

VOLUME 22/23

1962/63

**REVISTA**  
do  
**INSTITUTO**  
**ADOLFO LUTZ**

SECRETARIA DA SAÚDE PÚBLICA  
e  
DA ASSISTÊNCIA SOCIAL  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
S. PAULO - BRASIL

REVISTA  
DO  
INSTITUTO  
ADOLFO LUTZ

---

REDATOR RESPONSÁVEL

ARIOSTO BÜLLER SOUTO  
*Diretor do Instituto Adolfo Lutz*

SECRETÁRIA

DEBORA D. E. REBOCHO

COMISSÃO DE REDAÇÃO

ADALBERTO PETRONI  
ANTÔNIO JAMES BRANDI  
JOSÉ LOPES NETTO  
SILVIO JORDÃO  
WALKYRIA BERTHA H. LARA

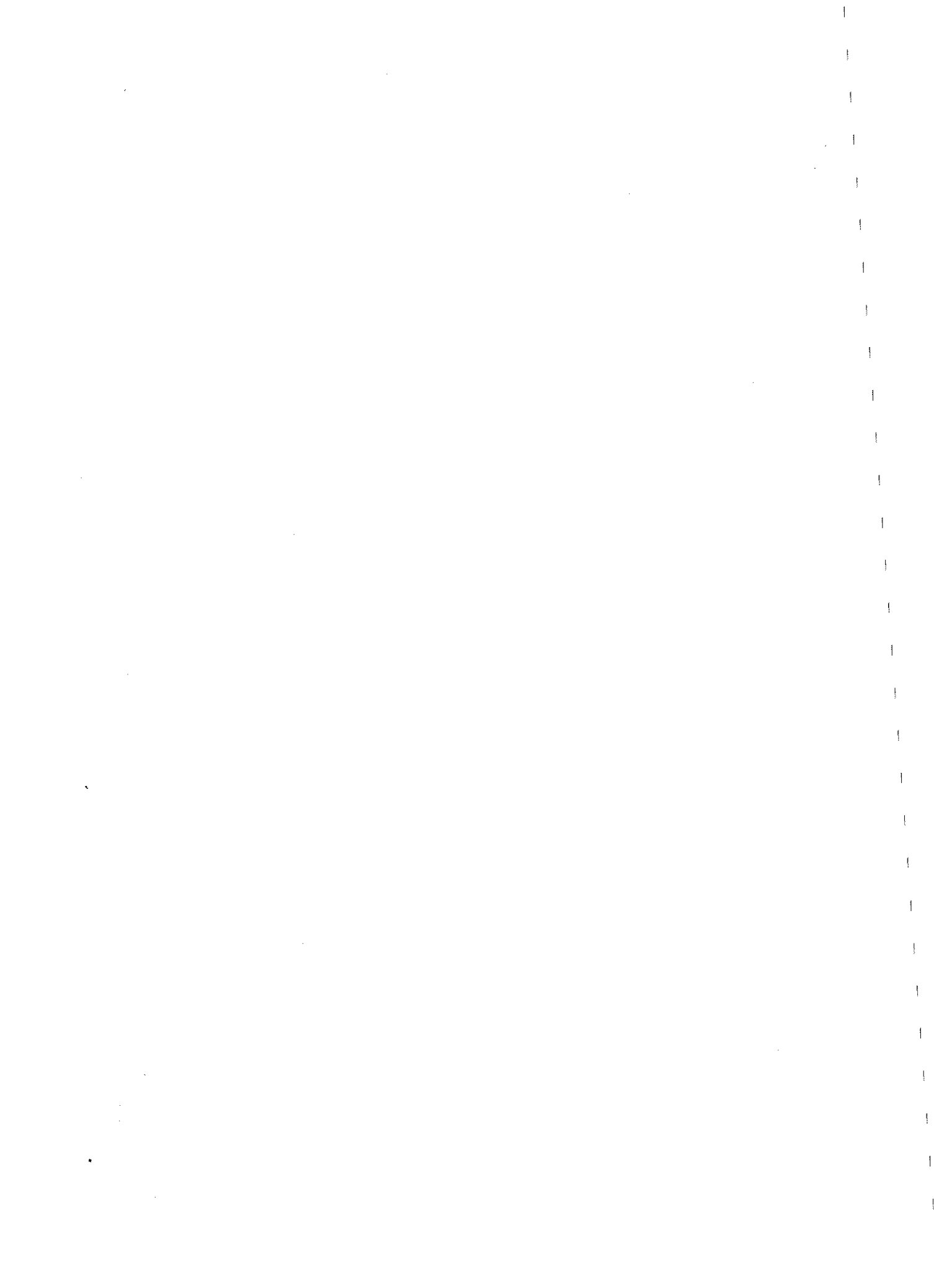
---

REDAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CAIXA POSTAL, 7027  
SÃO PAULO, S. P. - BRASIL  
-----  
ENDEREÇO TELEGRÁFICO: IALUTZ

REVISTA ANUAL

TIRAGEM: 1000 EXEMPLARES

REV. INST. ADOLFO LUTZ



# REVISTA

DO

# INSTITUTO

# ADOLFO LUTZ

---

Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23, 1962-63

---

## C O N T E Ú D O

### ARTIGOS ORIGINAIS

Pág.

- Esclerose tuberosa ou moléstia de Bourneville  
*Tuberous sclerosis (Bourneville's disease)*  
RUY PIAZZA & URSULINA PENTEADO BUENO ..... 7
- Staphylococcus pyogenes* em amígdalas extraídas  
*Staphylococcus pyogenes in excised tonsils*  
LUIZ DE GOES MASCARENHAS, CARLOS CACHONI, ARYOVALDO  
COSTA & OCTAVIO BARACCHINI ..... 57
- Nova técnica para a determinação colorimétrica de  $\alpha$ -tocoferol  
*A new technique for colorimetric determination of  $\alpha$ -tocoferol*  
WALDOMIRO PREGNOLATTO & IONE I. GOMES ..... 61
- Nova técnica para extração e determinação do  $\beta$ -caroteno em material verde  
*A new technique for the extraction and determination of  $\beta$ -carotene in green stuff*  
WALDOMIRO PREGNOLATTO & FRANCISCO PEDUTI ..... 65
- Teores de flúor em águas da cidade de Bauru, S.P., Brasil  
*Fluorine content in waters supply of Bauru, S.P., Brasil*  
AGARB CEZAR DE CARVALHO ..... 69
- Verificação da deterioração da sardinha (*Sardinella aurita*) por microdifusão  
(Método de Conway)  
*Conway's microdiffusion method applied to the evaluation of sardine's (Sardinella aurita) spoilage*  
CLAYDES QUADROS ZAMBONI ..... 73
- Óleo de Café. Determinação espectrofotométrica dos ácidos graxos insaturados  
*Coffee oil. Spectrofotometric determination of unsaturated fatty acids*  
MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA & CLEMENTINA AMATO ..... 77
- Avaliação dos resultados de uma campanha de vacinação contra a poliomielite em  
São Paulo, Brasil. II. Estado imunitário da população antes da vacinação  
*Evaluation of a vaccination program against poliomyelitis in São Paulo, Brasil. II. Immunity of the population before the vaccination*  
ROBERTO DE ALMEIDA MOURA, LUCY GUGLIELMI CAMPOS, CLELIA  
H. OLIVEIRA MARTINEZ, EOLO DE ARRUDA MILANO & JOSÉ  
DE TOLEDO PIZA ..... 81

	Pág.
Coloração de Maximow aplicada aos corpúsculos de Negri <i>The Maximow's stain for Negri bodies</i>	
ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI, MARGARIDA FRANZOSI & NILZA BAPTISTA .....	87
Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor para <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>A liquid and heated medium for Trypanosoma cruzi</i>	
OCTAVIO BARACCHINI .....	91
Diferenciação entre os vírus da varíola e da vacínia por meio de culturas de tecidos <i>Differentiation between small-pox and vaccinia viruses in tissue cultures</i>	
ADELA ROTH, IRENA MALACHOWSKA & LUÍS FLORENCIO SALLES GOMES .....	93

#### REGISTRO DE ENSAIO

Esquistossomose experimental no carneiro <i>Experimental Schistosomosis in sheep</i>	
LUIZ DOS SANTOS, SEBASTIÃO DE CAMARGO CALAZANS & CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO .....	97

## A O S C O L A B O R A D O R E S

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos especialmente relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Todos os artigos destinados à Revista deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com espaço duplo em folhas de papel formato officio, numeradas no ângulo superior direito, com margens de 3 cm de ambos os lados. As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas), legendas e rodapés deverão ser apresentados a parte, devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde deverão ser inseridos.

No preparo do texto, os autores deverão, sempre que possível, obedecer à seguinte ordem:

- Título em português
- Título em inglês
- Nome do autor ou autores (dados pessoais em rodapé)
- Resumo em inglês
- Introdução
- Material e métodos
- Resultados
- Discussão
- Conclusões
- Resumo em português
- Agradecimentos
- Referências bibliográficas

**TÍTULO** — Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

**RESUMOS** — Não deverão exceder 200 palavras. Deverão ser concisos e claros, ponde em relevo de forma precisa os fatos essenciais necessários à conclusão.

**ABREVIATURAS** — Serão evitadas, ou usadas apenas as que obedecem às normas nacionais ou, na falta destas, às internacionais. Os pesos e medidas (inclusive suas abreviaturas) deverão ser expressos no Sistema Métrico Decimal.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** — Deverão ser apresentadas somente as de trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Havendo um único autor, será indicado o último sobrenome, seguido das iniciais do(s) prenome(s). Sendo dois ou três os autores, será citado sempre o último sobrenome dos autores, seguido das iniciais do(s) prenome(s). Para quatro ou mais autores, será citado unicamente o sobrenome do primeiro autor, iniciais do prenome e a expressão et alii.

**No texto** — serão numeradas, em ordem crescente, com número alto ao lado do nome do autor.

**Na lista de referências** — serão ordenadas numericamente, de acordo com seu aparecimento no texto, como segue:

Para artigos

Sobrenome do autor (ou autores) seguido das iniciais, título do trabalho, título do periódico por extenso, volume, número, página inicial e final e ano de publicação.

Para livros

Sobrenome do autor (ou autores ou editor responsável) seguido das iniciais, título, edição, tradução (se for o caso), local de publicação, editor comercial, ano de publicação, número do volume, página(s) citada(s).

**ILUSTRAÇÕES** — *Deverão ser citadas no texto como "Fig.", numeradas e vir acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal e confeccionados de modo a poderem ser reduzidos na clichéria a 1/2 ou 1/3 do tamanho original, sem perda de nitidez ou legibilidade. As fotografias serão apresentadas em envelope a parte; deverão ser nítidas e de bom contraste, e trazer no verso o nome do autor, título do artigo e número com que irão figurar no texto.*

**QUADROS E TABELAS** — *Não deverão exceder as dimensões do texto da Revista. Os respectivos títulos deverão indicar claramente o conteúdo e, se possível, seguir as normas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:*

- quando o fenômeno não existe
- 0; 0,0; 0,00 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, a unidade adotada no quadro
- ... quando o dado é desconhecido, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno for mensurável, deverá ser expresso de maneira a somente figurarem os algarismos significativos.

### DA PUBLICAÇÃO

1. *A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação.*
2. *Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.*
3. *Os originais de trabalhos aceites para publicação não serão devolvidos aos autores.*
4. *Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com a secretária da Revista.*
5. *No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.*
6. *Solicita-se aos autores indicarem o endereço para correspondência.*
7. *É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor responsável e da Comissão de Redação da Revista. E permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação bibliográfica.*

## ESCLEROSE TUBEROSA OU MOLÉSTIA DE BOURNEVILLE (a)

### TUBEROUS SCLEROSIS (BOURNEVILLE'S DISEASE)

RUY PIAZZA (b)

URSULINA PENTEADO BUENO (c)

#### SUMMARY

The authors studied five cases of tuberous sclerosis, three of which were subject of complete anatomicopathological macro and microscopic examination. The cutaneous lesions suggested that the process was essentially a metabolic disorder due to vascular malformations of the tissue from the affected organs. This assumption was reinforced by microscopic examination of encephalic lesions that showed that the "monstrous cells" are degenerated elements of the three cellular lines generating the nervous system and that the vessels of this tissue are malformed, similarly to what happens in the skin. Finally the study of renal tumors of the disease revealed beyond doubt its malformed vascular origin.

With basis in this findings the authors built a new pathogenic conception, explaining the disease and embodying all its manifestations.

#### I — GENERALIDADES

A Esclerose Tuberosa é uma doença do sistema nervoso central, heredo-familiar, que se caracteriza por uma tríade sintomatológica — debilidade mental, epilepsia e adenomas sebáceos simétricos da face — acompanhada, em geral, de alterações de desenvolvimento corpóreas, externas e internas.

Recebeu esta doença várias denominações, prevalecendo, porém, a de Esclerose Tuberosa ou Moléstia de Bourneville.

Essa doença logrou logo individualização nosológica desde as comunicações de BOURNEVILLE<sup>26</sup> e seu discípulo BRISSAUD<sup>27</sup>, os quais em 1880-1881

fizeram a descrição anátomo-clínica dos principais sintomas encontrados em sete pacientes.

Êsses autores referiram-se aos achados de necrópsia, isto é, às lesões nodulares de esclerose encontradas no encéfalo e às manifestações delas decorrentes, a debilidade mental e a epilepsia.

Aos poucos, novos sintomas foram sendo conhecidos e alguns, tidos como patognomônicos, passaram a integrar seu quadro clínico.

BALZER & MENETRIER<sup>15</sup>, em 1885, descreveram lesões cutâneas, os adenomas sebáceos, que receberam o nome destes autores.

(a) Parte deste trabalho, sob o título de "Contribuição ao estudo da esclerose tuberosa" foi laureado em 1960 com o prêmio "Fausto Guerner", do Centro de Estudos Franco da Rocha. Aprofundado o estudo histopatológico e enriquecida a teoria patogênica de novos argumentos, o trabalho, ainda inédito, foi apresentado à Academia Nacional de Medicina onde lhe foi outorgado o prêmio "Alvarenga" de 1963.

(b) Chefe do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Juqueri, em regime de tempo integral.

Livre-Docente de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Sorocaba.

Livre-Docente de Patologia Geral e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ex-Professor Contratado de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina de Sorocaba.

(c) Diretora do Serviço de Psicopatologia Infantil do Hospital Juqueri.



Em 1890, PRINGLE<sup>66</sup> fez referência a outra variedade de adenomas sebáceos faciais. Deve-se, porém, a VOGT<sup>76</sup>, em 1908, segundo CRITCHEY & EARL<sup>32</sup>, a introdução dessas lesões no quadro sintomatológico da doença.

Em 1921, van der HOEVE<sup>73</sup>, ao encontrar tumores retinianos em cinco pacientes de Esclerose Tuberosa, admitiu serem estes sintomas de grande valor diagnóstico e denominou esse quadro “facomatose retiniana de Bourneville”, em homenagem ao descobridor da enfermidade.

PELLIZZI<sup>58</sup>, a quem se devem em 1901 os primeiros estudos histo-patológicos das lesões dos centros nervosos nos portadores desta moléstia, destacou as heterotopias das substâncias branca e cinzenta das circunvoluções, chamando-as de “histioatipia cortical disseminada”.

Citam-se ainda outros nomes como o de Neuro-displasia Ectodérmica (van BOGAERT<sup>72</sup>) e de Neurospongioblastose Difusa (FERRARO<sup>39</sup>).

SHERLOCK<sup>68</sup>, em 1911, propôs o termo “epilóia” para designar a tríade clássica — adenomas sebáceos, oligofrenia e epilepsia.

Depois que BIELSCHOWSKY<sup>17 e 18</sup>, seguido por AYALA & SABATUCCI<sup>13</sup>, correlacionou a Esclerose Tuberosa à Moléstia de von Recklinghausen, outras denominações foram propostas, como *Neurofibromatosis Universalis*, quando ambas coexistem. Quando van der HOEVE<sup>73</sup> assinalou a presença de tumores retinianos (facomas) em ambos os processos, propôs o nome de *Phakomatosis Bourneville* para a primeira e de *Phakomatosis von Recklinghausen* para a segunda, reunindo ambas sob a designação de *Phakomatosis*.

### *Estudo Clínico Geral*

A Esclerose Tuberosa é uma entidade mórbida complexa e polissintomática, podendo manifestar-se por lesões cutâneas, viscerais, ósseas, oculares e neuropsíquicas.

O início do aparecimento dos sintomas cutâneos é variável: mais comumente

se manifestam depois dos cinco anos; todavia, já foram constatados em recém-nascidos, conforme comunicação de GARCIN *et alii*<sup>30</sup>, em que pai e filha apresentavam, desde o nascimento, adenomas sebáceos da face e outras lesões da pele.

A oligofrenia verificada nestes doentes pode variar do grau da debilidade mental ao da idiotia.

A epilepsia geralmente se manifesta a partir dos dois anos, mas pode aparecer em recém-nascidos e, excepcionalmente, só depois dos trinta e cinco anos; apresenta-se sob formas diversas, desde equivalentes até crises típicas e completas. Estes sintomas, debilidade mental e epilepsia, quando associados aos adenomas sebáceos, constituem a chamada forma clássica ou típica, de fácil diagnóstico, quando as lesões são flóridas e bem exteriorizadas.

Entretanto, as formas mais freqüentes são as frustras ou incompletas, muitas vezes de difícil diagnóstico. Às vezes podem aparecer um ou dois sintomas considerados secundários, ou casos de epilepsia e oligofrenia sem adenomas sebáceos ou produções similares, sendo nestes doentes diagnosticada a natureza da moléstia somente *post-mortem*, quando autopsiados.

### *Síndromas neurológicas e psiquiátricas*

A oligofrenia, mais ou menos acentuada, está presente na maioria dos casos de Enfermidade de Bourneville; manifesta-se na infância e agrava-se com o evoluir dos anos, podendo chegar à demência, mormente quando associada à epilepsia.

A epilepsia pode apresentar-se sob diversas formas: equivalentes, tipo Bravais, grande mal ou ainda sob a forma de epilepsia psíquica, com episódios confusionais. As crises convulsivas podem desaparecer súbitamente e ocorrerem remissões prolongadas de vários anos.

Muitos autores fazem referência à falta de personalidade e do caráter epiléptico, nestes doentes.

CRITCHLEY & EARL<sup>32</sup>, em 1932, descreveram casos de psicoses de tipo

primitivo, semelhantes ao da esquizofrenia catatônica. A catatonia pode apresentar-se desde o grau leve ao da verdadeira rigidez com flexibilidade cérea.

Os autores chamam ainda a atenção para a tendência negativista apresentada por muitos doentes.

A excitabilidade extrema (MICHAX 56), com períodos de exacerbação e agitação, é observada com frequência.

Modificações da afetividade, formas depressivas ou maníacas têm sido relatadas.

Dos vinte e nove casos estudados por CRITCHLEY & EARL 82, apenas um era mentalmente são. Êstes autores acham que muitos casos da forma frustrada, cujos portadores são tidos como mentalmente são, se fôssem submetidos a acuradas pesquisas psicológicas, revelariam déficit mental.

As manifestações neurológicas estão ausentes em numerosos casos, porém podem ser encontradas sob a forma de hipotonia, hipertonia, paralisia flácida ou espástica de um membro ou de vários. As paralisias e hipertônias são notadas, geralmente, no estado avançado ou final da moléstia.

#### *Alterações de desenvolvimento*

As mal-formações dos centros nervosos são freqüentemente encontradas. Podem ocorrer agenesias de um hemisfério, de um lobo, do corpo caloso, do pedúnculo cerebral, de uma ou mais circunvoluções, apresentarem-se estas irregularmente soldadas, hidrocefalia congênita etc. No aparelho digestivo, fusão dos lóbulos hepáticos, baços supra-numerários e megacécum. Na esfera genital, ovários císticos e agenesias. No esqueleto, macro ou microcefalia, assimetria craniana e facial, apófise *crista galli* muito desenvolvida, palato em ogiva, espinha bífida, hiperostose e pneumatização óssea. Estas duas últimas alterações são encontradas com relativa frequência em membros, mãos, pés e na caixa craniana, podendo verificar-se, num mesmo caso, zonas de espessamento e de rarefação, alternadas com zonas de tecido normal.

Na calota óssea, estas lesões aparecem às vezes nas radiografias com o aspecto de flocos de algodão, devido à presença de ilhotas de rarefação e outras de condensação, sendo consideradas como um dos sintomas característicos da moléstia.

ROSS & DICKERSON 65, em vinte e cinco casos, encontraram apenas cinco com radiografias normais; os demais apresentavam espessamento e os sinais de flocos de algodão já anteriormente descritos por PINCHERLE 59 e YAKOVLEV & CORWIN 78.

#### *Lesões cutâneas*

Os sintomas cutâneos aparecem em 70% dos casos. Dêstes, dois são tidos como patognomônicos da moléstia, os adenomas sebáceos da face e os tumores ungueais de Koenen (van BOGAERT 72).

Conhecem-se três variedades de adenomas: tipo Balzer, de cor branca, apresentando hiperplasia atípica dos folículos pilo-sebáceos; tipo Pringle, semelhante à anterior, porém apresentando ainda numerosas teleangiectasias capilares, de coloração variando do rosa ao vermelho ou castanho avermelhado; tipo Hallopeau-Lèredde 43, formações de consistência dura, com predomínio de proliferação fibrosa. Os adenomas sebáceos localizam-se simetricamente na face, nos sulcos naso-genianos, mentonianos e sobre o nariz, disposição esta que lembra a forma de uma borboleta. Às vezes estas lesões se estendem por toda a face e pescoço. CAROL 30 e TOURAINÉ 70 fazem referência a achados semelhantes na mucosa palatina e na língua. Macroscopicamente, apresentam-se como pequenos nódulos de consistência dura, variando seu tamanho de uma cabeça de alfinete a um grão de ervilha. São considerados elementos neoplásicos.

Os tumores fibrosos peri-ungueais de Koenen aparecem em geral na segunda década da existência. São pequenos nódulos arredondados, duros, que se fixam entre a matriz e as pregas ungueais. Podem aparecer isolados ou em grupos de dois a três; segundo TOURAINÉ 70 e 71, são ângio-fibromas.

Além destes elementos descritos, outras formações cutâneas são notadas, que, quando associadas a outros sintomas, podem facilitar o diagnóstico: a chamada "peau de chagrin" é tida em destaque e apresenta-se sob o aspecto de placas constituídas de múltiplos fibromas achatados, rugosos e ásperos ao tacto, localizando-se com frequência na região lombar; nevos pigmentados, lisos ou pilosos; **mol-luscum pendulum**; hemangiomas; fibromas; manchas acrômicas ou hiperpigmentadas; verrugas etc.

### *Tumores viscerais*

Nos rins, com frequência, são encontrados pequenos tumores congênitos, disseminados bilateralmente, conhecidos por fibro-mio-lipomas.

Fischer, citado por KOH <sup>47</sup>, julga ser sua frequência de 60 a 80%. Também podem aparecer hipernefomas e quistos urinários. Estes, quando muito numerosos e de pequeno tamanho, dão origem aos rins polimicrocísticos.

No aparelho circulatório, além dos angiomas cutâneos, podem ser encontradas no miocárdio, com frequência, pequenas formações tumorais congênitas — rabiomiomas — instaladas na parede ventricular, fazendo saliência na cavidade. Podem apresentar-se uma ou várias. Em geral, ocasionam insuficiência cardíaca e falecimento precoce dos seus portadores. Às vezes aparece o rabiomiossarcoma.

Nos pulmões, têm sido relatados quistos fibrosos que nas radiografias aparecem com o aspecto de pulmão alveolar (SAMUELSEN <sup>66</sup>, ZACHRISSON & BERG <sup>70</sup> e VEJLENS & BERG <sup>75</sup>) e podem às vezes assemelhar-se aos achados radiológicos da tuberculose pulmonar.

Têm sido descritos, ainda, tumores no fígado, baço, tireóide, útero e pólipos intestinais.

### *Lesões oculares*

Os tumores retinianos encontrados nos doentes de Esclerose Tuberosa, por VAN DER HOEVE <sup>78</sup> e <sup>74</sup>, passaram a ter

lugar destacado na sintomatologia. Podem apresentar-se como único sintoma da moléstia (van der HOEVE).

São pequenos tumores achatados, de cor branca ou amarelada, às vezes levemente salientes ou pedunculados. Nestes tumores encontram-se algumas vezes depósitos calcáreos. Quistos também podem aparecer com certa frequência.

Aos achados tumorais, van der Hoeve deu o nome de facomas e, posteriormente, verificando encontrarem-se lesões semelhantes na neurofibromatose de von Recklinghausen e na angiomatose de Hippel-Lindau, reuniu as três moléstias no mesmo grupo, por possuírem também identidade quanto ao caráter heredo-familiar e à origem mal-formativa, denominando-o **phakomatosis**.

Além destas lesões, podem ocorrer deslocamento da retina, degeneração edematosa e **perimaculitis**.

### *Anatomia patológica*

O exame macroscópico do encéfalo revela alterações, das quais destacaremos apenas as típicas, que fazem parte integrante do quadro de Esclerose Tuberosa.

No córtex, apresentam-se nodosidades de cor branco-acinzentada, de formato arredondado ou oval, do tamanho aproximado ao de uma avelã, de consistência firme, comparada por alguns à da borracha. Estas formações estão disseminadas no córtex em número variável, raras ou numerosas, já tendo sido encontradas em um encéfalo 40 nodosidades (caso de Globus <sup>41</sup>). Além destas lesões, podem ser observadas áreas espessas, esclerosadas, sem limites precisos e integradas nas circunvoluções. As leptomeninges nestas regiões mostram-se comumente algo espessadas.

Nos ventrículos, são encontrados com frequência pequenos nódulos, às vezes mais endurecidos que os do córtex, de cor esbranquiçada, localizados em suas paredes e fazendo saliência na cavidade. Nestes nódulos, existem comumente depósitos calcáreos na luz dos vasos, constituindo as chamadas calcosferitas. Por vezes, os nódulos, que se podem apresen-

tar isolados ou em grupos, bloqueiam a saída do líquido céfalo-raquidiano, ocasionando hipertensão liquórica. Mais raramente, estas formações se apresentam no cerebelo e na medula. Os nódulos ventriculares podem ser constatados pela ventriculografia, cujas imagens dão a impressão de uma série de “gôtas de cêra”, expressão esta pela qual são conhecidos em Radiologia.

### *Histologia patológica*

A PELLIZZI<sup>58</sup> devemos os primeiros estudos histopatológicos das lesões dos centros nervosos encontradas na Moléstia de Bourneville. Aos cortes, as nodosidades corticais revelam alterações particulares da arquitetura nervosa, as heterotopias. As camadas da substância branca e cinzenta estão irregularmente dispostas e mal delimitadas. Ilhotas de substância cinzenta são encontradas na substância branca, tornando-se difícil precisar os limites das mesmas. As heterotopias podem existir em outras áreas afetadas de esclerose, sem a presença das formações nodulares. Constituem a chamada “histioatipia cortical disseminada” e podem ser visíveis macroscopicamente. Caracterizam-se pela disseminação de células ganglionares isoladas ou em grupos, no meio da substância branca, podendo estas células sofrer processo de neuroniofagia.

A proliferação glial, segundo BIELSCHOWSKY<sup>19 e 21</sup>, é a lesão principal encontrada nos nódulos corticais. Muitas células gliais podem apresentar formas atípicas e multinucleadas (células multinucleadas de Bowndyk-Bastiaanse).

As células gigantes ou monstruosas são freqüentes nestas lesões e, segundo HARTDEGEN<sup>44</sup>, são sinal característico da enfermidade. Encontram-se isoladas ou agrupadas. Para AUSTREGÉSILO FILHO<sup>2</sup>, o que caracteriza a Esclerose Tuberosa são os distúrbios arquitetônicos, as células gigantes atípicas e os turbilhões gliais (turbilhões de Philippe).

### *Etiologia e Patogenia*

A gênese desta enfermidade ainda permanece obscura e objeto de estudos e

discussões. Entretanto, se não foi encontrado o agente provocador, já se conhecem o comportamento e os efeitos da moléstia, como seu início na vida embrionária e seu caráter hereditário e, portanto, familiar.

Quanto à patogenia, BOURNEVILLE & BRISSAUD<sup>26 e 27</sup>, quando da descrição original da doença, consideraram-na proliferação inflamatória da neuroglia.

PELLIZZI,<sup>58</sup> em 1901, ressaltando a presença de numerosas células de caráter embrionário, a presença de células nervosas em plena substância branca e a alteração encontrada na seriação das camadas celulares corticais, atribuiu caráter disgenético à Esclerose Tuberosa, propondo a denominação de “histioatipia cortical disseminada”.

BIELSCHOWSKY<sup>17 e 23</sup> a princípio se opôs à teoria de Pellizzi e considerou a doença de caráter neoplásico, classificando-a como “spongeoblastose”; depois considerou-a de caráter misto, isto é, um processo displásico de tendência blastomatoso.

Numerosos autores que estudaram o assunto apresentaram opiniões variadas: uns acompanham a teoria disgenética; outros, a neoplásica; outros, a mista de Bielschowsky; outros consideram o processo como *sui generis*, ocupando posição intermediária entre as alterações de desenvolvimento e as neoplasias; outros, finalmente, acham que o processo não permite definição patogênica.

Tôdas essas teorias apoiam-se em argumentos de ordem clínica, anatômica e, sobretudo, histopatológica.

A favor da teoria mal-formativa de Pellizzi, defendida principalmente por ALZHEIMER<sup>12</sup>, VOGT<sup>76</sup>, GEITLIN<sup>40</sup>, YAKOVLEV & GUTHRIE<sup>77</sup>, falam as alterações da cito-arquitetura encefálica e as alterações de desenvolvimento corpóreo encontradas em alguns portadores da moléstia, como hipoplasia vascular, transposição dos grandes vasos da base do coração, polipose intestinal, spina bífida etc.

A teoria neoforativa, adotada por HARTDEGEN<sup>44</sup>, TELATIN<sup>69</sup>, GLOBUS, STRAUSS & SELINSKY<sup>41</sup>, entre

outros, encontra apóio na coexistência de blastomas no próprio encéfalo e em vários outros órgãos, sobretudo pele, coração e rins.

A teoria mista de Bielschowsky, defendida por BOLSI<sup>24</sup>, van BOGAERT<sup>72</sup> e outros, apoia-se, de um lado, na indiscutível existência de alterações da histogênese do córtex cerebral, acompanhada de mal-formações corpóreas, e, de outro, na piora progressiva do estado mental dos pacientes, acompanhada do agravamento dos sintomas decorrentes dos tumores cutâneos e viscerais, sobretudo do coração e dos rins.

A teoria que atribui à moléstia caráter *sui generis* defendida por MATTIROLO & ZORINI<sup>54</sup> e por BABONNEIX<sup>14</sup>, estriba-se no fato de as células gigantes características da mesma, encontradas no encéfalo, nunca apresentarem verdadeira transformação neoplásica e as lesões tuberosas nunca produzirem sintomas clínicos de compressão, tão característicos dos tumores; por outro lado, o processo não seria uma simples mal-formação, pois êses elementos gigantes não são encontrados em nenhum momento da histogênese nervosa.

Entre os que acham que o processo não permite definição quanto à patogenia, encontramos BRUSHFIELD & WYATT<sup>28</sup>.

Quanto à alteração de desenvolvimento, alguns autores consideram-na resultante de um distúrbio embrionário que afeta os três folhetos primitivos, a saber, ectoderma (encéfalo, pele e retina), endoderma (pulmões e intestino) e mesoderma (rins e coração). São desta opinião, entre outros, FERIZ<sup>35</sup> e BABONNEIX<sup>14</sup>.

Outros, entretanto, consideram-na ligada à disgenesia de um só folheto, a saber, o ectoderma (Displasia Neuroectodérmica de van BOGAERT<sup>72</sup>). Outros, ainda, consideram o distúrbio embriológico fundamental afetando dois folhetos, o ectodérmico e o mesodérmico (CASTELLINO<sup>31</sup> e CURTIUS<sup>33</sup>).

Os autores que a consideram um distúrbio embriogênico encaram a moléstia

como estacionária, desenvolvida tardiamente no período fetal (pois as lesões não comprometem os sulcos primários e secundários do encéfalo, que se completam aos 7-8 meses da vida intra-uterina), enquanto que os que a consideram um processo adquirido, evolutivo, encontram justamente um dos argumentos mais fortes para apoiar seu modo de entendê-la no caráter progressivo que ela, em geral, assume.

Divergem também as opiniões, tanto entre os que defendem a teoria blastomatosa como a mista, quanto à natureza do tumor que afeta o sistema nervoso: uns consideram-no de natureza glio-ganglionar (HARTDEGEN<sup>44</sup>, FERRARO & DOOLITTLE<sup>36</sup>), outros, essencialmente glial (BOLSI<sup>24</sup>).

### *Hereditariedade*

Numerosos autores têm feito referência ao caráter hereditário e, portanto, familiar da Esclerose Tuberosa, dos quais destacamos Berg, Bastiaanse e Koenen, citados por LEY<sup>49</sup>, KUFS<sup>48</sup>, van BOGAERT<sup>72</sup>, ROSS & DICKERSON<sup>65</sup>. Êstes últimos relatam o resultado de suas pesquisas em vinte e cinco doentes e em suas respectivas famílias, chegando à seguinte conclusão: um era filho de epiléptico e nenhum dêles era filho de pais que manifestavam a forma típica ou clássica da enfermidade. Entretanto, a maioria possuía familiares que apresentavam sintomas da forma frustra ou da forma típica.

CRITCHLEY & EARL<sup>32</sup>, fazendo pesquisas em 29 casos, verificaram que 13 dos pacientes tinham algum antecedente familiar de perturbações mentais e nove possuíam familiares com a sintomatologia clássica ou frustra. Julgam êses autores que existe evidente tara do tipo psicótico indeterminado entre os familiares dos portadores da Moléstia de Bourneville.

Quanto ao caráter da herança, divergem os autores, parecendo, porém, constituir maior número os que admitem ser a herança de caráter dominante, polimé-

rica<sup>(\*)</sup>, podendo, entretanto, aparecer em uma família, de forma isolada, com caráter de mutação.

Outros, entre os quais citaremos ILLING<sup>46</sup>, julgam ter a herança caráter recessivo, tendo papel preponderante a polimeria e a mutação.

Magnífico é o estudo de BORBERG<sup>25</sup> sobre a hereditariedade da Moléstia de Bourneville e suas correlações com a Moléstia de von Recklinghausen. Estudando 35 famílias em que havia casos da primeira e 79 famílias, da segunda, chegou às seguintes conclusões: a) herança indiscutível de Esclerose Tuberosa por mais de três gerações em 6 famílias e possível em outras 4 famílias; b) ausência de indícios de agravamento da doença de uma geração para as seguintes; c) falta de evidência de polimerismo; d) modo de transmissão sugestivo de dominância, com grande variação de manifestações; e) herança de tipo autossômico recessivo (heterossômico, isto é, ligada ao sexo, ao que parece, fora de cogitação); f) herança duvidosa em 4 famílias e sem sinais da mesma nas restantes 21; g) provável mutação nestas últimas, dando-se o mesmo com o grupo de herança duvidosa; h) correlações entre a Esclerose Tuberosa e a Moléstia de von Recklinghausen foram comprovadas — o que explica a semelhança de manifestações — mas há independência genética recíproca entre ambas; i) associação com outras facomatoses não foi comprovada.

Supunha-se até há pouco tempo que esta moléstia se apresentava somente na raça branca. Entretanto, recentes publicações revelam que a mesma pode aparecer em qualquer raça e em quaisquer latitude e longitude. A literatura nipônica descreve casos dessa enfermidade em pacientes da raça amarela, de que destacaremos a comunicação de KOH<sup>47</sup>, com referência a um casal de irmãos de 10 e 13 anos, que apresentava forma clássica da moléstia. SAMPAIO, LUISI & SILVA<sup>11</sup> referem o caso de uma menina

de 5 anos, de côr preta. CABIESES-MOLINA<sup>29</sup> relatou o caso de uma menina de 10 anos, índia peruana, que apresentava a sintomatologia clássica.

### *Evolução*

A evolução é lenta, progressiva e os sintomas vão fazendo sua aparição gradativamente. Quanto mais cedo aparecem os sintomas, mais grave o prognóstico. Há casos estacionários, pelo menos durante os períodos em que foram observados.

Os pacientes, de modo geral, não têm vida longa e muitos falecem na infância; no máximo, atingem a terceira década da existência. A decadência física e psíquica processa-se com o correr do tempo e muitos morrem em estado de caquexia; outros, em estado epiléptico, de complicações pulmonares, dos tumores viscerais etc.

### *Terapêutica*

A terapêutica visa apenas a mitigar os sintomas.

O tratamento das manifestações epilépticas é idêntico ao da epilepsia verdadeira, e conhecido.

FRIEDMAN<sup>37</sup>, em 1939, publicou um trabalho no qual faz referência a um paciente que teve cessação das crises epilépticas logo após a aplicação de radioterapia. Entretanto, somente depois do conhecimento de muitos casos, poderemos admitir a eficácia dessa terapêutica.

Nos doentes com complicações tumorais é indicado o tratamento cirúrgico.

As manifestações cutâneas, como papiomas, angiomas, nevos, verrugas etc. podem ser tratadas pelo termocautério ou cirurgia elétrica.

A educação e a instrução devem ser tentadas quando o psiquismo o permitir, sendo indicado o ensino individual ou em escolas especializadas.

(\*) Polimeria é, em Genética, o fenômeno pelo qual o mesmo locus cromossômico é ocupado por mais de um gen. Significa que, para determinar um caráter, dois ou mais gens são necessários.

## II — CASUÍSTICA

### CASO I

#### *Resumo da observação*

*Identificação:* M. M., 11 anos, côr parda, sexo masculino, brasileiro, internado em 3-8-56. Data do falecimento: 3-5-58.

*Antecedentes hereditários:* não há referências a moléstias de natureza neurológica ou psiquiátrica na família; apenas o genitor padece de eczema crônico.

*Antecedentes pessoais:* crises convulsivas desde os 12 meses de idade, com perda de consciência. Desenvolvimento motor normal. Desenvolvimento psíquico incompleto, tendo iniciado a fala aos 12 meses, porém sem lograr pleno domínio da linguagem.

*Exame psíquico:* agitação psico-motora. Desorientação alo e auto-psíquica. As funções intelectuais superiores apresentam-se profundamente comprometidas, deficitárias, não logrando mais a expressão pela palavra. Atitudes e comportamento pertinentes à idiotia. Humor colérico. Agressivo. Rebelde a todo o contacto com as pessoas, reage agressivamente quando estas tentam uma aproximação. Crises convulsivas típicas, violentas e freqüentes.

*Exame somático:* orelhas acabanadas. Seborréia facial abundante, apresentando a face aspecto untuoso e luzidio.

#### *Exames complementares*

*Neuro-ocular:* reflexo foto-motor diminuído em ambas as pupilas. Fundo de olho: pupilas ligeiramente pálidas. *Eletroencefalografia:* suspeita de foco temporal esquerdo. *Eletrocardiograma:* taquicardia sinusal. Não há alteração que indique comprometimento do miocárdio. *Hematológico:* anemia normocrômica. Leucocitose e monocitose. *Sangue:* reações sorológicas para lues, negativas. *Líquor:* normal. *Urina:* nada digno de registro. *Fezes:* ovos de ancilostomídeos, *Tricocephalus trichiurus* e *Trichomonas intestinalis*. *Glicose:* dosagem no sangue - 1,25g. *Radiológicos:* craniograma normal. Extremidades ósseas normais.

Idade óssea entre 9 e 11 anos. Campos pulmonares: transparência normal do parênquima pulmonar.

