

A coloração de, lípidios pelo Sudão III. Importância na classificação histopatológica da hanseníase (*)

RENE GARRIDO NEVES (**)

RESUMO — 1.º) As técnicas de coloração para lípidios devem ser realizadas, rotineiramente, ao lado da Hematoxilina eosin e da coloração de bacilos a fim de aumentar a precisão diagnóstica das diversas formas clínicas da Hanseníase.

2.º) O Sudão III usado em 8972 casos permite concluir que, apesar dos pequenos inconvenientes da fácil cristalização e descoramento das preparações é imprescindível à correção do diagnóstico histopatológico.

3.º) Na Hanseníase Indeterminada a pesquisa de lípidio patológico é sempre negativa. Alguns casos clinicamente diagnosticados como Indeterminados revelaram tratar-se de Hanseníase Virchowiana incipiente ou em fase de transição graças ao achado de células de Virchow típicas com o duplo componente bacilos-lípido. Somente o emprego obrigatório da coloração para lípidios despista estes casos.

4.º) Na Hanseníase Tuberculóide, com granulomas quiescentes a pesquisa de lípidios é sempre negativa.

5.º) Na Hanseníase Tuberculóide reacional a pesquisa de lípidio anormal é negativa porém graças ao edema que desestrutura os granulomas aparece uma tonalidade amarelada, clara e difusa.

Isto se deve à solubilização parcial do corante no líquido de edema que contém uma fração de lipóides normais. Um patologista não familiarizado com esta imagem poderia considerá-la como positiva (é portanto falso-positiva).

6.º) Consideramos como Hanseníase Tuberculóide em reação quando nem todos os granulomas apresentam edema separando as células epitelióides; a cor amarelada difusa somente é observada nos que estiverem nesta fase de transição.

7.º) Na Hanseníase Virchowiana em atividade a pesquisa de lípidios foi positiva em mais de 99% dos casos.

8.º) Na Hanseníase Virchowiana em regressão e residual a presença de lípidios é praticamente de 100%.

No estágio final a deposição do lípidio se faz também no interior de grandes vacúolos, cavidades e no citoplasma de células gigantes do tipo corpo estranho.

9.º) Na Hanseníase Dimorfa encontramos positividade em 75,9% dos casos.

10.º) Na Hanseníase Dimorfa é muito importante o reconhecimento dos 2 tipos de imagem pois elas podem estar presentes na mesma preparação:

- lípidio localizado grumoso e nítido, nas células de Virchow;
- lípidio difuso, amarelo claro, nos granulomas tuberculóides com edema.

Termos índice: Lípidios, Sudão III, Hanseníase, Célula de Virchow, Indeterminada, Virchowiana Tuberculóide, Dimorfa.

(*) Trabalho de habilitação ao Título de Mestre apresentado no Curso de Pós-Graduação em Dermatologia e Sifilografia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense — Niterói — Estado do Rio de Janeiro. 1976.

(**) Médico Encarregado. da Turma de Anatomia Patológica do ex-Instituto de Leprologia do Ministério da Saúde. Rio. Brasil.

1. HISTÓRICO

A degeneração lipídica foi referida por Virchow (43), em 1864, principalmente nas lesões mais antigas. Hansen (19), em 1871, utilizando o ácido ósmico identifica os bacilos e realiza a primeira coloração dos lipídios. Em 1893, Philipsson (30), utilizando ainda o ósmio descreve o aspecto finamente granular do lipídio e a sua localização intra-citoplasmática, principalmente, nas paredes dos vacúolos. Mitsuda (29) emprega em 1902 o Sudão III e demonstra que a vacuolização celular não era provocada por edema e sim por substância gordurosa. Atribui a Unna prioridade do reconhecimento da natureza lipídica dos vacúolos da célula de Virchow.

Trabalhos posteriores ampliaram os conhecimentos relativos ao aspecto morfológico da deposição dos lipídios na célula, a sua origem e a sua composição bioquímica, bastando citar os de Cedercreutz (10), Herxheimer (21), Stein (40, 41) e Kedrowsky (22). Os primeiros a realizarem estudo sobre a presença de lipídios relacionando com as formas clínicas na Classificação Sul Americana foram Rath de Souza e Alayon (38) em 1942, no nosso país. Azulay & Andrade (3, 4, 6, 6) tendo implantado, rotineiramente, a técnica de coloração pelo Sudão III no laboratório do ex-Instituto de Leprologia do Rio de Janeiro, desde 1948, publicaram sucessivos trabalhos baseados em notável acervo — a última e expressiva casuística registrava a análise de 7375 preparações.

Os estudos mais recentes como os de Harada (20), Sugai (42), Ghosh *et al.* (18) e Sakurai & Skinsnes, (36, 37) são orientados para a histoquímica e a cromatografia dos lipídios das lesões hansenóticas.

2. COLORAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os corantes usados, naturais ou sintéticos, são lipossolúveis e insolúveis na água. O mecanismo de coloração é puramente físico e, segundo Lison (27) — "há uma simples transferência de cor de um solvente medíocre para um bom solvente". Obedece à lei da partição cromática de Berthelot — o corante é dissolvido numa mistura de um solvente orgânico e água, em proporção adequada, de modo que o coeficiente de partição entre a mistura e o corpo graxo seja muito pequeno. Quando os cortes histológicos são colocados nesta solução, o corante se dissolverá em alta concentração nos lipídios. Deve-se preservar ao máximo o lipídio existente nos tecidos, evitando-se a sua solubilização no solvente do corante. Assim sendo, é indispensável que os solventes sejam soluções hidroalcoólicas, atendendo à lei da partição — "se um soluto se distribui entre duas fases líquidas a relação das concentrações no equilíbrio é uma constante".

Castro (9) explica do seguinte modo: "o álcool absoluto dissolve o corante em boa proporção mas solubiliza, parcialmente, o lipídio; a água não dissolve o corante nem o lipídio porém mistura-se bem ao álcool; o corante é solúvel ao mesmo tempo no álcool e no lipídio".

O Sudão III (benzeno-azobenzeno-azobetanaftol) foi introduzido em técnica histológica em 1896 por Daddi (11). Na técnica original o corante é dissolvido à saturação na mistura, em partes iguais, de álcool a 70% e acetona; veja-se Lillie (28) e Fernandes (15). Apesar da existência atual de outros corantes como o Sudão IV ou Escarlata R, o Sudão negro B, o "Oil red O", o "Oil red 4 B", ele continua sendo dos mais utilizados. Inclui-se entre os corantes gerais de evidênciação de lipídios, e as principais deficiências

apontadas são: a cristalização e o fácil descoramento das preparações histológicas. A cristalização decorre das soluções saturadas do corante e da ação desidratante dos preparados usados na montagem das lâminas. As apresentações comerciais não apresentam composição química uniforme e, segundo Romeis (35), contêm basicamente 3 corantes, dos quais apenas um parece ser atuante. A heterogeneidade observada parece, entretanto, ter utilidade prática, pois, diferenças tintoriais serão observadas entre a gordura normal e a patológica de composição química e lipofilia diversas.

3. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

- 3.1 Técnica de coloração para lípidios — Sudão III
(método de rotina usado no Instituto de Leprologia)
- 3.1.1 Fazer cortes em congelação com 10 a 15 micra de espessura
- 3.1.2 Colocar os cortes n'água comum
- 3.1.3 Passar os cortes n'água destilada
- 3.1.4 Passar, rapidamente, no álcool a 70%
- 3.1.5 Corar pelo Sudão III durante 15 minutos em frasco comum com rolha de plástico ou em vidro de relógio
- 3.1.6 Lavar no álcool a 70%
- 3.1.7 Lavar n'água destilada (duas passagens)
- 3.1.8 Corar pela hematoxilina de Harris durante meio a um minuto

- 3.1.9 Lavar n'água destilada
- 3.1.10 Passar n'água amoniacal — placa de Petri com água e 5 gotas de amônia
- 3.1.11 Distender os cortes sobre lâmina e deixar escorrer o excesso de água
- 3.1.12 Montar em geléia de Kaiser
- 3.1.13 Fechar as bordas da lâmina com esmalte de unhas incolor.

Preparo dos corantes

- a) Sudão III } aã
 Álcool a 70% }
 Acetona
 Sudão III até saturação

Triturar o corante em grau previamente aquecido e depois acrescentar a solução aos poucos. Deixar na estufa a 37°C durante 24 horas. Filtrar em papel de filtro antes de usar. Na prática utilizamos aproximadamente 1,0 g do corante para 100,0 ml da mistura álcool-acetona.

- b) Hematoxilina de Harris
 Hematoxilina em cristais 2,5 g
 Álcool a 95% 25,0 ml
 Alume de potássio 50,0 g
 Água destilada 500,0 ml
 Oxido de mercúrio .. 1,25 g

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alume na água, aquecendo um pouco. Misturar as 2 soluções e levar à fervura o mais rápido possível. Retirar do fogo e juntar o óxido de mercúrio. Aquecer novamente até to-

mar a cor púrpura escura (1 minuto, aproximadamente). Retirar do fogo e imergir em vasilha com água fria. Após o esfriamento a solução estará pronta para uso.

c) Gelatina de Kaiser

Gelatina	7,0 g
Água destilada	50,0 ml
Glicerina	25,0 ml
Ácido fênico	1,0 g

Juntar a gelatina na água quente, agitando. Retirar do fogo e acrescentar a glicerina e, logo a seguir, o ácido fênico.

- 3.2 Técnica de coloração para lipídios
Sudão III. Modificação de Inácio de Castro (9)
- 3.2.1 Fazer cortes em congelação
- 3.2.2 Passar n'água destilada
- 3.2.3 Passar no álcool a 79 GL a 15°C
- 3.2.4 Deixar na solução corante durante 15 minutos, em frasco bem arrolhado
- 3.2.5 Lavar rapidamente no álcool a 79 GL
- 3.2.6 Imergir n'água destilada
- 3.2.7 Contrastar pela hematoxilina de Delafield diluída ao terço, 30 a 60 segundos

3.2.8 Lavar n'água novamente

- 3.2.9 Passar n'água amoniacal a loto
- 3.2.10 Passar n'água destilada, rapidamente
- 3.2.11 Montar em gelatina de Kaiser
- 3.2.12 Fechar as bordas da lâmina para boa conservação

Reagentes

a) Solução estoque (A) — 0,2 g de Sudão III "Grübber" em 100,0 ml de álcool etílico absoluto.

b) Solução de uso (B) — num frasco de 100 ml colocar 10,0 ml de álcool absoluto e 0,2 g de colesterol. Completar o volume de 100 ml, após a dissolução completa do colesterol, com a solução A filtrada. No momento do emprego colocar 2,0 ml da solução B de uso, filtrada, em tubo de ensaio seco.