#### *Evolução*

*Março de 1957* — Surgiram na face algumas tumorações agrupadas mas individualizadas, do tamanho de cabeça de alfinete, de côr ligeiramente mais clara do que a pele circundante — adenomas sebáceos.

*Setembro de 1958* — Os adenomas sebáceos adquiriram tonalidades rosadas. No tronco e na cintura pélvica surgiram algumas manchas brancas, despigmentadas. Os adenomas faciais aumentaram em número.

*Maior de 1959* — Sujeito a freqüentes desordens intestinais e, ainda pela evolução desta grave moléstia abiotrófica, foi o paciente emagrecendo e entrou em estado de caquexia. O óbito ocorreu no decurso de uma crise convulsiva.

#### COMENTÁRIOS DO PONTO DE VISTA CLÍNICO

Trata-se de um caso típico de Moléstia de Bourneville, com a tríade clássica — oligofrenia, crises convulsivas e adenomas sebáceos simétricos da face. Chamam a atenção no caso: 1) a extrema agressividade que o paciente sempre manifestou; 2) o agravamento da deficiência mental no decorrer da doença; 3) o crescimento em número e a acentuação da côr dos tumores faciais o que, aliado ao exposto na alínea anterior, traduz o caráter progressivo do mal; 4) o tipo Pringle dos adenomas da face; 5) o paciente ser pardo, portanto, descendente da raça negra.

#### *Resumo da autópsia*

*Diagnósticos:* anemia dos tegumentos e dos órgãos internos. Adenomas sebáceos simétricos da face. Facoma retiniano. Rins micropolicísticos, com fibromas corticais. Atrofia da mucosa lingual. Ancilostomose e tricocefalose intestinais. Hipoplasia da tireóide. Caquexia.

*Encéfalo:* pesa 1.300 g. Apresenta externamente: leptomeninge espessada; pólo occipital direito bífido; lobo temporal direito constituído na face lateral quase exclusivamente por duas circunvolu-

ções, pois a 3.<sup>a</sup> está apenas acenada e pertence mais pròpriamente à base; restos da fossa silviana de ambos os lados; do lado esquerdo há uma fossa situada entre a 1.<sup>a</sup> e a 2.<sup>a</sup> circunvoluções parie-

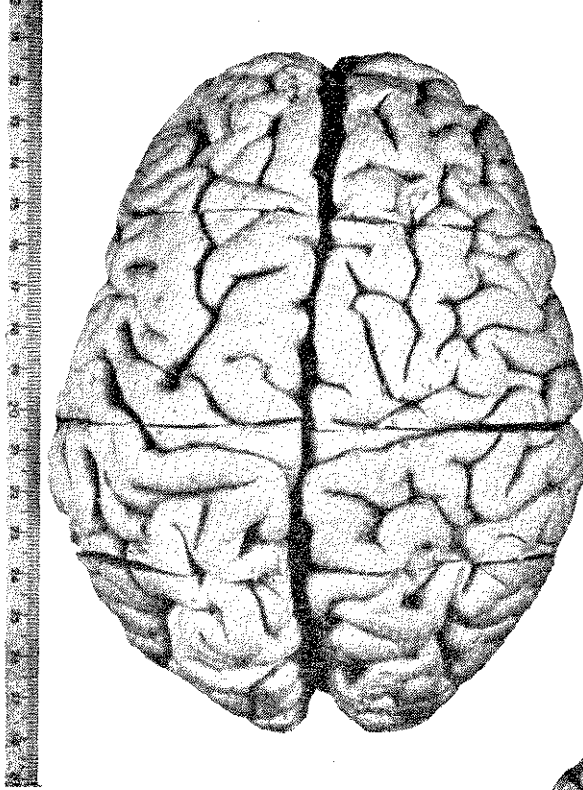
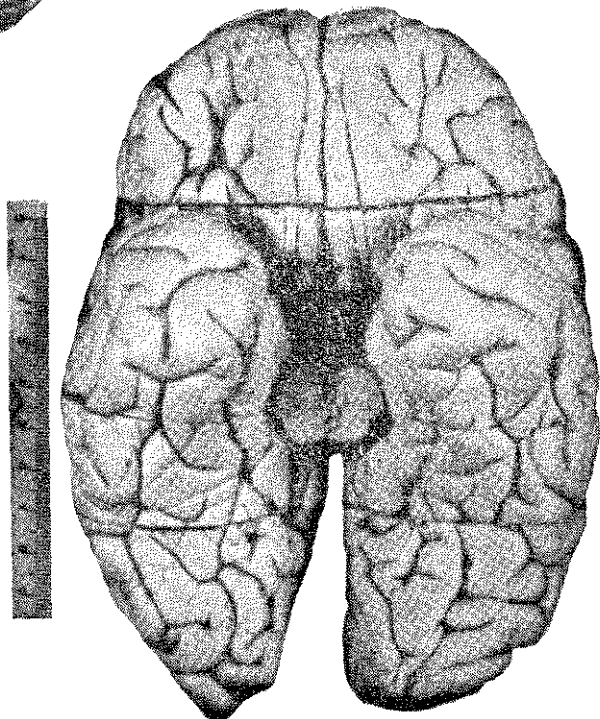


Fig. 1 — CASO I — Vista superior do encéfalo.

Fig. 2 — CASO I — Vista inferior do encéfalo.





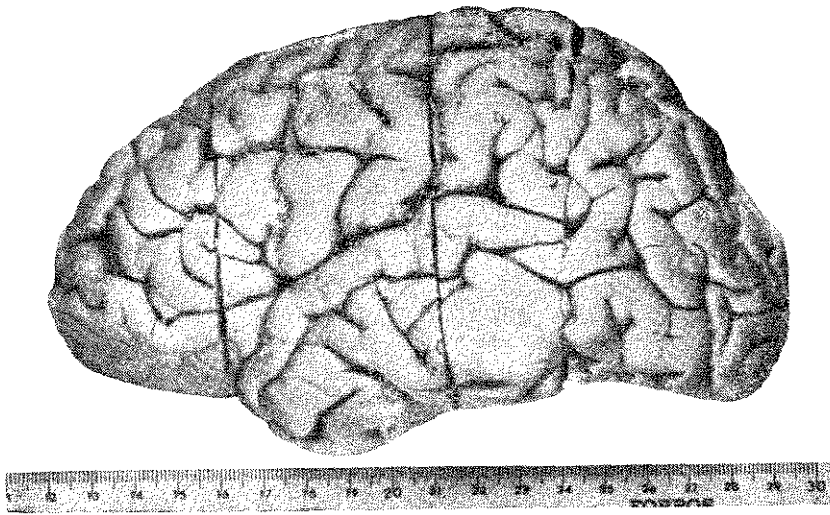


Fig. 3 — CASO I — Vista lateral esquerda do cérebro.

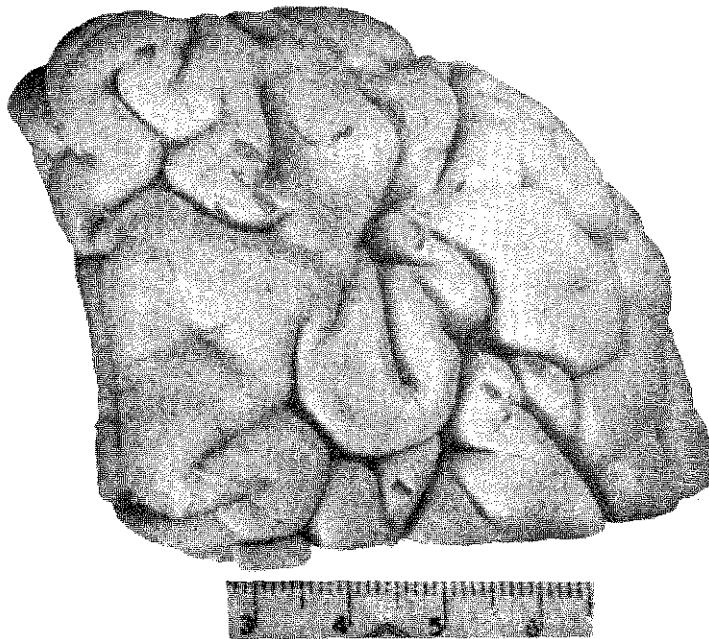


Fig. 4 — CASO I — Detalhe de uma tuberosidade cortical.

tais, no t $\text{e}$ rço posterior delas, para a qual convergem pregas dessas duas circunvoluções; as circunvoluções apresentam áreas endurecidas e de c $\text{o}$ r esbranquiçada muito evidente; tal processo, por v $\text{e}$ zes, acompanha a circunvolução por um longo trecho, caso em que a arquitetura da circunvolução é mais ou menos conservada, apresentando-se apenas de aspecto mais

grossoiro, sem dobras de enriquecimento e de c $\text{o}$ r mais clara; outras v $\text{e}$ zes, o processo é limitado a um trecho da circunvolução, caso em que forma uma esp $\text{e}$ cie de ilha bem individualizada e de centro quase sempre umbilicado; em ambos os casos, a superf $\text{i}$ cie lembra o aspecto de couro cru; essas lesões, de um tipo ou de outro, s $\text{a}$ o encontradas em todos

os lobos cerebrais e em grande número; sendo à palpação de consistência muito aumentada, transmitem ao órgão peculiar dureza; o processo é tão intenso que podemos dizer ser raro encontrarem-se trechos normais de circunvoluções. Aos cortes, os ventrículos são de capacidade normal; nos cortes que incidem sobre as lesões descritas, não se distingue mais o limite entre substância branca e cinzenta, pois há como que uma mistura de ambas, formando u'a mancha esbranquiçada de limites imprecisos; abertos os ventrículos laterais, nota-se a presença de inúmeras tumorações esbranquiçadas,

apenas à parede, fazendo saliência na luz, sésseis, de tamanho variável entre o de uma ervilha e o de uma cabeça de alfinete; tais lesões não são encontradas no 3.º ventrículo e nem no 4.º, que apresentam, ambos, superfície lisa, úmida e brilhante.

*Globo ocular direito* (retirado na ocasião da autópsia e examinado após fixação): praticado um corte sagital, foi encontrado na parede externa (face temporal) um pequeno tumor de côr branca, do tamanho aproximado de uma lentilha, hemisférico, de superfície lisa, localizado na

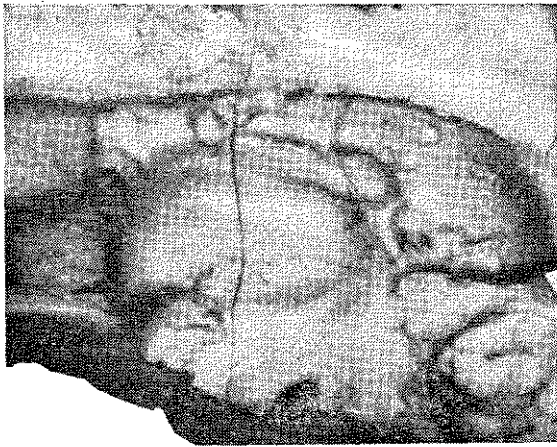


Fig. 5

CASO I — Tumores da parede dos ventrículos laterais, fazendo saliência na cavidade.

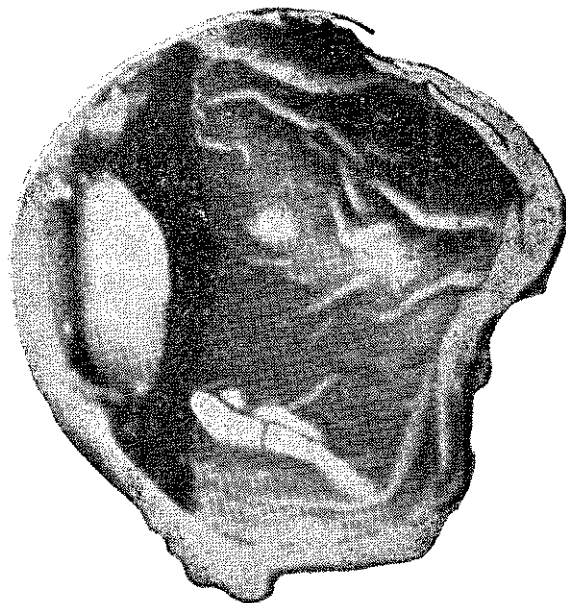


Fig. 6

CASO I — Facoma retiniano.

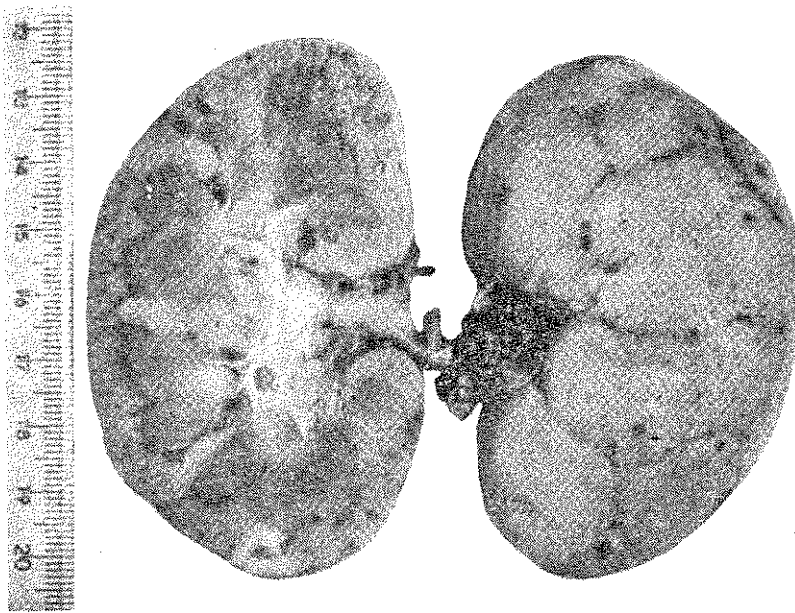


Fig. 7 — CASO I — Superfície externa e superfície de corte de rins em que se notam os “fibromas corticais” e os microquistos.

retina, séssil e fazendo saliência para dentro da cavidade do órgão.

*Rins:* pesam 150 g cada. Ambos apresentam, disseminados pela superfície e no interior do parênquima, numerosos pequenos quistos de conteúdo líquido transparente, em geral do tamanho de uma lentilha. Além destes micro-quistos, existem alguns poucos tumores do tamanho de uma ervilha, de cor branca, consistência firme, bem individualizados, distribuídos pela cortical do órgão. O parênquima restante é róseo-amarelado, devido à anemia e à esteatose.

*Medula espinhal:* nada digno de nota.

#### COMENTÁRIOS SOBRE OS ACHADOS MACROSCÓPICOS DA AUTÓPSIA

Trata-se de um caso de Esclerose Tuberosa ou Enfermidade de Bourneville, com lesões cerebrais, cutâneas, renais e retinianas muito características. Além disto, o doente apresentava intensa anemia generalizada, ligada à atrofia da mucosa gástrica e à parasitose intestinal, com conseqüentes atrofia da mucosa lingual (língua calva) e esteatose de diversos órgãos. Estes estados carenciais são muito contraditórios nos oligofrênicos profundos, pela facilidade com que se instalam, devido à expulsão em que vi-

vem e pela falta de iniciativa que dificulta sua apropriada alimentação.

Quanto ao encéfalo, as lesões encontradas são absolutamente típicas da enfermidade. Temos a assinalar, ainda, alterações de caráter disgenético, como pólo occipital bifido, restos da fossa silviana de ambos os lados e uma fossa situada no lobo parietal esquerdo que confirmam ser o órgão alterado constitucionalmente.

#### CORRELAÇÕES ANATOMO-CLÍNICAS

Da comparação entre o que foi observado em vida e o exame *post-mortem*, podemos assinalar: 1) a idiotia está explicada pela extensão das lesões cerebrais; 2) não se compreende a falta de sintomas neurológicos imponentes pois, por exemplo, toda a área motora estava atingida e o paciente apresentava marcha e movimentação normais; 3) não houve correspondência entre os achados eletroencefalográficos e as lesões, pois aqueles indicavam foco temporal e estas tomavam quase toda a superfície cerebral.

#### CASO II

##### *Resumo da observação*

*Identificação:* J. B. S. S., 5 anos, cor branca, brasileiro, sexo masculino, inter-

nado em 22-5-57. Data do falecimento: 5-6-57.

*Exame somático no ato da entrada:* criança de constituição franzina, grácil, em estado de subnutrição. Estado gripal. Na face apresenta algumas tumorações bem individualizadas, do tamanho aproximado de uma cabeça de alfinete, da cor da pele circundante, disseminadas ao longo dos sulcos naso-genianos e nasolabiais, de consistência extremamente dura.

*Exame neurológico:* nada digno de nota.

*Exame psíquico:* deficiência mental acentuada. Não se expressa pela palavra. Agitação psico-motora. Não pára no leito, saindo a correr pelos corredores. Genioso, birrento, agressivo. Tiques e esgares faciais. Ataques do tipo grande mal freqüentes. Gatismo.

*Decurso:* desde sua chegada, esteve acamado devido ao processo gripal. No decurso deste, foi acometido de ataques, sucumbindo na segunda crise convulsiva.

#### COMENTARIOS DO PONTO DE VISTA CLÍNICO

Trata-se de um caso típico de Moléstia de Bourneville pela existência dos três

sintomas característicos — oligofrenia, adenomas sebáceos simétricos da face e crises convulsivas. O paciente teve apenas 14 dias de vida após a sua internação, não se tendo conseguido apurar sua anamnese e nem realizar exames complementares, como seria de interesse no caso. Entretanto, chamam a atenção o estado de agitação psico-motora que manifestava e ser portador dos adenomas faciais tipo Hallopeau-Lerédde.

#### Relatório da autópsia

*Diagnósticos:* anemia dos tegumentos e dos órgãos internos. Adenomas simétricos da face. Fibromas corticais dos rins. Aderências pleurais recentes, devidas ao processo broncopneumônico. Esteatose hepática. Ascaridiose intestinal. Atrofia simples do braço. Broncopneumonia.

*Encéfalo:* pesa 1.300 g. Apresenta externamente: leptomeninge fina e transparente; vasos da base e suas principais ramificações, normais; circunvoluções quase tôdas alargadas e de consistência muito aumentada, cartilaginosa, de cor esbranquiçada, destacando-se nitidamente das poucas circunvoluções de aspecto

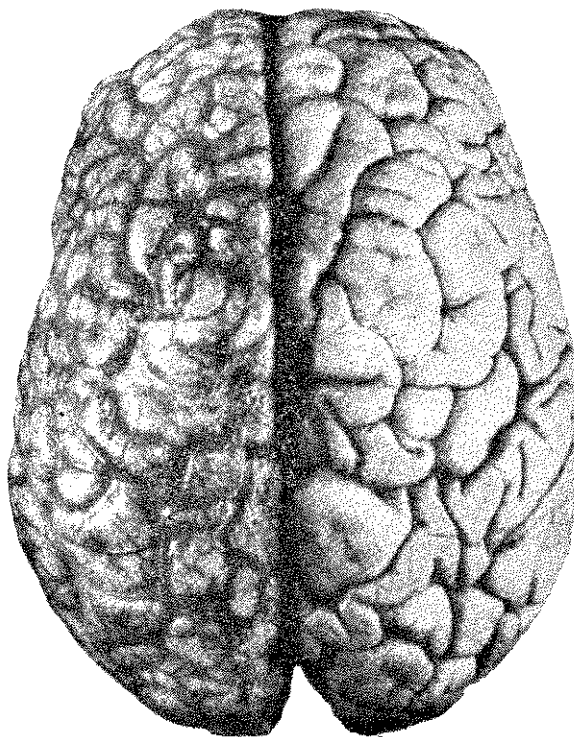


Fig. 8 — CASO II  
— Vista superior do cérebro. Do lado direito foi retirada a meninge

Fig. 9 — CASO II  
— Vista inferior do  
cérebro. Do lado  
direito do órgão foi  
retirada a meninge

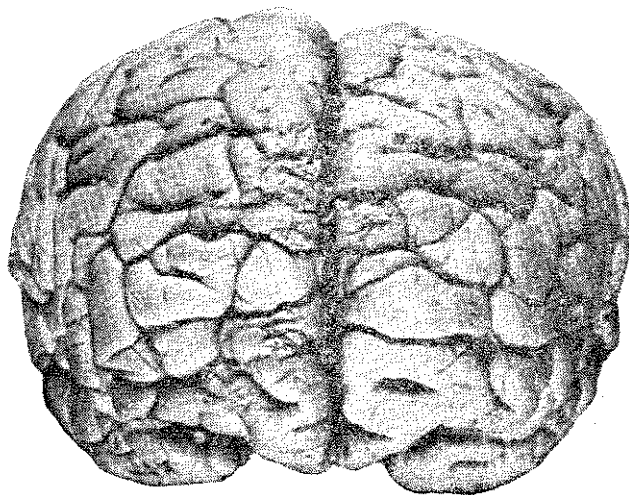
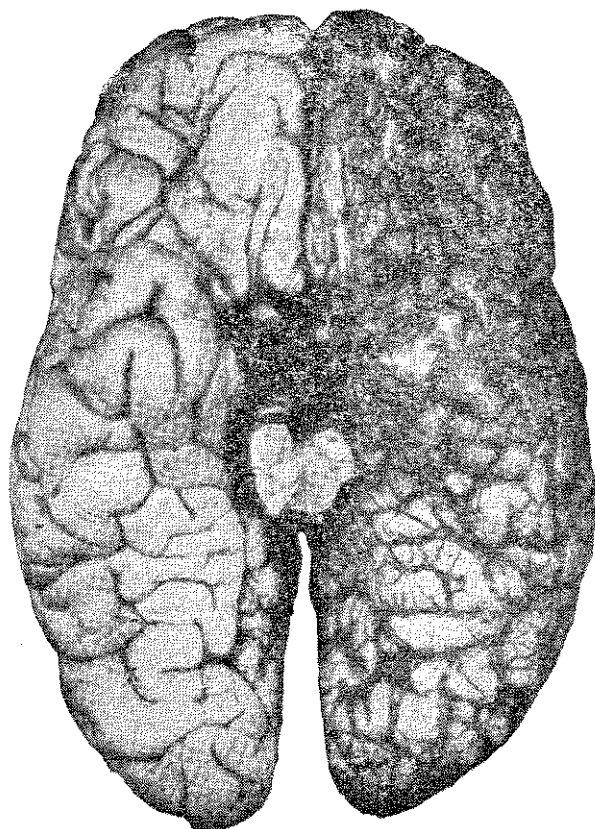


Fig. 10 — CASO  
II — Vista ante-  
rior do cérebro

normal; tais circunvoluções apresentam trechos enrolados sôbre si mesmos, formando espécies de ilhotas de centro deprimido, de superfície irregular, assemelhando-se à do couro cru; o rombencéfalo nada apresenta digno de menção. Aos

cortes, as circunvoluções descritas não apresentam o desenho normal, dado pelo limite entre substância cinzenta e branca, pois esta continua-se naquela, insensivelmente, e em alguns pontos se notam faixas esbranquiçadas em plena substância

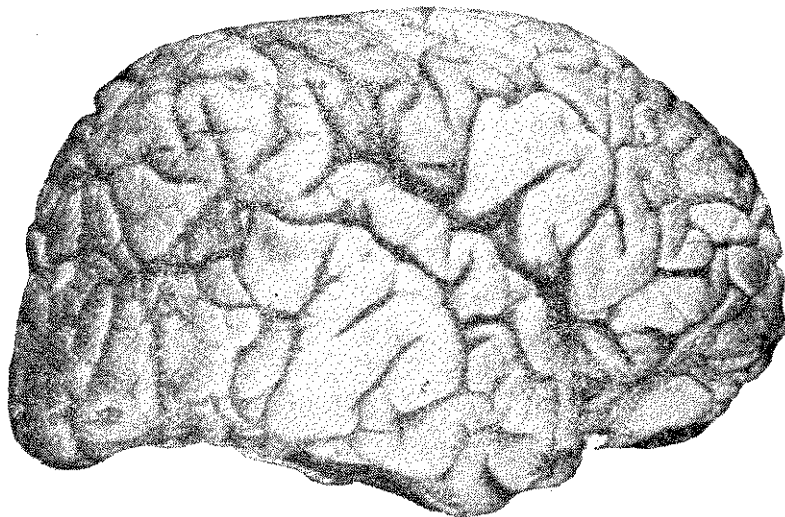


Fig. 11 — CASO II — Vista lateral direita do cérebro.

cinzenta. Nos ventrículos laterais, são encontrados nódulos esbranquiçados, duros, do tamanho variável de uma cabeça de alfinete ao de uma ervilha, fazendo saliência na luz da cavidade ventricular; 3.º e 4.º ventrículos nada apresentam digno de nota.

*Rins:* pesam 40 g cada e apresentam raros e pequenos tumores na superfície do órgão, fazendo saliência na mesma, de cor esbranquiçada, consistência firme e dura, tamanho aproximado ao de uma ervilha, hemisféricos, contornos regulares e superfície lisa. Aos cortes do órgão, percebe-se que tais tumores, sempre isolados, estão situados somente na cortical.

#### COMENTARIOS SOBRE OS ACHADOS MACROSCÓPICOS DE AUTÓPSIA

Trata-se de um caso de Esclerose Tuberosa ou Moléstia de Bourneville, caracterizado pela presença das tuberosidades cerebrais e pelos adenomas sebáceos simétricos da face. Ainda mais, há tumores renais, que macroscopicamente podem ser catalogados como fibromas, de localização cortical, como freqüentemente são encontrados em tal enfermidade. Quanto ao restante, presença de estado carencial, como se encontra comumente nos psicopatas e que, no caso, pode ser

correlacionado à gastrite atrófica e à ascariíose do paciente. A broncopneumonia que causou a morte é evidentemente uma complicação final do decurso da doença. A atrofia simples do baço traduz anatômicamente o estado anérgico do paciente.

#### CORRELAÇÕES ANATOMO-CLÍNICAS

Devido ao pouco tempo de observação do paciente, não há muito para se dizer. Em todo o caso, a deficiência mental no grau da idiotia é explicada pela extensão das lesões cerebrais. Outrossim, não se entende como alguém, sendo portador de tão imponentes lesões, que atingiam as circunvoluções frontais ascendentes, possa apresentar movimentação como a do paciente, pois saía correndo pelos corredores, descia e subia escadas, sendo necessário prendê-lo ao leito com faixas.

#### CASO III

*(Este caso foi definido como de Esclerose Tuberosa somente na autópsia)*

#### *Resumo da observação*

*Identificação:* J.P.S., 7 anos, cor branca, sexo masculino, brasileiro, internado em 28-11-55. Data do falecimento: 3-6-57.

*Antecedentes hereditários:* não há referências a psicopatias ou a moléstias neurológicas ou de natureza dermatológica em pessoas da família.

*Antecedentes pessoais:* crises convulsivas desde os 12 meses de idade. Sempre agitado, fere-se nas crises mais fortes. Aprendeu a falar apenas umas poucas palavras.

*Exame psíquico:* comparece em intensa agitação psico-motora. Não contata com o examinador. Atualmente, não fala. Humor irritadiço, com impulsos agressivos. Nível mental profundamente baixo. Gatismo. Vida animal.

*Exame somático:* o exame dos aparelhos e órgãos da economia apresentava, digno de nota, evidentes sinais de subnutrição. Pr. art. 8,5 x 6,0. No exame neurológico nada de especial foi constatado. O paciente andava, corria e sua movimentação voluntária era a comum. Um exame mais detalhado não pôde ser realizado por oposição do paciente.

#### *Exames Complementares*

*Exame de liquor:* negativo. *Exame de sangue:* duvidosas as reações de Wassermann, Kahn e Eagle. *Exame de fezes:* ovos de *Ascaris lumbricoides* e de *Ancilostomídeos*. *Exame de urina:* normal.

#### *Evolução*

O estado mental, durante o período de internação, não apresentou modificações apreciáveis. Quanto às condições físicas, o paciente nos últimos meses foi definindo, perdendo peso e faleceu em estado de caquexia.

#### COMENTÁRIOS DO PONTO DE VISTA CLÍNICO

Trata-se de um caso de oligofrenia que se foi acentuando com a evolução da moléstia, chegando ao grau da idiotia; o paciente sofria de crises convulsivas desde 12 meses de idade. Chama a atenção no caso o estado de constante agitação e agressividade manifestado pelo paciente.

#### *Relatório da autópsia*

*Diagnóstico:* anemia dos tegumentos e dos órgãos internos; adenomas sebáceos simétricos da face; fibromas corticais dos rins; anemia e esteatose do miocárdio; esteatose dos rins; ascaridiose intestinal; gastrite atrófica.

*Cabeça:* a pele da face apresenta numerosos e minúsculos tumores, de tamanho variável entre o de cabeça de alfinete e o de lentilha, sésseis, de consistência



Fig. 12 — CASO III — Adenomas sebáceos simétricos da face.

firme, superfície pontilhada, distribuídos nas regiões nasal, geniana, labial, mentoniana, orbitária e frontal, mais abundantes no dorso do nariz e nos sulcos naso-genianos, onde assumem a clássica distribuição em borboleta; apesar de agrupados, mantêm sempre sua individualidade. A cor é a mesma da pele circunstante, apenas um pouco mais escura.

*Encéfalo:* pesa 1.200 g. Externamente, apresenta: leptomeninges finas e transparentes; algumas circunvoluções macrogíricas, grosseiras, ligeiramente mais salientes e mais claras do que as circuns-

tantes e que são de consistência dura, le-nhosa. Tal aspecto é encontrado: à di-reita, nas circunvoluções 1.<sup>a</sup> e 2.<sup>a</sup> fron-tais, pé da 3.<sup>a</sup> frontal, em tôda a extensão

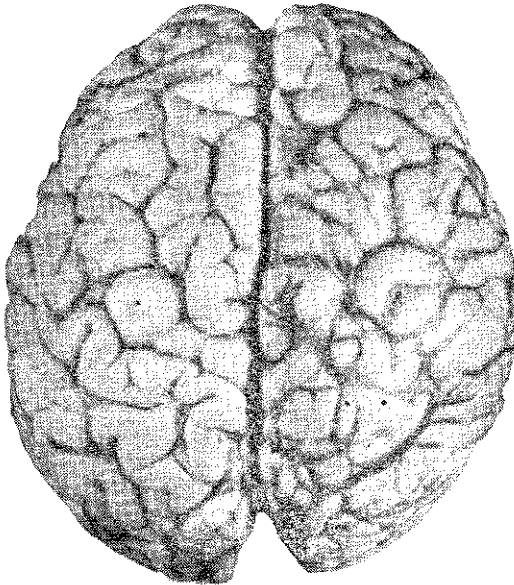


Fig. 13 — CASO III — Vista superior do cérebro. Do lado esquerdo foi retirada a meninge.

da 2.<sup>a</sup> temporal, na parte média da 2.<sup>a</sup> parietal, em duas áreas limitadas da 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> occipitais e no ângulo lateral externo da face orbitária do lobo frontal; à esquerda, na 1.<sup>a</sup> frontal, pé da 2.<sup>a</sup> fron-

tal, têrço superior da frontal ascendente, tôda a extensão da 2.<sup>a</sup> temporal, **gyrus angularis**, têrço anterior da 1.<sup>a</sup> tempo-ral; na face medial, estão comprometidas, do lado direito, o lóbulo para-central e a circunvolução frontal interna e, do lado esquerdo, o **gyrus lingualis** e a frontal interna, assim como a sub-calosa e a par-te do **gyrus cinguli** que recobre anterior-mente o joelho do corpo caloso; no lóbulo para-central há um tubérculo do tama-nho de uma ervilha. Em algumas áreas, as circunvoluções afetadas apresentam segmentos enrolados de modo a formar nodosidades, com o centro umbilicado, que se destacam ainda mais das áreas circunstantes do que o restante das cir-cunvoluções tomadas pelo processo. Des-sas nodosidades aparecem, à esquerda, três na 1.<sup>a</sup> frontal, uma no pé da 2.<sup>a</sup> fron-tal e uma na parietal ascendente e, à di-reita, uma na 1.<sup>a</sup> frontal e duas na 2.<sup>a</sup> frontal. O rombencéfalo nada apresenta digno de nota, fora o fato de os hemis-férios não recobrirem totalmente o ver-me. Feito um corte sagital mediano, apa-rece uma neoplasia de limites geográficos, nítidos, de consistência mole, friável, de côr cinzento-avermelhada, com áreas hemorrágicas no seu interior e ao seu redor, que interessa tálamo, habênula e epífise no sentido longitudinal; aos cortes fron-

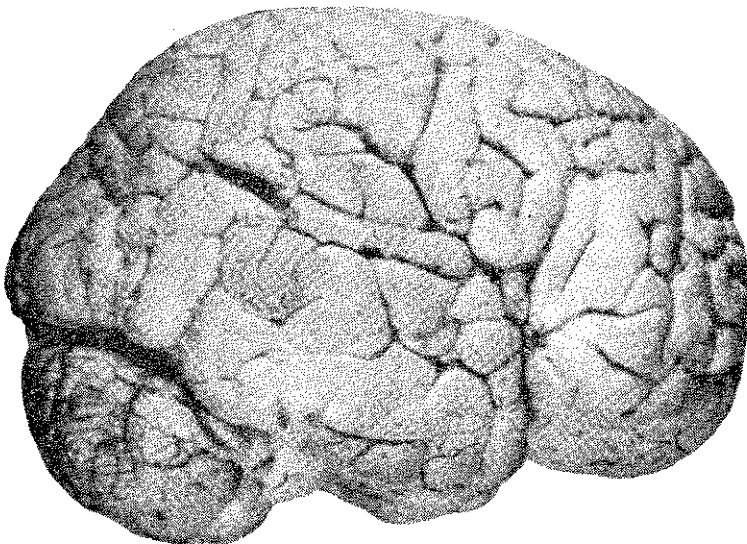


Fig. 14 — CASO III — Vista lateral direita do encéfalo, após retirada de tôda a meninge.





Fig. 15 — CASO III — Vista lateral esquerda do encéfalo, após retirada de toda a meninge.

tais, verifica-se que ela invade todo o tálamo até o pulvinar, cápsula externa, núcleo subtalâmico de Luys, parte final da cauda do núcleo caudado, núcleo ru-

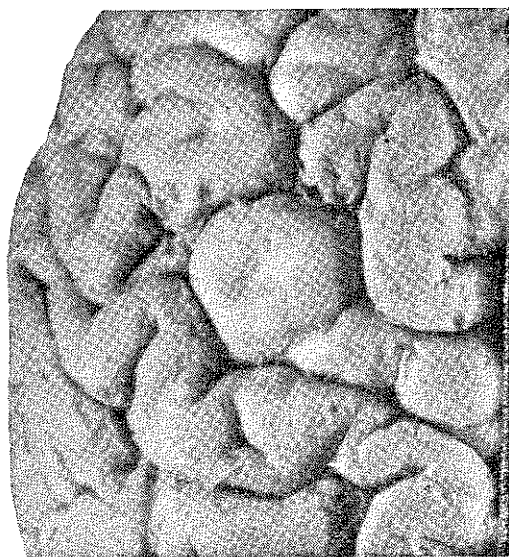


Fig. 16 — CASO III — Detalhes de uma tuberosidade cortical.

bro, locus niger e lamina quadrigemina. O tumor apresenta assinalada simetria em relação ao eixo sagital.

*Exame microscópico do tumor cerebral:* os cortes examinados, corados pela H.E., revelaram grande número de he-

mácias no parênquima nervoso, formando um manto contínuo, em cuja periferia se percebem acúmulos de glóbulos vermelhos formando figuras em anel em torno dos vasos (hemorragias anulares). Trata-se, portanto, de um enfarte hemorrágico e não de um tumor como sugeria o aspecto macroscópico. Como o processo abrange a substância nervosa ao redor do 3.º ventrículo cerebral, reproduz o quadro da "polioencefalite superior hemorrágica de Wernicke", perturbação circulatória ligada a uma discrasia sangüínea do tipo carencial.

*Rins:* pesam 125 g cada. Ambos são de cor rósea com áreas amareladas de permeio e apresentam na superfície alguns tumores do tamanho variável entre o grão de lentilha e o de ervilha, de cor branca, consistência firme, superfície lisa, forma hemisférica, bem individualizados e destacados do parênquima circunstante. Aos cortes, verifica-se que se localizam todos na cortical, de cujo parênquima estão bem destacados.

#### COMENTÁRIOS SOBRE OS ACHADOS MACROSCÓPICOS DA AUTÓPSIA

Trata-se de um caso de Moléstia de Bourneville, achado de autópsia, com lesões cerebrais, cutâneas e renais características da doença. A causa da morte



Fig. 17 — CASO III — “Fibromas corticais” (ângio-miomas) dos rins.

foi um profundo estado carencial ligado às próprias condições mentais do doente, à gastrite atrófica e à ascaridiose intestinal. O encéfalo, além das lesões próprias da Esclerose Tuberosa, apresentou polioencefalite superior hemorrágica de Wernicke. Os adenomas sebáceos simétricos da face eram do tipo Pringle.

#### CORRELAÇÕES ANATOMO-CLÍNICAS

Mesmo sendo achado de autópsia, o caso permite-nos formular algumas considerações interessantes: 1) quando a atenção do clínico não é chamada pelos adenomas sebáceos, a Esclerose Tuberosa pode passar despercebida e rotulada como oligofrenia mais epilepsia. Daí o valor diagnóstico das lesões da face e a necessidade do exame sistemático do tegumento cutâneo entre os psicopatas, particularmente os oligofrênicos; 2) também neste caso não há referência a perturbações da motricidade voluntária, pelo menos imponentes; entretanto, o paciente tinha uma lesão tuberosa no terço superior da frontal ascendente esquerda.

#### CASO IV

##### Resumo da observação

*Identificação:* J.L.C., 9 anos, côr branca, brasileiro, sexo masculino, internado em 26-3-57. Data da saída (a pedido): 28-8-58.

*Antecedentes hereditários:* pai de temperamento impulsivo e violento, abandonou a família 4 meses após o casamento. Mãe nervosa já apresentou dois episódios psicóticos, tendo sido internada em hospitais psiquiátricos; é sujeita a crises alérgicas, “fica inchada e com bôlhas no rosto” (sic). Uma tia pelo lado paterno sofre de hemiplegia desde a juventude. Ignora a informante (mãe) mais detalhes sobre o caso, pois desconhece a maior parte dos parentes do espôso.

*Antecedentes pessoais:* crises convulsivas desde 7 dias após o nascimento, que perduram até esta data. De 3 anos para cá, tem piorado e sofrido modificações sensíveis na conduta e no temperamento; sempre foi nervoso, “mas era bonzinho” (sic) e, atualmente, é irascível, teimoso, colérico e agressivo.

*Exame somático:* macrocefalia relativa. Apresenta no dorso do nariz e nas regiões genianas numerosas tumorações de côr avermelhada, perceptíveis à distância — adenomas sebáceos da face, tipo Pringle. Lesões semelhantes são encontradas no pescoço, porém em menor número. As lesões da face tiveram início aos 2 anos de idade aproximadamente. Nada de anormal foi constatado no exame dos aparelhos circulatório, respiratório e geniturinário.

*Exame neurológico:* apenas constatamos vivacidade dos reflexos patelares.

*Exame psíquico:* deficiência mental acentuada. Crises convulsivas desde os 7 dias de idade. Aqui no Hospital vem tendo crises com as características do pequeno mal. Inicialmente solta um pequeno grito, revira os olhos para a esquerda e cai pesadamente para a frente, batendo com a fronte sempre para a esquerda, repetindo-se no mesmo local as escoriações ou hematomas. Suas crises não passam da fase tônica e são de curta duração. Submetido aos testes Binet-Simon, revelou I.M. 3,2 - Q.I. 0,35 - A.M. 5,8.



Fig. 18 — CASO IV — Adenomas sebáceos simétricos da face tipo Pringle. Notar a vascularização.