Juntar cuidadosamente, e sob agitação constante, gotas de água destilada até ligeira turvação. Retornar à limpidez com um mínimo de gotas de álcool absoluto. Transferir esta solução para um frasco arrolhado onde serão colocados os cortes, evitando a evaporação.

c) Álcool a 79°GL — na prática usamos a 80°GL aplicando as tabelas apropriadas de conversão de Gay-Lussac; vide Langeron (25).

Quantidade de água em ml necessária a ser acrescentada a 100,0 ml de álcool a diluir

Álcool a obter	Álcool a diluir								
	100	99	98	97	96	95	94	93	92
80	29,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	19,49	18,04	16,61

d) Hematoxilina de Delafield —
Diluída ao terço e filtrada antes de
usar.

Hematoxilina —	6,4 g
Alume de amônio —	60,0g
Álcool etílico	200,0 ml
Glicerina —	160,0 ml
Água —	640,0 ml

O modo de preparar é semelhante ao da Hematoxilina e de Harris porém a temperatura usada é de 25°C. Somente deve ser usada 6 ou 8 semanas após o preparo (período de amadurecimento). Permanece inalterada durante anos.

f) Solução de amoníaco a 1% em água destilada, recentemente preparada.

Observação — Segundo Castro as vantagens das modificações introduzidas são as seguintes: controle do título alcoólico; cristalização mínima do corante nas preparações; ausência do fenômeno de "coacervat" ; resultados mais constantes, uniformes.

4. RESULTADOS DA COLORAÇÃO PELO SUDÃO III

A aplicação da técnica aos cortes histológicos da pele normal revela a presença de gordura normal nas células adiposas da hipoderme, nos lóbulos das glândulas sebáceas e entre as lâminas da camada córnea da epiderme. É importante assinalar 2 aspectos:

- 4.1 a tonalidade amarelo-avermelhada;
- 4.2 a homogeneidade da coloração. (Microfotografias 1 e 2)

Os resultados tintoriais observados nos cortes histológicos de lesões pertencentes às diversas formas de Hanseníase podem ser assim resumidos:

na Hanseníase Indeterminada não se observa qualquer coloração ao nível dos infiltrados celulares quase sempre discretos e constitui-

dos por linfócitos, histiócitos e fibroblastos;

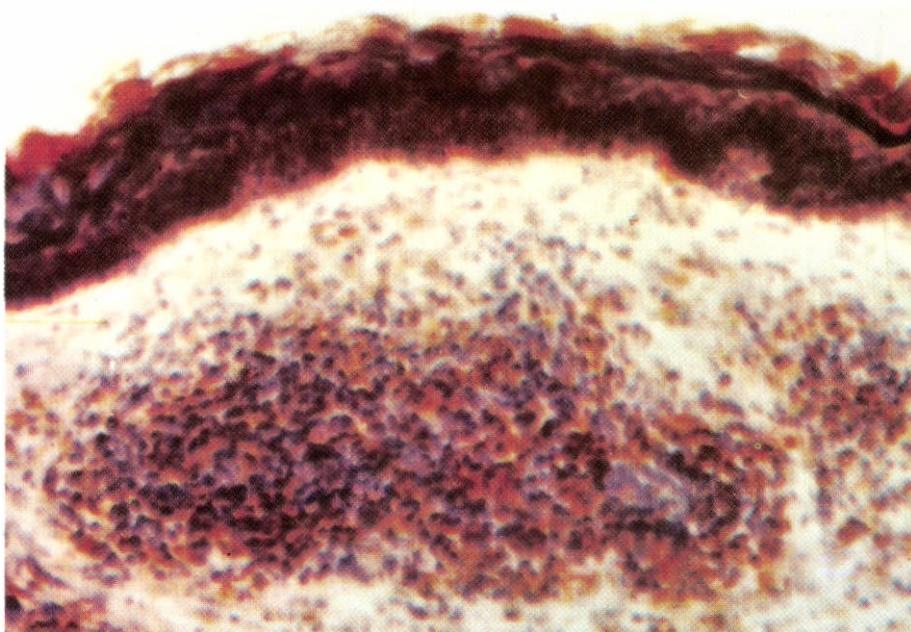
na Hanseníase Tuberculóide duas imagens podem ser apreciadas:

- a) nos granulomas tuberculóides quiescentes, em que as células epitelióides e gigantes estão unidas, sem edema inter ou intracelular não ocorre qualquer coloração;
- b) nos granulomas com intenso edema intercelular e intracelular, nos vacúolos das células epitelióides, vamos observar uma coloração amarelo-pálido, difusa; (Microfotografias n.º 3 e 4) ;

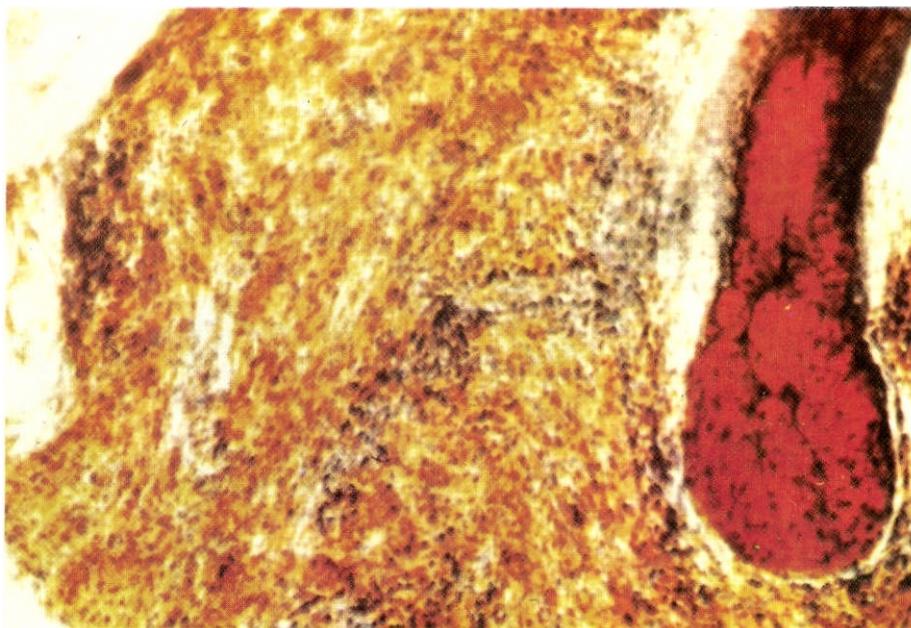
— na Hanseníase Virchowiana vamos encontrar a deposição nítida do corante ao nível dos infiltrados conferindo uma cor amarela, bem diferente da tonalidade da gordura normal; nas lesões recentes a quantidade de lipídeo pode ser discreta de aparência grumosa fina ou goticular nas lesões antigas é freqüente o achado de grandes grumos ocupando enormes vacúolos ou no interior de células gigantes, tipo corpo estranho; (Microfotografias 1, 2 e 5) ;

na Hanseníase Dimorfa, quando ambas as estruturas são concomitantes na mesma preparação histológica podemos encontrar as duas imagens acima descritas, isto é:

- a) coloração difusa, amarelo claro nos infiltrados tuberculóides em que as células epitelióides apresentarem edema intra e intercelular;
- b) coloração amarelo nítido, localizada e bem individualizada no citoplasma das células de Virchow. (Microfotografia n.º 6).

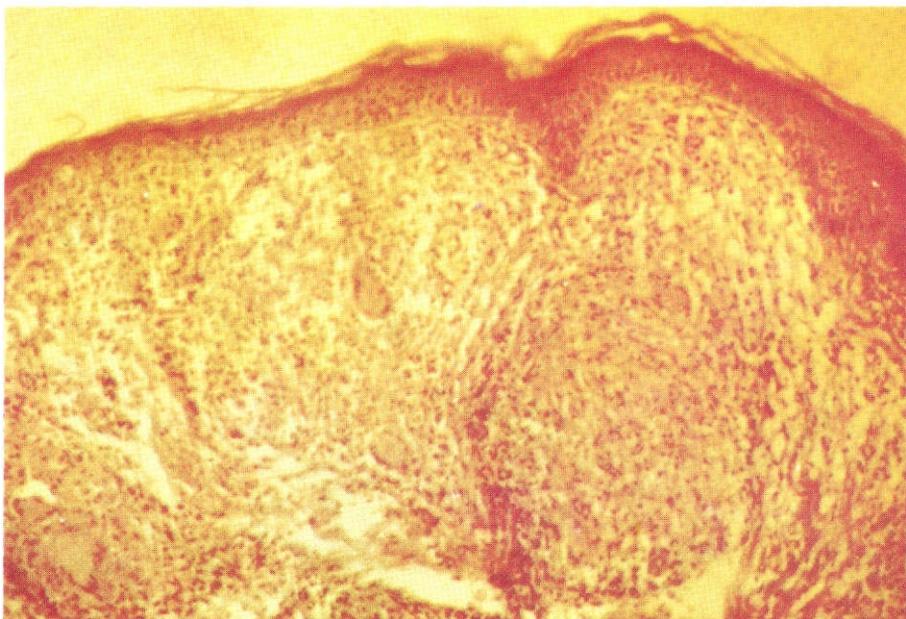


Microf. n.º 1 — Lipídio normal, de cor amarelo-avermelhado, na camada cornea; lipídio patológico, de cor amarela, no infiltrado Virchowiano.