#### *Exames Complementares*

*Neuro-ocular:* anisocoria ligeira; reflexos foto-motor e consensual diminuídos. A.O.: pupilas de contornos pouco nítidos, ligeiramente edematosos. O.E.: zona de degeneração da retina. *Eletroencefalografia:* complexo espícula-onda lenta. *Radiológicos:* craniograma normal. Extremidades, mãos e pés: aspecto normal dos elementos ósseos, com idade óssea entre 7 e 8 anos. *Hematológico:* anemia hipocrômica. Leucocitose. *Glicemia em jejum:* 0,97 g. *Reações soro-*

*lógicas para lues:* normais. *Liquor:* normal. *Urina:* abundantes uratos amorfos. *Feces:* ovos de Ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides* e *Trichocephalus trichiurus*.

#### *Evolução:*

As crises convulsivas, de seis meses para cá, vêm se repetindo com frequência gradativamente maior, atingindo aqui no Hospital 2 a 3 por dia. Até há dois anos atrás, o paciente tinha conhecimento da aproximação das crises e avisava seus familiares, dizendo "lá vem o queié", procurava acercar-se deles ou sentar-se no chão; atualmente, não mais as pressente. Criança dócil que era, de há três anos para cá tornou-se briguento, colérico, quer fazer coisas absurdas como cozinhar sabão, beber sangue humano etc.

#### COMENTARIOS DO PONTO DE VISTA CLÍNICO

Trata-se de um caso típico de Moléstia de Bourneville com a tríade clássica — oligofrenia, crises convulsivas e adenomas sebáceos simétricos da face. Chamam a atenção no caso: 1) epilepsia do tipo pequeno mal; 2) com o passar do tempo, modificações do caráter e do humor e aumento da frequência das crises convulsivas; 3) aparecimento dos adenomas sebáceos na idade de 2 anos; 4) tara psicopática familiar, manifestada por temperamento impulsivo-violento do genitor, dois episódios psicóticos sofridos pela genitora e hemiplegia, desde a juventude, de uma tia paterna; 5) oligofrenia do grau da imbecilidade; 6) lesões oculares degenerativas; 7) o tipo Pringle dos adenomas da face.

#### CASO V

##### *Resumo da observação*

*Identificação:* O.E., 26 anos, côr preta, brasileira, sexo feminino, solteira, internada desde 17-9-53.

*Antecedentes hereditários:* prejudicados. Apenas sabemos ter vindo de um asilo onde fôra recolhida por abandono.



Fig. 19 — CASO V — Adenomas sebáceos simétricos da face. Notar a intensa seborréia facial.

*Antecedentes pessoais:* sofre de ataques há muitos anos, não sabendo porém a paciente precisar a data de início deles. Também não sabe dizer quando principiaram a se manifestar as lesões dérmicas da face.

*Exame psíquico:* paciente calma, apática, com carência de iniciativa e indiferença pelo ambiente. Deficit das funções intelectuais superiores, ao nível da imbecilidade. Ataques do tipo grande mal, espaçados, dois a três por ano.

*Exame dermatológico:* na face, apresenta numerosas tumorações de tamanho variável entre o de uma cabeça de alfinete e o de uma lentilha, sésseis, da mesma cor da pele circundante, agrupadas sobretudo nas regiões nasal e genianas, mais numerosas nos sulcos naso-genianos. Destacam-se pelo tamanho e localização duas delas, uma no ângulo interno da órbita esquerda e outra no sulco lábio-geniano direito. A pele do rosto é untuosa e a paciente apresenta, também, seborréia do couro cabeludo. Nos pés,

nos sulcos peri-ungueais, apresenta pequenos tumores, em geral do tamanho de uma lentilha, de cor esbranquiçada, consistência dura, móveis e que aderem fortemente à sua base de implantação. O exame dos aparelhos circulatório, pulmonar e geniturinário não acusa anormalidades.

*Exame neurológico:* não acusou perturbações dignas de registro.

#### *Exames complementares*

*Eletrocardiograma:* normal. *Eletroencefalograma:* normal. *Neuro-ocular:* pupila em O.D. deformada - 2,5 mm; O.E. redonda - 4 mm. Anisocoria. Reflexos foto-motor e consensual diminuídos. Fundo de olho: na região da artéria nasal superior do O.E. foi observada uma elevação cor de ardósia (tumor?). A artéria acha-se esclerosada. *Liquor:* normal. *Reações sorológicas para lues:*

negativas. *Exame do suco gástrico:* negativo para bacilos álcool-ácido-resistentes. *Urina:* leves traços de albumina. *Fezes:* ovos de *Ascaris lumbricoides*. *Radiológicos:* a) *crânio: frente e perfil* — hiperostose frontal interna; b) *tórax:* coração — área cardíaca dentro dos limites da normalidade; campos pulmonares — transparência normal do parênquima pulmonar; c) *mãos e pés* — ausência de sinais de lesões ósseas.

#### *Evolução*

Não houve melhora ou piora do quadro mental e físico da paciente durante os anos de sua internação no hospital, onde ainda se encontra. Apenas, em 1959, apresentou um episódio de agitação psico-motora, de curta duração, voltando, depois, a seu estado usual de apatia.

### III — HISTOPATOLOGIA

Dos três casos autopsiados foram, após descrição e fotografia dos órgãos atingidos, retirados fragmentos das lesões e de áreas normais para exame microscópico. Dos outros dois casos foram feitas biópsias das lesões cutâneas.

Das lesões encefálicas foram feitos preparados histológicos, que coramos pela hematoxilina-eosina, pelos métodos de Nissl (para células nervosas), de Weil (variante de Weigert-Pal para fibras mielínicas), de Bielschowsky (para aparelho neuro-fibrilar da célula e fibra nervosa), de Globus (variante do sublimado-ouro de Cajal, para astrogliã), de Penfield (para microglia), de Perdrau e de Gomori (para fibras reticulínicas do S.R.E.) e do Sudan III (para gorduras).

A medula espinhal foi incluída em cealoidina e de suas diferentes alturas (cervical, torácica, lombar e sagrada) foram feitos cortes que foram corados pelos métodos de Weil e de Nissl.

Os tumores cutâneos e os renais foram corados pela hematoxilina-eosina.

### COMENTÁRIOS DO PONTO DE VISTA CLÍNICO

Trata-se de um caso típico de Moléstia de Bourneville, com a tríade sintomática — oligofrenia, crises convulsivas e adenomas sebáceos simétricos da face. Chamam a atenção no caso: 1) crises convulsivas tipo grande mal e exame eletroencefalográfico normal; 2) presença dos tumores peri-ungueais de Koenen e, provavelmente, de facoma retiniano; 3) um episódio de agitação psico-motora; 4) estado mental estacionário desde sua entrada no hospital, dando-se o mesmo com o estado físico; 5) distúrbios da ossificação craniana; 6) seborréia do couro cabeludo, portanto fora das regiões atingidas pelos adenomas cutâneos; 7) o tipo Pringle dos adenomas sebáceos.

#### 1. Lesões cutâneas

##### a) “Adenomas sebáceos simétricos da face”

Caso I — H.E. — A hipoderme nada apresenta digno de nota. A derme, muito rica em folículos pilosos, o que é normal para a região de que foi retirado o fragmento, apresenta numerosas angiectasias que se dispõem junto dos anexos cutâneos e ao longo da zona subepidérmica, invadindo e alargando com freqüência as papilas que, recobertas por epitélio denso, produzem digitações e ondulações na superfície do órgão; nada se nota para o lado das glândulas sebáceas, mas alguns folículos dilatados e contendo abundante material sebáceo revelam a hipersecreção das mesmas; por vêzes, há formação de quistos desta natureza. A epiderme, pelo alargamento das papilas, apresenta os corpos interpapilares pouco acentuados, formando ela como que uma faixa ondulada.

*Diagnóstico:* “Adenoma sebáceo” tipo Pringle.

*Comentário:* Na realidade, não há adenoma. O que há são simples angiectasias, pois tôdas as demais alterações

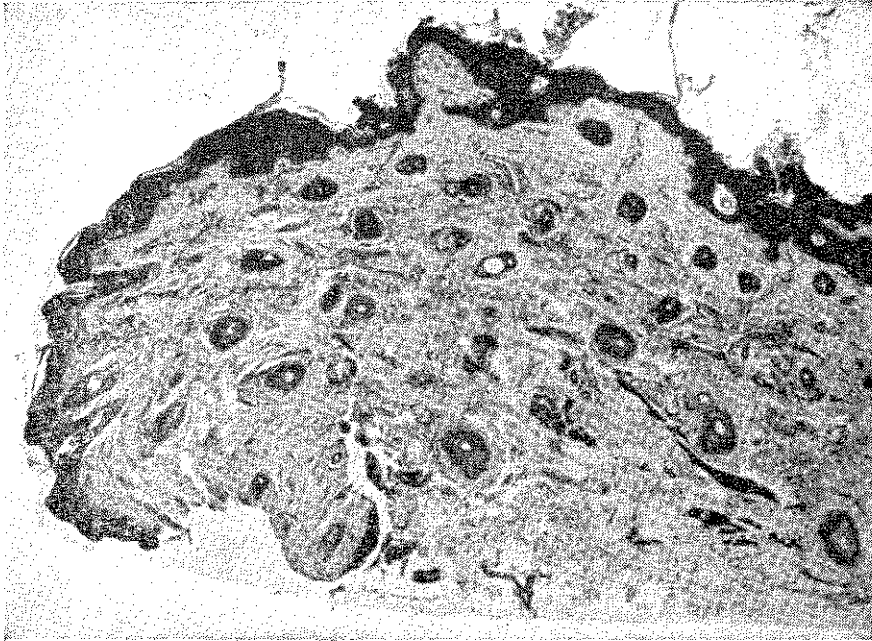


Fig. 20 — CASO I — Corte de adenoma sebáceo tipo Pringle: dilatação dos folículos pilosos, angiectasias, alargamento das papilas e digitações na superfície. (Microf. Zeiss, lupa. Col. H.E.).

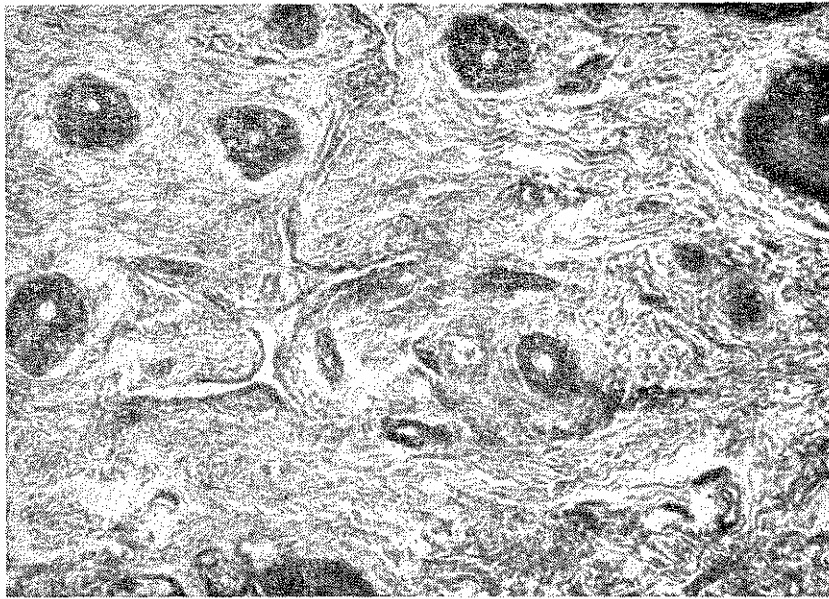


Fig. 21 — CASO I — Mesmo corte da fig. anterior. Ao maior aumento, notam-se as angiectasias em tôrno dos anexos cutâneos. (Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 6. Col. H.E.).

assinaladas (acentuada hipersecreção sebácea, revelada pela maioria dos folículos pilosos dilatados, ondulações e digitações papilíferas da superfície cutânea) são

conseqüentes às perturbações circulatórias causadas por essas mal-formações vasculares, através de distúrbios metabólicos dos tecidos.

Caso II — H.E. — A hipoderme nada apresenta digno de nota. A derme apresenta numerosas angiectasias, de luz estreita, dispostas sobretudo em tórno dos folículos pilosos e ao longo da faixa sub-epidérmica, que invadem as papilas. Estas, devido a essa invasão e à proliferação conjuntiva que a acompanha, apre-

sentam-se dilatadas e, recobertas pelo epitélio, fazem saliência na superfície do órgão sob a forma de digitações. Duas ou mais destas digitações reunidas produzem uma elevação papuliforme. Alguns folículos pilosos estão dilatados. Pigmento melânico é encontrado na derme, logo abaixo da epiderme, em pequena

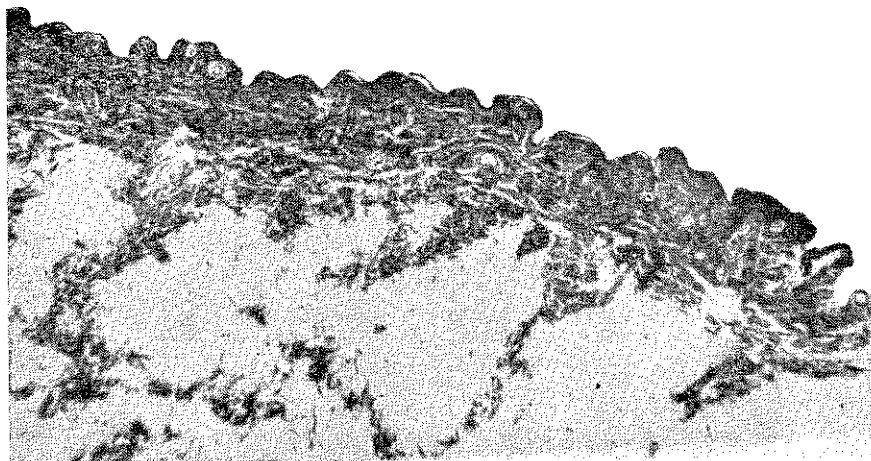


Fig. 22 — CASO II — Corte de adenoma sebáceo tipo Hallopeau-Lerédde: papilas dilatadas, formando digitações na superfície. Poucos folículos dilatados. Predomina a proliferação conjuntiva. Mesmo neste aumento, já são visíveis as angiectasias. (Microf. Zeiss, lupa. Col. H. E.).



Fig. 23 — CASO II — Mesmo corte da fig. anterior. Alguns folículos estão dilatados, havendo um deles que forma um quisto. Intensa proliferação conjuntiva e angiectasias em tórno dos anexos. (Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 9. H. E.).

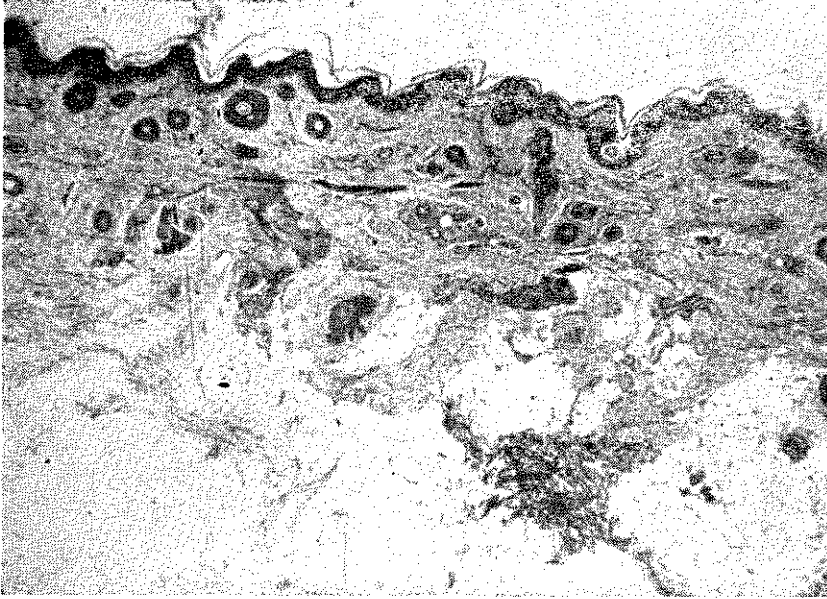


Fig. 24 — CASO III — Corte de adenoma sebáceo tipo Pringle. Digitações papilíferas, angiectasias e dilatação dos folículos pilosos. (Microf. Zeiss, lupa. Col. H. E.).

quantidade, mas não são visualizadas células névicas. A epiderme é densa, de altura normal, mas praticamente sem colunas interpapilares, pelo alargamento das papilas dérmicas, e recoberta por camada córnea um pouco mais espessa do que o normal. Alguns folículos pilosos estão dilatados.

*Diagnóstico:* "Adenoma sebáceo" tipo Hallopeau-Lerèdde.

*Comentário:* na realidade, não há adenoma. O que há são angiectasias, pois todas as demais alterações assinaladas (discreta hipersecreção sebácea, revelada pela dilatação de alguns folículos pilosos; proliferação conjuntiva da derme, de que depende a dureza da lesão observada macroscopicamente; elevações antes papilíferas e depois papulosas da pele; presença de pigmento melânico na derme) decorrem dessas mal-formações vasculares. Classificamos o quadro como do tipo Hallopeau-Lerèdde por predominar nêle a proliferação conjuntiva dos corpos papilares.

Caso III — H.E. — A derme apresenta numerosas angiectasias de luz estreita que se dispõem sobretudo em tórno dos anexos cutâneos e ao longo da faixa subepitelial, invadindo e alargando, com freqüência, as papilas. Estas, recobertas pela epiderme, determinam saliências digitiformes na superfície do órgão que, assim, apresenta-se irregular, com espículas e ondas. Ao redor das angiectasias há acúmulo de células névicas com pequena quantidade de pigmento melânico intra e extra-celular. Os folículos pilosos, abundantes como sempre na região de que foi retirado o fragmento, apresentaram-se em grande número dilatados, pelo acúmulo de secreção sebácea em seu interior e com o epitélio da parede atrofiado, formando o conjunto figuras císticas. Não se nota aumento numérico ou volumétrico das glândulas sebáceas. O epitélio, denso e com corpos interpapilares pouco acentuados pelo alargamento das papilas dérmicas, apresenta discreto grau de hiperqueratose.



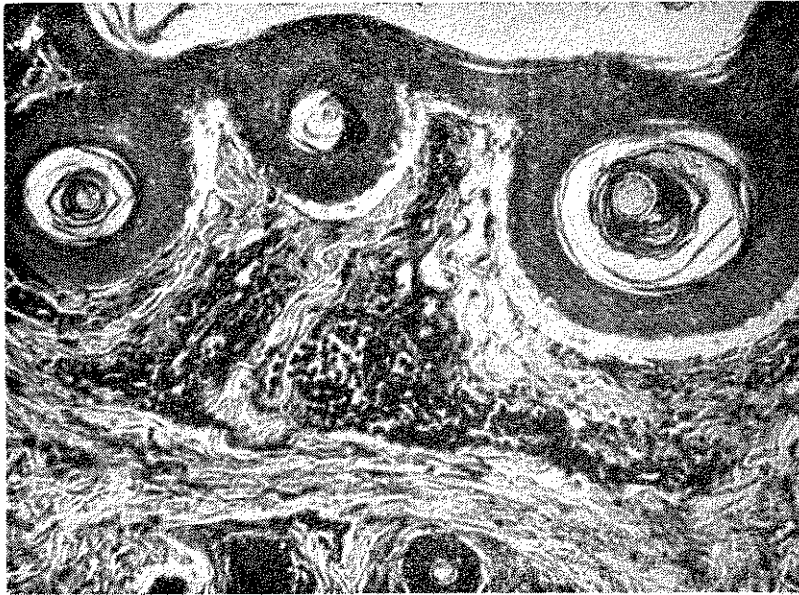


Fig. 25 — CASO III — Mesmo corte da fig. anterior. Ao maior aumento, nota-se que as angiectasias invadem as papilas, cercadas de células névicas. Quadro descrito por Pasini como "nevo fibromatoso telangiectásico". (*Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 9. Col. H. E.*).

*Diagnóstico:* "Adenoma sebáceo" tipo Pringle.

*Comentário:* na realidade, não há adenoma. O que há são angiectasias, pois tôdas as demais alterações assinaladas (acentuada hipersecreção sebácea, revelada pela dilatação da maioria dos folículos pilosos; ondulação da superfície cutânea; proliferação de células névicas) decorrem dessas alterações de desenvolvimento dos vasos. É a este quadro que os autores dão o nome de "nevo fibromatoso angiectásico da face", proposto por Pasini. Não concordamos com esta denominação porque as células névicas aparecem unicamente ao redor das angiectasias e não formam blocos celulares como nos verdadeiros nevos. Classificamos o quadro como do tipo Pringle por predominar nêle a hipersecreção sebácea, revelada pela dilatação dos folículos, muitas vezes em forma cística.

**Caso IV** — H.E. — A hipoderme nada apresenta digno de nota. A derme apresenta numerosas angiectasias, de luz muito dilatada, dispostas sobretudo em

tôrno dos anexos cutâneos e ao longo da camada subepidérmica, que invadem e alargam as papilas, a ponto de a epiderme formar uma densa faixa apenas ondulada. Não há distúrbios de pigmentação. A camada córnea é um pouco mais espessa do que o normal. Os folículos pilosos, muito abundantes na região de que foi retirado o fragmento, estão dilatados e contêm abundante material sebáceo, formando, por vêzes, figuras císticas.

*Diagnóstico:* "Adenoma sebáceo" tipo Pringle.

*Comentário:* na realidade, não há adenoma. O que há são angiectasias, pois tôdas as demais alterações assinaladas (hipersecreção sebácea, revelada pela dilatação dos folículos pilosos; desaparecimento das colunas interpapilares) delas decorrem. Classificamos o quadro como do tipo Pringle por predominar nêle a hipersecreção sebácea e o distúrbio circulatório revelado pela grande dilatação das próprias angiectasias.

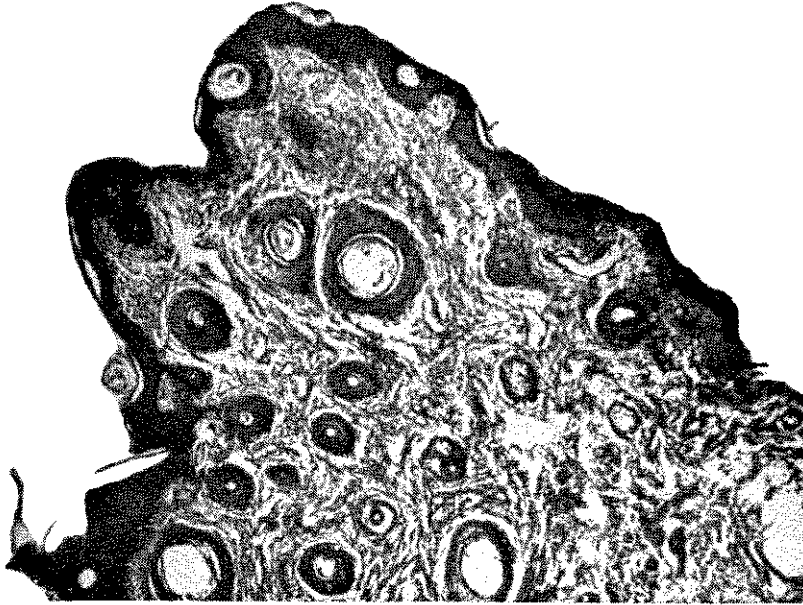


Fig. 26 — CASO IV — Corte de adenoma sebáceo tipo Pringle. Dilatação dos folículos pilosos, rodeados pelas angiectasias. Dilatação das papilas. Notam-se poucas colunas epidérmicas inter-papilares. (*Microf. Zeiss, lupa. Col. H. E.*).

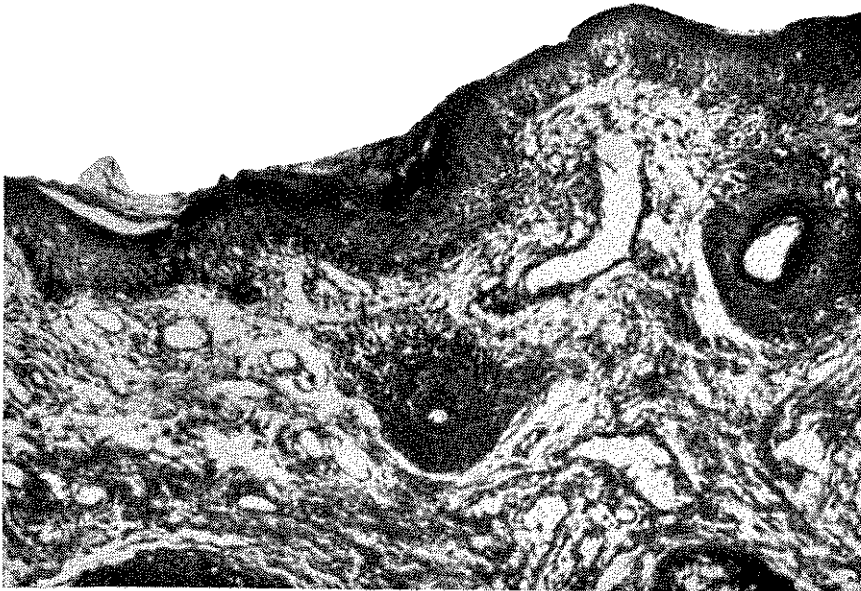


Fig. 27 — CASO IV — Mesmo corte da fig. anterior. Ao maior aumento, nota-se a dilatação das angiectasias, o que explica a cor vinhosa da lesão cutânea. (*Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 9. Col. H. E.*).

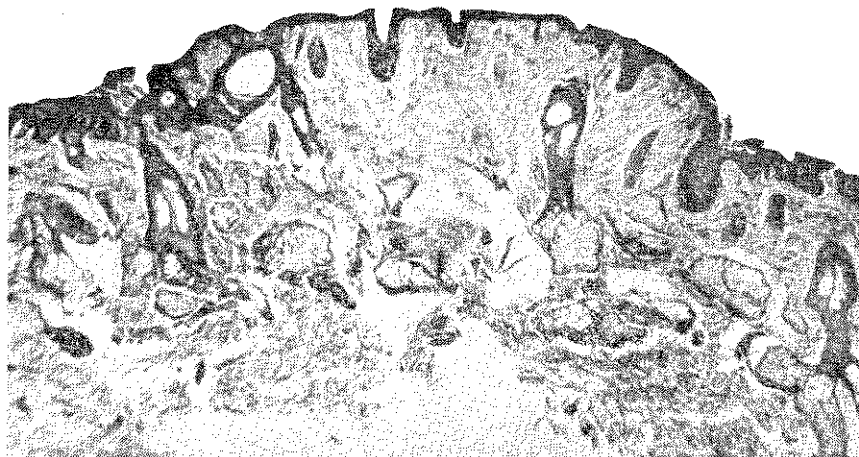


Fig. 28 — CASO V — Corte de adenoma sebáceo tipo Pringle. Grupo de papilas, dilatadas e crescidas, formando uma saliência papulosa na superfície. Dilatação dos folículos pilosos. Hiperplasia de glândulas sebáceas. Angiectasias invadindo as papilas (Microf. Zeiss, lupa. Col. H. E.).

Caso V — H.E. — Hipoderme nada apresenta digno de nota. A derme apresenta as glândulas sebáceas muito aumentadas em número e tamanho; numerosos folículos pilosos estão dilatados e contêm material amorfo acidófilo. Vêm-se numerosas angiectasias que se distribuem em tórno dos anexos e logo abaixo da epiderme, infiltrando as papilas, o que, acompanhado de proliferação conjuntiva, as eleva e alarga. Por vèzes, grupos de 4 ou 5 ou mais destas papilas assim alteradas determinam elevações papulosas da superfície cutânea. Ao longo e em tórno das angiectasias encontram-se células névicas e algum pigmento melânico é encontrado dentro e fora delas. A epiderme apresenta a camada basal muito rica em melanina e a camada córnea é algum tanto espessada.

*Diagnóstico:* “Adenoma sebáceo” tipo Pringle.

*Comentário:* êste é o único dos cinco casos em que há hiperplasia e hipertrofia das glândulas sebáceas o que, entretanto, sabemos não constituir um “adenoma”. A êste tipo de lesão, como vimos, Pasini denominou “nevo fibromatoso angiectásico”; também aqui as células névicas não formam blocos como nos verdadeiros

nevus, pois são unicamente encontradas ao longo e em tórno dos vasos. Tôdas as alterações assinaladas podem ser atribuídas às angiectasias: hiperplasia e hipertrofia das glândulas sebáceas, com hipersecreção; distúrbio da melanogênese; proliferação conjuntiva etc.

#### COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE OS “ADENOMAS SEBÁCEOS”

Fomos obrigados a fazer descrição detalhada, até mesmo enfadonha, do exame microscópico das lesões cutâneas, de caso por caso, porque somente assim podemos formar um conceito da verdadeira natureza dessas lesões e qual o lugar que ocupam no quadro geral da enfermidade. A bem dizer, foi o estudo das lesões cutâneas que nos abriu o caminho para entender a Esclerose Tuberosa dentro de uma única explicação patogênica.

Das diferentes descrições, ressalta que a lesão fundamental e comum a todos os casos é constituída pelas angiectasias. Quanto ao mais, são apenas “nuances” dependentes, como sempre acontece nas doenças, do terreno individual. Entre o caso 2 e os demais há só diferença de quantidade e não de qualidade da proli-

íeração conjuntiva. Quanto aos casos 3 e 5, que reproduzem o quadro descrito por Pasini como “nevo fibromatoso angiectásico”, como já assinalamos, não constituem de modo algum verdadeiros nevos. Aliás, o próprio caso 2 (Hallopeau-Lerèdde) apresenta pigmento melânico na derme, ainda que em pequena quantidade. No caso 4, que clinicamente apresentava o quadro mais típico do tipo Pringle, dado pela coloração vinhosa da lesão cutânea, a única diferença encontrada em relação aos demais é que as angiectasias eram de luz muito aberta. E assim por diante.

As angiectasias, pelas perturbações circulatórias que determinam na pele, podem ocasionar tôdas ou qualquer uma das alterações que caracterizam o quadro dos “adenomas sebáceos simétricos da face”, denominação que, aliás, há muito deixou de ter significação etimológica.

É lógico que para uma só doença procuremos uma única explicação patogênica e nas lesões descritas, de comum, há essas angiectasias.

Isto tem importância na nova explicação patogênica geral da enfermidade que nos propomos a dar, no trabalho, mais adiante.

#### b) “Tumor de Koenen”

**Caso V** — H.E. — Os cortes examinados revelam um minúsculo fragmento de pele que apresenta a camada córnea de espessura muito aumentada, o epitélio pavimentoso sem grandes particularidades e a derme com numerosos vasos de estrutura capilar, dilatados e de luz vazia. O estroma conjuntivo colágeno circunstante nada apresenta digno de menção.

*Diagnóstico:* Tumor de Koenen.

**Comentário:** esta lesão é denominada por TOURAINE<sup>66 e 67</sup> ângio-fibroma. Não concordamos com a denominação porque seus vasos não constituem angiomatoses, mas simples ectasias vasculares, e o tecido conjuntivo é adulto, praticamente acelular e não pode, portanto, ser considerado de natureza neoplásica. Acha-mos que o que confere particular consistência firme ao tumor periungueal de



Fig. 29 — CASO V — Corte de um tumor de Koenen. Acentuada hiperkeratose. Numerosas angiectasias na derme (Microf. Zeiss, lupa. Col. H.E.).

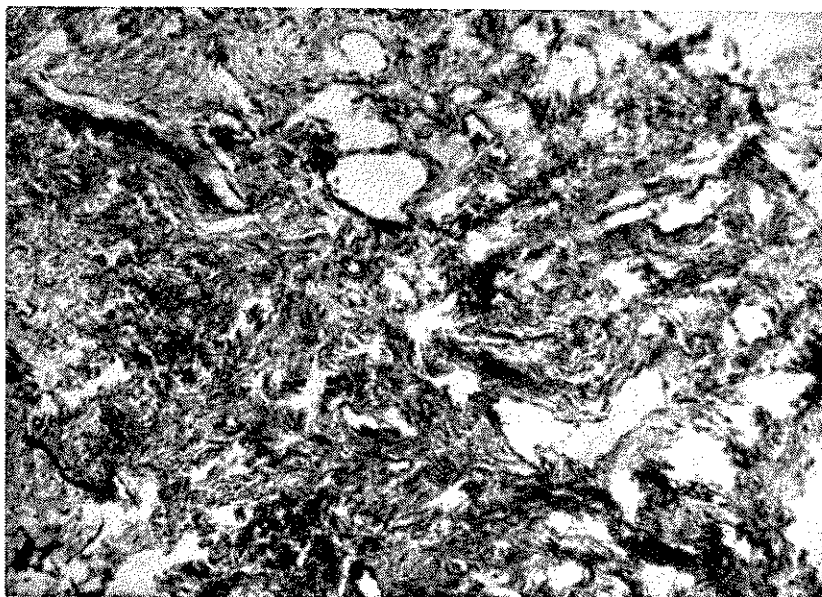


Fig. 30 — CASO V — Mesmo corte da fig. anterior. Angiectasias (*Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 9. Col. H. E.*).

Koenen é a camada córnea muito espessa, o que pode perfeitamente ser explicado pelas perturbações metabólicas decorrentes da presença das angiectasias na derme, pois desta camada é que depende, como é notório, a nutrição da epiderme.

## 2. Lesões cerebrais

### a) *Lesões corticais*

Foram sempre colhidos fragmentos que compreendiam córtex e substância branca subcortical correspondente, inclusive todo o eixo da circunvolução.

De um modo geral, os cortes realizados nos casos I, II e III, corados pelos mesmos métodos, ofereceram resultados sensivelmente iguais, quase idênticos. Ao todo, foram examinadas cerca de 500 preparações microscópicas e não podemos dizer que qualquer um dos 3 casos em que foi realizada a autópsia apresentasse algum aspecto que outro não apresentasse também, no estudo que realizamos.

Assim sendo, passaremos à descrição dos principais fatos constatados nos diferentes métodos de coloração:

*H.E.* — Chama a atenção a grande riqueza vascular da lesão, já visível ao pequeno aumento. A camada molecular é de espessura aumentada e muito rica em células com a forma dos astrocitos. As células monstruosas da Esclerose Tuberosa (a que passaremos a chamar de células e.t., para simplificar) coram-se bem, em geral, em vermelho-azulado; algumas mostram-se até mesmo borradas, sem que nelas se consiga distinguir o núcleo. Quanto à distribuição, as células e.t. aparecem em tôdas as camadas corticais, desde a molecular, e na zona subcortical. No parênquima circunstante da lesão, o fundo do tecido mostra uma fina trama fibrilar como a que usualmente se encontra nos cortes de substância nervosa, mas na própria lesão essa trama é mais grosseira e rala, chegando a assumir aspecto esponjoso.

*Globus* — Hiperplasia e hipertrofia da astroglia, que forma na camada molecular uma faixa de elementos estratificados e, no restante da área atingida pela lesão córtico-subcortical, é distribuída mais ou menos difusamente. Alguns

elementos desta natureza apresentam figuras de divisão (amitose), outros, modificações morfológicas que revelam alterações degenerativas. As células e.t. coram-se bem por este método, apresentando-se borradas: nelas não se distingue o núcleo do citoplasma; por vezes aparece

somente o corpo celular, outras, impregnam-se também os prolongamentos e, então, parecem astrocitos monstruosos.

**Comentário:** o exame, por este método, dá-nos uma idéia de que a natureza das células e.t. nem sempre é spongioblástica. Outra idéia, que nos fornece

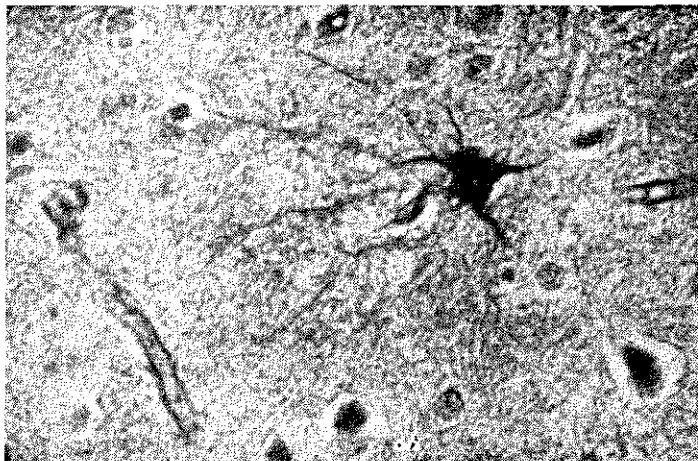


Fig. 31 — CASO III — Lesão tuberosa. Célula e.t. de aspecto spongioblástico. Notar vizinhança com vaso (*Microf. Zeiss, obj. 20, oc. 8. Col. Globus*).

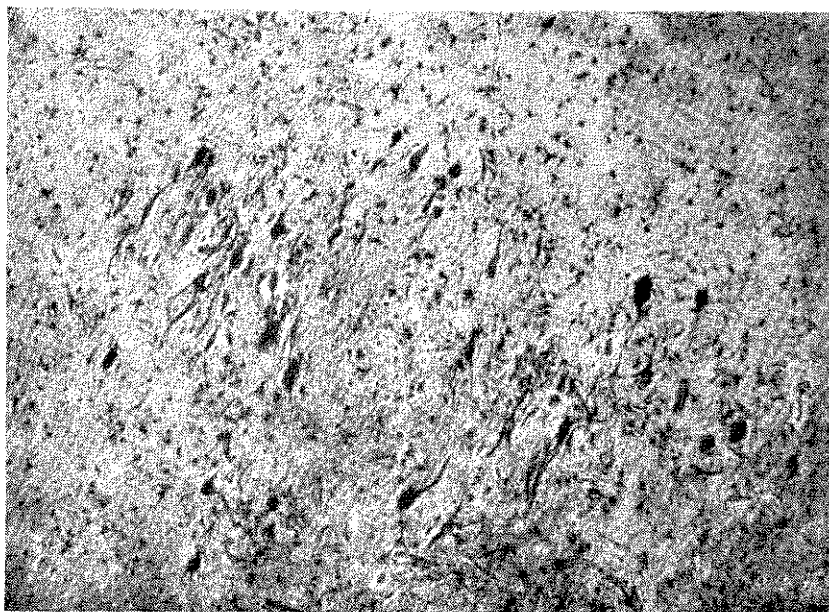


Fig. 32 — CASO III — Lesão tuberosa. Ninho de células e.t. na substância branca sub-cortical (*Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 4. Col. Globus*).

o exame dos cortes corados por êle, é de que a espessa faixa gliosa superficial que ocupa e substitui tôda a área da camada molecular muito deve contribuir para a consistência firme, por vêzes lenhosa, das lesões. Não se distinguem astrocitos protoplásmicos de fibrilares, parecendo todos, se não iguais, semelhantes, devendo

as diferenças morfológicas ser, antes, atribuídas aos processos degenerativos que os acometem.

*Nissl* — Por êste método destacam-se bem as células e.t. sôbre um fundo azul claro, semeado de núcleos dos elementos gliais. As células monstruosas e.t. apresentam, em geral, o núcleo visível com

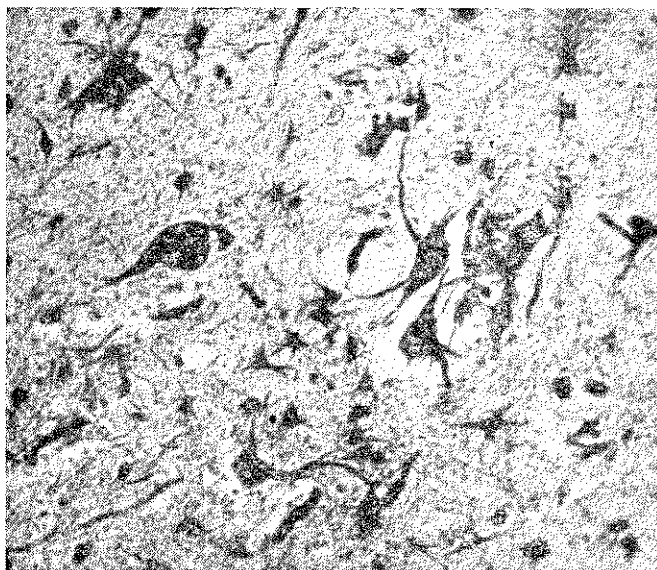


Fig. 33 — CASO IV — Idem fig. anterior. Ao grande aumento, nota-se a variedade de morfologia que as células apresentam (*Microf. Zeiss, obj. 20, oc. 8. Col. Globus*).

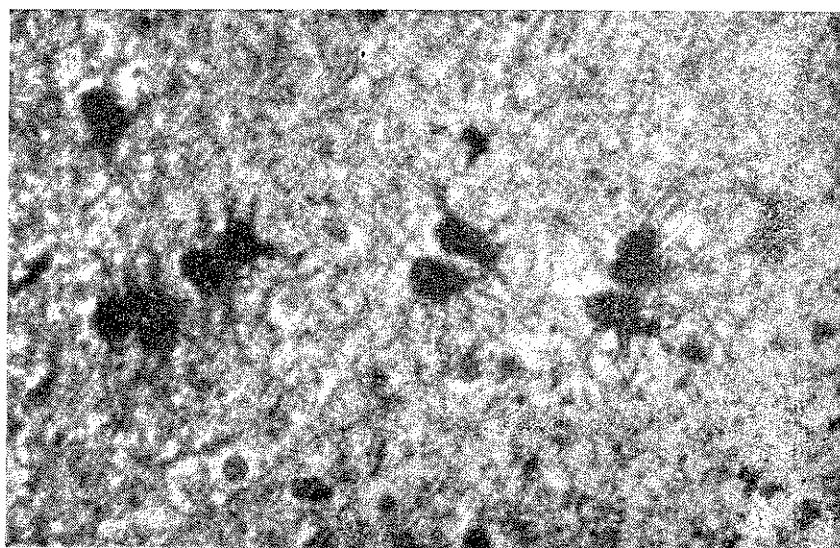


Fig. 34 — CASO III — Lesão tuberosa. Hiperplasia e hipertrofia da astroglia. Figuras de divisão (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 10. Col. Globus*).

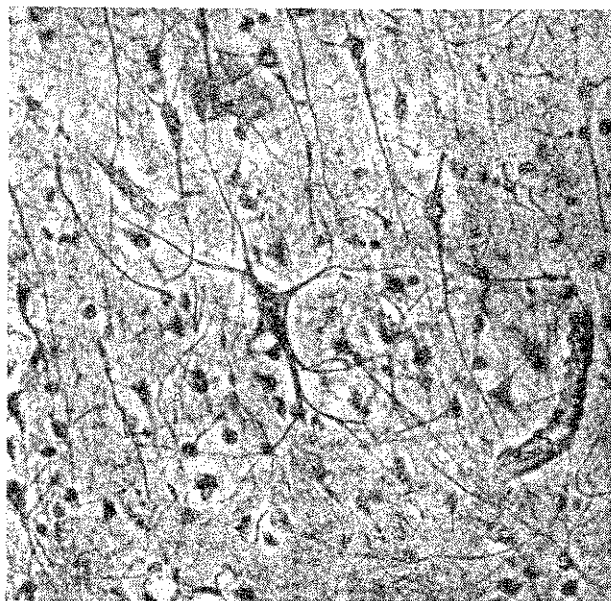


Fig. 35 — CASO I — Lesão tuberosa. Célula e.t. de aspecto neuroblástico no córtex. Notar suas relações com os vasos e a desorganização da citoarquitetura da região (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 5. Col. Bielsch.*).

seu nucléolo, mas o citoplasma é uniforme e amorfo, não se percebendo a substância cromófila (tigróide) de Nissl. Por vêzes, tais elementos coram-se apenas fracamente, apresentando-se como sombras celulares. Nas zonas afetadas, o córtex apresenta profunda alteração da citoarquitetura e intensa rarefação das células nervosas normais. As células e.t. são encontradas tanto na camada cortical como na subcortical, em plena substância branca. Não encontramos células nervosas normais fora de sua sede habitual.

**Comentário:** apesar de as células se corarem por este método, não apresentam características tintoriais que permitam estabelecer sua natureza neuroblástica. Ressalta a desorganização e a rarefação das camadas celulares corticais nas áreas lesadas.

*Bielschowsky* — Os cortes estão bem impregnados pela prata. As células que povoam a camada molecular, já descritas e que sabemos serem de natureza glial, estão coradas, ainda que o núcleo e o citoplasma menos intensamente. Entre elas

aparecem algumas células e.t. Nas demais camadas do córtex e na substância branca subcortical (eixo da circunvolução) tais células aparecem em grande número, de tamanho monstruoso, algumas de aspecto estrelado, com dendritos grossos e muito ramificados, outras globosas e sem ramificações visíveis. Nas primeiras, constata-se um aparelho neuro-fibrilar grosseiro, em geral fasciculado em lugar de reticulado, no citoplasma, que se estende pelos dendritos, formando por vêzes traços tangenciais ao núcleo, que de um dendrito passam em ponte para outro; nas segundas, o citoplasma é uniforme e amorfo e o núcleo é bem visível, o que nem sempre acontece nas primeiras. Entre estes dois aspectos polares, as células e.t. apresentam tôda uma gama de formas intermediárias. Distribuem-se pela lesão formando conglomerados, espécies de ninhos, ou então aparecem isoladas. Quando conglomeradas no córtex, a citoarquitetura normal desta apresenta-se profundamente alterada, podendo chegar mesmo a desaparecer, pois entre os elementos e.t. assim reunidos acontece de não ser visualizado nenhum equiva-



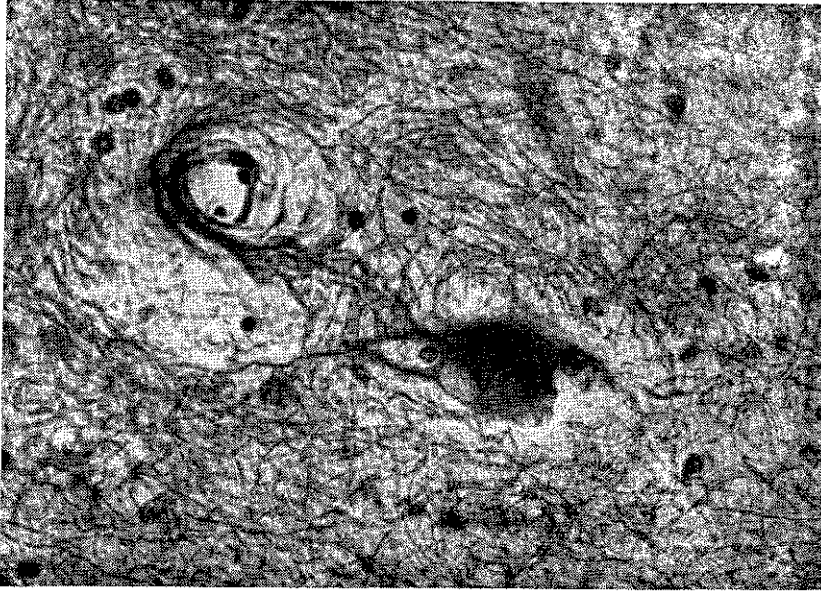


Fig. 36 — CASO IV — Lesão tuberosa. Célula e.t., de morfologia indeterminada, com o núcleo visível, cujos prolongamentos se prendem à parede de um vaso. Trama tecidual grosseira. (Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 10. Col. Bielsch.).

lente celular nervoso normal. A trama vascular é muito rica e constituída por canais pequenos e tortuosos, de paredes mais espessas do que o normal, de aspecto rígido. É sempre muito estreita a relação de vizinhança entre as células e.t. e estes vasos. Fora das áreas lesadas, o corte também apresenta grande riqueza vascular, ainda que não tão acentuada como nelas. A trama glial das áreas mais atingidas pelo processo apresenta-se de aspecto tóscio, grossa e pouco ramificada, enquanto que no parênquima normal forma um fino rendilhado espesso. Isto permite distinguir, já ao pequeno aumento, quais as zonas mais intensamente lesadas, pois estas se apresentam de aspecto esponjoso. Alguns elementos e.t. aparecem aparentemente isolados no meio do parênquima normal. Uma observação mais atenta, entretanto, mostra-nos que, mesmo que os elementos circundantes sejam de morfologia normal, sua disposição, isto é, sua cito-arquitetura está alterada. Algumas células e.t. parecem células nervosas gigantescas.

**Comentário:** por este método, que é o que melhor nos dá idéia de conjunto do

processo, verificamos: 1) o aparelho neuro-fibrilar não é o das células nervosas normais; 2) a trama glial das áreas atingidas pela enfermidade está substancialmente alterada; 3) nas áreas mais atingidas há rarefação das camadas corticais e alteração da cito-arquitetura; esta última aparece mesmo quando os elementos e.t. se apresentam isolados; 4) confirma-se a estreita relação das células e.t. com os vasos; 5) é bem patente que a trama vascular está alterada na região.

*Weil* — Por este método, já a olho nu, percebe-se que há desmielinização das fibras de projeção que partem das regiões corticais atingidas pelo processo. O exame microscópico simplesmente confirma esse achado.

*Penfield* — As células e.t. coram-se bem pelo método, sem que, entretanto, se consigam detalhes de sua estrutura. Nota-se sua estreita relação com vasos de paredes espessas e aspecto rígido a tal ponto que, num corte histológico qualquer, podemos encontrar as áreas mais afetadas pelo aspecto peculiar da trama vascular.

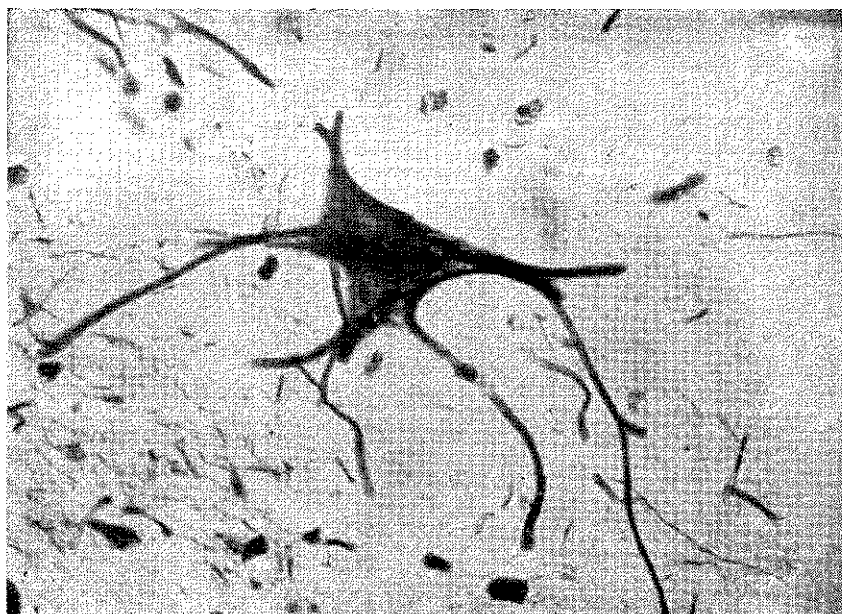


Fig. 37 — CASO I — Lesão tuberosa. Célula e.t. de aspecto neuroblástico. Aparelho neurofibrilar grosseiro. Prolongamentos tôscos (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 10. Col.*)

**Comentário:** as células e.t. poderiam, portanto, ser elementos monstruosos de microglia.

*Perdrau e Gomori* — Os cortes corados por êstes métodos oferecem resultados que se superpõem, variando apenas na coloração do fundo que, sendo mais clara no Perdrau, mostra os vasos com sua trama reticular em maior destaque. Chama a atenção a grande riqueza desta trama, muito maior do que nos cortes normais de cérebro ou de áreas não afetadas pela enfermidade do mesmo caso. Entretanto, nestas também há um sensível aumento da vascularização, se comparadas a fragmentos de um cérebro normal corados pelo método em questão. Além da maior abundância de vasos, de grossa trama reticular, êstes são de parede espessa, de endotélio alto e dão a impressão de condutos rígidos. A trama do tecido nervoso não aparece, o que serve de teste para a boa qualidade da impregnação — apresenta-se o tecido nervoso como um manto de coloração pardacenta uniforme, semeada de núcleos. As células e.t. não estão coradas.

**Comentário:** o método põe bem em evidência que a vascularização das áreas

tuberosas é patológica, do tipo de mal-formação.

*Sudan III* — Não há particularidades dignas de menção.

#### b) *Pequenos tumores ventriculares*

Os cortes corados pelos mesmos métodos empregados no estudo das tuberosidades corticais revelaram que os tumores ventriculares correspondem em tudo às lesões que acabamos de descrever, nada mais sendo, portanto, do que tuberosidades salientes nas cavidades ventriculares.

### 3. Cerebelo

O exame histológico confirmou a ausência de lesões de Esclerose Tuberosa. Sômente foi encontrada maior riqueza da vascularização.

#### COMENTARIOS GERAIS SÔBRE OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NAS LESÕES ENCEFÁLICAS

Em primeiro lugar, não há sinais de tumor. Com efeito, se, por um lado, as células e.t. são monstruosas, por outro,

não apresentam nenhum outro sinal de natureza blastomatosa como, por exemplo, mitoses (nem típicas e nem atípicas), aumento da afinidade tintorial do núcleo, autonomia celular (pelo contrário, vimos como as células e.t. estão sempre ligadas

aos vasos e à trama glial do tecido) e, sobretudo, não reproduzem o aspecto de células de nenhum momento das linhagens do tecido nervoso ou de outros tecidos, como sempre acontece com os elementos blastomatosos (o que constitui a

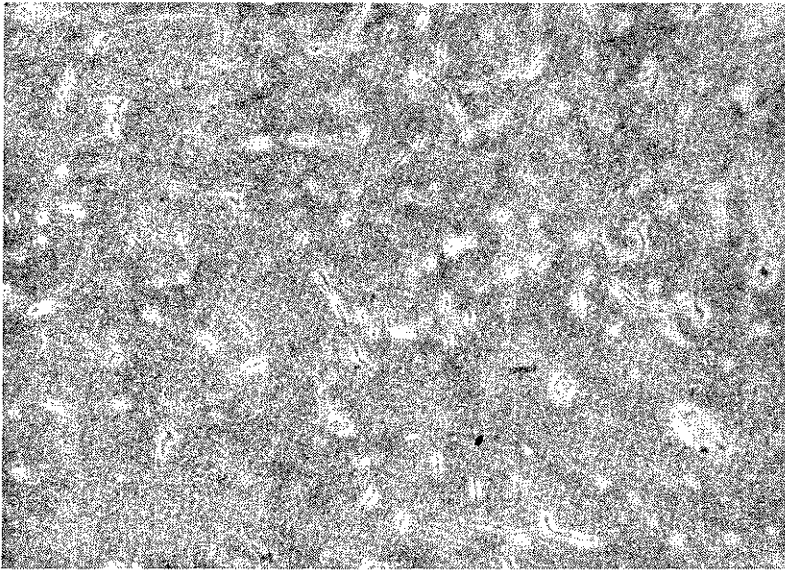


Fig. 38 — CASO I — Trama vascular de lesão tuberosa. Notar grande riqueza de vasos que se apresentam espessados e de aspecto rígido (*Microf. Zeiss, lupa. Col. Perdrau*).



Fig. 39 — CASO I — Idem fig. anterior (*Microf. Zeiss, obj. 2,5, oc. 8. Col. Perdrau*).

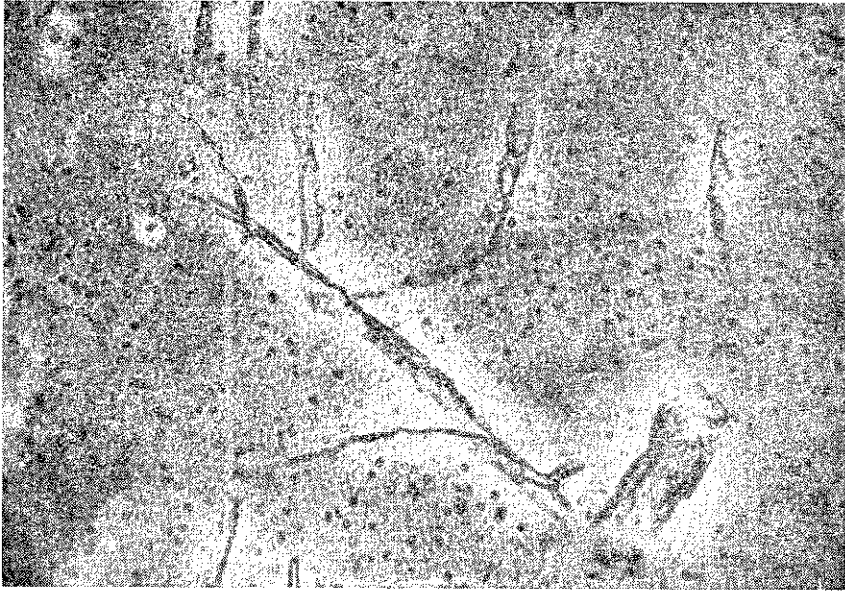


Fig. 40 — CASO I — Idem fig. anterior (Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 4. Col. Perdrau).

base da classificação histogenética dos tumores, universalmente adotada). Com efeito, a guiar-se pela morfologia para definir a natureza das células, se algumas vezes elas se assemelham ao equivalente celular do neurônio, outras, parecem-se muito com astrocitos gigantes e, ainda, muitas vezes, são elementos alongados com ramificações curtas que lembram células em bastonete gigantes (elementos microgliais). De modo que, pela morfologia, não podemos defini-las como pertencentes a u'a mesma linhagem, pelo contrário, somos levados a considerá-las elementos de diferentes linhagens (neuroblástica, espongiblastica e mesenquimal). Pelos métodos de coloração também nada podemos concluir quanto à sua natureza; tais células coram-se indiferentemente pelos métodos de Nissl (ainda que nunca seja visível a substância tigróide), Globus e Penfield, respectivamente para células nervosas, astroglia e microglia e, além disto, a impregnação argêntica pelo método de Bielschowsky ora mostra um aparelho neuro-fibrilar, se bem que grosseiro, ora não, o que também fala a favor de derivarem elas de linhagens diferentes.

Concluimos, pois, que as células e.t. não são tumorais, mas elementos degenerados dos próprios constituintes maduros do tecido nervoso (célula nervosa, macro e microglia).

Quanto à reação glial, já bem marcada na própria camada molecular, sua presença é completamente inespecífica, pois a gliose é o modo de reagir do tecido nervoso a qualquer noxa, seja de natureza circulatória, degenerativa, necrótica ou tumoral. As figuras de divisão (mitose) encontradas revelam simplesmente que o processo era ativo na ocasião da morte, o que explica o caráter evolutivo que a Moléstia de Bourneville pode apresentar.

Chama a atenção nos cortes corados pelos métodos da H.E., de Bielschowsky, Perdrau e Gomori, particularmente por estes dois últimos, a riqueza da trama vascular e o caráter nitidamente disgenético que os vasos apresentam, pois são tortuosos, de parede espessa e aspecto rígido.

#### 4. Medula

O exame histológico comprovou, nos três casos, a ausência de lesões de Esclerose Tuberosa.

## 5. Visceras

Todos os principais órgãos internos dos três casos foram objeto de exame histológico, após inclusão em parafina e coloração pela H.E. Excetuados os rins, nos demais nada encontramos de especial que pudesse ser correlacionado à enfermidade. Entretanto, chama a atenção a riqueza de vascularização que todos eles apresentam.

*Rins* — Os tumores corticais, encontrados nos três casos autopsiados, apresentavam a mesma estrutura, de modo que passaremos a fazer uma só descrição para todos eles.

“Fibromas” corticais — H.E. — Trata-se de um nódulo tumoral, do tamanho de uma ervilha, localizado na cortical do rim, bem distinto do parênquima circunstante, mesmo sem ser dele separado por uma cápsula envolvente. O tumor é constituído por uma neoplasia de natureza vascular, cujos elementos são grandes, polimorfos, fusiformes, ovulares ou poliédricos, de citoplasma eosinófilo, finamente granuloso e núcleo pequeno, arredondado ou ovalar, de cromatina frouxa, pontilhada. Ao poliformismo celular opõe-se a uniformidade da morfologia nuclear. Não são visíveis figuras de mitose típica ou atípica. As células estão em íntima relação com os vasos, dos quais se percebe nitidamente que derivam, vasos ês-

tes que apresentam a parede muito espessa pela presença de diversas camadas de células, nas quais, em geral, não se conseguem distinguir as três encontradas nos vasos normais. De fato, toda a parede vascular é constituída por células muito semelhantes às do próprio parênquima tumoral. Apesar do intenso polimorfismo, a regularidade nuclear e a falta de mitoses definem a natureza benigna da neoplasia, comprovada, ainda, pela falta de caráter invasivo.

*Diagnóstico:* Ângio-mioma.

*Comentário:* os ângio-miomas são considerados mal-formações comuns dos rins e recebem também as denominações de miomas, lipomas, mio-lipomas, fibro-mio-lipomas ou ângio-mio-lipomas, conforme, naturalmente, em sua estrutura predomine o componente vascular, muscular, gorduroso ou fibroso. Entretanto, as células muito características que os compõem são sempre reconhecidas como de indiscutível natureza muscular e consideradas por Apitz como mioblastos anormais.

Tais tumores atingem, por vêzes, dimensões consideráveis, podendo ocupar toda a espessura da cortical e fazer saliência para fora do rim. São considerados por RIOPELLE<sup>62</sup> como a origem dos hipernefomas. Esta hipótese é con-

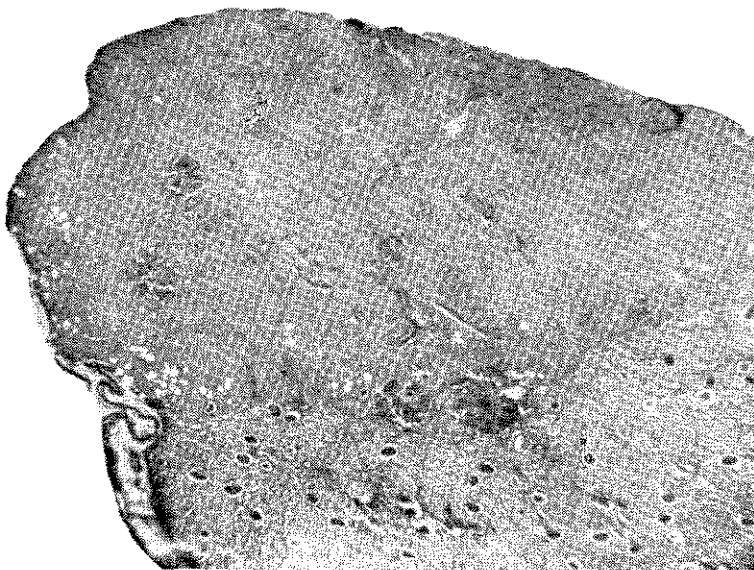


Fig. 41 — CASO II — Tumor da cortical do rim. Ângio-mioma. Aspecto de conjunto (Microf. Zeiss, lupa. Col. H.E.).

siderada bem fundamentada por MASSON<sup>53</sup>, a maior autoridade médica em Oncologia. Isto explica por que nos casos de Esclerose Tuberosa podem ser encontrados êstes ângio-mio-lipomas, as-

sim como hipernefromas. Em nossos casos, a origem vascular dos elementos mióides dos tumores é excepcionalmente evidente, como bem demonstram as microfotografias que ilustram êste trabalho.

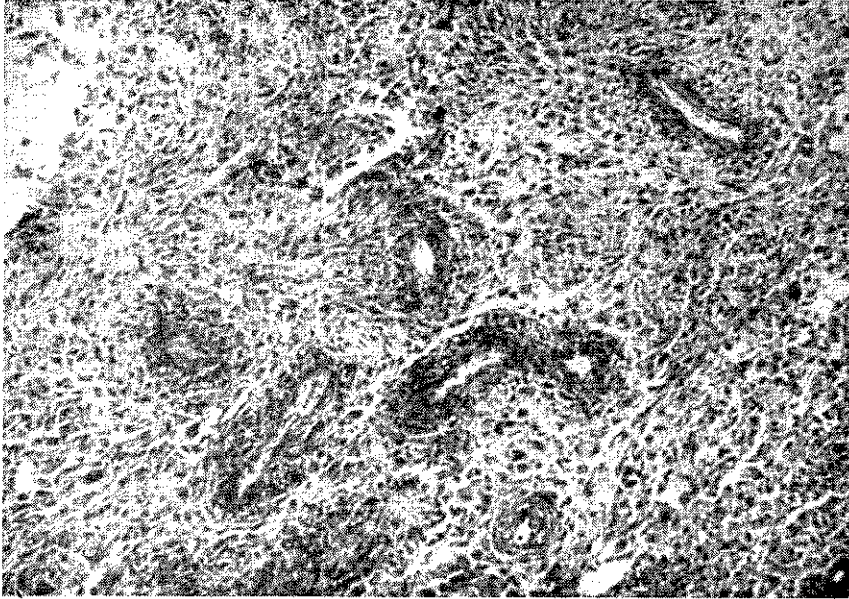


Fig. 42 — CASO II — Idem fig. anterior. Parênquima tumoral, em que se notam os vasos arteriais mal-formados (*Microf. Zeiss, obj. 10, oc. 4. Col. H. E.*).

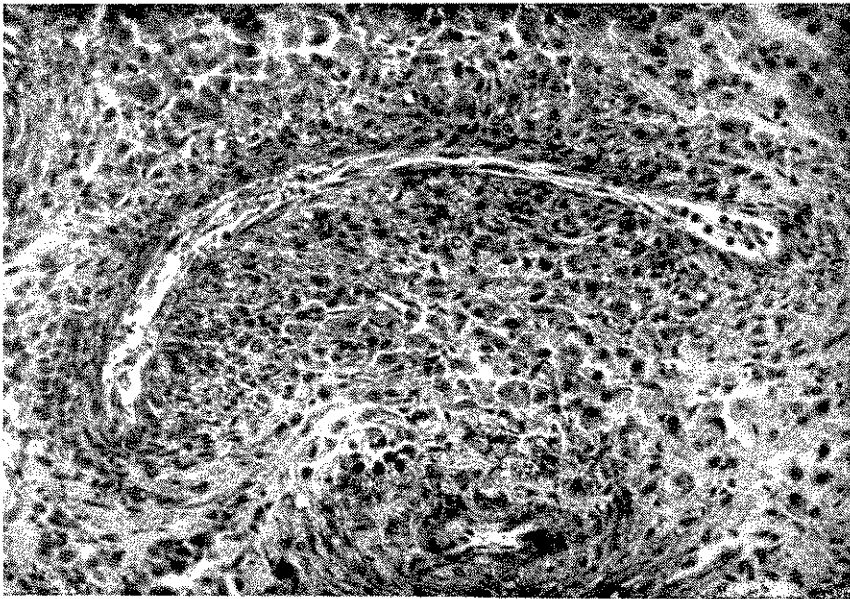


Fig. 43 — CASO II — Idem fig. anterior. Ao maior aumento, nota-se que o parênquima tumoral se continua com a parede de artérias mal-formadas, da qual se origina (*Microf. Zeiss, obj. 20, oc. 4. Col. H. E.*).

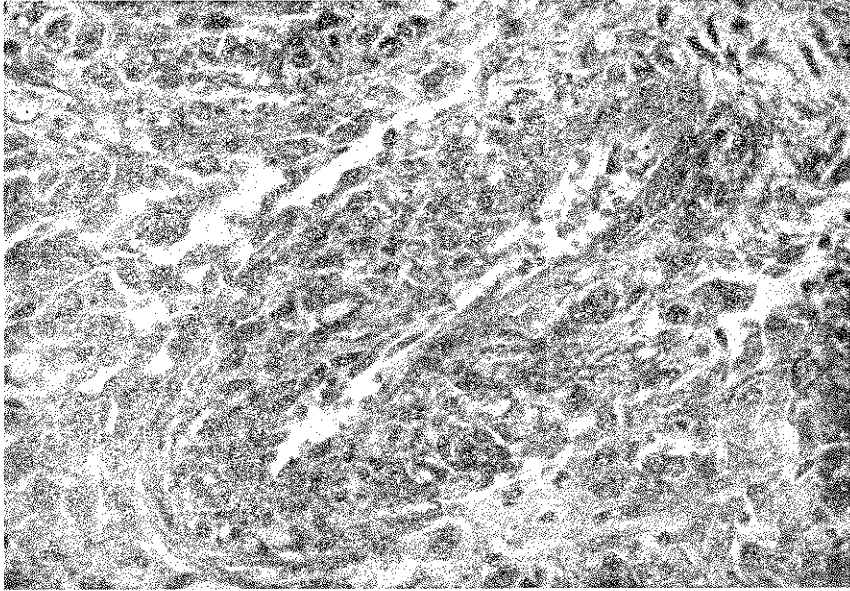


Fig. 44 — CASO II — Idem fig. anterior, em detalhe (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 4. Col. H. E.*).

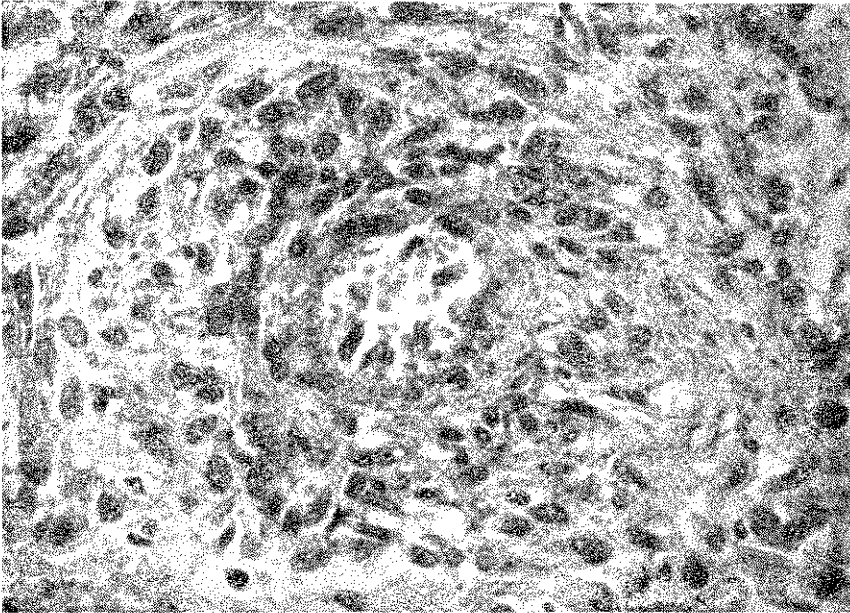


Fig. 45 — CASO II — Idem fig. anterior. Neste vaso, ainda que nitidamente de caráter tumoral mal-formativo, consegue-se distinguir uma camada íntima (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 4. Col. H. E.*).

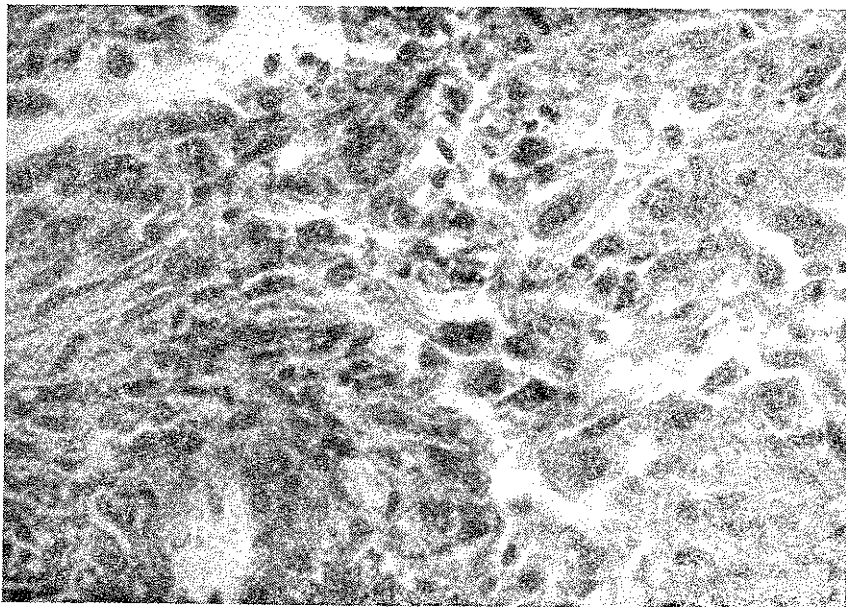


Fig. 46 — CASO II — Idem fig. 41, em detalhe, para mostrar a continuidade dos elementos da parede do vaso com os do parênquima tumoral (*Microf. Zeiss, obj. 40, oc. 5. Col. H, E.*).

#### IV — DISCUSSÃO

Passemos agora à comparação dos dados colhidos em nossa casuística com os fornecidos pela literatura médica nacional e estrangeira, resumidos na parte I dêste trabalho:

##### *Síndromas neurológicas e psiquiátricas*

O grau da oligofrenia variou, em nossos casos, da imbecilidade (casos IV e V) à idiotia (casos I, II e III).

A deficiência mental foi se acentuando gradativamente nos casos I e IV. Não temos informes sôbre o caso II. Estacionou nos casos III e V, pelo menos durante o tempo em que êstes pacientes estiveram internados no Hospital (de 28-11-55 a 3-6-57 e de 17-9-53 até a presente data, respectivamente).

Quanto à idade em que se manifestaram as crises convulsivas, foi de 12 meses nos casos I e III e de 7 dias no caso IV. Não obtivemos informes a respeito dos casos II e V.

O tipo das crises convulsivas foi o de grande mal nos casos I, II e V e de pequeno mal no caso IV.

Quanto ao tipo de personalidade, os casos I, II, III e IV possuíam a epiléptica, enquanto que o caso V apresentou um só episódio de agitação durante todo o tempo em que permaneceu no hospital (10 anos).

Confirmando essa personalidade, os casos I, II, III e IV apresentavam acentuada excitabilidade, com agitação frequente ou mesmo contínua.

Não pudemos avaliar o estado da afetividade em nossos pacientes nos casos I, II e III, pois quando os examinamos encontravam-se em estado de vida vegetativa (idiotia); nos casos IV e V, de imbecis, estava embotada.

Não constatamos psicoses associadas. Também não encontramos manifestações neurológicas de importância em nenhum caso.



### *Alterações de desenvolvimento*

**Alterações de desenvolvimento corpóreas** não foram verificadas em nenhum de nossos pacientes.

**Alterações de desenvolvimento cerebrais** foram constatadas macro ou microscòpicamente em todos os 3 casos autopsiados.

Quanto às **alterações esqueléticas**, conseguimos fazer o estudo radiológico nos casos I, IV e V; somente encontramos hiperostose frontal interna no caso V. A idade óssea foi sempre normal.

### *Lesões cutâneas*

**Apareceram** aos dois anos no caso IV e mais ou menos aos 10 anos, no caso I. Não obtivemos dados a respeito nos casos II, III e V.

Os **adenomas sebáceos simétricos da face** eram do tipo Pringle nos casos I, III, IV e V e do tipo Hallopeau-Lerèdde no caso II.

Os **tumores de Koenen** foram constatados somente no caso V.

Em nenhum caso foram verificadas a *peau de chagrin* ou outras formações cutâneas de natureza semelhante.

### *Tumores viscerais*

Nos 3 casos autopsiados, encontramos **tumores renais** benignos (ângio-mio-fibro-lipomas).

Não apareceram **tumores do coração ou de outros órgãos**.

### *Lesões oculares*

**Facoma da retina** existia no caso I, encontrado em autópsia e, muito provavelmente, no caso V constituía a lesão verificada clinicamente.

No caso IV, o exame oftalmológico revelou **degeneração edematosa da retina** do olho esquerdo.

### *Anatomia patológica*

Nossos achados concordam, em geral, com os dos autores que se dedicaram ao

estudo do assunto. Em resumo, encontramos:

1. No **sistema nervoso**, lesões cerebrais inclusive das paredes dos ventrículos. Nos três casos necropsiados, não havia lesões cerebelares, do tronco cerebral ou medulares;

2. Nos demais **órgãos**, tumores renais.

### *Histologia patológica*

Também neste campo, nossos achados se sobrepõem aos dos autores que trataram do assunto; só que êstes não fazem, em geral, referência ao caráter mal-formativo dos vasos encefálicos e às suas relações estreitas com os ninhos de células e.t. das lesões tuberosas, ou então, quando se referem a êsse caráter não lhe atribuem a importância que nós lhe damos.

### *Etiologia e patogenia*

Quanto à etiologia, nada conseguimos apurar.

Quanto à patogenia, baseados nos dados clínicos e anátomo-patológicos, desejamos discutir mais detalhadamente o assunto:

Vimos que as diferentes colorações empregadas no estudo das tuberosidades encefálicas revelam que **as células e.t.** apresentam características tintoriais tanto do equivalente celular do neurônio (célula nervosa), como da astrogliá ou da microglia, respectivamente de origem neuroblástica, spongeoblástica e mesenquimal.

Também vimos que, do ponto de vista morfológico, seu aspecto reproduz, indiferentemente, o de qualquer desses três elementos.

Isto nos levou à conclusão de que as células e.t. nada mais são do que elementos degenerados dessas três linhagens e não neoplásicos. Com efeito, não constituiriam as células e.t. o primeiro exemplo de células degeneradas de aspecto monstruoso. No tecido muscular estria-

do, esquelético ou cardíaco, os exemplos são relativamente comuns.

Mas, qual o mecanismo do processo degenerativo? Aachamos que seja uma perturbação circulatória, devida à mal-formação do território vascular correspondente, o que se evidencia pela presença de vasos de paredes grossas e aspecto rígido, em quantidade excepcional. A presença destes vasos já fora assinalada por FERRARO *et alii*<sup>36</sup>, autores êsses que assinalam também fenômenos degenerativos da astroglia, referindo-se à presença de "hypertrophic astrocytes undergoing degenerative changes" e chamam a atenção para as calcificações existentes nas lesões. Ora, sabemos da Patologia Nervosa que as calcificações constituem sempre expressão de um distúrbio circulatório. Ainda que nós não tenhamos encontrado tais calcificações, elas pertencem ao quadro geral da enfermidade, conforme referimos no Capítulo I.

Quanto à rarefação das células nervosas, pode ser encarada de dois modos: 1.º conseqüência pura e simples da perturbação circulatória; figuras de neurofagia já foram observadas por outros autores, inclusive pelo próprio FERRARO *et alii*<sup>36</sup>; 2.º alteração da embriogênese, caso em que a perturbação circulatória, iniciando-se no período embrionário, deveria influir na neurogênese; isto é perfeitamente admissível, considerando que a vascularização do sistema nervoso se dá aos dois meses e meio da vida embrionária, precedendo imediatamente a diferenciação e "migração" dos neuroblastos. Ora, se há alteração de desenvolvimento dos vasos e se a diferenciação e migração dos neuroblastos está na imediata dependência da vascularização embrionária, é fácil de se entender que esta condicione aquela. Assim, explicamos facilmente as heterotopias de substância cinzenta. Compreende-se, também, o quadro descrito por Pellizi como "histioatipia cortical disseminada".