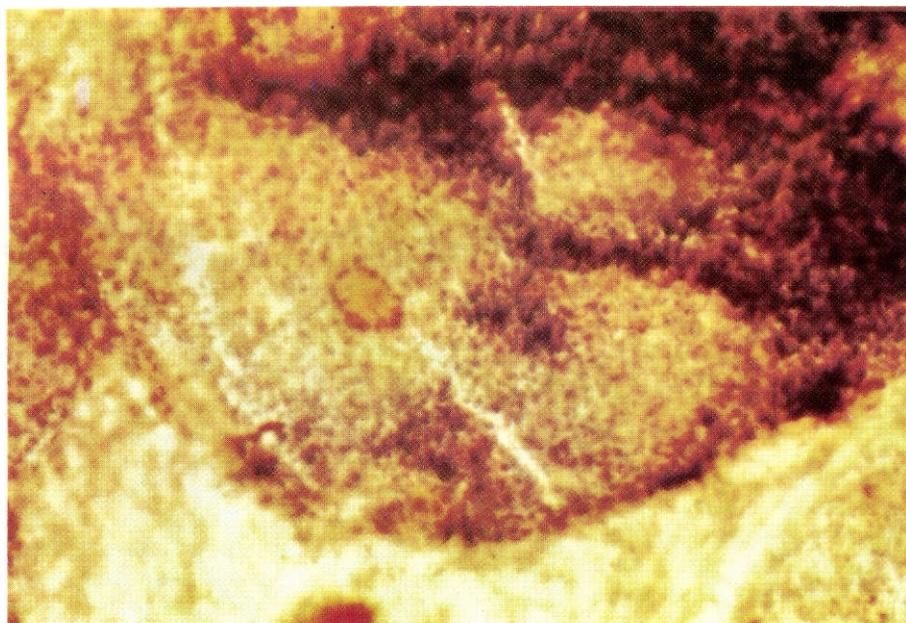


Microf. n.º 2 — Glândula sebácea com a gordura em amarelo-avermelhado, contrastando com a tonalidade amarela do lipídio das células de Virchow.

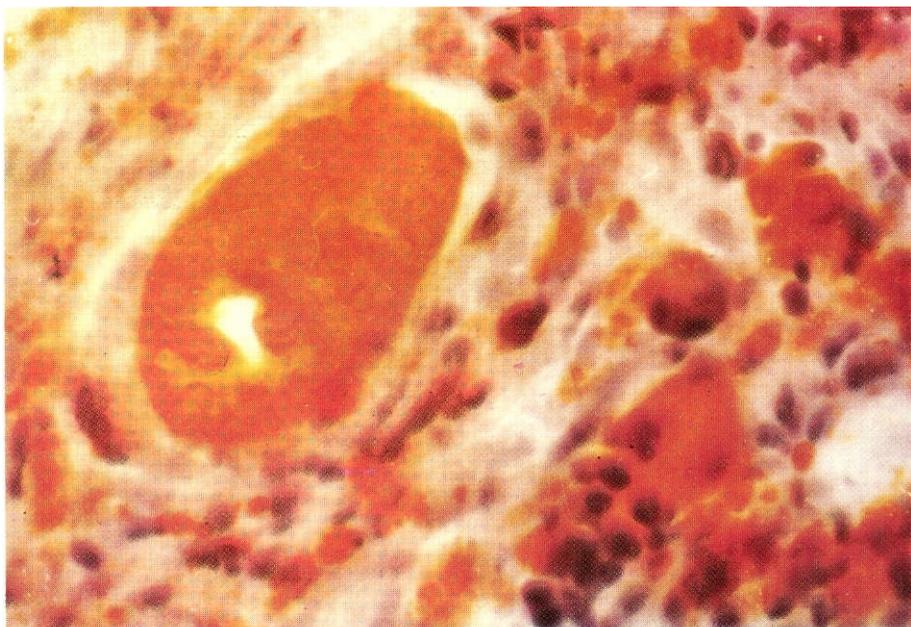
Lípidios e classificação histopatológica da hanseníase



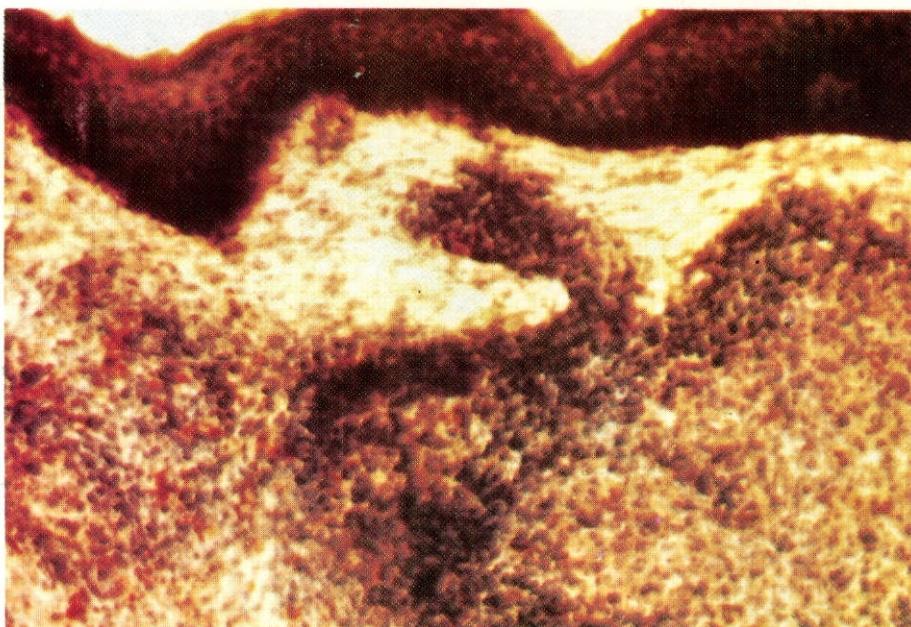
Microf. n.º 3 — Nódulos de células epitelióides e gigantes separadas por edema na Hanseníase Tuberculóide reacional. Col. Hematoxilina — eosina.