A reação da glia, conforme já dissemos, é inespecífica e tanto aparece nas degenerações como nas necroses ou nas neoplasias. Essa reação, que comprovamos ainda ativa em nossos casos pela presença de figuras de amitose (que é

como a glia normalmente se reproduz), indica processo em evolução. Do ponto de vista clínico, os casos I e IV confirmam a natureza evolutiva da enfermidade, o que é, aliás, conhecido na literatura. Ora, considerando-se o distúrbio fundamental de natureza vascular mal-formativa, é compreensível êsse caráter da Esclerose Tuberosa: as alterações de desenvolvimento vascular determinam perturbações metabólicas que levam à degeneração os elementos do tecido nervoso e, a esta, segue-se a reação glial. Ainda mais, as alterações de desenvolvimento constituem sempre *loci minoris resistentiae* do organismo, portanto, pontos eletivos de ação dos mais diferentes processos orgânicos, de causa física, química ou biológica. Quando isto acontece, inflamam-se, e a inflamação do sistema nervoso traduz-se, principalmente, pela gliose.

Quanto à opinião dos autores que acham que o processo se instala tardiamente na vida embrionária, porque **respeita os sulcos das circunvoluções**, encarando-o da maneira como o estamos fazendo, fica explicado o fato, mesmo que se instale, como aachamos, aos dois meses e meio de vida intra-uterina: no decorrer desta, apenas se processam os distúrbios da "migração" dos neuroblastos; as tuberosidades desenvolvem-se por causa dos fenômenos degenerativos e inflamatórios, em decorrência da deficiente irrigação fornecida pelos vasos mal-formados, e porque os territórios por êstes irrigados constituem *loci minoris resistentiae* e, assim, estão facilmente expostos às noxas físicas, químicas e biológicas.

Os distúrbios da "migração" dos neuroblastos explicam a **oligofrenia**; os fenômenos degenerativos e inflamatórios, o **caráter evolutivo** que a enfermidade pode apresentar, como nos nossos casos de números I e IV.

Por outro lado, os casos estacionários do ponto de vista psíquico, como os nossos III e V, ficam explicados, o que não seria possível se admitíssemos a teoria neoformativa.

Assim, quanto às lesões encefálicas e ao quadro clínico delas decorrente, se considerarmos a mal-formação vascular como o distúrbio fundamental, ficam per-

feitamente compreensíveis. E os demais componentes do quadro da moléstia como, principalmente, os adenomas sebáceos da face, os tumores de Koenen, os tumores renais e os do coração?

Quanto aos tumores da face, já vimos, nos comentários sobre a histopatologia dos mesmos, que consideramos as angiectasias como a lesão fundamental, porque explica, pelas perturbações circulatórias que provoca no tecido, tôdas as demais lesões encontradas, como a pigmentação, a hipersecreção sebácea, a hiperplasia das glândulas sebáceas, a elevação das papilas, a reação conjuntiva etc. e as diferentes variações que êsses tumores apresentam (tipo Pringle, tipo Hallopeau-Lerède etc.). O mesmo expusemos a respeito dos tumores de Koenen.

Quanto aos tumores renais, benignos ou malignos, também vimos que sua natureza é essencialmente vascular mal-formativa, pois o parênquima tumoral se origina de vasos mal-formados e, particularmente, da camada média (muscular) de artérias disgenéticas.

E quanto ao rabiomioma do coração? Em nenhum de nossos três casos autopsiados êle apareceu, mas, que é o miocárdio senão a camada média, muscular, de um grande vaso, tanto embriológica como anatômica, histológica, fisiológica e patologicamente? E, como é sabido de todos, o rabiomioma é justamente o tumor maturo de fibras musculares cardíacas e o rabiomiossarcoma, seu correspondente maligno.

Quanto aos facomas retinianos, que um dos nossos casos apresentava, infelizmente um descuido do técnico o pôs a perder e não pudemos realizar seu exame histopatológico. Mas, a descrição feita pelo oftalmologista, no caso V, de um tumor retiniano encontrado no O.E., com tôda probabilidade um facoma, diz que “na região da artéria nasal superior do O.E. foi observada uma elevação côr de ardósia (tumor?). A artéria acha-se esclerosada”, o que é bem expressivo, pois o provável tumor está em conexão com a artéria e esta acha-se esclerosada. Note-se que se trata de uma paciente que na ocasião do exame tinha 25 anos, portanto, é bem possível que seu aspecto corresponda ao que observamos nos vasos ce-

rebrais dos casos autopsiados, isto é, que a alteração vasal seja uma alteração de desenvolvimento e não arteriosclerose. O facoma, em si, é uma lesão tuberosa. Sabemos que o epitélio retiniano é um neuro-epitélio e em tudo corresponde ao córtex cerebral.

Dêste modo, em tôrno de uma alteração vasal primitiva, conseguimos agrupar todos os principais sintomas da moléstia.

Sem dúvida, muita coisa resta para ser verificada e o mecanismo patogênico que damos precisa ser comprovado nas outras lesões que não aparecem em nossos casos, como os tumores cardíacos. Nas lesões que nos foi dado estudar, êsse mecanismo satisfaz por inteiro, se as tomarmos individualmente. Mas, se as tomarmos em seu conjunto, algumas dúvidas podem surgir. Por exemplo, por que as lesões encefálicas evolutivas são degenerativas e as renais, neoplásicas, quando o distúrbio fundamental é o mesmo? São fatos que estão a requerer mais estudos. Uma hipótese, entretanto, pode ser aventada:

Um distúrbio da embriogênese de um determinado tecido, processando-se em órgão da mesma linhagem, predisporia êsse órgão ao aparecimento de tumores disgenéticos (seria o que, em Patologia Geral, se conhece pela denominação “factor realizante” de um tumor), de modo que a mal-formação vascular nos rins predispõe-n’os ao aparecimento de tumores (ângio-fibro-mio-lipoma e hipernefro-ma), por serem os vasos e os rins da mesma linhagem (mesoderme); enquanto que o mesmo distúrbio, processando-se em órgão de linhagem diferente, não teria essa ação “realizante” oncogena; no caso do encéfalo, a mal-formação vascular apenas provocaria, através dos mecanismos já expostos, lesões degenerativas e inflamatórias.

Outro fato que reclama explicação é: por que pacientes portadores de extensas lesões em áreas motoras, como os nossos casos de números I, II e III, não apresentaram sintomas neurológicos, pelo menos imponentes? Podemos, também aqui, aventar uma explicação:

As lesões das células nervosas, sendo de natureza degenerativa, não implicam em função abolida mas apenas alterada. O fato é que, se fôsseis neoplásicas, isto não poderia acontecer.

### *Hereditariedade*

Não pudemos fazer estudo apropriado do assunto. Limitamo-nos a colher dados anamnésticos, sempre que nos foi possível.

Nada apuramos nos casos II e V por falta de informes.

No caso I e III não havia referências a neuro-psicopatias entre os familiares.

No caso IV havia evidente tara neuro-psicopática na família, eis que o pai do paciente era de temperamento impulsivo-violento, a mãe sofrera dois episódios psicóticos e uma tia paterna apresentara hemiplegia desde a juventude.

Quanto à *raça*, o caso I era de indivíduo pardo, os casos II, III e IV, de brancos, e o caso V, de negro.

### *Evolução*

Do ponto de vista psíquico, os casos I e IV apresentaram caráter evolutivo e os III e V, estacionário. O caso II, que

ficou no hospital apenas poucos dias antes do falecimento, não nos forneceu elementos para avaliar o assunto.

Do ponto de vista físico, os casos I, II e III tiveram evolução desfavorável, enquanto que os de números IV e V, ainda vivos, gozam de bom estado geral de saúde.

Quanto ao *modo de morte*, esta deu-se em caquexia nos casos I e III, em estado de subnutrição no caso II e, ainda, no decorrer de crise convulsiva nos casos I e II.

Quanto à *causa da morte*, esta foi caquexia no caso I, broncopneumonia no caso II e polioencefalite superior hemorrágica de Wernicke no caso III.

### *Terapêutica*

A terapêutica que empregamos foi a clássica anti-convulsivante, aliada a cuidados gerais. Não conseguimos fazer a radioterapia preconizada por FRIEDMAN<sup>87</sup>.

## V — CONCLUSÕES

1. A Esclerose Tuberosa resulta de um distúrbio da embriogênese vascular e, portanto, do folheto médio (mesoderme), processo que pode ser denominado “*dis-mesodermia vascular*”.

2. A disontogenia instala-se no sistema nervoso, muito provavelmente, no momento em que se processa sua vascularização, isto é, aos dois meses e meio de vida embrionária.

3. Dêsse distúrbio resultam, nesse sistema, durante a vida embrionária, alterações na diferenciação e “*migração*” dos neuroblastos, com conseqüente “*histioatipia cortical disseminada*” e, do ponto de vista clínico, oligofrenia.

4. Dêsse mesmo distúrbio resultam, no decorrer da existência: a) perturbações metabólicas que condicionam fenô-

menos degenerativos nos elementos das diferentes linhagens do tecido nervoso, o que se manifesta, microscopicamente, pelo aspecto monstruoso que tais elementos adquirem; b) processos de natureza inflamatória; ambos determinam o caráter evolutivo que a enfermidade pode apresentar, tanto do ponto de vista clínico, quanto anatômico.

5. Na pele, os adenomas sebáceos simétricos da face, com tôdas as suas variedades, e os tumores de Koenen decorrem de mal-formações vasculares dos territórios atingidos.

6. Os tumores renais, igualmente, originam-se de vasos mal-formados.

7. Quando a moléstia se manifesta nos demais órgãos, o processo patogênico fundamental deve ser provocado por um distúrbio da embriogênese vascular.

## RESUMO

Os autores estudaram cinco casos de Esclerose Tuberosa, dos quais três foram autopsiados. A partir das lesões cutâneas, suspeitaram de que o processo fôsse essencialmente uma perturbação metabólica do tecido dos órgãos atingidos devido a mal-formações vasculares. O estudo das lesões encefálicas reforçou tal hipótese. Com efeito, o exame microscópico de cortes corados pelos métodos clássicos para estudo das células nervosas, da glia e dos vasos revelaram que as células monstruosas da Esclerose Tuberosa são

elementos degenerados das três linhagens que dão origem ao tecido nervoso e, por outro lado, mostraram que, à semelhança do que acontece na pele, os vasos desse tecido são mal-formados nessa doença. Finalmente, o estudo dos tumores renais revelou sua indiscutível origem de vasos mal-formados. Com base em tais achados, armaram nova concepção patogênica para sua explicação, enquadrando tôdas as manifestações da doença.

## RÉSUMÉ

Les auteurs présentent cinq cas de Sclérose Tubéreuse, dont trois avec examen anatomo-pathologique macro et microscopique complet, et les deux derniers avec biopsies des lésions cutanées.

Du point de vue clinique, on a pu recueillir de nombreuses données intéressantes, les plus importantes étant: dans aucun des cas ne furent signalées de manifestations neurologiques d'importance; il y avait hyperostose frontale interne dans un des cas; les adénomes sébacés symétriques de la face étaient du type Pringle dans quatre cas, et du type Hallopeau-Lerédde dans le dernier; dans un cas il y avait les tumeurs péri-unguéales de Koenen; dans un cas on notait une dégénérescence oedémateuse de la rétine, et, dans un autre, selon toute probabilité, un phacoma rétinien (cas examiné sur un sujet vivant et non après autopsie); les patients étaient trois blancs, un mulâtre et un noir; pour deux des trois patients décédés, la mort survint au cours d'une crise convulsive.

Du point de vue anatomo-pathologique, on trouva les lésions classiques de la maladie dans le cerveau; on pouvait en outre signaler qu'il n'y avait pas de lésions du cervelet, du tronc cérébral, ni de la moëlle; on trouva dans chacun des cas des tumeurs rénales (angio-myo-fibro-lipômes) bénignes; pas de tumeurs cardiaques; un phacoma rétinien dans un seul cas; la cause de la mort fut une

cachéxie dans un cas, une broncho-pneumonie dans un autre, et une polio-encéphalite supérieure hémorragique de Wernicke dans le dernier.

Quant à l'étiologie, rien ne put être conclu définitivement.

Quant à la pathogénie, les auteurs s'estiment autorisés à avancer une nouvelle théorie, basée sur les faits suivants, observés dans l'étude *in vivo* et *post-mortem* des cas présentés:

1. L'histopathologie des deux types de lésions cutanées caractéristiques de la Sclérose Tubéreuse, c'est-à-dire, les adénomes sébacés symétriques de la face et les tumeurs péri-unguéales de Koenen, révèle la présence d'une lésion élémentaire — les angiectasies — commune non seulement aux deux types mais encore à différentes variétés du premier type (Pringle, Hallopeau-Lerédde etc.), lésion vasculaire mal-formative qui peut, par les perturbations circulatoires qui en sont la conséquence, expliquer les autres lésions élémentaires rencontrées en quantités et degrés variables dans chaque cas, comme l'hypersécrétion sébacée, l'hypercératose, la congestion, les digitations papillifères, l'accumulation de pigment mélanique etc.

2. L'histopathologie des lésions cérébrales, en dehors du cadre déjà connu (gliose, avec figures d'amitose, raréfaction des cellules nerveuses, ectopie de matière grise, trame gliale grossière et

raréfiée etc.) révèle que les cellules monstrueuses de la Sclérose Tubéreuse (que les auteurs finirent par appeler "cellules S.T." pour simplifier) présentent les caractéristiques tinctoriales aussi bien de l'équivalent cellulaire du neurone (cellule nerveuse), que de l'astroglie ou de la microglie, respectivement d'origine neuroblastique, spongéoblastique ou mésenchymale; quant à la morphologie, son aspect reproduit, indifféremment, l'aspect de n'importe lequel de ces trois éléments.

Outre tout ceci, on a pu vérifier la présence de vaisseaux à parois grosses et d'aspect rigide, en quantité exceptionnelle, évidemment mal formés.

Ceci conduisit les auteurs à la conclusion que les cellules S.T. ne sont rien de plus que des éléments dégénérés de ces trois lignages et non pas des éléments néoplasiques, la dégénérescence en question étant due aux perturbations circulatoires consécutives à la malformation du territoire vasculaire.

3. L'histopathologie des tumeurs rénales révèle qu'il s'agit toujours d'angio-myofibro-lipômes, dont l'origine s'établit indiscutablement à partir de la couche moyenne de vaisseaux malformés.

Les auteurs formulent ainsi l'hypothèse que la Sclérose Tubéreuse serait la conséquence d'une "dysmésodermie vasculaire". La perturbation embryogénique s'installerait à la dixième semaine de la vie intra-utérine; au cours de celle-ci, en conséquence, cette perturbation provoquerait dans le système nerveux un processus d'altération de la "migration" des neuroblastes, donnant l'"histoatypie corticale disséminée" (PELLIZZI), car cette migration (et différenciation) se produit immédiatement après la vascularisation dudit système.

Les tubérosités se développeraient au cours de l'existence en raison de phénomènes dégénératifs (cellules S.T., dégénérescence graisseuse des astrocytes, calcifications etc.) et inflammatoires (hyperplasie de la glie, avec des figures d'amitose, épaissement de la leptoméninge), en conséquence de l'irrigation déficiente fournie par les vaisseaux mal formés et parce que les terrains irrigués par ceux-ci constituent des "loci minoris resistentiae" de l'organisme et deviennent ainsi facilement exposés aux agents nocifs les plus variés, physiques, chimiques et biologiques.

Les angio-myofibro-lipômes prenant origine de vaisseaux mal-formés, le rhabdomyôme et le rhabdomyosarcome du coeur étant des tumeurs formées dans la couche moyenne d'un grand vaisseau (on peut considérer le coeur comme tel) et l'hypernéphrome étant la forme maligne des angio-myofibro-lipômes (RIOPELLE), toutes ces manifestations tumorales communes à la maladie peuvent être reliées aux vaisseaux, comme peuvent l'être également les manifestations cutanées et nerveuses ainsi qu'il a déjà été expliqué.

De cette manière, et pour la première fois, la Sclérose Tubéreuse reçoit une explication pathogénique uniciste et de nombreuses caractéristiques déconcertantes de la maladie, comme, par exemple, l'arrêt de l'évolution des symptômes psychiques ou bien alors la coexistence de lésions cérébrales, oculaires, cutanées, rénales et cardiaques, trouvent une explication adéquate.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs.: Antônio James Brandi, que cedeu o material autóptico do caso II, e Hélio Machado, que lhes facultou o estudo da paciente do caso V.

#### BIBLIOGRAFIA NACIONAL

1. ARTOM, M. & CERRUTTI, H. — Os adenomas simétricos da face. Anais do II Congresso Médico Paulista 2:307-32, 1945.
2. AUSTREGÉSILO, A.M. — Neurodisplasia e esclerose tuberosa. Tese do curso para catedrático de Clínica Neurológica na Faculdade de Medicina da Universidade de Recife. Recife, 1944.
3. CUNHA, A.A., PEREIRA, C.C.A. & BENNINI, A. — Moléstia de Bourneville. Apresentação de um caso. Rev. Paul. Med. 50:389, 1957.
4. ELEJALDE, P. & BARRETO NETTO, M. — Contribuição ao estudo histopatológico da esclerose tuberosa. Arq. Brasil Med. 35:421-39, 1945.
5. GARCIA, J.A. — Compêndio de psiquiatria. Rio de Janeiro, Ateneu, 1954.

6. GRIECO, V. — Estudo anatomo-clínico sobre nove casos de "adenomas sebáceos symétricos da face" (Balzer-Menétrier). Rev. Assoc. Paul. Med. 8:99-115, 1936.
7. MAFFEI, W.E. — As bases anatomopatológicas da neuropsiquiatria e psiquiatria. São Paulo, Imprensa Metodista, 1951.
8. NAVARRO, C. — Esclerose tuberosa. Cultura Med. (Rio de Janeiro) 8(1):58, 1946.
9. NOETZEL, H. & NOETZEL, C. — Observations anatomo-cliniques sur la sclérose tubéreuse. J. Brasil Psiquiat. 3 (2):137-65, 1954.
10. PACHECO e SILVA, A.C. & CASTRO FILHO, B. — Sobre um caso de esclerose tuberosa. Mem. Hosp. Juquery (S. Paulo) 5-6:109-18, 1928-1929.
11. SAMPAIO, B.A., LUISI, A. & SILVA, J. de A. — Esclerose tuberosa de Bourneville. Arq. Dep. Assist. Psicop. S. Paulo 22:5, 1956.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ESTRANGEIRAS

12. ALZHEIMER, A. — Die Gruppierung der Epilepsie. Allg. Z. Psychiat. 64:418, 1907.
13. AYALA, G. & SABATUCCI, F. — Klinischer und pathologisch-anatomischer Beitrag zum Studium der zentralen Neurofibromatose. Z. Ges. Neurol. Psychiat. 103:496, 1926.
14. BABONNEIX, L. — A propos de la sclérose tubéreuse. Rev. Neurol. 34(7-8):17, 1918.
15. BALZER, F. & MÉNÉTRIER, P. — Étude sur un cas d'adénomes sébacés de la face et du cuir chevelu. Arch. Physiol. 6:565-576, 1885.
16. BERNALES, J.V. & NORIEGA, E.B. — Un caso de esclerose tuberosa de Bourneville. Rev. Neuropsiquiat. 10 (2):196-202, 1947.
17. BIELSCHOWSKY, M. — Über tuberöse Sklerose und ihre Beziehungen zur Recklinghausenschen Krankheit. Z. Ges. Neurol. Psychiat. 26:133-55, 1914.
18. BIELSCHOWSKY, M. — Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen tuberöser Sklerose und Gliomatose. J. Psychol. Neurol. 21(3/4):101-11, 1915.
19. BIELSCHOWSKY, M. — Zur Histopathologie und Pathogenese der tuberösen Sklerose. J. Psychol. Neurol. 30(3-4):167-99, 1924.
20. BIELSCHOWSKY, M. & FREUND, C.S. — Über Veränderungen des Striatums bei tuberösen Sklerose und Beziehungen zu den Befunden bei anderen Erkrankungen dieses Hirnteils. J. Psychol. Neurol. 24:20, 1918.
21. BIELSCHOWSKY, M. & GALLUS — Über tuberöse Sklerose. J. Psychol. Neurol. 20(1):1-88, 1913.
22. BIELSCHOWSKY, M. & HENNEBERG, R. — Über einen Fall von doppelseitigem Neurinom des Acusticus und zur Histologie und Histogenese der zentralen Neurofibromatose. Z. Ges. Neurol. Psychiat. 33:247, 1923.
23. BIELSCHOWSKY, M. & ROSE, M. — Zur Kenntnis der zentralen Veränderungen bei Recklinghausenscher Krankheit. J. Psychol. Neurol. 35:42, 1927.
24. BOLSI, D. — Contributo all'istologia patologica cerebrale della sclerosi tuberosa. Riv. Pat. Nerv. Ment. 33:656-77, 1928.
25. BORBERG, A. — Clinical and genetic investigations into tuberous sclerosis and Recklinghausen's neurofibromatosis. Copenhagen, Munksgaard, 1951.
26. BOURNEVILLE, D. — Sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales: idiotie et épilepsie hémiplegique. Arch. Neurol. 1:81-91, 1880.
27. BOURNEVILLE, D. & BRISSAUD, E. — Encéphalite ou sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales. Arch. Neurol. 1:398, 1881.
28. BRUSHFIELD, T. & WYATT, W. — Epiloia. Brit. J. Child. Dis. 23:178-85, 1926.
29. CABIESES-MOLINA, F. — Sobre un caso de esclerose tuberosa. Enfermedad de Bourneville. Rev. Neuro-psiquiat. 9(1):37-56, 1946.
30. CAROL, W.L.L. — Beitrag zur Kenntnis des Adenoma sebaceum (Pringle) und sein Verhältnis zur Krankheit von Bourneville und von Recklinghausen. Acta dermat.-venereol. 2:186, 1921.
31. CASTELLINO, P.G. — Familial Recklinghausen's Disease. Urol. Cutan. Rev. 34:384-90, 1930.
32. CRITCHLEY, M. & EARL, C.J.C. — Tuberose sclerosis and allied conditions. Brain 55:311, 1932.
33. CURTIUS, F. — Die organischen und funktionellen Erbkrankheiten des Nervensystems. Stuttgart, 1935. Apud BORBERG, A.<sup>25</sup>.
34. FATTOVICH, G. — Sclerosi Tuberosa e Tumore Cerebrale. Rass. Studi Psichiat. 36(3):424-43, 1947.
35. FERIZ, H. Ein Beitrag zur Histopathologie der tuberösen Sklerose. Arch. Path. Anat. (Virchows) 278:690-769, 1930.

36. FERRARO, A. & DOOLITTLE, G.J. — Tuberos sclerosis (Diffuse neurospongiblastosis). Psychiat. Quart. 3 (10):365-416, 1936.
37. FRIEDMAN, A.B. — Tuberos sclerosis. Relief of epileptic symptoms by radiation therapy. Arch. Neurol. Psychiat. 41:565-7, 1939.
38. GARCIN, M.M.R. — Sclérose tubéreuse de Bourneville. J. Bras. Psiquiat. 11: 348, 1953.
39. GARCIN, M.M.R. *et alii* — Sur un cas héréditaire de sclérose tubéreuse de Bourneville. Adénomes sébacés ... Rev. Neurol. 71(1):62, 1939.
40. GEITLIN, F. — Zur Kenntnis der tuberösen Sklerose des Gehirns. Arb. Path. Inst. Univ. Helsingfors, Berlin, 1906. v. 1. Apud BORBERG, A.<sup>25</sup>.
41. GLOBUS, H.J., STRAUSS, I. & SELINSKY, H. — Das Neurospongiblastom eine primäre Gehirngeschwulst bei disseminierter Neurospongiblastose (tuberöse Sklerose). Z. Ges. Neurol. Psychiat. 140:1-29, 1932.
42. HALLERVORDEN, J. & KRUECKE, W. — Die tuberoese Hirnsklerose. In LUBARSCH, O. & HENKE, F. — Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie. Berlin, Springer, 1956. v. 13(4). 602.
43. HALLOPEAU & LERÉDDE — Sur un cas d'adénomes sébacés à forme scléreuse. Ann. Derm. Syph. 6(3ème série): 473-479, 1895.
44. HARTDEGEN, A. — Ein Fall von multipler Verhärtung des Grosshirns nebst histologisch eigenartigen harten Geschwülsten der Seitenventrikel (Glioma ganglio-cellulare) bei einem Neugeborenen). Arch. Psychiat. Nervenkr. 11:117, 1881.
45. HORNOWSKI, J. & RUDZKI, S. — Sur la sclérose tubéreuse cérébrale. Encephale 5:435-451, 1910.
46. ILLING, E. — Erbblologische Erhebungen bei tuberöser Sklerose. Z. Ges. Neurol. Psychiat. 165:340, 1939.
47. KOH, E. — On a familiar occurrence case of tuberos sclerosis. Folia Psychiat. Neurol. Jap. 6(8), 1952.
48. KUFES, H. — Beiträge zur Diagnostik und Pathologischen Anatomie der tuberösen Hirnsklerose. Z. Ges. Neurol. Psychiat. 18:291, 1913.
49. LEY, A. — Sur la sclérose tubéreuse des circonvolutions cérébrales. J. Neurol. Psychiat. 31, 1936.
50. LUQUE, O. & MORCILLO, R.P. — Sobre un caso de enfermedad de Bourneville. Rev. Med. Cordoba 33(4):235-51, 1945.
51. MARCHAND, L., BRISSOT, M. & MAILLEFER, J. — Sclérose tubéreuse à forme maligne. Encéphale 34(2):57-77, 1939.
52. MARCHAND, L., BRISSOT, M. & LENTULLO, B. — Phacomatose rétinienne de van der Hoeve dans deux cas de sclérose tubéreuse. Ann. Med. Psychol. 1(2):156-60, 1947.
53. MASSON, P. — Tumeurs humaines. 2ème ed. Paris, Maloine, 1956.
54. MATTIROLO, G. & ZORINI, O. — Note sopra un caso di sclerosi tuberosa del cervello. Minerva Med. 6, 1926.
55. MENGOLI, G. & MACCAGNANI, G. — Un caso di sclerosi tuberosa o malattia di Bourneville-Pellizzi. Riv. Sper. Freniat. 82(3):738-756, 1958.
56. MICHAUX, L. — Psychiatrie Infantile. Toulouse, Imp. France, 1950.
57. ORZECZOWSKI, K. & NOWICKI, W. — Zur pathogenese und pathologischen Anatomie der multiplen Neurofibromatose und der Sclerosis tuberosa (Neurofibromatosis universalis). Z. Ges. Neurol. Psychiat. 11:237-307, 1912.
58. PELLIZZI, G. — Contributo allo studio dell'idiozia. Riv. Sper. Freniat. 27: 265-9, 1901.
59. PINCHERLE, P. — Reperti radiologici nella sclerosi tuberosa cerebrale. Trieste, Susmel, 1928.
60. PRINGLE, J.J. — Über einen Fall von Kongenitalen Adenoma sebaceum. Mschr. Prakt. Dermat. 10:197, 1890. Apud BORBERG, A.<sup>25</sup>.
61. PUECH, M.M.P., LEREBoullet, J. & BERNARD, P. — Sclérose tubéreuse et tumeurs cérébrales. Rev. Neurol. 77(9-10):225-46, 1945.
62. RIOPELLE, J.L. — Epithélio-sarcome du rein gauche, avec fibro-myo-lipome du même rein et fibrome théco-cellulaire de l'ovaire homolatéral. Origine rénale du prétendu hypernephrome vrai du rein. Rev. Canad. Biol. 4:40-65, 1945.
63. RIOPELLE, J.L. — Sur les tumeurs rénales connues sous le nom d'hypernephromes vrais. Théorie rénale de leur origine. Rev. Canad. Biol. 4:66-103, 1945.
64. RONCAL, P. — Manual de neuro-psiquiatria infantil. Mexico, La Casa de España, 1960.
65. ROSS, A.T. & DICKERSON, W.W. — Tuberos Sclerosis. Arch. Neurol. Psychiat. 50:233-57, 1943.
66. SAMUELSEN, E. — Tuberos Sclerosis med Lunge- og Knogleforandringer. Nord. Med. 14:1773 [14, 20, 153], 1942. Apud BORBERG, A.<sup>25</sup>.
67. SANCTIS, S. de — Neuropsychiatria Infantile. Roma, Stock, 1924.
68. SHERLOCK, E.B. — The feeble minded. London, Mac Millan, 1911.



69. TELATIN, L. — Sindromi neurologiche rare o meno note. Roma, Pozzi, 1950.
70. TOURAINE, M.M.A. & SOÉMAMA, F. — Adénomes sébacés symétriques et sclérose tubéreuse. Bull. Soc. Franç. Derm. Syph. 43:1276-80, 1936.
71. TOURAINE, M.M.A. & LORTAT-JACOB, E. — Adénomes sébacés type Balzer-Ménétrier familiaux et à début tardif. Bull. Soc. Franç. Derm. Syph. 46:696-8, 1939.
72. van BOGAERT, L. — Les dysplasies neuro-ectodermiques congénitales. Rev. Neurol. 63(3):353-98, 1935.
73. van der HOEVE, J. — Augengeschwülste bei der tuberösen Hirnsklerose. Arch. Ophthamol. 105:880, 1921.
74. van der HOEVE, J. — Augengeschwülste bei der tuberöse Hirnsklerose und verwandten Krankheiten. Arch. Ophthamol. 111:1, 1923.
75. VEJLENS, G. & BERG, G. — Maladie cystique du poumon et sclérose tubéreuse du cerveau. Acta Paediat. 226:16, 1939.
76. VOGT, H. — Sur Pathologie und pathologischen Anatomie der verschiedenen Idiotieformen. Tuberöse Sklerose. Mschr. Psychiat. Neurol. 24:106, 1908. Apud CRITCHLEY, M. et. al.<sup>32</sup>.
77. YAKOVLEV, P.I. & GUTHRIE, R.H. — Congenital ectodermoses (Neurocutaneous syndromes) in epileptic patients. Arch. Neurol. Psychiat. 26(6):1145-94, 1931.
78. YAKLOVEV, P.I. & CORWIN, W. — A roentgenographic sign in cases of tuberous sclerosis of brain (Multiple "Brain Stones"). Arch. Neurol. Psychiat. 42(6):1030-37, 1939.
79. ZACHRISSON, C.G. & BERG, G. — Cystic lungs of rare origin—tuberous sclerosis. Acta Radiol. 22:425, 1941.

*Recebido para publicação em 15 de setembro de 1963*

RUY PIAZZA

Av. Paulista, 2584, ap. 102  
S. Paulo - BRASIL

## STAPHYLOCOCCUS PYOGENES EM AMÍGDALAS EXTRAÍDAS (a)

### STAPHYLOCOCCUS PYOGENES IN EXCISED TONSILS

LUIZ DE GÓES MASCARENHAS (b)

CARLOS CACHONI (b)

ARIOVALDO COSTA (c)

OCTAVIO BARACCHINI (c)

#### SUMMARY

The authors, based on papers published by various workers on colonization of *Staphylococcus pyogenes* in children and adults, verified the incidence of this bacteria in tonsils extracted from patients with chronic tonsilitis.

Tonsils from 115 patients were examined bacteriologically, and from 79 (68%) *Staphylococcus pyogenes* were isolated.

It is important that almost all staphylococci isolated were resistant to various antibiotics.

#### INTRODUÇÃO

O problema das estafilococias assumiu grande importância nestes últimos dez anos, como atestam inúmeras publicações sobre os mais variados tipos de infecções causadas por estafilococos (pneumopatias, bronquites, otites, enterocolites, alergias etc.).

Com base em trabalhos publicados por vários pesquisadores<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup> sobre a colonização de *Staphylococcus pyogenes* resistentes a antibióticos, em crianças e adultos, foi organizado<sup>(a)</sup> um programa de pesquisa com a finalidade de estudar a sua incidência em amígdalas extraídas.

Trabalhos anteriores<sup>9,10,11</sup> tratam mais do estudo da flora bacteriana das amígdalas, especialmente de estreptococos. Sobre estafilococos, não encontramos referência na literatura compulsada.

O presente trabalho é o resultado do estudo de 115 pacientes amigdalectomi-

zados, tendo sido submetido o conteúdo das amígdalas a exame bacteriológico, para isolamento de *Staphylococcus pyogenes* e determinação de sua sensibilidade aos antibióticos normalmente usados em casos de amigdalite.

#### MATERIAL E MÉTODOS

As amigdalectomias foram realizadas no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina e no Hospital São Francisco.

A indicação cirúrgica foi baseada na anamnese, exame físico geral, exame otorrinolaringológico e exames subsidiários. Foram operados pacientes com amigdalites crônicas, com ou sem hipertrofia das amígdalas e adenóides.

Empregou-se tanto a anestesia local como a geral. Nos casos que requereram

(a) Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Serviço de Otorrinolaringologia e Endoscopia Peroral e Cirurgia da Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas) e no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

Subvencionado, em parte, pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Serviço de Otorrinolaringologia e Endoscopia Peroral e Cirurgia da Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

(c) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

anestesia geral, esta foi praticada por intubação naso-traqueal, pela equipe do Serviço de Anestesia do Hospital das Clínicas. Nas anestésias locais, empregou-se como medicação de base, no pré-operatório, morfina e atropina por via endoflébica, seguindo-se anestesia tópica com solução de neotutucaína a 2% na faringe e infiltração em cada loja com 10 ml de solução de scurocaína a 1 ou 2%.

O ato cirúrgico foi sempre realizado com o paciente em decúbito dorsal horizontal e com a cabeça em extensão, quando submetido a narcose, e em posição sentada, quando submetido a anestesia local. A técnica cirúrgica foi sempre a da dissecação.

As amígdalas extraídas foram recolhidas assépticamente, tendo sido sempre realizados os exames bacteriológicos nas primeiras 12 horas após o ato cirúrgico.

As amígdalas foram cortadas com tesouras e as criptas tocadas com estiletos de arame montados com algodão, embebidos em caldo comum, com os quais se procedeu à semeadura de duas placas de

ágar-sangue (\*), que foram incubadas por 24 horas, em estufa a 37°C.

As culturas que se desenvolveram foram examinadas quanto à morfologia, pigmento, comportamento bioquímico e reações tintoriais.

As provas de coagulase foram realizadas pelo método de aglutinação em lâmina, sendo os casos negativos reverificados pelo método do tubo (leitura até 24 horas).

As determinações da sensibilidade foram feitas pelo método dos discos (30 mcg por disco, exceto os de penicilina que continham 30 unidades Oxford). para os seguintes antibióticos: penicilina, estreptomina, cloranfenicol, oxitetraclina, novobiocina, eritromicina, kanamicina, neomicina e espiramicina.

## RESULTADOS

Foram isolados *Staphylococcus pyogenes* das amígdalas de 79 (68%) dos 115 pacientes examinados.

As provas de sensibilidade a antibióticos acusaram os seguintes resultados:

### Resultados das provas de sensibilidade a antibióticos

Antibióticos	Prova positiva					Prova Negativa	N. casos estudados
	+	++	+++	++++	Total		
Penicilina .....	13	8	4	9	34	37	71
Estreptomina ....	11	27	17	4	59	14	73
Cloranfenicol .....	2	15	32	22	71	2	73
Oxitetraclina ....	14	28	9	3	54	16	70
Novobiocina .....	9	16	24	12	61	9	70
Eritromicina .....	3	9	18	38	68	3	71
Kanamicina .....	3	32	26	7	68	4	72
Neomicina .....	15	38	12	4	69	0	69
Espiramicina .....	8	32	5	3	48	7	55

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem aos autores concluir que a incidência de *Staphylococcus pyogenes* nas amigdalites crônicas é alta, com porcentagem de 68% no presente trabalho. Este fato

induz os autores a chamarem a atenção dos clínicos, dada a importância do *Staphylococcus pyogenes* na etiologia das pneumopatias, bronquites, otites, enterocolites, alergias etc.

Verificou-se, também, que os antibióticos — eritromicina, cloranfenicol e no-

(\*) Agar-sangue: Cloreto de sódio P.A. — 5g; Triptose (Difco) — 20g; Dextrose anidra (Merck) — 5g; Água destilada — 1 000 cm<sup>3</sup>; Sangue humano desfibrinado — 50 ml.

vobiocina — foram os que se mostraram mais ativos nos estudos da sensibilidade do *Staphylococcus pyogenes* "in vitro".

#### RESUMO

Foi estudada a incidência de *Staphylococcus pyogenes* em amígdalas extraídas de 115 pacientes, bem como, a resistência dessa bactéria a vários antibióticos. Os resultados encontrados, 68% de positividade, são mais elevados do que os apresentados por FRAGA, ROGERS, e PASTORE *et alii*.

O estudo *in vitro* da resistência do *Staphylococcus pyogenes* aos antibióticos, normalmente usados em casos de amigdalites, demonstrou que a neomicina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, novobiocina e espiramicina foram os antibióticos mais ativos.

Os resultados encontrados sugerem maior atenção dos clínicos para a alta incidência de *Staphylococcus pyogenes* nas amigdalites crônicas, considerando a importância dessa bactéria na etiologia de infecções como: pneumopatias, bronquites, otites, enterocolites, alergias etc.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROUNTREE, P. M. & THOMPSON, E. F. — Incidence of penicillin-resistant and streptomycin resistant staphylococci in hospital. *Lancet* 2:501-504, 1949.

2. LEPPER, M. H. *et alii* — Epidemiology of penicillin and aureomycin resistant staphylococci in a hospital population. *Arch. Int. Med.* 92:40-50, 1953.
3. EDMUNDS, P. N. *et alii* — Pathogenic staphylococci in the environment of newborn infants. *Brit. Med. J.* 1:990-994, 1955.
4. SHAFFER, R. E. *et alii* — Staphylococcal infections in newborn infants. *Pediatrics* 18:750-761, 1956.
5. HURST, V. — *Staphylococcus aureus* in the infant upper respiratory tract. *J. Hyg.* 55(3):299-321, 1959.
6. SCATENA, L. *et alii* — *Staphylococcus pyogenes* resistentes a antibióticos isolados do naso-faringe de recém-nascidos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 19:69-73, 1959.
7. BARACCHINI, O. *et alii* — *Staphylococcus pyogenes* resistentes a antibióticos isolados de recém-nascidos. *Bol. Inst. Puer. Univ. Brasil* 17(3):229-234, 1960.
8. BARBER, M. *et alii* — Spread of *staphylococcus aureus* in a maternity department in the absence of severe sepsis. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* 60:476, 1953.
9. FRAGA, H. — Estudos bacteriológicos das amígdalas e faringe. *Vacinoterapia. Bol. Cent. Est. Hosp. Serv. Rio de Janeiro* 5(7):171-174, 1953.
10. ROGERS, L. S. — Tonsillites and rheumatic fever. *Arch. Otolaring.* 67(5):569-576, 1958.
11. PASTORE, P. N. & HENCH, M. E. — Antimicrobials, tonsils and adenoids bacteriology, and blood culture finding before and after tonsilectomy and adenoidectomy. *Laryngoscope* 70:638-646, 1960.

Recebido para publicação em 15 de janeiro de 1963



## NOVA TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE $\alpha$ -TOCOFEROL (a)

### A NEW TECHNIQUE FOR THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF $\alpha$ -TOCOPHEROL

WALDOMIRO PREGNOLATTO (b)  
IONE I. GOMES (b)

#### SUMMARY

The authors describe a new technique for the stabilization of the color of the complex  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipyridil-Fe II in the determination of  $\alpha$ -tocopherol.

EDTA is used for complexing the excess of the ions Fe III used in the reaction.

The data are reproducible and the color is steady, which makes the process very sensible.

#### INTRODUÇÃO

A principal dificuldade na reação de EMMERIE & ENGEL<sup>1</sup>, que é a instabilidade da cor produzida, foi eliminada com o uso do EDTA para complexar o excesso de ions de Fe III, presentes na reação.

A reação de Emmerie-Engel consiste essencialmente na dosagem dos ions de Fe II, que se formam na redução de Fe III pela vitamina E.

Existem inúmeras técnicas para a dosagem de vitamina E, segundo esta reação, mas nenhuma delas consegue estabilizar quantitativamente o complexo formado, devido principalmente ao excesso de ions de Fe III que continuam em solução. Estes, além de serem rapidamente reduzidos fotoquimicamente, o que requer cuidados especiais, a fim de se excluir qualquer interferência da luz, ainda impedem acertar-se o 100% de transmitância do aparelho com o branco, devendo este acerto ser feito com etanol.

TSEN<sup>2</sup>, mais recentemente, recomenda complexar-se o excesso de Fe III com ácido fosfórico, o que, todavia, não estabiliza a cor do complexo, não oferecendo, portanto, qualquer vantagem.

A técnica aqui descrita utiliza o EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético) para complexar o excesso de ions de Fe III. Nas condições por nós recomendadas, obtêm-se estabilidade da cor, resultados reproduzíveis e, o que é mais importante, pode-se usar, como branco, a mistura dos reagentes, tornando o método sobremodo sensível.

Conhece-se hoje uma série enorme de substâncias orgânicas capazes de formar complexos coloridos com ions de Fe II, como por exemplo a 2,4,6-tripiridil-s-tiazina<sup>3</sup>, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina<sup>1</sup>, 1,10-fenantrolina<sup>4</sup>, 2,2',2''-terpiridina<sup>4</sup>, éter monometílico do o-nitrosoresorcinol<sup>5</sup>, tôdas elas tão ou mais sensíveis e espe-

(a) Trabalho realizado na Secção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz. Apresentado na 15.<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

cificas que a  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila. Empregamos, todavia, esta última, por ser mais fácil sua obtenção entre nós, como também por seus resultados satisfatórios.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A determinação colorimétrica do tocoferol requer sua extração prévia dos materiais gordurosos ou dos medicamentos que os contêm, para eliminação de substâncias interferentes. Descrevemos, inicialmente, os métodos para essa extração e, em seguida, a técnica da reação.

##### a) Extração de vitamina E em altas concentrações

###### *Reagentes:*

- Hidróxido de potássio (em pastilhas)
- Ácido clorídrico concentrado
- Pirogalol
- Éter etílico (isento de peróxidos)
- Sulfato de sódio anidro
- Álcool etílico

*Procedimento* — Adicionar à mistura, contendo aproximadamente 200 mg de acetato de tocoferol, num frasco de fundo redondo, esmerilhado, 50 cm<sup>3</sup> de etanol. Deixar refluxar pelo menos por um minuto. Enquanto a solução está fervendo, juntar, através do condensador, 1 g de KOH em pastilhas (1 pastilha de cada vez, com cuidado para não haver superaquecimento). Deixar refluxar por 20 minutos. Ainda quente, juntar 2 cm<sup>3</sup> de HCl concentrado, gôta a gôta (ou fazer a saponificação em presença de 100 mg de pirogalol, sem o emprêgo de HCl, depois). Deixar esfriar, transferir a solução para um funil de separação de 500 cm<sup>3</sup>, lavando o frasco em 100 cm<sup>3</sup> de éter de petróleo e 100 cm<sup>3</sup> de água. Agitar bem e deixar em repouso até que as camadas se separem. Recolher a camada etérica e lavar a camada aquosa com mais de 2 porções de 50 cm<sup>3</sup> de éter. Reunir os extratos etéricos. Lavar a solução etérica com 4 porções de 100 cm<sup>3</sup>

de água. Adicionar à solução Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> anidro para eliminar alguma água restante. Evaporar o éter de petróleo em banho-maria, sob fluxo de nitrogênio, até aproximadamente 8 cm<sup>3</sup>. Depois, evaporar o restante do éter de petróleo sem aquecimento, sob fluxo de nitrogênio. Dissolver o resíduo em álcool e transferir a solução alcoólica para um balão volumétrico, de modo a ter uma solução de aproximadamente 30 µg/cm<sup>3</sup> de vitamina E. Determinar, espectrofotometricamente, a concentração da vitamina E, nesta solução, segundo a técnica descrita.

##### b) Extração de vitamina E em pequenas concentrações

###### *Reagentes:*

- Solução de KOH (dissolver 5 g de KOH em 5 cm<sup>3</sup> de água destilada)
- Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Dissolver 5 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em 15 cm<sup>3</sup> de água destilada)
- Éter de petróleo (isento de peróxidos)

*Procedimento* — Transferir para um tubo de saponificação 10 cm<sup>3</sup> de uma solução etanólica da amostra a analisar. Esta solução deve conter pelo menos 60 µg de  $\alpha$ -tocoferol ou de seu éster, e não mais que 60 mg de gordura. Adicionar uma pérola de vidro e imergir o fundo do tubo num banho de água quente. Dirigir uma corrente de ar para a parte superior externa do tubo, que funcionará como condensador. Ferver pelo menos por um minuto e, então, ainda fervendo, adicionar 0,1 cm<sup>3</sup> da solução de KOH. Colocar um tampão de algodão no tubo e continuar refluxando por 30 minutos. Enquanto a solução ainda está fervendo, remover o tampão de algodão e adicionar 0,2 cm<sup>3</sup> da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Deixar esfriar à temperatura ambiente, adicionar exatamente 12 cm<sup>3</sup> de éter de petróleo e 10 cm<sup>3</sup> de água destilada. Tampar e agitar vigorosamente. Retirar uma alíquota rigorosamente medida da camada de éter de petróleo para um tubo de espectrofotômetro. Evaporar à secura, em corrente de nitrogênio.

c) Reação colorimétrica

*Reagentes:*

Etanol absoluto purificado (O produto comercial é destilado sobre  $MnO_2$  e  $NaOH$ )

Solução de clorêto de Fe III a 0,25% em etanol, recentemente preparada

Solução de  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila a 0,6% em etanol

Solução aquosa de EDTA (3,5 mg/cm<sup>3</sup>)

Solução-padrão de  $\alpha$ -tocoferol — Dissolver aproximadamente 50 mg de  $\alpha$ -tocoferol em 50 cm<sup>3</sup> de etanol absoluto. Transferir 1 cm<sup>3</sup> desta solução para um balão volumétrico de 50 cm<sup>3</sup> de capacidade e completar o volume com etanol. Esta solução final contém ao redor de 20  $\mu$ g de  $\alpha$ -tocoferol por cm<sup>3</sup>.

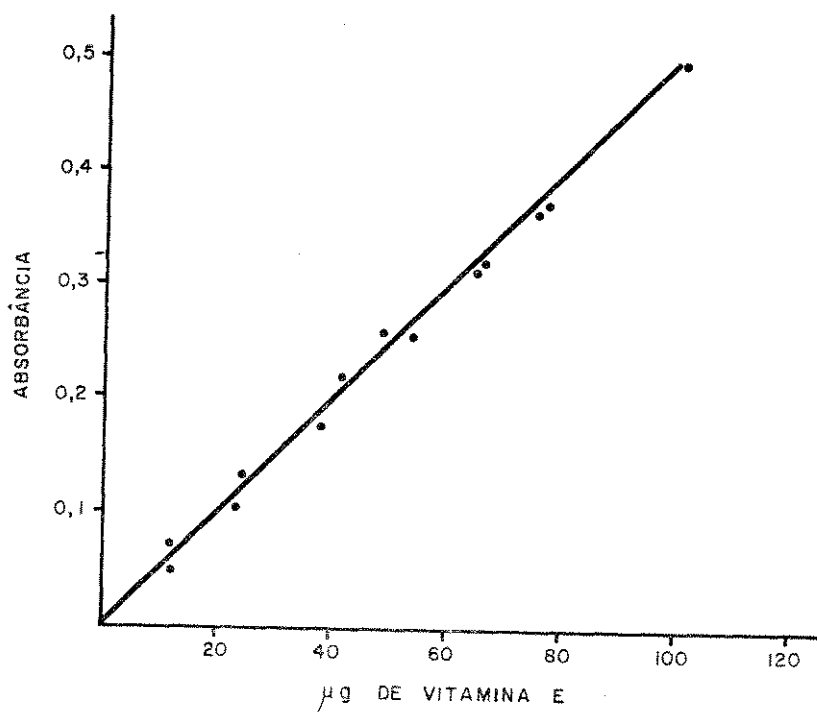
lumes tais da solução de  $\alpha$ -tocoferol de forma a ter, em cada tubo, aproximadamente de 20 a 120  $\mu$ g de  $\alpha$ -tocoferol, em incrementos crescentes de 20  $\mu$ g. 2) Adicionar a cada tubo 1 cm<sup>3</sup> da solução de  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila e um volume tal de etanol que some 7 ml com o volume da solução padrão de  $\alpha$ -tocoferol. Proteger os tubos da luz e adicionar a cada um 1 cm<sup>3</sup> da solução de clorêto de Fe III. 3) Esperar 2m e 30s e lêr no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 520 m $\mu$ . Acertar o 100% de transmitância do aparelho com o "branco" (mistura dos reagentes, menos a vitamina E).

*Nota:* É importante que os reagentes sejam rigorosamente adicionados na ordem indicada; os tempos recomendados devem ser obedecidos e a solução de clorêto de Fe III deve ser preparada no momento do uso, sendo desprezada a seguir.

*Construção da curva padrão —*

1) Pipetar para tubos do colorímetro vo-

A figura representa o gráfico de absorção por nós obtido.



Curva padrão para determinação colorimétrica do  $\alpha$ -tocoferol. Espectrofotômetro Colleman Jr., 520 m $\mu$ , cuba de 19 mm (14-302 B)



### *Técnica*

Dissolver o resíduo em 2 cm<sup>3</sup> de etanol e proceder como na construção da curva padrão, a partir do item 2.

### CONCLUSÕES

Usando a técnica acima proposta, conseguimos resultados reproduzíveis.

É evitada a conversão fotoquímica dos ions de Fe III a Fe metálico (o maior inconveniente do uso da  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila).

Com esta técnica, temos determinado o teor de vitamina E existente em medicamentos, alimentos vegetais e rações para animais.

Em provas de recuperação por nós feitas, sempre encontramos o teor de vitamina E adicionado.

### RESUMO

É descrita uma nova técnica para estabilizar a cor produzida por  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridila e ion de Fe II, na determinação de  $\alpha$ -tocoferol, usando para isto o EDTA

como complexante do excesso de ions de Fe III usados na reação. Os resultados são reproduzíveis e a cor é estável, tornando a reação mais sensível.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. EMMERIE, A. & ENGEL, C. — Colorimetric determination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments. Rec. Trav. Chim. 58:283-289, 1939.
2. TSEN, C. C. — An improved spectrophotometric method for the determination of tocopherols using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. Anal. Chem. 33(7): 849-851, 1961.
3. COLLINS, P. F., DIEHL, H. & SMITH, G. F. — 2,4,6-tripyridyl-s-triazine as a reagent for iron. Determination of iron in limestone, silicates and refractories. Anal. Chem. 31(11):1862-867, 1959.
4. SNELL, F. D. & SNELL, C. T. — Colorimetric methods of analysis. 3. ed. New York, Van Nostrand, 1949. v.2:316.
5. TETSUYA, T. — J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. 76:336, 1955. (Apud TSEN, C. C. 2).
6. GLICK, D. ed. — Methods of biochemical analysis. New York, Interscience, 1955. v.2.

Recebido para publicação em 13 de agosto de 1963.

## NOVA TÉCNICA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO $\beta$ -CAROTENO EM MATERIAL VERDE (a)

### A NEW TECHNIQUE FOR THE EXTRACTION AND DETERMINATION OF $\beta$ -CAROTENE IN GREEN STUFF

WALDOMIRO PREGNOLATTO (b)

FRANCISCO PEDUTI (b)

#### SUMMARY

A technique has been developed for the extraction and determination of  $\beta$ -carotene from vegetables and all naturally green stuff. The extraction of the pigments is done in a modified Soxhlet in such a way that one is able to extract at the same time all the pigments and to separate the chlorophyll from the yellow pigments. In the present technique the formation of emulsions is prevented, time is spared and one is able to completely extract all the  $\beta$ -carotene present in the stuff. The  $\beta$ -carotene is chromatographically separated from the other pigments, after the extraction and separation of the chlorophyll, by a modified Quackenbush *et alii* technique.

#### INTRODUÇÃO

Ainda hoje os métodos de dosagem do  $\beta$ -caroteno pouco diferem daquele preconizado por KUHN & BROCKMAN<sup>1</sup>, com a diferença de que agora dispomos de espectrofotômetros sensíveis para medição da absorção das suas soluções. Aquêles autores mediam, todavia, simplesmente a intensidade de uma solução alaranjada, computando tudo como  $\beta$ -caroteno. À luz dos atuais conhecimentos, obtinham êles sempre valores muito elevados para a pró-vitamina A. Com as observações feitas por DEUEL *et alii*<sup>2</sup>, em 1945, e KEMERER *et alii*<sup>3</sup>, em 1955, de que a atividade vitamínica do  $\gamma$ -caroteno e do  $\alpha$ -caroteno eram bem inferiores à do  $\beta$ -caroteno, a separação dessas substâncias tornou-se necessária para uma melhor avaliação do poder vitamínico A de um vegetal.

BEADLE & ZSCHERLE<sup>4</sup> descobriram posteriormente estério-isômeros do  $\beta$ -caroteno em vários vegetais, isômeros

êsses sem atividade vitamínica A. Também a separação desses estério-isômeros se tornou necessária.

A importância da separação dos diferentes pigmentos foi evidenciada por CALLISON *et alii*<sup>5</sup> que, determinando química e biologicamente o  $\beta$ -caroteno da cenoura e da batata-doce, mostraram que pelo método biológico se determinava apenas 34 a 41% do  $\beta$ -caroteno encontrado pelo método químico.

Para nós, constituiu sempre, um sério problema a extração e separação do  $\beta$ -caroteno, existente na parte verde dos vegetais em geral, dos outros carotenóides, pigmentos e clorofila. Experimentamos diferentes métodos de extração, como sejam o preconizado por COOLEY e KOEHN<sup>6</sup>, que refluxavam o material durante uma hora com partes iguais de tolueno, álcool etílico e acetato de etilo, ou aquêles recomendados pelo A.O.A.C.<sup>7</sup>

(a) Trabalho realizado na Secção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado na 15.<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

(refluxar alfafa com acetona a 30% em Skellysolve B ou refluxar o material em solução alcoólica de KOH a 12%<sup>8</sup>), sem que nenhum deles nos satisfizesse, pois verificamos que sempre grande parte do  $\beta$ -caroteno continuava incluído na clorofila.

Efetuamos, então, uma série de experiências pelas quais chegamos à elaboração de um método de extração do  $\beta$ -caroteno existente em vegetais, principalmente aquele existente na sua parte verde.

### MATERIAL E METODOS

*Preparo do material* — Secar o material a vácuo e à temperatura máxima de 45°C e pulverizá-lo com o auxílio de um moinho a martelo.

*Técnica da extração* — Colocar meia grama do material verde desidratado e reduzido a pó fino em um pequeno cartucho de extração (Soxlet), sobrepondo-se ao pó um pequeno tampão de algodão.

Colocar o cartucho em um extrator contínuo, tipo Soxlet, com cerca de 250 cm<sup>3</sup> de capacidade. Adicionar ao balão do extrator 8 a 10 pastilhas de hidróxido de sódio puro.

Extraír o material com éter etílico purificado, isento de peróxidos, de água e de álcool, durante 6 a 8 horas, para que todo o material seja extraído. A vantagem de se usar o éter etílico como solvente é a de que êle dissolve perfeitamente os pigmentos do material verde, pigmentos êsses que se acham interligados na composição do produto. O éter etílico, arrastando os pigmentos e a clorofila do vegetal, põe esta última em contacto com a pequeníssima quantidade de hidróxido de sódio que está dissolvido no éter, tornando-a insolúvel. O excesso de hidróxido de sódio, adicionado, tem a função de reter a água ainda existente no material verde submetido à extração.

Após 8 horas, suspender a extração. Reduzir o volume do solvente até 40 cm<sup>3</sup>, evaporando o éter em atmosfera de nitrogênio.

Transferir a solução final para um cartucho, agora longo, de um nôvo Soxlet contínuo. Lavar bem com éter. Fechar

com tampão de algodão. Adicionar éter até atingir cerca de 2/3 do volume do balão, que deverá ter a capacidade de 250 cm<sup>3</sup>.

Extraír, agora continuamente, durante duas horas, o que determina a separação de todo o  $\beta$ -caroteno da clorofila que fica retida no cartucho. Evaporar totalmente o éter em atmosfera de nitrogênio e diluir o resíduo com 100 cm<sup>3</sup> de hexana.

*Cromatografia* — Adotamos para a separação cromatográfica dos diferentes pigmentos amarelos existentes no material verde a técnica descrita por QUACKENBUSH *et alii*<sup>9</sup>, com ligeiras modificações:

Cromatografar 25 cm<sup>3</sup> da solução hexânica através de uma coluna de magnésia (12 x 1 cm), à qual é sobreposta, por segurança, uma camada de 1 cm de altura de sulfato de sódio anidro.

Eliminar o dissolvente a vácuo e eluir inicialmente com hexana contendo 5% de acetona, obtendo-se assim a fração 1 de Quackenbush, com a qual todo o  $\beta$ -caroteno é extraído. Eliminar o dissolvente em atmosfera de nitrogênio, a abrigo da luz.

Diluir o resíduo com 100 cm<sup>3</sup> de éter de petróleo (60 a 80°C).

Determinar a absorção em espectrofotômetro, a 450 m $\mu$  (utilizamos o espectrofotômetro Beckman DU).

Determinar a concentração de  $\beta$ -caroteno em microgramas por grama de material, pela fórmula:

$$C = \frac{AVD \times 1000}{aP}$$

A = absorvência  
V = volume original do extrato  
D = fator de diluição  
P = peso da amostra  
a = fator de absorção

### RESULTADOS

Testamos a técnica descrita, determinando o teor de  $\beta$ -caroteno existente no espinafre (*Spinacia oleracea*) e nas folhas de cenoura (*Daucus carota*) comparativamente à técnica do A.O.A.C., conforme o demonstra o quadro:

*Teores de  $\beta$ -caroteno encontrados pela técnica descrita e pela técnica da A.O.A.C.*

Material	Técnica descritiva		Técnica da A.O.A.C.	Literatura
	$\beta$ -caroteno $\mu\text{g/g}$	outros carotenóides $\mu\text{g/g}$	$\beta$ -caroteno $\mu\text{g/g}$	$\beta$ -caroteno $\mu\text{g/g}$
Espinafre fresco	42,5	7,5	22,0	63,0 (4) 43,0 — 120,0 (10)
Fôlhas de cenoura	39,6	6,6	20,0	—

CONCLUSÕES

A técnica que desenvolvemos permite eliminar o grande número de lavagens em dupla-fase (água-dissolvente orgânico) necessárias para se obter a completa eliminação da clorofila saponificada; evita-se, assim, a formação de emulsões quase sempre desagradáveis. Além disso, permite trabalhar-se com pequena quantidade de material em tempo menor, extrair todo o  $\beta$ -caroteno existente no material em exame e os resultados são reproduzíveis. Aplicando o método em questão, estamos procedendo à determinação do teor de  $\beta$ -caroteno em vegetais, frutas e outros materiais verdes do Brasil, o que será objeto de trabalho ulterior.

RESUMO

Os autores descrevem uma nova técnica para extrair e dosar  $\beta$ -caroteno de vegetais e material verde em geral.

A extração dos pigmentos é feita em aparelho de Soxlet modificado de maneira a permitir a extração de todos os pigmentos e a separação de toda a clorofila dos mesmos. Após a extração da clorofila, o  $\beta$ -caroteno é separado cromatograficamente dos outros pigmentos amarelos e determinado espectrofotometricamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUHN, R. & BROCKMANN, H. — Determination of carotenoids. Z. Physiol. Chem. 206:41-64, 1932.
2. DEUEL, J., Jr. *et alii* — Stereo-chemical configuration and provitamin A activity. III. All-trans- $\beta$ -carotene and neo- $\beta$ -carotene U. Arch. Biochem. 6: 157-161, 1945.
3. KEMMERER, A. R. & FRAPS, G. S. — The vitamin activity of neo- $\beta$ -carotene U and its steric rearrangement in the digestive tract of rats. J. Biol. Chem. 161:305-309, 1945.
4. BEADLE, B. W. & ZSCHEILE, F. P. — Studies on the carotenoids. II. The isomerization of  $\beta$ -carotene and its relation to carotene analysis. J. Biol. Chem. 144:21-33, 1942.
5. CALLISON, E. C. *et alii* — Comparison of chemical analysis and bio-assay as measures of vitamin A value of some vegetables and the effect of comminution upon the bio-assay value. J. Nutrition 37(1):139-152, 1949.
6. COOLEY, M. L. & KOEHN, R. C. — Chromatographic estimation of carotene in feeds and feed ingredients. Anal. Chem. 22:322-326, 1950.
7. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEM. — Changes in official and tentative methods of analysis made at the Sixty-first-Annual Meeting, 1947. 36. Vitamins. J. Assoc. Agric. Chem. 31:111-112, 1948.
8. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEM. — Changes in official and tentative methods of analysis made at Sixtieth-first-Annual Meeting, 1946. 36. Vitamins: carotene. J. Assoc. Agric. Chem. 30: 84-86, 1947.
9. QUACKENBUSH, F. W. *et alii* — Analysis of carotenoids in corn grain. J. Agric. & Food Chem. 9(2):132-135, 1961.
10. U. S. DEPT. AGRIC. — Food: The Yearbook of Agriculture. Washington, D. C., Govt. Print. Off., 1959. p. 238.



## TEORES DE FLÚOR EM ÁGUAS DA CIDADE DE BAURU (a)

### FLUORINE CONTENT IN WATERS SUPPLY OF BAURU, S.P., BRASIL

AGARB CEZAR DE CARVALHO(b)

#### SUMMARY

The fluorine content of 12 major sources of water supply of the city of Bauru, was determined. The method used in this investigation consisted in an initial concentration of the sample (10:1) followed by steam distillation, in  $H_2SO_4$ . The values obtained were very low, showing that the water of the city of Bauru does not offer adequate protection against dental caries.

#### INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados com a saúde dos dentes de uma população, a nosso ver, devem começar pela determinação dos teores de flúor nas águas que abastecem esta população. Tal conclusão decorre da influência do flúor contido em águas potáveis, quer seja como elemento de proteção quer seja como causador de fluorose.

O teor ideal de flúor nas águas de abastecimento, aconselhado por vários autores 1,2,3,4,6, está em torno de 1 ppm.

A fluoretação (c) artificial de águas de abastecimento tem sido realizada em grande número de comunidades em diversos países, e periodicamente são realizados estudos da situação dentária, principalmente de escolares entre 7 e 12 anos de idade. Tais estudos revelam que o flúor em proporção adequada pode reduzir o índice C.P.O. (d) em cerca de 50% 4,5,6.

Corroboram estas conclusões, entre outros, os trabalhos de FREIRE<sup>14</sup> em Baixo Guandu, FLÁVIO LUCE *et alii*<sup>7 e 8</sup> em Taguara e Santa Maria.

Em São Paulo, GANDRA<sup>9</sup> determinou o teor de flúor em águas de abastecimento de 335 cidades e concluiu que

tôdas elas apresentavam teor considerado insuficiente para a adequada proteção das populações, contra a cárie dentária. CAMPOS<sup>10</sup>, estudando o teor de flúor nas águas de abastecimento da cidade de São Paulo, obteve resultados muito baixos, detectados por concentração das amostras.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A população de Bauru (cerca de 100 000 habitantes) utiliza como água potável, além da proveniente da rede de abastecimento, outra que se origina de fontes naturais e poços profundos distribuídos em vários pontos da cidade. É muito utilizada também água comercializada, em garrações. Foram estas águas, que supomos cobrir a quase totalidade do consumo da cidade, o objeto do nosso trabalho. A nossa finalidade é conhecer a riqueza de flúor das águas usadas pela população de Bauru.

Numa primeira etapa colhemos amostras de águas em número de 12 e fizemos a determinação direta pelo método espectrofotométrico, segundo MEGREGIAN-MAIER<sup>11</sup>. Como tôdas as amostras revelaram, após esta determinação direta,

- (a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Bauru). Subvencionado pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.
- (b) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Bauru).
- (c) Termo aconselhado pela Organização Mundial da Saúde.
- (d) Dentes cariados, perdidos, obturados.

um teor de flúor nulo ou duvidoso (que consideramos nulo), conforme demonstra o Quadro I, resolvemos realizar novas colheitas e concentrar as amostras. Para isto, tomamos um litro de cada amostra, alcalinizamos com NaOH e evaporamos em banho-maria até mais ou menos 60 ml. Completamos, quantitativamente,

para 100 ml. A amostra assim obtida foi destilada sobre  $H_2SO_4$  por corrente de vapor, a uma temperatura máxima de  $145^\circ C$ . Recolhemos em seguida 200 ml do destilado<sup>11</sup>. O teor de flúor foi então determinado pelo já citado método de Megregian-Maier. Os resultados se encontram no Quadro I.

#### QUADRO I

*Teores de flúor em águas de Bauru, por determinação direta e por redução de volumes (a)*

N.º	PROCEDENCIA	LOCAL DA COLHEITA	F <sup>-</sup> ppm (b)	F <sup>-</sup> ppm (c)
1	Fonte natural	Fonte do Contorno .....	Zero	0,04
2	Poço profundo	Anderson Clayton .....	Zero	0,08
3	Poço profundo	Cia. Antarctica Paulista .....	Zero	0,05
4	Poço profundo	E. F. Sorocabana .....	Zero	0,02
5	Poço profundo	Refrigerantes Bauru .....	Zero	0,04
6	Fonte natural	Av. Duque de Caxias .....	Zero	0,06
7	Poço profundo	Oficina da N.O.B. ....	Zero	0,02
8	Poço profundo	Estádio "Ubaldo de Medeiros" .....	Zero	0,014
9	Poço profundo	Hospital Sanatório .....	Zero	Zero
10	Poço profundo	Sociedade Hípica .....	Zero	0,008
11	Rio Batalha	Rêde de abastecimento .....	Zero	0,06
12	Fonte natural	Garrafão .....	Zero	0,008

#### *Testes de recuperação*

Foram preparadas as seguintes amostras para os testes de recuperação:

- 1 - Água destilada
- 2 - Água destilada
- 3 - Água destilada e alcalinizada reduzida de um litro para 100 ml
- 4 - Solução de NaF a 0,1 ppm em  $F^- + NaCl^{(d)} + NaHCO_3^{(e)}$  reduzida de 1 litro para 100 ml
- 5 - Solução de NaF a 0,66 ppm, em  $F^-$

Nos cinco casos, as amostras foram destiladas pelo processo usado no trabalho.

Os resultados dos testes acham-se no Quadro II

#### QUADRO II

*Resultados dos testes de recuperação*

N.º	Esperados F <sup>-</sup> ppm	Encontrados F <sup>-</sup> ppm
1	Zero	Zero
2	Zero	Zero
3	Zero	0,004
4	0,1	0,092
5	0,65	0,63

(a) Com exceção das águas relativas às amostras de números 5, 7 e 10, tôdas as demais têm acesso público.

(b) Determinação direta.

(c) Determinação após redução de volume

(d) 3 ppm

(e) 20 ppm

## CONCLUSÕES

As águas consumidas pela população de Bauru apresentaram um teor de flúor muito baixo e não oferecem condições de proteção à população, contra a cárie dentária.

## RESUMO

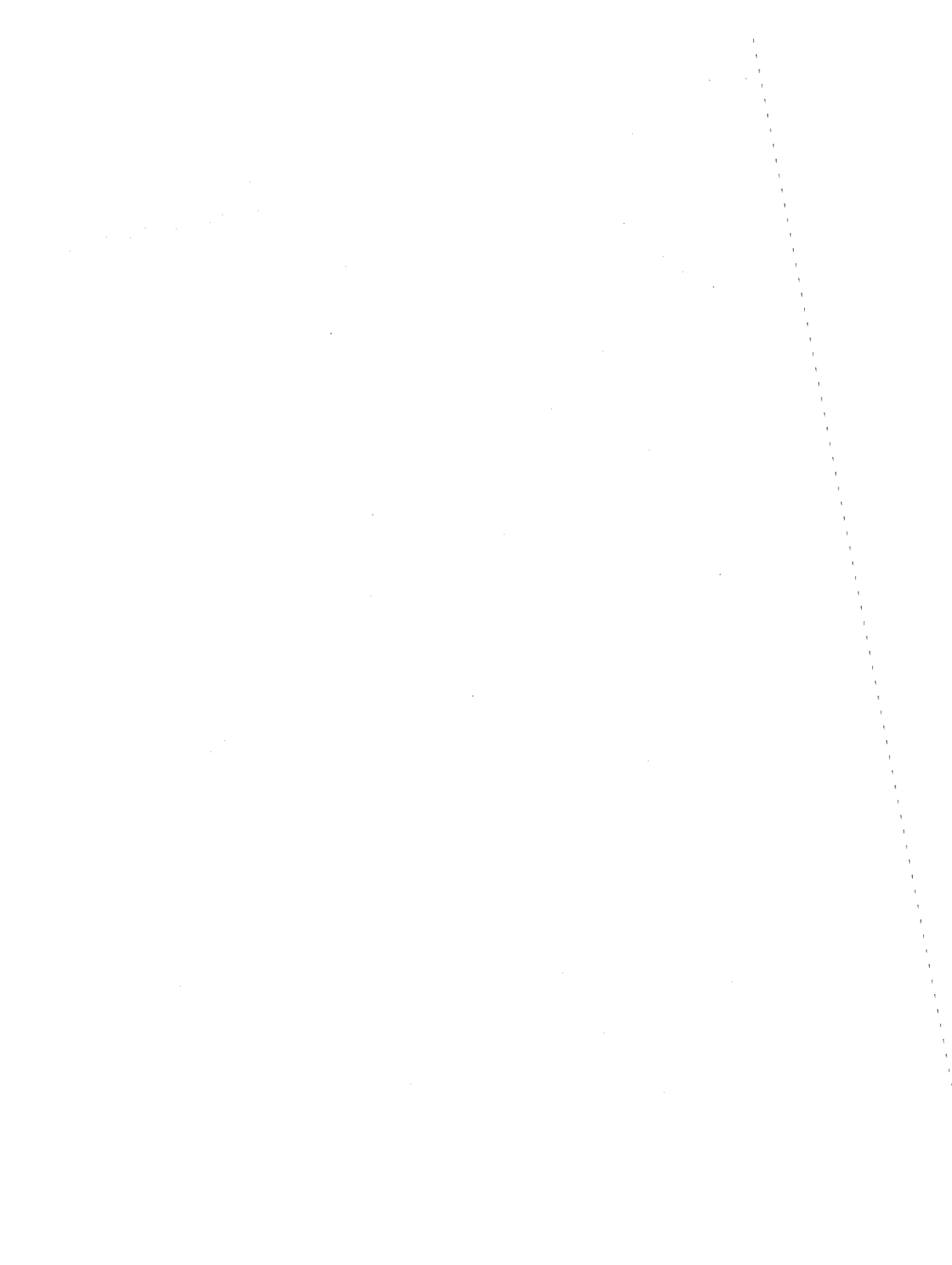
O autor determinou o teor de flúor em águas de 12 origens diferentes, que abastecem a população da cidade de Bauru. A dosagem foi feita com uma prévia concentração das amostras (10:1), seguida de destilação sobre  $H_2SO_4$  em corrente de vapor, segundo as técnicas adotadas por "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". Os valores encontrados foram muito baixos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MUHLER, J. C. ed. — Textbook of Biochemistry. St. Louis, Mosby, 1959. p. 421.
2. VILLELA, G. G., BACILA, M. & TASTALDI, H. — Bioquímica. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1961. p. 558.
3. CORONA, L. — Tratado de química normal y patologia de la sangre. 4. ed. Santiago do Chile, Zig-Zag, 1948. p. 1351-353.
4. McCLEDON, J. F. & GERSHON, C. — The effect of fluorine-free food on dental and periodontal structures as revealed by Roentgen studies. Amer. J. Roentgen. 71(6):1020, 1954.
5. ANDELMAN, S. L. — Chicago's experience with fluoridation. J. Amer. Dent. Ass. 65:613, 1962.
6. VIEGAS, A. R. — Odontologia sanitária. Aspectos preventivos da cárie dentária. (Compilação das aulas proferidas no Curso de Especialização em Saúde Pública para Cirurgiões Dentistas). Mimiografado. S. Paulo, 1961. p. 277.
7. LUCE, F. A., CANTERGI, W. P., FIGUEIRA, O. P. & CORONE, C. — Cinco anos de fluoração na cidade de Taquara no Rio Grande do Sul. [Pôrto Alegre?] Comissão de Fluoração das águas do Rio Grande do Sul, 1962. Mimiogr. 6 fls.
8. LUCE, F. A., CANTERGI, W. P., FIGUEIRA, O. P. & CORONE, C. — Três anos de fluoração em Santa Maria. [Pôrto Alegre?] Comissão de fluoração das águas da Secretaria de Obras Públicas do Rio Grande do Sul. Apresentado ao 3.º Congresso Sul-Riograndense de Higiene. Santa Maria, 1962.
9. GANDRA, Y. R. — Contribuição para o conhecimento de teor de flúor de águas do Estado de São Paulo — Significação sanitária do problema. Arq. Fac. Hig. S. Paulo 4(2):135-183, 1950.
10. CAMPOS, M. A. P. — Águas de abastecimento da cidade de São Paulo e seu teor de flúor. An. Fac. Farm. Odont. S. Paulo 7:209-227, 1948/49.
11. AMER. PUBL. HLTH. ASSOC. — Standard methods for the examination of water and waste-water. 11. ed. New York, A.P.H.A., 1960. p. 123-128.
12. ORG. MUND. SALUD — Comité de expertos en fluoración del agua: primer informe. Ginebra, O.M.S., 1950. Serie de relatorios tecnicos n. 146.
13. FREIRA, P. S. — Resultados da fluoração depois de cinco anos na cidade de Baixo Guandu. Apresentado ao 7.º Congresso Odontológico Brasileiro. Pôrto Alegre, julho, 1959. Apud VIEGAS, A. R. 6.

Recebido para publicação em 17 de outubro de 1963





## VERIFICAÇÃO DA DETERIORAÇÃO DA SARDINHA (*SARDINELLA AURITA*) POR MICRODIFUSÃO (MÉTODO DE CONWAY) <sup>(a)</sup>

### CONWAY'S MICRO-DIFFUSION METHOD APPLIED TO THE VALUATION OF SARDINE'S (*SARDINELLA AURITA*) SPOILAGE

CLAYDES QUADROS ZAMBONI <sup>(b)</sup>

#### SUMMARY

Conway's micro-diffusion method was applied for the study of Sardine (*Sardinella aurita*) spoilage. It was found a good correlation between both the concentration of total volatile nitrogen and trimethylamine nitrogen and taste.

#### INTRODUÇÃO

No contrôlo do estado de conservação do peixe fresco, freqüentemente se apresentam ao analista de fiscalização dificuldades decorrentes da subjetividade do método empregado. Analisando os trabalhos existentes e procurando um método mais objetivo para verificação da deterioração do peixe, encontramos os estudos de JEPSEN<sup>1</sup> e de WATANABE<sup>2</sup>, que fazem o exame do pescado aplicando o método de microdifusão de Conway<sup>3,4</sup>.

Baseados nesses trabalhos, fizemos um estudo da deterioração da sardinha (*Sardinella aurita*), comparando os resultados obtidos com as condições de palatibilidade e outros caracteres organolépticos.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos quatro lotes de mais ou menos 4 kg de sardinhas. O peixe era

conservado no congelador de geladeira tipo doméstico, à temperatura de -2 a 0°C. A intervalos determinados, retirávamos amostras que eram limpas e divididas em duas partes, das quais uma era passada em liquidificador para posterior exame pelo método de Conway e a outra, utilizada para verificação da palatibilidade.

De cada amostra, foi determinado, álcali-acidimêtricamente, pelo método em questão, o teor de nitrogênio volátil total e o nitrogênio da trimetilamina.

A determinação da palatibilidade foi feita como segue: o peixe, dividido em três partes (cabeça, meio do corpo e cauda), cozido em solução de NaCl a 2%, durante 10 minutos, era experimentado por quatro pessoas que davam graus à palatibilidade, relacionando-a, também, com o aspecto e o odor, de acôrdo com o esquema apresentado no Quadro I.

(a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Santos).  
Subvencionado, em parte, pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Santos).

QUADRO I

*Caracteres organolépticos e graus de palatibilidade da sardinha*

PALATIBILIDADE		ASPECTO	ODOR
Gosto	Grau		
Excelente	10	Consistência firme <i>Rigor mortis</i>	Cheiro de mar, característico
Muito bom	8	Consistência diminuída Olhos com perda do brilho e ligeiramente afundados	Neutro
Bom	6	Carne mais mole Pele quase sem brilho Olhos acinzentados e fundos Muco esbranquiçado	Adocicado e forte
Ruim	4	Carne mole Aparência geral de deterioração Muco viscoso	Característico de deterioração
Muito ruim	2	Carne muito mole Muco muito viscoso	Amoniacal
Inaceitável	0	Carne muito mole e facilmente destacável da espinha Muco amarelado ou castanho	Pútrido (amônia, gás sulfídrico, indol)

RESULTADOS

Os resultados encontrados estão reunidos no Quadro II

QUADRO II

*Comparação entre a palatibilidade e os teores de nitrogênio determinados pelo Método de Conway*

Lote	Tempo de conservação (-2°C a 0°C)	Nitrogênio Volátil Total (mg %)	Trimetilamina (mg N %)	pH	Palatibilidade
I	5.º dia	13,40	4,02	6,8	8
	9.º dia	17,42	7,37	6,8	7
	14.º dia	23,45	8,04	6,8	7
	16.º dia	24,12	8,04	7,0	7
	20.º dia	35,51	16,75	7,0	2
	23.º dia	44,89	17,42	7,0	0
II	2.º dia	18,09	3,35	6,8	9
	4.º dia	23,80	5,36	6,8	7
	8.º dia	29,48	10,72	7,0	5
	11.º dia	32,16	14,74	7,0	4
	15.º dia	41,54	14,74	7,0	2
III	7.º dia	27,50	11,39	6,8	6
	22.º dia	39,53	12,06	7,0	4
	23.º dia	62,31	14,74	7,0	2
	26.º dia	64,32	15,41	7,0	0
	27.º dia	65,66	16,08	7,0	0
IV	2.º dia	20,10	5,36	6,4	8
	5.º dia	21,44	5,36	6,4	8
	6.º dia	22,78	5,36	6,8	7
	7.º dia	24,79	6,70	6,8	6

Os índices de palatibilidade (P) e o nitrogênio volátil (NVT) apresentaram boa correlação ( $r = 0,9$ ), sendo a equação de regressão:  $P = NVT (-0,17) + 10,49$ ; a palatibilidade e os teores de nitrogênio da trimetilamina igualmente apresentaram boa correlação ( $r = 0,9$ ), sendo a

equação de regressão:  $10 \times \log (1 + P) = NTMA (-0,46) + 10,97$  (Fig. 1 e 2).

Foi verificado, também, no decorrer das experiências, que a sardinha se mantém em condições de comestibilidade durante mais ou menos 15 dias quando conservada em geladeira, à temperatura de  $-2$  a  $0^{\circ}\text{C}$ .