Microf. n.º 4 — Cor amarelo clara, difusa, do granuloma tuberculóide reacional. Coloração: Sudão III.



Microf. n.º 5 — Presença de lipídio nas células de Virchow, nas células gigantes tipo corpo estranho e em grandes vacúolos e cavidades.



Microf. n.º 6 — Hanseníase Dimorfa: à esquerda, lipídio nítido, grumoso, nas cel. de Virchow; à direita, cor difusa ao nível das cel. epitelióides separadas por edema.

5. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após a descrição de "célula leprosa" de Virchow, inúmeros estudos procuraram interpretar o mecanismo da formação dos vacúolos, o seu conteúdo, a situação citoplasmática dos bacilos e do lípidio anormal, o aspecto morfofuntorial e a natureza bioquímica dessa gordura patológica.

O monócito tecidual ou histiócito, célula do sistema reticulo-endotelial que faz a pexia bacilar e apresenta a posterior deposição de lípidio no seu citoplasma representa a conceituação real da célula de Virchow. Assim esta denominação só pode ser usada corretamente quando estiverem presentes os dois elementos no citoplasma do macrófago — bacilos e lípidio patológico.

A imagem vacuolar ou espumosa observada nos preparados corados pela Hematoxilina — eosina, decorre de carreamento das substâncias gordurosas pelo xilol e álcool, na fase de inclusão em parafina. Nas lesões recentes o número de vacúolos é muito reduzido porém, com o evoluir, tornam-se numerosos e podem ocupar todo o citoplasma. As lesões antigas apresentam grandes histiócitos com intensa vacuolização e núcleos picnóticos. Na Hanseníase Virchowiana residual vamos encontrar além do aspecto espumoso franco, a formação de cavidades resultantes da fusão de vacúolos de várias células e também vacúolos de células gigantes do tipo corpo-estranho com escasso citoplasma e poucos núcleos (o corpo estranho, nestes casos, é representado pelo lípidio anormal). Neste estágio evolutivo final, regressivo, os infiltrados celulares já estão desabitados, sem bacilos ou granulações bacilares — nesta situação os histiócitos, apesar da presença do lípidio, não mais podem ser denominados células de Virchow.

Os vacúolos observados nas células epitelióides, nos períodos reacionais, são produzidos por edema e podem simular os anteriormente descritos.

A nosso ver, a vacuolização é mais irregular e mostra, com frequência, rompimento das finas paredes dos vacúolos. Este aspecto nós comparamos com o da teia de aranha quando rompida em certos pontos. A diferenciação indubitável se fará pelo Sudão III: no infiltrado Virchowiano ocorre a localização nítida do corante no citoplasma das células com degeneração lipóidica; no infiltrado tuberculóide reacional há uma coloração difusa, amarelo claro, não localizada.

Apresentaremos a seguir alguns trabalhos que selecionamos a fim de mostrar a evolução dos conhecimentos até atingir as atuais interpretações.

A localização exclusiva citoplasmática do lípidio e a sua situação extravacuolar juntamente com os bacilos foi defendida por Philippson (30).

Sobre a natureza dos lipóides encontrados dedicaram-se, desde muito cedo, alguns autores, por exemplo : Cedercreutz (10) — considerava uma mistura de lipóides isotrópicos e anisotrópicos; Herxheimer (21) interpretava como processo degenerativo representado por uma mistura de colesterol e ésteres, ácidos gordurosos glicerizados e ácidos graxos; Stein (40, 41) — acreditava que a infiltração gordurosa fosse decorrência do tratamento chalmúgrico, usado na época.

Quando Mitsuda (29) usou o Sudão III e complementou com estudos de microquímica ficou demonstrada definitivamente a existência de substância lipóide no interior dos vacúolos. Atribuía que fosse derivada dos bacilos.

No livro de Dubois (13) encontramos uma perfeita diferenciação entre a célula epitelióide e a célula de Virchow.

A segunda apresentando bacilos e uma degeneração gordurosa do citoplasma, corada em "vermelho" pelo Sudão III. Rath de Souza e Alayon (38) descrevem gotículas de cor alaranjada nas células de Virchow e a cor vermelha ao nível da glândula sebácea e do tecido adiposo. Consideravam fácil a distinção da vacuolização encontrada nos infiltrados Virchowianos da produzida por edema nas células epitelióides. Excepcionalmente esta diferenciação foi "extremamente laboriosa ou mesmo impossível". A presença de "líquido inerte" no interior dos vacúolos e a presença precoce dos lipídios juntamente com os bacilos, porém extravacuolar, era admitida por Fite (16, 17). Considerava também que vacúolos podiam ser vistos no citoplasma de células epitelióides podendo conter finos depósitos de lipídios.