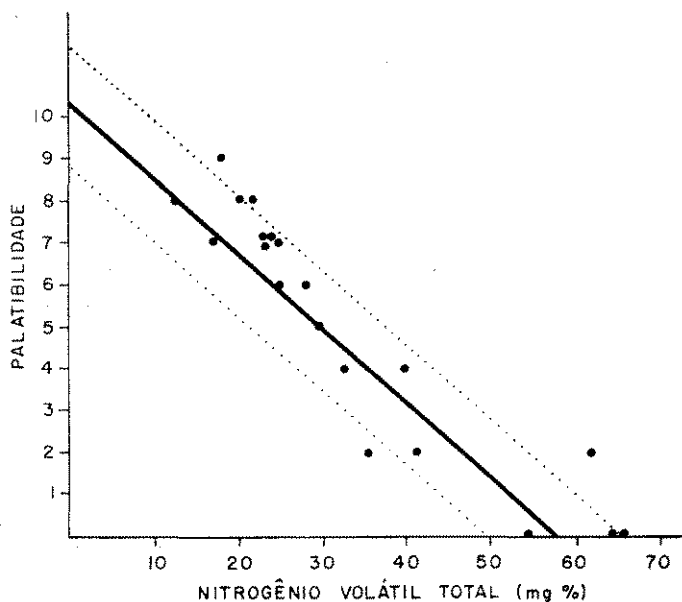


Fig. 1  
Relação entre nitrogênio volátil total e a palatibilidade.

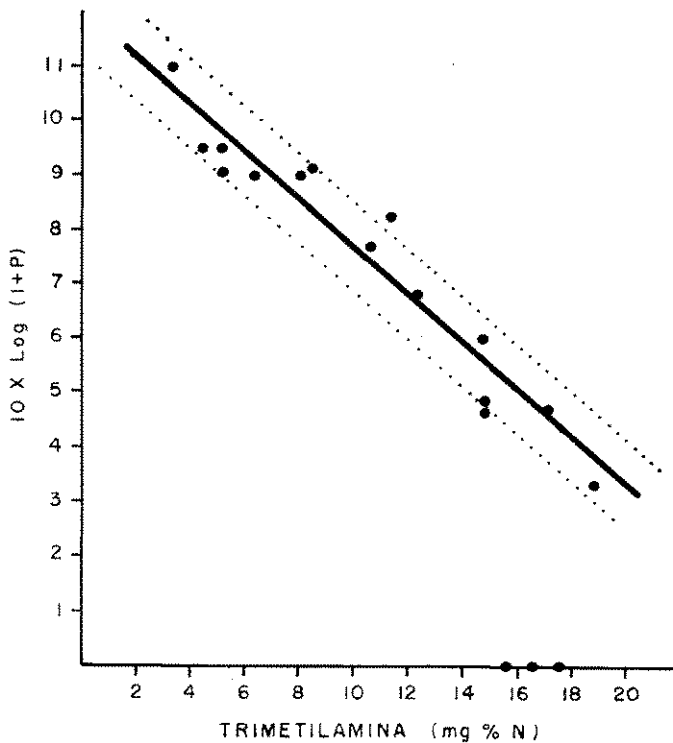


Fig. 2  
Relação entre teores de trimetilamina e a palatibilidade.

## DISCUSSÃO

WATANABE<sup>2</sup>, utilizando o método de Conway para o estudo da deterioração da “pescada-foguete” (*Macrodon ancylodon*), havia demonstrado correlação entre os teores de nitrogênio volátil total e de trimetilamina e a palatibilidade, mostrando ainda ser o método objetivo e de fácil emprêgo em laboratório de controle de pescado. O mesmo foi verificado no presente trabalho, com relação à deterioração da sardinha. Entretanto, confrontando as nossas observações com as daquele autor, constatamos a existência de diferenças entre as duas espécies de peixe, o que nos leva a crer na possibilidade de haver também diferenças para outras espécies. Parece-nos recomendável, pois, para a utilização do método, em controle rotineiro, serem elaboradas tabelas para as espécies mais freqüentemente encontradas nas regiões servidas pelos laboratórios de controle do pescado.

## RESUMO

Aplicando o método de microdifusão de Conway para controle da deterioração da sardinha, foi verificado haver boa correlação entre os teores de nitrogênio

volátil total e nitrogênio da trimetilamina e a palatibilidade.

Foi verificado, também, que a sardinha se manteve em condições de comestibilidade durante mais ou menos 15 dias, quando conservada em geladeira, à temperatura de -2°C a 0°C.

## AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Dr. Ko Watanabe, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, pela assistência prestada a este nosso trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JEPSEN, A. — The spoilage of fish and examination of fish. WHO, Regional Office for the Western Pacific. Seminar on Veterinary Public Health. WPR/VPH/9, 31-3-59.
2. WATANABE, K. — Spoilage in iced “pescada-foguete” (*Macrodon ancylodon*) from south brazilian fishing grounds. Bol. Inst. Ocean. 2(2):65-77.
3. JACOBS, M. B., ed. — The chemistry and technology of food and food products. 2. ed. New York, Interscience Publishers, 1951. v. 2:955-958.
4. TRESSLER, D. K. & LEMON, J. McW. — Marine products of commerce. 2. ed. New York, Reinhold, 1951.

Recebido para publicação em 26 de dezembro de 1963

## ÓLEO DE CAFÉ. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (a)

### COFFEE OIL. SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF UNSATURATED FATTY ACIDS

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA (b)  
CLEMENTINA AMATO (b)

#### SUMMARY

Spectrophotometric determination of unsaturated fatty acids of coffee oil was carried out according to the American Oil Chemists' Society method. The average results obtained from two samples were: linoleic acid, 39.86-39.38%; linolenic acid, 0.84-1.41%; conjugated diene, 1.08-1.01%; conjugated triene, 0.06-0.08%; oleic acid, 17.03-12.20%; saturated acids, 33.83-34.25%. The presence of linolenic acid among the fatty acids of coffee oil was evidenced. The following chemical and physical characteristics were also determined: refractive index at 40°C, saponification value, iodine value, modified Bellier value, M.P. of fatty acids, S.P. of fatty acids (Titer), unsaponifiable matter and squalene.

O óleo de café vem sendo utilizado, ultimamente, no Brasil, como óleo comestível. Aparece no comércio, principalmente, em mistura com óleo de algodão ou óleo de amendoim. Sua aceitação, por parte do consumidor, é, ainda, restrita mas o seu consumo vem sendo, gradualmente, aumentado.

A percentagem de óleo existente nas sementes, segundo alguns autores, varia de 5 a 10%<sup>1</sup>; outros, atribuem valores bem mais altos, de 15%<sup>2</sup> até 17,9%<sup>3</sup>; porém, os valores citados com mais frequência estão situados ao redor de 10%<sup>1,4,5</sup>. O teor de óleo existente nas sementes é ligeiramente mais alto no café torrado do que nas sementes não torradas.

O óleo de café encontrado no comércio é de cor amarela escura, inodoro. Trabalhamos, entretanto, com uma amostra de óleo cru (bruto), de cor verde, não

desodorizada, cujo cheiro lembrava fortemente o da cereja madura do café, recentemente colhida.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhamos com duas amostras de óleo de café provenientes de sementes cruas, sendo que a amostra bruta foi por nós refinada no laboratório, segundo técnica indicada pela A.O.C.S.<sup>6</sup>, empregando alumina ativada.

Foram determinadas as seguintes características físicas e químicas dos dois óleos, pelos processos usuais<sup>7</sup>: índice de refração a 40°C, índice de saponificação, índice de iodo, índice de Bellier modificado<sup>8</sup>, ponto de fusão dos ácidos graxos, ponto de solidificação dos ácidos graxos (Título), resíduo insaponificável e esqualeno. Os resultados obtidos estão reunidos no Quadro I.

(a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz.

Apresentado ao 8.º Congresso Latino-Americano de Química, realizado em Buenos Aires, Argentina, de 16 a 23 de setembro de 1962.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

QUADRO I

*Características físicas e químicas do óleo de café*

	Amostra A	Amostra B
Índice de refração a 40°C .....	1,4649	1,4682
Índice de saponificação .....	192,5	183,4
Índice de iodo .....	91,90	87,6
Índice de Bellier modificado .....	28,2	27,5
Ponto de fusão dos ácidos graxos (°C) .....	40,4	40,5
Ponto de solidificação dos ácidos graxos (Título - °C) .....	37,5	35,8
Resíduo insaponificável (%) .....	3,04	7,60
Esqualeno (mg/100g) .....	20	40

Em geral, estes dados concordam com os encontrados na literatura<sup>1,9</sup>; apenas o teor de insaponificável de um dos óleos é bem mais baixo do que o citado por outros autores, que apresentavam uma variação de 6,5 até 12,63%<sup>2,3,4,5,9,10</sup>, com exceção de REWALD<sup>1</sup>; aliás, encontramos em GAROGLIO<sup>11</sup> um teor de insaponificável de 21%, o que encaramos com muita reserva. A técnica por nós empregada foi a da extração com éter etílico, segundo os métodos da A.O.A.C.<sup>7</sup>.

A segunda parte do trabalho compreende a determinação dos ácidos graxos poli-insaturados pelo processo espectrofotométrico na região ultravioleta.

Ácidos graxos poli-insaturados, quando submetidos a aquecimento, na presença de hidróxido de potássio, como catalizador, sofrem processo de isomerização pelo qual as duplas ligações isoladas passam a ligações conjugadas. Estas ligações conjugadas dão origem a faixas de absorção características e intensas dentro de um intervalo do espectro de 200 a 400 m $\mu$ .

MITCHELL *et alii*<sup>12</sup>, em 1943, publicaram os primeiros detalhes do processo para a determinação de ácidos linoléico e linolênico. BEADLE *et alii*<sup>13</sup>, em 1944, ampliaram o método para a determinação de ácido araquidônico e desde então vários pesquisadores trabalharam para incluir, no processo, a determinação de ácidos com 5 e 6 duplas ligações.

Na determinação dos ácidos poli-insaturados do óleo de café, seguimos a téc-

nica indicada pelo A.O.C.S.<sup>6</sup> que, em linhas gerais, é a seguinte:

Os constituintes naturais conjugados são primeiramente determinados pela medida de suas absorções na região ultravioleta, em comprimentos de onda específicos.

Os constituintes poli-insaturados não conjugados são isomerizados a ligações conjugadas e depois seus picos de absorção são determinados da mesma maneira que para os constituintes conjugados preexistentes.

a) *Leitura no espectrofotômetro* (Beckman — Modelo DU) de uma solução do óleo em iso-octana nos seguintes comprimentos de onda: 233 m $\mu$ , para ácidos dienóicos; 262, 268 e 274 m $\mu$ , para ácidos trienóicos; 308, 315 e 322 m $\mu$ , para ácidos tetraenóicos e 346 m $\mu$ , para ácidos pentaenóicos. A concentração da solução deve ser de ordem tal que as absorbâncias observadas estejam entre 0,2 e 0,8.

Das leituras, por meio de fórmulas e correções, é calculada a percentagem dos constituintes conjugados preexistentes: dienas e trienas.

b) *Processo de isomerização* nas seguintes condições: Aquecer 0,1 g do óleo em solução de hidróxido de potássio a 6,6% em etileno glicol, a 180°C e manter nessa temperatura, rigorosamente controlada, por 25 minutos exatos. Trabalhar sempre em atmosfera de nitrogênio. Após saponificação, diluir a solução com álcool metílico a concentrações ade-

quadas e fazer novas leituras de absorções no espectrofotômetro, da mesma maneira que para os constituintes conjugados preexistentes.

Calcular, por meio de fórmulas e correções, a percentagem de ácido linoléico

(2 duplas ligações), ácido linolênico (3 duplas ligações), ácido araquidônico etc., de acordo com as absorbâncias encontradas.

Os resultados obtidos estão reunidos no Quadro II.

## QUADRO II

### Componentes do óleo de café

	Amostra A	Amostra B
Ácido linoléico (%)	39,86	39,38
Ácido linolênico (%)	0,84	1,41
Dienas conjugadas (%)	1,08	1,01
Trienas conjugadas (%)	0,06	0,08
Ácido oléico (%)	17,03	12,20
Ácidos saturados (%)	33,83	34,25

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os dados encontrados na literatura sobre o teor de ácidos graxos insaturados no óleo de café são bastante contraditórios. Alguns autores atribuem teores aproximadamente iguais para os ácidos linoléico e oléico<sup>2,3,10</sup>, enquanto que outros até computam ao ácido oléico um teor maior que o do linoléico<sup>14</sup>. Concordantes com nossos resultados são os encontrados por SUBRAHMANYAN & ACHAYA<sup>15</sup>, que usaram o clássico processo de precipitação com sais de chumbo, seguido da técnica de fracionamento dos ésteres metílicos.

No andamento da análise, antes de o óleo sofrer o processo de isomerização, encontramos um pico de absorção correspondente a um componente com 2 duplas ligações conjugadas, no teor de 1%. Não sabemos, no momento, a que constituinte atribuir tal absorção.

A presença de ácido linolênico entre os ácidos graxos constituintes do óleo de café não fôra, ainda, assinalada por outros autores.

## RESUMO

No óleo de café, ultimamente utilizado como óleo comestível, foi determinada a composição dos ácidos graxos poli-insaturados pela medida das absorções na região ultra-violeta, em comprimentos de onda específicos, antes e depois do pro-

cesso de isomerização a ligações conjugadas. Os resultados médios obtidos de duas amostras foram os seguintes: ácido linoléico, 39,86-39,38%; ácido linolênico, 0,84-1,41%; dienas conjugadas preexistentes, 1,08-1,01%; trienas conjugadas preexistentes, 0,06-0,08%; ácido oléico, 17,03-11,58%; ácidos graxos saturados, 33,83-34,25%. Constatamos a presença de ácido linolênico entre os ácidos graxos constituintes do óleo de café, não assinalada por outros autores. Foram também determinadas as seguintes características físicas e químicas: índice de refração a 40°C, índice de saponificação, índice de iodo, índice de Bellier modificado, ponto de fusão e de solidificação dos ácidos graxos, resíduo insaponificável e esqualeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REWALD, B. — The phosphatides and oil in unroasted and roasted coffee beans. *Oil & Soap* 23(1):19-20, 1946.
2. BENGIS, R. O. — Oxidation of fat fraction of roasted coffee. *Ind. Eng. Chem.* 28:290-293, 1936.
3. SLOTTA, C. H. & SZYSZKA, G. — O café sob o ponto de vista químico. 3. Uso do café no preparo de sabão ou óleo comestível. *Mem. Inst. Butantan* 11: 55-60.
4. ECKEY, E. W. — Vegetable fats and oils, with a chapter by Lawrence P. Miller. New York, Reinhold, 1954. (*Am. Chem. Soc. Monograph Series n. 123*). p. 760.



5. JAMIESON, G.S. — Vegetable fats and oils: their chemistry, production and utilization for edible, medicinal and technical purposes. 2. ed. New York, Reinhold, 1943. (Am. Chem. Soc. Monograph Series n. 58). v. 1:58.
6. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY — Official and tentative methods. 2. ed. Chicago, A.O.C.S., 1946.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS — Official methods of analysis. 9. ed. Washington, A.O.A.C., 1960.
8. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Métodos de análises bromatológicas. I. Análises químicas. S. Paulo, Rev. Tribs., 1951.
9. SCHWETTE, H.A., COWLEY, M.A. & CHANG, C.Y. — The characteristics and composition of coffee oil. The characteristics and composition of coffee bean oil. J. Am. Chem. Soc. 56: 2085-86, 1934.
10. BENGIS, R.O. & ANDERSON, R.J. — The chemistry of the coffee-bean. 11. Composition of the coffee-bean oil. J. Biol. Chem. 105:139-151, 1934.
11. GAROGLIO, P.G. — Tecnologia de los aceites vegetales con especial referencia al aceite de oliva. Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo, 1950. v. 1: 1024.
12. MITCHEL, J.H., Jr., KRAYBILL, H.R. & SZCHEILE, F.P. — Quantitative spectrum analysis of fats. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 15:1-3, 1943.
13. BEADLE, B.W. & KRAYBILL, H.R. — Spectrophotometric analysis of fats. J. Am. Chem. Soc. 66:1232, 1944.
14. BAUER, K.H. & NEU, R. — Coffee oil. Fette u. Seifen 45:229-232, 1938.
15. SUBRAHMANYAN, V. & ACHAYA, K.T. — Lesser known indian vegetable fats. J. Sci. Food Agr. 8:657-662, 1957.

*Recebido para publicação em 13 de junho de 1963*

## AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE UMA CAMPANHA DE VACINAÇÃO CONTRA A POLIOMIELITE EM SÃO PAULO, BRASIL (a)

### II. Estado imunitário da população antes da vacinação

### EVALUATION OF A VACCINATION PROGRAM AGAINST POLIOMYELITIS IN SÃO PAULO, BRAZIL. II. Immunity of the population before the vaccination

ROBERTO DE ALMEIDA MOURA (b)  
LUCY GUGLIELMI CAMPOS (b)  
CLELIA H. OLIVEIRA MARTINEZ (b)  
EOLO DE ARRUDA MILANO (c)  
JOSE DE TOLEDO PIZA (c)

#### SUMMARY

Six hundred and eithen pre-vaccination sera of a pilot vaccination program against poliomyelitis with oral (Sabin) vaccine were studied by means of neutralization tests. The vaccination was held in São Paulo, Brazil and the sampling was carefully planned by randomization. The age-limits were from less than 1 year up to four years of age. Among 618 children, 57% belong to a fairly good socioeconomic group and 49.9% are male. Neutralization titer of 1:4 was considered as positive and the endpoint of each titration was determined by microscopic observations. In the group of less than 1 year of age (127 children), 58.3% were triple negatives, 22.0%, double negatives, 14.2%, single negatives and 5.5%, triple immune. At the age of one (133 children), there were 26.3% of triple negatives and 17.3% of triple immune. At 2, 3 and 4 years of age (129, 160 and 69 children), there were respectively 8.5, 1.9 and 1.4% of triple negatives and 37.2, 74.4 and 84.1% of triple immune. The susceptibility from 0 to 3 years of age reached the 94.4% level, confirming by laboratory means previous epidemiological data.

#### INTRODUÇÃO

A escassez de dados de laboratório sobre o estado imunitário de uma determinada população no Brasil em relação à poliomielite justifica destacar, neste trabalho, os resultados obtidos no exame sorológico da amostragem anterior à vacinação efetuada por ocasião da campanha contra a poliomielite, realizada em Santo André (Milano *et alii*<sup>1</sup>).

Com o emprêgo cada vez maior de vacina oral contra a poliomielite, através de aplicações em larga escala, torna-se hoje praticamente impossível de se efe-

tuar análise da infecção natural de uma população com os diferentes tipos de poliovírus.

A epidemiologia da poliomielite modificou-se entre nós, como em todo o mundo, e dificilmente se pode encontrar uma população em que o estado imunitário não tenha sofrido interferência de vacinações anteriores.

No Brasil, como em vários outros países do mundo que não possuem recursos de laboratório especializado, os levanta-

(a) Trabalho realizado na Secção de Virulogia (Laboratório de Enterovírus) do Instituto Adolfo Lutz.

Subvencionado, em parte, pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

(c) Da Divisão do Serviço do Interior da Secretaria da Saúde Pública e da Assistência Social do Estado de São Paulo.

mentos estatísticos eram baseados exclusivamente em dados de morbidade e mortalidade, obtidos através das notificações compulsórias. GALVÃO<sup>2</sup>, ressaltando que eram necessários estudos de laboratório para o perfeito conhecimento do problema, apresentou provas de que epidemiologicamente a distribuição por idade dos coeficientes de casos paráliticos notificados mostra que a poliomielite no interior do Estado de São Paulo é acentuadamente do tipo epidemiológico infantil. Conclusões idênticas são evidenciadas por BARBOSA<sup>3</sup>, pois 94,67% dos casos ocorrem, no município de São Paulo, até a idade de 4 anos.

Após o trabalho de MOURA & CONTRÉRAS<sup>4</sup>, em que foi evidenciada a presença dos três tipos de poliovírus no Brasil, ALMEIDA *et alii*<sup>5</sup> verificaram por meio de provas de neutralização e reações de fixação de complemento, realizadas nos Estados Unidos da América do Norte, que em Ribeirão Prêto a infecção poliomiéltica era precoce, coincidindo com o maior aparecimento de casos clínicos no grupo etário menor de 3 anos. Estes últimos chegaram a essa conclusão analisando os soros de 160 crianças de famílias de baixo nível sócio-econômico e concluíram que aos 8 anos de idade 80% das crianças examinadas tinham sido infectadas pelos três tipos de poliovírus.

MARTINS DA SILVA & SYVERTON<sup>6</sup>, analisando 111 soros de pessoas residentes no Rio de Janeiro, mostraram que aos 8 anos de idade era grande a percentagem de crianças imunes aos tipos de poliovírus, especialmente se residentes em áreas de baixo poder sócio-econômico.

Os resultados aqui apresentados provêm de amostragem estatisticamente conduzida, abrangendo ao acaso todo o município de Santo André, num total de 618 crianças, das quais 57% vivem em boas condições de higiene e 49,4% pertencem ao sexo masculino. Os resultados obtidos são perfeitamente válidos para a população de Santo André e, com toda a probabilidade, aplicáveis a outras cidades de condições sócio-econômicas e climáticas semelhantes.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram dosados os anticorpos neutralizantes contra a poliomielite nos soros de 618 crianças de 3 a 5 anos incompletos, residentes no município de Santo André, S.P., antes da vacinação oral ali executada. A colheita desses soros foi planejada e executada conforme consta de publicação anterior (MILANO *et alii*<sup>1</sup>). Com o uso de fichas individuais de investigação de laboratório (Fig. 1), foi possível excluir as crianças cujos pais

Sobrenome		Nome			
Sexo	Idade	Data do Nascimento:			
Responsável		Endereço			
Condições Sanitórias: B - <input type="checkbox"/> M - <input type="checkbox"/>		Salk <input type="checkbox"/> 1.º <input type="checkbox"/> 2.º <input type="checkbox"/> 3.º			
Administração da Vacina Oral Contra a Poliomielite					
Data	1.ª	2.ª			
Título de Anticorpos			Fézes		
Data	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Data	Resultado

Ficha Individual de Investigações de Laboratório

VGP-11

Fig. 1

ou responsáveis haviam informado terem recebido anteriormente uma ou mais doses de vacina injetável, tipo Salk.

**Distribuição das crianças, segundo as idades** — As 618 crianças examinadas estavam assim distribuídas, segundo grupos etários: 127, menores de 1 ano, 133, entre 1 e 2 anos, 129, entre 2 e 3 anos, 160, entre 3 e 4 anos e 69, entre 4 e 5 anos.

**Verificação de anticorpos neutralizantes** — Foi realizada por meio de provas de neutralização em culturas de tecido, com leitura microscópica, segundo a técnica descrita a seguir, que permite demonstrar anticorpos mesmo em soros com baixa capacidade de neutralização: 0,25 cm<sup>3</sup> de diluições seriadas do soro a partir de 1:4 eram incubados juntamente com 0,25 cm<sup>3</sup> de suspensão contendo 100 DCT<sub>50</sub>/0,25 cm<sup>3</sup> de poliovírus padrão tipo I, II e III, durante 4 horas, a 37°C e levadas à geladeira. O diluente usado tanto para soros como para os vírus foi meio de Hanks com hidrolisado de lactalbumina e extrato de levedura. No dia seguinte, cada uma dessas misturas era decantada para tubo de cultura de tecido (linhagem AV 3 de célula amniótica humana) previamente lavado com solução salina de Hanks e esgotado; em seguida, os tubos de incubação eram lavados com 0,5 cm<sup>3</sup> de meio de Hanks com hidrolisado de lactalbumina e extrato de levedura, sendo o produto dessa lavagem também adicionado ao tubo de cultura correspondente. Os tubos de cultura eram incubados a 37°C até que os tubos controle, contendo a mesma quantidade de suspensão de vírus, apresentassem cerca de 50% de ação citopática, o que geralmente ocorria no 3.º dia. Os

soros que apresentassem título igual ou superior a 1:4 para um determinado tipo de poliovírus eram considerados como positivos para o mesmo.

**Classificação segundo a suscetibilidade** — De acordo com a suscetibilidade aos poliovírus, as crianças foram classificadas em:

*tríplice-negativas*: não apresentavam anticorpos para nenhum dos três tipos de poliovírus; eram suscetíveis aos três tipos de vírus da poliomielite;

*Duplo-negativas*: não apresentavam anticorpos para dois dos três tipos de poliovírus, podendo apresentar as seguintes combinações: negativas para tipos I e II, para I e III ou para II e III; eram suscetíveis a esses pares de poliovírus;

*simples-negativas*: não apresentavam anticorpos para apenas um dos três tipos de poliovírus; eram suscetíveis somente a esse tipo;

*zero-negativas*: apresentavam anticorpos contra todos os três tipos de poliovírus; eram sorologicamente imunes à poliomielite.

## RESULTADOS

Analisando os dados encontrados (Quadro I), verifica-se que, entre as crianças menores de 1 ano de idade, 5,5% se apresentam completamente imunes e apenas 58,3%, inteiramente suscetíveis. A suscetibilidade vai diminuindo com a idade de modo que, aos 4 anos, 84,1% das crianças estão imunes aos três tipos de poliovírus.

Na Fig. 2 vemos a interpretação gráfica dos resultados obtidos, possibilitan-

QUADRO I

*Estado imunitário da população de Santo André, antes da vacinação (%)*

Idade (em anos)	N. de crianças	Tríplice neg.	Duplo neg.	Simples neg.	Zero neg.
< 1	127	58,3	22,0	14,2	5,5
1	133	26,3	27,8	28,6	17,3
2	129	8,5	18,6	35,7	37,2
3	160	1,9	3,1	20,6	74,4
4	69	1,4	5,8	8,7	84,1

do assim acompanhar a queda percentual de cada categoria acima referida, de acôrdo com o grupo etário.

Na Fig. 3 estão os dados obtidos tanto por grupo etário quanto por tipo de poliovirus.

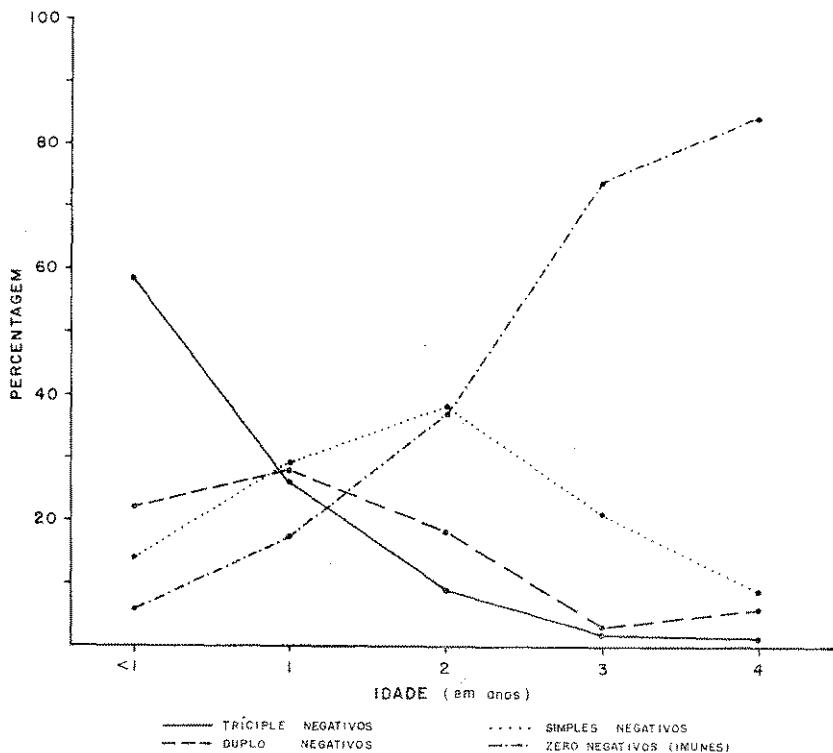


Fig. 2 — Suscetibilidade à poliomielite por grupos etários

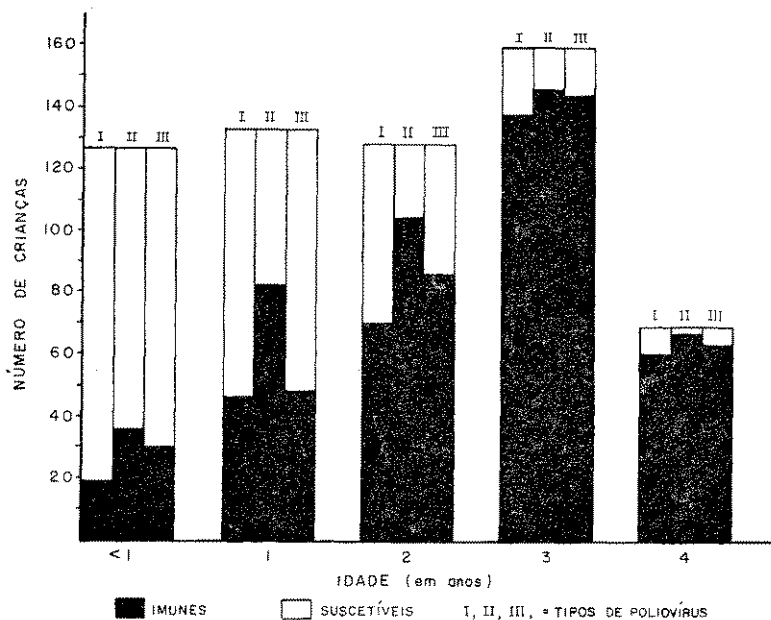


Fig. 3 — Estado imunitário de 618 crianças, antes da vacinação oral, no município de Santo André

DISCUSSÃO

A análise dos dados mostra, agora com base em investigações de laboratório, que a distribuição etária da infecção poliomiéltica, entre nós, é do tipo epidemiológico infantil.

Dos 4 aos 5 anos de idade existe já um grande contingente de crianças imunes, sendo que das 15,9% das suscetíveis, a maioria já foi infectada subclínicamente por dois ou três tipos de poliovírus.

Se analisarmos a cinética da infecção poliomiéltica no município de Santo André, somando as percentagens das crianças duplo, simples e zero-negativas em cada grupo etário (Quadro II), vemos que 41,7% das crianças menores de 1 ano de idade já entraram em contacto com um ou mais tipos de poliovírus, tiveram sua infecção subclínica e ficaram imunes contra êsse tipo ou tipos de poliovírus. De 2 a 3 anos essa percentagem já é de 91,5%, passando a 98,6% nas crianças de 4 a 5 anos.

QUADRO II

*Cinética da infecção poliomiéltica em Santo André (%)*

Idade (em anos)	Crianças inteiramente suscetíveis	Crianças que já tiveram contacto com 1 a 3 tipos
< 1	58,3	41,7
1	26,3	73,7
2	8,5	91,5
3	1,9	98,1
4	1,4	98,6

Comparando-se a suscetibilidade à poliomielite com o registro de casos paráliticos apresentado por BARBOSA<sup>3</sup> (Quadro III), com a ressalva de que em nosso caso a análise vai somente até o grupo etário de 4 anos, temos que, enquanto o registro de casos paráliticos no município de São Paulo atinge 93,02%, até o grupo etário de 3 anos de idade, a análise sorológica da população de Santo André chega a percentagem quase idêntica para o mesmo grupo etário (94,4%).

QUADRO III

*Suscetibilidade aos poliovírus em Santo André e casos paráliticos em São Paulo (%)*

Idade (em anos)	Suscetíveis em Santo André (1 ou mais tipos)	Paráliticos em São Paulo (V. Barbosa, 1963 <sup>3</sup> )
< 1	33,6	37,83
1	29,5	36,31
2	22,3	14,36
3	9,0	4,52
4	5,6	1,65

NEVES DA SILVA<sup>7</sup>, estudando a imunidade natural à poliomielite em residentes em zona rural e urbana de Pôrto Alegre, incluiu nesse trabalho 66 crianças até 4 anos de idade. A seleção das crianças para êsse estudo obedeceu ao seguinte critério: umas eram enviadas por um grupo de pediatras, que as selecionavam entre sua clínica particular, outras freqüentavam instituições assistenciais de caridade e outras eram filhos de agricultores que habitavam a periferia da cidade. Com um número reduzido de crianças em cada grupo etário (14 no grupo de menos de 1 ano, 17 no de 1 ano, 12 no de 2 anos, 9 no de 3 anos e 14 no de 4 anos), verificou que, antes de 1 ano de idade, 85,8% das crianças apresentavam anticorpos pelo menos contra um dos tipos de poliovírus e que até o grupo etário de 4 anos essa percentagem subiu até 92,9%.

SABIN<sup>8</sup>, ao analisar o trabalho de MARTINS DA SILVA & SYVERTON<sup>6</sup>, sugere que os dados obtidos assim como outros, publicados por PAYNE<sup>9</sup>, favorecem a hipótese de que a presença de anticorpos contra pelo menos um dos três tipos de poliovírus constitui o melhor índice de suscetibilidade de uma determinada população à forma parálitica da infecção. Em nosso caso também ocorre êsse fato, bastando a análise do Quadro II que demonstra a alta percentagem de crianças já infectadas com pelo menos um dos tipos de poliovírus (41,7%), ainda antes de 1 ano de vida.

### CONCLUSÕES

Através de amostragem estatisticamente conduzida, foram analisados soros de 618 crianças do município de Santo André que nunca tinham sido vacinadas quer por vacina oral contra a poliomielite (tipo Sabin), quer por vacina injetável (tipo Salk). A análise da imunidade existente nos grupos etários que abrangem o programa em questão comprova a grande prevalência de suscetíveis até 3 anos incompletos e justifica perfeitamente o estabelecimento de prioridade para crianças dessas idades, nas vacinações em massa já realizadas no Estado de São Paulo, prioridade que, por medida de segurança baseada em dados epidemiológicos, foi desde o princípio estendida até 4 anos incompletos.

Nessas condições, baseando-se nos dados obtidos através das provas de neutralização, 94,4% da população exposta aos vírus da poliomielite poderia ser protegida pela vacinação realizada.

### RESUMO

A escassez de dados de laboratório sobre o estado imunitário contra a poliomielite no Brasil justifica destacar no presente trabalho os resultados obtidos nas provas de neutralização dos soros de 618 crianças, antes da aplicação da vacina oral contra a poliomielite (tipo Sabin). Foram excluídas todas as crianças que tinham tomado uma ou mais doses da vacina contra a poliomielite, injetável (tipo Salk).

A amostragem foi estatisticamente conduzida assim como as provas de laboratório, que foram efetuadas no Instituto Adolfo Lutz, através de provas de neutralização em culturas de tecido, com leitura microscópica.

Os resultados das provas sorológicas indicaram que, no grupo etário de menos de 1 ano de idade, 58,3% das crianças não apresentaram anticorpos contra os três tipos de poliovírus e que 5,5%

eram imunes a êsses vírus. Nos grupos etários de 1, 2, 3 e 4 anos, a suscetibilidade foi diminuindo de tal forma que aos 3 anos, só havia 1,9% de crianças sem anticorpos contra os três tipos de poliovírus e que já aos 2 anos de idade 91,5% das crianças tinham sido infectadas com pelo menos um tipo de poliovírus.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MILANO, E. A. *et alii* — Avaliação dos resultados de uma campanha de vacinação contra a poliomielite em São Paulo. I. Planificação, organização e execução. Arq. Hig. (S. Paulo) 27(93): 207-222, 1962.
2. GALVÃO, A. L. A., FALCI, N. & SANTOS, J. A. A. — Alguns dados epidemiológicos sobre a poliomielite no interior do Estado de São Paulo. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo 10(4): 301-321, 1955.
3. BARBOSA, V. — Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da poliomielite no município de São Paulo. Tese de doutoramento da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da U.S.P., 1963.
4. MOURA, R. A. & CONTRERAS, G. — Isolamento e tipagem em cultura de tecidos de nove amostras de vírus de poliomielite, de casos observados em São Paulo (Nota preliminar). Rev. Inst. Adolfo Lutz 15:225-229, 1955.
5. ALMEIDA, J. O. *et alii* — Nível de anticorpos antipoliomielite em crianças de Ribeirão Preto. Rev. Paul. Med. 52(4):283-290, 1958.
6. SILVA, M. M. & SYVERTON, J. T. — Poliomyelitis survey in Rio de Janeiro. Pub. Hlth. Rep. 71(4):395-398, 1956.
7. SILVA, N. N. — Imunidade natural à poliomielite em Porto Alegre, Brasil. Hospital (Rio) 58:303-312, 1960.
8. SABIN, A. B. — Poliomyelitis in Brazil, Uruguay, Argentina and Chile. Data of importance in planning for elimination of the disease. Yale J. Biol. Med. 34:399-420, 1961/2.
9. PAYNE, A. M. — M. Immunization against poliomyelitis in the light of existing immunity of populations. Poliomyelitis: Papers and discussions presented at the Fourth International Poliomyelitis Conference. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1958. p. 157-164.

Recebido para publicação em 24 de Julho de 1964

## COLORAÇÃO DE MAXIMOW APLICADA AOS CORPÚSCULOS DE NEGRI <sup>(a)</sup>

### THE MAXIMOW'S STAIN FOR NEGRI BODIES

ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI <sup>(b)</sup>

MARGARIDA FRANZOSI <sup>(b)</sup>

NILZA BAPTISTA <sup>(b)</sup>

#### SUMMARY

Paraffin-embedded sections of Ammon's horn from the brain of men and animals infected with rabies virus or from inoculated animals were stained by Maximow's procedure for bone marrow, slightly modified. Fixation was made either by Carnoy method or with sublimate-alcohol. Slides were stained either by Harris or Erlich hematoxylin (the latter with better results), and then with Maximow's stain. The use of CO<sub>2</sub>-free solution prevents precipitation, permitting differentiation in 95% alcohol. Negri bodies, even the smaller ones, appeared neatly stained and with sharply defined structure.

#### INTRODUÇÃO

Em virtude de os corpúsculos de Negri serem corados pelos compostos azur-eosina e, conseqüentemente, poder-se esperar que fôsem êles igualmente corados pela solução utilizada por MAXIMOW<sup>1</sup>, na técnica que leva seu nome, para medula óssea, foi experimentada a técnica de MAXIMOW, adaptada por BLOCK<sup>2</sup> e, posteriormente, por HUMANSON<sup>3</sup>, para sua coloração.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cornos de Ammon retirados de animais infectados pelo vírus rábico de rua e de animais inoculados com material positivo de vírus rábico humano.

#### Reagentes

##### 1. *Fixadores*

a) *Álcool-sublimado* — mistura de solução aquosa saturada a quente de bicloreto de mercúrio e álcool absoluto (2:1, v/v).

ou

b) *Fixador de Carnoy* — ácido acético glacial, álcool absoluto e clo-rofórmio (10:60:30, v/v).

##### 2. *Corantes*

a) *Hematoxilina de Harris ou de Erlich*, ambas de fórmulas conhecidas, não necessitando de corantes de marcas especiais para sua preparação.

b) *Corante de Maximow*, preparado como segue:

(a) Trabalho realizado na Secção de Anatomia Patológica da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.



*Solução A* — 0,2 g de eosina Y em 100 cm<sup>3</sup> de água destilada desmineralizada e fervida durante 30 minutos.

*Solução B* — 0,1 g de azur II\* em 100 cm<sup>3</sup> de água destilada, desmineralizada e fervida durante 30 minutos. Em ambas as soluções foi passada corrente de nitrogênio, durante 10 minutos.

*Solução corante* — 15 cm<sup>3</sup> da solução A adicionada a 85 cm<sup>3</sup> de água destilada, desmineralizada e fervida durante 30 minutos, juntando-se, sob agitação, 10 cm<sup>3</sup> de solução B. Não deve ser filtrada.

c) *Álcool-ácido* — ácido clorídrico a 0,5% em álcool etílico a 70%.

d) *Xilol-fenicado* — ácido fênico (ácido carbônico) dissolvido em banho-maria e xilol (1:3, v/v).

### Técnica

1) Desparafinizar e hidratar as preparações da maneira habitual.

2) Se o fixador empregado foi álcool-sublimado, mergulhar as preparações em lugol, durante 5 minutos, lavá-las em água corrente e mergulhá-las em hipossulfito de sódio a 2%, até clareamento. Empregando-se o fixador de Carnoy, dispensa-se este item.

3) Lavar em água corrente durante 5 minutos.