A grande capacidade de armazenar bacilos e lipídios dos histiócitos levou Buengeler (7) a comparar os hansenomas aos xantomias, "sem sofrer degeneração". Interpretava os lipídios como colesterol e ésteres. Assinalou nas lesões antigas a presença de grandes gotas de gordura e elementos monstruosos representados por células gigantes do tipo corpo estranho. O aspecto do lipídio parecia a Campos (8) suficiente para diferenciar Hanseníase Virchowiana de Tuberculóide reacional. Na primeira, a deposição se fazia em gotículas de tamanho médio e grandes; no segundo descrevia como "poeira fina". Os vacúolos da célula epitelióide não seriam produzidos por edema mas dependeriam dos bacilos, freqüentes no Tuberculóide reacional.

No capítulo sobre a histoquímica de lipídios, Lison (27) inclui a coloração pelo Sudão III entre outras técnicas gerais de revelação dos lipídios. Considera que mesmo as técnicas especiais não identificam histoquimicamente os lipídios existentes mas indicam os

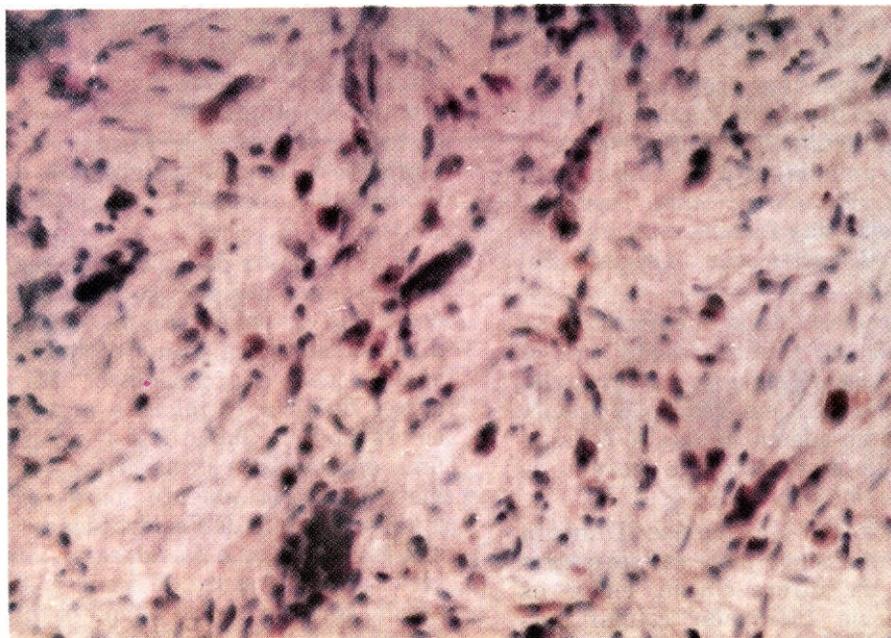
radicais que participam das reações coradas.

Ainda sobre o edema observado nas estruturas tuberculóides reacionais a opinião de Khanolkar (23), é de que a sua natureza é albuminóide e não lipídica. Quanto ao aspecto do lipídio observado intracitoplasmaticamente nas células de Virchow, Azulay & Andrade (4) descrevem como "grânulos ou bolhas com bordas mais coradas" (Microfot. 7 e 8). A coloração difusa observada nos granulomas tuberculóides reacionais é explicada pela solubilização do corante no líquido de edema. Alonso (1) e Andrade (2) também se referem à natureza hidrópica dos vacúolos.

Analisando vários trabalhos de histoquímica, dos lipídios encontrados na Hanseníase Virchowiana assim se refere Sakurai & Skinsnes (36, 37), pela existência de grande quantidade de fosfolipídios e ácidos gordurosos e quantidade variável de glicolipídios, colesterol e gordura neutra. Realizaram estudo cromatográfico e comparativo entre fragmentos da pele normal e lesões hansenóticas. Na Hanseníase Virchowiana acharam maior quantidade de fosfo e glico-lipídios, colesterol livre e ácidos graxos livres. Interpretaram o colesterol como resultante de lipofanose e os demais, procedentes dos bacilos.

6. OBJETIVOS

A finalidade primordial será apresentar o resultado da técnica de coloração pelo Sudão III aplicada a 8972 preparações histológicas pertencentes às várias formas clínicas da Hanseníase. Representa uma continuidade dos estudos já citados de Azulay e Andrade utilizando casuística mais ampla podem do acervo comum existente no ex-Insti-



Microf. n.º 7 — Células de Virchow esparsas coradas pelo Sudão III de cor amarelo-alaranjada.



Microf. n.º 8 — Aspecto goticular e grumoso do lipídio no citoplasma da célula de Virchow.

tuto de Leprologia do Rio de Janeiro onde exerço atividade, na Seção de Anatomia Patológica.

Julgamos oportuno reiterar o valor da coloração de lipídios quando realizada obrigatoriamente pois permite, a nosso ver, um diagnóstico histopatológico mais correto e uma perfeita caracterização das formas clínicas definidas na Classificação Oficial Sul Americana.

Procuraremos ainda demonstrar a importância da familiarização com a imagem difusa observada nos granulomas tuberculóides em reação e reacionais devido ao edema no qual o corante se solubiliza discretamente porém de modo uniforme e constante.

Nos casos de Hanseníase Dimorfa este reconhecimento pode ser de extrema valia na diferenciação entre os dois tipos de infiltrado celular nas células de Virchow, cor amarelo nítido devido a solubilização no lipídio patológico intra citoplasmático ; nas zonas de células epitelióides com edema inter e intracelular, a presença de tonalidade amarelo-clara difusa, não localizada.