4) Corar pela hematoxilina de Harris de 1/2 a 1 minuto, ou de Erlich, durante 4 minutos.

5) Lavar em água corrente durante 5 minutos.

6) Diferenciar em álcool ácido (4 mergulhos para a hematoxilina de Harris, 2 mergulhos para a de Erlich).

7) Lavar em água corrente, durante 5 minutos.

8) Colocar em água destilada *desmineralizada e previamente fervida* durante 15 minutos.

9) Deixar na solução corante de Maximow, de 6 a 24 horas.

10) Despejar álcool a 95% sobre a lâmina para retirar o excesso do corante e colocar a lâmina em um frasco de Borrel com álcool a 95% até que a preparação se torne rósea.

11) Desidratar e clarear: duas mudas de álcool absoluto, xilol fenicado durante 3 minutos e lavagem em xilol.

12) Montar as lâminas em bálsamo do Canadá diluído em toluol.

### RESULTADOS

Os núcleos e as membranas citoplasmáticas das células nervosas e os núcleos da glia apresentaram-se corados de azul intenso; o citoplasma, em cinza bem claro. A substância branca do tecido nervoso corou-se de tom rosa claro e as hemácias, de vermelho. Os corpúsculos de Negri apareceram geralmente corados de vermelho vivo, apresentando no seu interior vários pontos basófilos. Em certos casos, verificou-se o aparecimento de diferentes tonalidades de vermelho na coloração dos corpúsculos de Negri, fato esse que se constata igualmente utilizando outros métodos, o que já foi referido por ANDRAL & GENTILE<sup>4</sup>. Pelo emprego da técnica ora apresentada, mesmo pequenos corpúsculos aparecem bem evidenciados, por se destacarem no citoplasma corado de cinza claro.

### DISCUSSÃO

Entre os fixadores usados, verificamos que o que dá melhores resultados é o de Carnoy, pois não somente facilita o trabalho, dispensando o uso de lugol e, portanto, de hipossulfito de sódio, como também pelo fato de as células não se apresentarem retraídas.

Substituímos a hematoxilina de Harris pela de Erlich por determinar melhor coloração das células e preparações isentas de precipitados.

As modificações feitas na preparação do corante de Maximow foram baseadas em ROMEIS<sup>5</sup>, que usa água destilada e fervida durante 15 minutos para a mis-

(\*) Foi empregado azur II (Grübler).

tura final do corante de Maximow, e em HUMANSON<sup>3</sup> que recomenda que as soluções sejam recentes.

Pelas medidas acima, complementadas pela passagem de nitrogênio nas soluções, removeu-se o gás carbônico dissolvido, que determinava o precipitado que aparece quando da mistura final dos componentes do corante.

Recomendamos o uso de xilol fenicado após desidratação, porque favorece a completa desidratação da lâmina. O bálsamo do Canadá, dissolvido em toluol, determina a secagem mais rápida da preparação.

### CONCLUSÕES

A técnica de coloração de Maximow pode ser utilizada para evidenciação dos corpúsculos de Negri.

É obtido melhor resultado com as modificações sugeridas.

Por outro lado, a técnica em questão permite também o uso dos dois fixadores experimentados — Carnoy e álcool - sublimado — o que facilita o trabalho.

### RESUMO

Cortes histológicos de corno de Ammon, procedentes de pacientes infectados por raiva, de animais portadores de vírus rábico de rua ou de animais inoculados com material positivo para raiva foram corados pelo método de Maximow, ligeiramente modificado.

Os cornos de Ammon foram fixados em álcool-sublimado ou em fixador de Carnoy e as lâminas coradas por hematoxilina de Harris ou, preferivelmente, por hematoxilina de Erlich e, em seguida, pelo corante de Maximow.

Usando-se soluções isentas de CO<sub>2</sub>, não ocorre precipitado algum na preparação da mistura final, conseguindo-se

assim uma mais rápida diferenciação em álcool a 95%.

Os corpúsculos de Negri, mesmo aqueles de pequeno tamanho, aparecem bem corados e sua estrutura bem evidenciada.

**Agradecimentos** — Agradecemos ao Dr. Evandro Pimenta de Campos, diretor da Diretoria de Patologia, ao Dr. Antônio James Brandi, chefe da Secção de Anatomia Patológica, à Dra. Yolanda Tavares, chefe do Laboratório de Bioquímica, às Dras. Adela Roth e Irena Malachowska, ambas do Laboratório de Vírus Dermatológicos, à Dra. Clélia Helena de Oliveira Martinez, do Laboratório de Culturas de Tecido da Secção de Virulogia e ao Dr. Waldomiro Pregnolato, chefe da Secção de Química Biológica e Espectrografia pela orientação e colaboração prestadas.

Agradecemos também ao Dr. Morris D. Schneider, do Illinois Institute of Technology, pelo fornecimento de material infectado.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MAXIMOW, A. — Über zweckmäßige Methoden für cytologische und histogenetische Untersuchungen am Wirbeltierembryo, mit spezieller Berücksichtigung der Celloïdschnittserien. Z. Wissen Mikr. 26(2):177-190, 1909.
2. BLOCK, M., SMALLER, V. & BROWN, J. — An adaptation of the Maximow technique for preparation of sections of hematopoietic tissue. J. Lab. Clin. Med. 42:145-151, 1953.
3. HUMASON, G. L. — Animal tissue techniques. S. Francisco, Cal., Freeman, c 1962. p. 227-229.
4. ANDRAL, L. & GENTILE, A. — Une méthode simplifiée de coloration des corps de Negri. Bull. Soc. Path. Exot. 49(6):1114-1115, 1956.
5. ROMEIS, B. — Mikroskopische Technik. München, Leibnis Verlag, 1948. p. 326: 1396.

Recebido para publicação em 21 de setembro de 1964



## MEIO DE CULTURA LÍQUIDO ESTERILIZÁVEL PELO CALOR PARA *TRYPANOSOMA CRUZI*

A LIQUID AND HEATED MEDIUM FOR *TRYPANOSOMA CRUZI* (a)

OCTAVIO BARACCHINI (b)

### SUMMARY

A liquid and heated medium for *Trypanosoma cruzi*, without red cells and protein precipitates, that gives 300 mg of dry *Trypanosoma cruzi* per 1 000 c.c., is described.

### INTRODUÇÃO

O largo emprégo da reação de GUERREIRO & MACHADO<sup>1</sup>, na rotina sorológica dos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, trouxe, como conseqüência, a necessidade de maiores quantidades de *Trypanosoma cruzi* para o preparo de antígeno para a referida reação, o que nos levou a apresentar este trabalho. Os meios de cultura mais comumente usados para o cultivo desse protozoário são os meios difásicos (NOVY & McNEAL<sup>2</sup>, BONACCI<sup>3</sup>, SENEKJIE<sup>4</sup>, CHANG<sup>5</sup>) e várias modificações desses meios. A necessidade da incorporação de sôro ou sangue total, que contém os fatores essenciais para o cultivo do *T. cruzi* "in vitro" torna os meios de cultura citados pouco práticos, pois exige operações que não raro contribuem para a contaminação dessas preparações. Os referidos meios são, na verdade, excelentes para a conservação das culturas; porém, o mesmo não acontece para o estudo químico dos tripanosomas, devido aos precipitados de proteínas, hemácias etc.

Foram LITTLE & SUBBAROW<sup>6</sup> (1945) e SAMPATH & LITTLE<sup>7</sup> os primeiros a mostrar que as hemácias incorporadas aos meios de cultura para o *T. cruzi* podiam ser aquecidas sem que o rendimento da cultura fôsse prejudica-

do. Posteriormente, novos meios foram descritos: LITTLE & OLESON<sup>8</sup>, CITRI & GROSSOWICZ<sup>9</sup>, WARREN<sup>10</sup>, BONÉ & PARENT<sup>11</sup> e NEAL & MILES<sup>12</sup>. Dêsses meios, os de Citri e Parent, são os de composição menos complexa e quase quimicamente definidos.

O meio de cultura que ora apresentamos é um meio complexo, pois na sua fórmula entram sangue, cérebro, coração e fermentos; é, porém, um meio prático, esterilizável pelo calor e que proporciona a obtenção de quantidade apreciáveis de *T. cruzi*.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Preparação do meio básico* — Colocar 750 cm<sup>3</sup> de água destilada no copo de um liquidificador. Acionar o aparelho e, aos poucos, adicionar 100 g de coágulos de sangue humano, previamente colocados sobre uma folha de papel filtro. Deixar funcionar o aparelho durante 2 minutos. A seguir, adicionar o conteúdo de um ôvo de galinha à mistura de sangue e ligar o aparelho por mais 2 minutos. Passar o líquido para um balão de vidro de dois litros e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). Após a autoclavagem, filtrar a quente em papel<sup>1</sup> e refiltrar as pri-

(a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

(b) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Ribeirão Preto).

meiras porções até a obtenção de um líquido pardo-avermelhado, transparente e sem depósito.

*Meio de cultura* — Meio básico: 1 000 cm<sup>3</sup>; infusão de cérebro e coração (Oxoid ou Difco): 37 g; extração de levedura (Oxoid ou Difco): 5g. Deixar em repouso durante 10 minutos; agitar para dissolver. Distribuir em balões ou vidros em quantidades não superiores à metade da capacidade dos recipientes. Tamponar com algodão e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). O pH deverá ser de 7.2 a 7.6. Usando-se produtos Oxoid ou Difco, não será necessário acertar o pH.

*Amostras de T. cruzi utilizadas* — Amostras B.T. e M.P.P., gentilmente cedidas pelo Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; amostras n.º 34, n.º 5 e n.º 15 e Y, fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Central).

*Técnica de cultivo* — Repicar o conteúdo de um tubo de cultura de qualquer meio difásico para cada 100 cm<sup>3</sup> do meio descrito. Incubar em estufa a 28°C, durante 10 dias, agitando diariamente os recipientes. O repique de meio líquido para meio líquido deverá ser de 10 em 10 dias, na proporção de 10%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio descrito permite um rendimento médio de 300 mg de pó seco de *T. cruzi* por 1 000 cm<sup>3</sup>, após 10 dias de incubação, em estufa a 28°C. Todas as amostras de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho apresentaram o mesmo rendimento, com exceção da amostra Y que sempre apresentou média de rendimento inferior a 300 mg por 1 000 cm<sup>3</sup>. Sendo líquido e esterilizável pelo calor, pode ser empregado em grandes volumes, o que facilita a obtenção de grandes quantidades de *T. cruzi*.

Não foi nosso objetivo proceder a um estudo comparativo entre o meio descrito e os já publicados. O nosso interesse foi a obtenção de um meio de cultura para o *T. cruzi*, de preparo simples,

esterilizável pelo calor, utilizável em grandes volumes e que fôsse livre de precipitados de proteínas e de hemácias.

## RESUMO

É descrito um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, isento de hemácias e precipitados de proteínas, permitindo um rendimento médio de 300 mg de pó seco de *T. cruzi* por 1 000 cm<sup>3</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Bras. Méd. 27:225-226, 1913.
2. NOVY, F. G. & McNEAL, W. J. — On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis. 1:1-30, 1904.
3. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi*. Chagas, 1909. Rev. Inst. Bacteriol. 6:242-247, 1934.
4. SENEKJIE, H. A. — Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. 23:523-531, 1943.
5. CHANG, S. L. — Studies of haemoflagellates. I. A semi-solid medium and fluid medium with a solid for growing various species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 80:164, 1947.
6. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50:57-60, 1945.
7. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in liquid media. J. Bact. 57:265, 1949.
8. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61:709-714, 1951.
9. CITRI, N. & GROSSOWICZ, N. — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 13:273-278, 1955.
10. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. J. Parasit. 46:529, 1960.
11. BONÉ, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31:261-266, 1963.
12. NEAL, R. A. & MILES, A. R. — Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. Nature (London) 198:210-211, 1963.

## DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS VÍRUS DA VARIÓLA E DA VACÍNIA POR MEIO DE CULTURAS DE TECIDOS <sup>(a)</sup>

### DIFFERENTIATION BETWEEN SMALL-POX AND VACCINIA VIRUSES IN TISSUE CULTURES

ADELA ROTH <sup>(b)</sup>

MARTA IRENA MALACHOWSKA <sup>(b)</sup>

LUÍS FLORENCIO DE SALLES GOMES <sup>(b)</sup>

#### SUMMARY

The technique of Lindenmann for testing the effect of interferon on viruses grown in tissue cultures was successfully employed in the macroscopic differentiation between discrete lesions of variola and vaccinia viruses grown in cultures of chicken embryo, human kidney and amnion cells. Staining with crystal violet improved the differentiation.

#### INTRODUÇÃO

Pelo fato de provocarem reações imunológicas cruzadas, a diferenciação dos vírus variólico e vacínico em laboratório é feita tanto pela apreciação macroscópica da morfologia das lesões provocadas em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha como por passagens seriadas em pele de coelho. Existem trabalhos demonstrando alterações citopáticas bem definidas causadas por estes dois vírus em culturas de células HeLa, Fl, KB, RBV e outras, nas quais a observação microscópica cuidadosa permite diferenciá-los quando são usadas pequenas doses de vírus <sup>1,2,3,7,8,9,10</sup>.

A formação de placas pelo vírus vacínico e de pontos de proliferação pelo vírus variólico, em culturas de células, possibilitou não só a titulação destes vírus como a de soros específicos e também a de interferon <sup>3,4,5,8</sup>.

Neste trabalho, apresentamos aspectos morfológicos visualizados macroscopicamente, causados pelos vírus variólico e vacínico em culturas de células de em-

brão de galinha, de rim humano e amnióticas humanas, segundo a técnica de LINDENMANN <sup>4</sup>.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Usaram-se as seguintes células: primárias de embrião de galinha (EG), em segunda passagem, tanto estacionárias como em suspensão; linhagem de rim humano (HK), recebida do Instituto Biológico de Ness Ziona, Israel, e linhagem de âmnio humano (AV<sub>3</sub>), recebida do Laboratório de Vírus da Ch. Pfizer Co. Inc. E.E.UU. O meio de manutenção das células foi o de Hanks com lactalbumina e soro de vitelo a 10%, contendo 100 unidades de penicilina e 100 microgramas de estreptomicina por ml de meio.

As amostras de vírus usadas foram: 1) linfa vacínica, fornecida pelo Instituto Butantan, para vacinação antivariólica, cujo vírus foi adaptado a membranas cório-alantóides de ovos embrionados de

(a) Trabalho realizado na Secção de Vírus Ectodermotrópicos da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

galinha, em nosso laboratório, e recebeu a denominação de Bt; 2) as amostras de vírus variólico, denominadas "1026" e "1080", por nós isoladas, em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, de pacientes de varíola menor (alastrim), internados no Hospital "Emílio Ribas".

Estas duas amostras foram identificadas com provas de soro-neutralização.

Tôdas as amostras de vírus foram tituladas nas células escolhidas para a determinação da dose 50% (DCT<sub>50%</sub>) e ponto final (End point), segundo as técnicas correntes de rotina. O número de tubos usados para estas determinações foi de 4 para cada diluição do vírus e a temperatura de incubação foi a de 36°C. A leitura final foi feita no 6.º dia após a inoculação do vírus.

Para as experiências, usamos culturas de células, em camada única, em frascos retangulares de 60 cm<sup>3</sup> de capacidade, nos quais, antes da inoculação do vírus, o meio nutritivo era substituído por meio de Hanks com soro de vitelo a 2% (com antibióticos), no volume de 3,5 a 4,0 ml por frasco, quantidade suficiente para cobrir todo o tecido.

Após a inoculação do vírus, todos os frascos eram incubados em estufa (36°C) e, de acôrdo com nosso planejamento, retirávamos os frascos da incubação, desprezávamos o meio nutriente e corávamos as células com solução aquosa de cristal violeta a 10%, durante dois minutos. Em seguida, lavávamos as células com água de torneira no mínimo três vezes e deixávamos secar os frascos para a apreciação dos resultados. Da mesma maneira procedíamos com os frascos-contrôle das células.

Tendo em vista determinar em que dia de incubação as lesões eram macroscopicamente mais facilmente identificadas e se doses variáveis de vírus influenciavam a morfologia destas alterações citopáticas, usamos inicialmente 10, 100 e 1 000 DCT<sub>50%</sub> dos três vírus escolhidos nas células EG, HK e AV<sub>3</sub>. Procedíamos à retirada de 4 frascos de cada sistema de células inoculadas com vírus e de 1 frasco-contrôle de células de estufa após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incuba-

ção. Após coloração e tempo necessário para secagem, os resultados eram observados a olho nu ou por meio de lupa de 5 aumentos.

Posteriormente, tendo em vista os resultados desta experiência, passamos a utilizar uma série de 10 materiais colhidos de vesico-pústulas de doentes de alastrim internados no Hospital "Emílio Ribas". Colocávamos em 1,0 ml de meio de Earle o conteúdo variável de uma a cinco lesões, tratávamos êstes materiais com antibióticos (1 000 U de penicilina e 250 mg de estreptomina), deixávamos na temperatura ambiente por duas horas, centrifugávamos (2 000r.p.m por 10-15m) e retirávamos o sobrenadante, que era usado para inoculações em frascos de células HK. Após 48 e 72 horas de incubação, procedíamos à coloração e observação dos resultados.

Dois materiais, um deles constituído pelo conteúdo de lesão vacínica da pálebra e outro pelo raspado de uma lesão do lábio inferior de diferentes casos humanos de vacínia generalizada, também foram experimentados nestas últimas células.

## RESULTADOS

Após 24 horas de incubação, nenhuma alteração foi observada macroscopicamente nos frascos com células EG, HK e AV<sub>3</sub>, inoculadas com as três amostras de vírus, em doses diferentes (10, 100 e 1 000 DCT<sub>50%</sub>). Após 48 horas de incubação, verificamos macroscopicamente a presença de lesões proliferantes causadas pelas amostras de vírus variólico, com as três doses usadas, nas células EG e HK, e de placas causadas pelo vírus vacínico, nestas mesmas células. Não foram observadas macroscopicamente alterações das células AV<sub>3</sub> inoculadas com êstes vírus. Após 72 horas de incubação, as lesões proliferantes causadas pelo vírus variólico e as placas causadas pelo vírus vacínico eram verificadas com maior evidência nas células EG e HK. Não se observou nenhuma alteração macroscópica provocada por êste vírus no sistema de células AV<sub>3</sub>. Após 96 horas de incubação, além das alterações causadas pelos vírus variólico e vacínico nas células EG e HK, verificamos macroscò-

picamente pontos de proliferação causada pelo vírus variólico e placas causadas pelo vírus vacínico nas células AV<sub>3</sub>. Após 120 horas de incubação, limite de nossa experiência, além das alterações nas células EG e HK, notava-se o aparecimento de alterações nas células AV<sub>3</sub>, causadas pelos vírus variólico e vacínico.

É interessante notar que macroscopicamente as lesões proliferantes causadas pelo vírus variólico coram-se mais intensamente pela violeta que o resto do tecido aparentemente não afetado pelo vírus. Ao redor de 72-96 horas de incubação, êste agrupamento de células degeneradas parece destacar-se mais do resto do tecido vizinho, ou ainda, tornar-se mais distinto macroscopicamente, pela formação de um halo ao redor da lesão. Êste fato foi verificado nas células EG e HK, o mesmo acontecendo nas células AV<sub>3</sub>, com incubação de 96-120 horas. Por outro lado, as placas causadas pelo vírus vacínico, com 48 horas de incubação, demonstraram macroscopicamente, após coloração, contornos irregulares mais intensamente corados que o resto do tecido aparentemente não afetado pelo vírus, sendo perfeitamente visível um pequeno centro necrótico. Depois de 72 e 96 horas de incubação, estas placas assumiram contornos muito regulares e muito nítidos, não se percebendo qualquer resto celular em seu interior. Também nas células AV<sub>3</sub> êste aspecto foi observado com maior tempo de incubação vírus-células. Após 96 horas de incubação, nas células EG e HK, verificou-se ainda que as placas causadas pelo vírus vacínico aumentam de tamanho, podendo juntar-se às placas secundárias ou às primárias circunvizinhas, formando placas maiores que, por vêzes, lembram a forma de vírgula ou cometa.

Inocularam-se, em menor número de frascos de células EG e HK, quantidades mais concentradas (10 000 e 100 000 DCT<sub>50%</sub>) dos vírus variólico e vacínico e, após 48, 72 e 96 horas de incubação, foram coradas e observadas. O resultado demonstrou, confirmando os achados microscópicos de VIEUCHANGE<sup>9</sup>, em tubos, não ser possível qualquer caracterização macroscópica do vírus variólico ou vacínico, devido ao rápido e extenso efeito citopático. Com incubações

de 48-72 horas, pequena parte do tecido ainda colado à parede dos frascos não permitia a observação morfológica das lesões específicas individualizadas. Por esta razão, com os materiais colhidos diretamente dos doentes, inoculávamos três frascos, o primeiro com o inóculo sem diluição, o segundo e terceiro com diluições do material a 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. Em nenhuma ocasião foi preciso aumentar as diluições dos materiais experimentados para a observação e caracterização macroscópica das lesões específicas.

### DISCUSSÃO

A comparação macroscópica das lesões produzidas pelos vírus variólico e vacínico em culturas de tecido constitui um dado a mais para a diferenciação dêstes dois vírus. Estas lesões, após coloração, podem ser caracterizadas com clareza, com 48 horas de incubação do vírus nos sistemas celulares EG e HK.

A leitura microscópica das culturas de células em tubos inoculados com doses maciças dêstes vírus não possibilita a apreciação das lesões, devido ao rápido efeito citopático<sup>9</sup>.

A técnica de Lindenmann, nas culturas de células em garrafas, proporciona maior clareza para a observação macroscópica das lesões causadas por êstes dois vírus, o que nos parece tão simples quanto a observação macroscópica das lesões provocadas por êstes mesmos vírus na membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha.

Os experimentos, visando a aplicação prática do diagnóstico diferencial entre êstes vírus, demonstraram a viabilidade dêste diagnóstico, com os resultados de 10 amostras de portadores de varíola minor e 2 amostras de portadores de vacínia generalizada. Tôdas estas amostras foram paralelamente isoladas e identificadas, segundo a morfologia das lesões e por provas de sôro-neutralização em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha.

Outros vírus são capazes de provocar lesões em células semelhantes às causadas pelo vírus vacínico, porém, na prática diagnóstica, a sôro-neutralização es-



pecífica esclarece a etiologia, acrescenta dos dados da procedência do material e da suspeita clínica.

#### RESUMO

A técnica de Lindenmann em culturas de células de embrião de galinha, rim humano e âmnio humano foi empregada para a observação macroscópica das lesões provocadas pelos vírus variólico e vacínico. Verificou-se ser possível, pela técnica em questão, a diferenciação macroscópica entre estes dois vírus. A coloração das lesões facilita sobremaneira a observação da sua morfologia. A viabilidade do método foi observada com o material de dez pacientes de varíola minor (alastrim) e de dois de vacínia generalizada.

#### BIBLIOGRAFIA

1. NOYES, W.F. — A simple technic for demonstrating plaque formation with virus of vaccinia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83:426-429, 1953.
2. ST. GEME, J.W., Jr. — A simple *in vitro* assay for vaccinia virus using tube cultures of human cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.: 113:133-135, 1963.
3. KIRN, A. & BRAUNWALD, J. — Titrage du virus vaccinal par la méthode des plages sur souche cellulaire KB. 1. Exposé de la méthode. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 103:832-840, 1962.
4. LINDENMANN, J. & GIFFORD, G.E. — Studies of vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon. 1. Dynamics of plaque formation by vaccinia virus. Virology 19:283-293, 1963.
5. MAHNEL, H. & MUNZ, E. — Differenzierung von Variola- und Vakzine-virus in HeLa- und F1-Zellkulturen. Zbl. Bakt. (Orig.) 178:149-155, 1960.
6. PORTERFIELD, J.S. — A simple plaque-inhibition test for the study of arthropod-borne viruses. Bull. Wld. Hlth. Org. 22:373-380, 1960.
7. PORTERFIELD, J.S. & ALLISON, A.C. — Studies with poxviruses by an improved plaque technique. Virology 10: 233-244, 1960.
8. POSTLETHWAITE, R. — A plaque technique for the titration of vaccinia virus in chick embryo cells and some features of vaccinia infection in this system. Virology 10:466-482, 1960.
9. VIEUCHANGE, G., BRION, G. de & GRUEST, J. — Virus variolique en cultures de cellules. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 95:681-693, 1958.
10. YOUNGNER, J.S. — Virus adsorption and plaque formation in monolayer cultures of trypsin-dispersed monkey kidney. J. Immun. 76:288-292, 1956.

Recebido para publicação em 1.º de outubro de 1964

Fig. 1

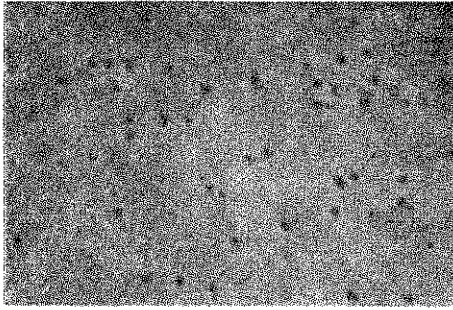


Fig. 2

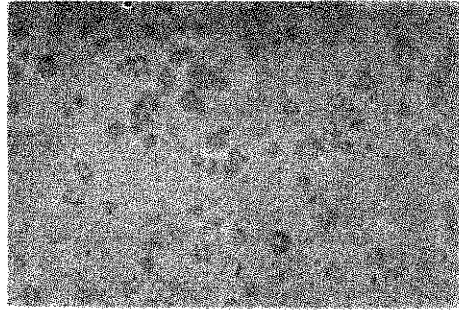


Fig. 3

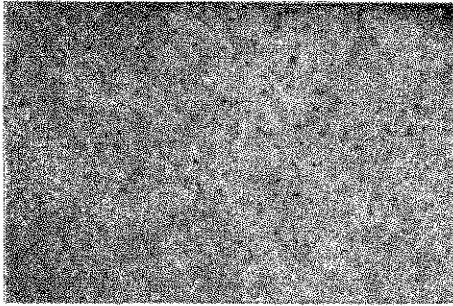


Fig. 4

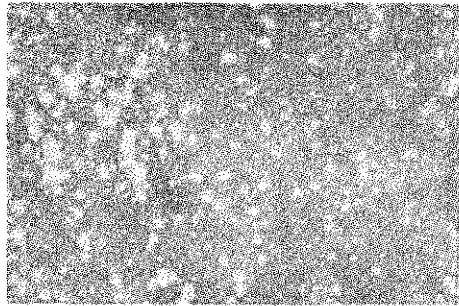


Fig. 5

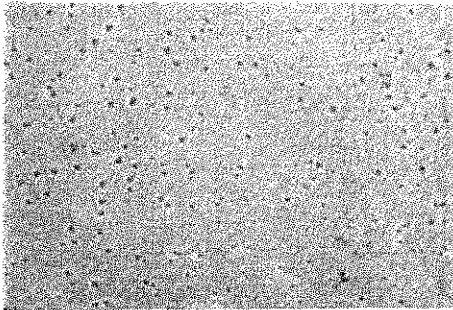


Fig. 6

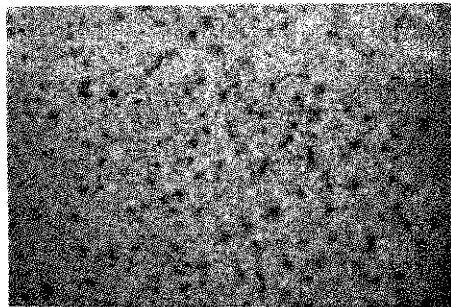
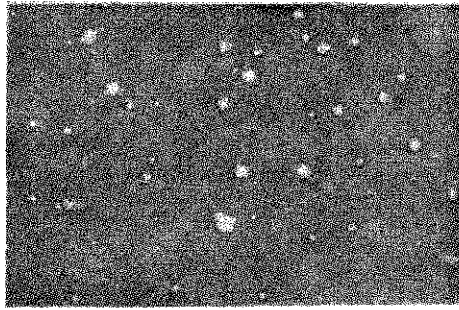


Fig. 7

Fig. 1 — Vírus variólico  
(em culturas E.G. com 48 horas de incubação)

Fig. 2 — Vírus vacínico  
(em culturas E.G. com 48 horas de incubação)

Fig. 3 — Vírus variólico  
(em culturas H.K. com 72 horas de incubação)

Fig. 4 — Vírus vacínico  
(em culturas H.K. com 72 horas de incubação)

Fig. 5 — Vírus variólico  
(em culturas AV<sub>3</sub> com 96 horas de incubação)

Fig. 6 — Vírus vacínico  
(em culturas AV<sub>3</sub> com 96 horas de incubação)

Fig. 7 — Material tirado de pústulas de um caso  
de variola, inoculado em células H.K., com 48  
horas de incubação



## ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL NO CARNEIRO <sup>(a)</sup>

### EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS IN THE SHEEP

LUIZ DOS SANTOS <sup>(b)</sup>

SEBASTIÃO DE CAMARGO CALAZANS <sup>(c)</sup>

CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO <sup>(b)</sup>

#### SUMMARY

It was obtained the experimental infection of two sheeps (*Ovis aries aries*) with *Schistosoma mansoni*. It was also verified that one of the animals still was infected a year after the inoculation. It might be suggested a possible role of the sheep in the epidemiology of schistosomosis.

#### INTRODUÇÃO

Nos trabalhos experimentais que vimos executando, no Laboratório Regional de Taubaté, sobre esquistossomose mansônica, temos dado preferência ao camundongo branco (*Mus musculus var. albinus*), em vista das vantagens que oferece pela facilidade de criar e de manter, manejo cômodo e, sobretudo, pelo comportamento semelhante ao do homem em relação à helmintose. Entretanto, a realização de pesquisas concernentes à sorologia e à terapêutica experimental da esquistossomose exigiram a utilização de animais de maior porte. Dos animais silvestres, tidos como sensíveis à moléstia, tais como a paca (*Cuniculus paca paca*), o gambá (*Didelphis paraguayensis*), o preá (*Cavia aperea aperea*) e o quati (*Nasua narica*), nenhum poderia ser escolhido pelas dificuldades na sua obtenção e manutenção, bem como no manejo, que não

é isento de perigos. Por sugestão de Calazans, para que se utilizasse o carneiro, em vista do seu grande porte, manejo fácil e de ser suscetível à *Fasciola hepatica*, trematódeo muito semelhante ao *Schistosoma mansoni*, que nele ocasiona moléstia excepcionalmente parecida com a esquistossomose mansônica (localização nos canais biliares, angiocolite, cirrose pericanicular centrífuga, compressão das vênulas hepáticas), resolvemos verificar a possibilidade de infestá-lo com cercárias de *Schistosoma mansoni*.

LEIPER<sup>1</sup>, MacHATTIE & CHADWICK<sup>2</sup>, e MacHATTIE, MILLS & CHADWICK<sup>3</sup> referem não ter conseguido infestar carneiros com cercárias de *Schistosoma haematobium*; MARTINS<sup>4</sup> afirma ser muito variável a suscetibilidade individual dos carneiros às cercárias de *Schistosoma mansoni*.

(a) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Taubaté).

(b) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Taubaté).

(c) Ex-Chefe dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz.

### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos dois carneiros machos, adultos, sem raça definida, aos quais demos números; n.º 1 (carneiro com chifres) e n.º 2 (carneiro môcho).

Antes de proceder às inoculações, efetuamos exames de fezes de ambos os

animais, em número de sete, pelo método de Hoffmann-Pons-Jenner, que foram sempre negativos para ovos de *Schistosoma mansoni*.

Efetuamos, também, exames hematológicos, cujos resultados estão expressos no Quadro I:

### QUADRO I

#### Exames hematológicos

ELEMENTOS	Valores encontrados		Valores normais	
	Carneiro n.º 1	Carneiro n.º 2	Burnett 6, apud 5	Antunes 5
Leucócitos p/mm <sup>3</sup> .....	7 700	7 000	7 700	10 500
Neutrófilos % .....	24	31	30 - 55	14
Metamielócitos % .....	0	0	...	2
Bastonetes % .....	2	1	...	2
Segmentados % .....	22	30	...	10
Eusínófilos % .....	5	5	0,2 - 8	2
Linfócitos % .....	67	59	40 - 60	80
Monócitos % .....	4	5	3 - 11	4
Hemoglobina:				
g p/100 cm <sup>3</sup> .....	10,0	12,0	...	...
% .....	62	75	...	...
Hemácias p/mm <sup>3</sup> .....	7 500 000	8 000 000	8 000 000	8 000 000

Reações de Hanger executadas com sôro dos animais foram negativas.

Foram empregados dois processos para inoculação dos carneiros: *per outem* e *per os*. No primeiro, o quarto posterior direito do animal, previamente depilado e raspado com lâmina de barbear, lavado com água e sabão e cuidadosamente enxuto, foi pôsto em contacto direto (mergulhado em líquido infestante) durante 30 minutos; em seguida, o animal foi forçado a beber o líquido infestante.

Para o preparo de líquido infestante, 150 caramujos infestados foram colocados num cristalizador com cêca de 3 litros de água e deixados sob luz solar durante aproximadamente 3 horas.

O carneiro n.º 1 foi pôsto em contacto com um volume de 3 litros de líquido

infestante, contendo 17 cercárias por cm<sup>3</sup> (51 000 no volume total); para o carneiro n.º 2, utilizamos 2 ½ litros, contendo 24 cercárias por cm<sup>3</sup> (60 000 no volume total).

Nas inoculações por via oral foram utilizados volumes de 50 cm<sup>3</sup> de líquido infestante, recebendo o carneiro n.º 1, 850 cercárias e o carneiro n.º 2, 1 200 cercárias.

Foram inoculados dois camundongos testemunhos para cada carneiro, para contrôle de experimentação.

### RESULTADOS

Nos quadros seguintes resumiremos os dados encontrados:

QUADRO II

CARNEIRO N.º 1

Dias após a infestação	ACHADOS
de 30 a 50	Exames de fezes diários, negativos.
33	Perfusão do fígado e mesentério de um dos camundongos: 8 exemplares de <i>Schistosoma mansoni</i> (6 machos adultos e um casal em cópula).
50	Presença de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nas fezes do animal e nas do camundongo de controle.
71, 72, 97, 224, 257, 286 e 295	Presença de ovos nas fezes.
240	Reação de Hanger: fortemente positiva (+++). Transaminase glutâmico-pirúvica: 60 unidades Sigma-Frankel em 1 cm <sup>3</sup> de soro. Reação de fixação do complemento (método de Pellegrino e Kágan): positiva. Exames hematológicos (ver Quadro IV).

QUADRO III

CARNEIRO N.º 2

Dias após a inoculação	ACHADOS
de 30 a 40	Exames de fezes negativos.
40	Presença de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nas fezes do camundongo testemunho.
46	Presença de ovos nas fezes do animal.
de 47 a 70	Exames de fezes novamente negativos.
237	Reação de Hanger: fortemente positiva (+++). Transaminase glutâmico-pirúvica: 20 unidades Sigma-Frankel em 1 cm <sup>3</sup> de soro. Reação de fixação do complemento (método de Pellegrino e Kágan): positiva. Exames hematológicos (ver Quadro IV).

QUADRO IV

Comparação entre os exames hematológicos realizados antes e depois da inoculação

ELEMENTOS	Carneiro n.º 1		Carneiro n.º 2	
	Antes	Após	Antes	Após
Leucócitos p/mm <sup>3</sup> .....	7 700	7 600	7 000	8 200
Neutrófilos % .....	24	40	31	28
Metamielócitos % .....	0	0	0	0
Bastonetes % .....	2	0	1	0
Segmentados % .....	22	40	30	28
Eusínófilos % .....	5	15	5	11
Linfócitos % .....	67	44	59	59
Monócitos % .....	4	1	5	2
Hemoglobina:				
g p/100 cm <sup>3</sup> .....	10,0	11,4	12,0	10,4
% .....	62	71	75	65
Hemácias p/mm <sup>3</sup> .....	7 500 000	4 500 000	8 000 000	4 500 000

CONCLUSÕES

Os achados das experiências realizadas permitem afirmar que o carneiro é passível de infestar-se pelo *Schistosoma mansoni* e tornar-se portador da doença, pelo menos durante um ano, o que foi evidenciado pelos resultados referentes ao carneiro n.º 1. No caso do carneiro n.º 2, embora os exames se tenham tornado negativos logo após o aparecimento de ovos nas fezes, foram positivas a reação de Hanger e a reação de fixação do complemento. Ambos os animais apresentaram eosinofilia moderada posterior à inoculação, embora não fossem altos os seus índices, como acontece na esquistossomose humana<sup>7</sup>. É evidente a necessidade de se repetir a experiência com maior número de animais, para comprovação da possibilidade de se poder atribuir ao carneiro importância epidemiológica. Realmente, daqui por diante, as autoridades sanitárias, ao lado da vigilância que devem exercer sobre muitos animais silvestres, tais como o mão pelada (*Procyon cancrivorus*)<sup>8</sup>, a paca (*Cuniculus pacca*) e o furão (*Grison furax*)<sup>9</sup>, o quati (*Nasua narica*), o gambá (*Didelphis paraguayensis*)<sup>10</sup>, o rato silvestre

(*Rattus rattus frugivorus*)<sup>11</sup> e a cutia (*Dasyprocta aguti* Lin.)<sup>12</sup>, devem ficar alerta e precaver-se ante a presença de carneiros em regiões que sejam focos de planorbídeos.

RESUMO

Os autores conseguiram infestar experimentalmente dois carneiros com *Schistosoma mansoni*, verificando ainda que um deles tornou-se portador da infecção pelo menos durante um ano.

Chamam também a atenção para a possibilidade de assumirem esses animais importância epidemiológica, principalmente em regiões que sejam focos de planorbídeos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LEIPER, R. T. — Researches on Egyptian billharziasis. London, Bale Sons & Danielsson, 1915. Part I, 42.
2. MACHATTIE, C. & CHADWICK, C. R. — *Schistosoma bovis* and *S. mattheei* in Irak with notes on the development of eggs of the *S. haematobium* pattern. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 26:147-156, 1932.

3. MACHATTIE, C., MILLS, E. A. & CHADWICK, C. R. — Can sheep and cattle act as reservoirs of human schistosomiasis?. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 27:173-184, 1933.
4. MARTINS, A. V. — Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. Bull. Org. Mond. Santé 18:937, 1958.
5. ANTUNES, A. — Morfologia dos elementos figurados do sangue. I e II. Rev. Industr. Animal 3(9):992-999 e 3(10):1123-135, 1933.
6. BURNETT, S. H. — The clinical pathology of the blood of domesticated animals. Citado por ANTUNES, A. 5. p. 1124.
7. MEIRA, J. A. — Quadro clínico da esquistossomose mansônica. Rev. Bras. Malariol. 11(2/3):247-357, 1959.
8. RUIZ, J. M. — Schistosomose experimental. 1. Receptividade de *Procyon cancrivorus* à infestação pelo *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Butantan 24(2):111-114, 1952.
9. RUIZ, J. M. — Esquistossomose experimental. 3. *Cuniculus pacca pacca* e *Grison furax*, novos animais receptíveis a infestação pelo *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Butantan 25(1):23-26, 1953.
10. RUIZ, J. M. — Esquistossomose experimental. 4. *Nasua narica* e *Didelphis paraguayensis*, animais sensíveis à infestação experimental pelo *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Butantan 25(2):23-27, 1953.
11. BARBOSA, F. S., DOBBIN, J. E. Jr., & COELHO, M. V. — Infestação natural de *Rattus rattus frugivorus* por *Schistosoma mansoni* em Pernambuco. Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães 2(4):43-46, 1953.
12. PRICE, D. L. — Laboratory infection of the Agouti, *Dasyprocta aguti*, with *Schistosoma mansoni*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2(5):926-929, 1953.

Recebido para publicação em 11 de setembro de 1963