A justificativa maior seria talvez a existência de opiniões discordantes como a de Davison (12) e a de Ridley & Jopling (34) que *julgam dispensável* a coloração de lipídios para o diagnóstico complementar histopatológico e perfeita caracterização das formas clínicas da doença.

7. MATERIAL EXAMINADO

O material examinado pertence ao arquivo do ex-Instituto de Leprologia, do Rio de Janeiro, no qual rotineiramente a técnica de coloração para lipídios pelo Sudão III é realizada desde 1948.

Os fragmentos de pele são enviados ao laboratório em formol a 10% e procedem de vários Estados brasileiros. São acompanhados, na quase totalidade

dos casos, de uma guia padronizada para requisição do exame histopatológico da qual constam as seguintes informações: aspecto das lesões, distúrbios da sensibilidade, a baciloscopia, o teste de Mitsuda, a forma clínica, o tempo e o tipo de tratamento, a finalidade da biopsia (diagnóstico ou controle).

O fragmento de pele, ao chegar ao laboratório é dividido ao meio e a parte destinada à coloração de lipídios irá diretamente para o micrótomo de congelação pelo gás carbônico. Fazem-se cortes de 10 a 13 micra e procede-se à coloração pelo Sudão III, de acordo com uma das técnicas já descritas. A outra metade do fragmento passará pelas etapas normais de desidratação e inclusão em parafina e os cortes histológicos terão uma espessura de 5 micra — estes serão corados pela Hematoxilina — eosina e Ziehl-Wade-Klingmüller.

O nosso estudo representa a análise de 8972 preparações coradas pelo Sudão e os resultados são mostrados na tabela I.

8. CONSIDERAÇÕES

8.1 Grupo Indeterminado

Encontramos 100% de negatividade frente ao Sudão III nos 3.412 casos de Hanseníase Indeterminada. Diante deste fato poderia parecer dispensável a inclusão da técnica para o diagnóstico histopatológico. Isto representa uma falsa impressão como procuraremos demonstrar. Verificamos, por exemplo, que vários casos clinicamente classificados como Indeterminados tiveram o seu diagnóstico modificado graças ao achado histológico de típicas células de Virchow — com bacilos e lipídios no citoplasma. Quando a vacuolização ocorre em histiócitos integrantes de pequenos infiltrados e não se faz como rotina o Sudão III, ela pode passar despercebida ou não ser valorizada.

TABELA I

RESULTADOS DA COLORAÇÃO DE LIPÍDIOS PELO SUDÃO III
EM 8972 CASOS DE HANSENÍASE

INSTITUTO DE LEPROLOGIA — RIO DE JANEIRO — PERÍODO: 1948/1976

LIPÍDIO ESTRUTURA HISTOLÓGICA	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL
	N.º CASOS	%	N.º CASOS	%	
Indeterminada	0	0,0	3412	100,0	3412
I. para Tuberculóide	0	0,0	103	100,0	103
I. para Virchowiana	1	3,2	30	96,8	31
Tuberculóide	0	0,0	964	100,0	964
T. Reacional	0	0,0	307	100,0	307
Virchowiana em ativ.	2862	99,2	25	0,8	2887
V. em regressão	972	99,6	4	0,4	976
V. residual	121	99,2	1	0,8	122
Dimorfa	129	75,9	41	24,1	170

I = Indeterminada

T = Tuberculóide

V = Virchowiana (lepromatosa)

Os 103 casos classificados pela histologia como Indeterminados em provável viragem para Tuberculóide apresentaram esboço de granuloma tuberculóide e ausência de lipídios. Dos 31 casos considerados como Indeterminados em provável transformação para estrutura Virchowiana apenas 1 mostrou raríssimos histiócitos com lipídio. Os critérios adotados pelo observador para considerar a *provável evolução* para o pólo Virchowiano foram:

8.1.1 infiltrados celulares mais amplos porém ainda inespecíficos, formados por histiócitos, linfócitos, fibroblastos e eventuais plasmócitos e mastócitos;

8.1.2 presença mais freqüente de bacilos nos infiltrados celulares e filetes nervosos.

A presença de histiócitos com lipídio além de bacilos deveria ser o suficiente para enquadrar no Tipo Virchowiano. No único caso Indeterminado com pre-

sença de lipídio mantivemos a transitoriedade graças ao número exíguo de células de Virchow. Casos dessa natureza confirmam a conhecida existência de situações de transição entre os Grupos e Tipos polares, constituindo um verdadeiro espectro. A histologia pode às vezes revelar estes estados evolutivos nem sempre com o correspondente quadro clínico lesional. A realização sistemática da coloração de lipídios ajuda a despistar casos em transição ou já perfeitamente integrados no pólo Virchowiano.

Julgamos oportuno condenar a atitude desastrosa de alguns hansenólogos de colocar o Grupo Indeterminado à parte da Classificação, aguardando uma definição. Ele deve merecer todas as atenções e necessita dos mesmos recursos complementares de diagnóstico inclusive a coloração de lipídios para ser melhor diagnosticado e interpretado. A sua importância desponta do simples exame da distribuição global das formas

clínicas. A Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária estudando a Morbidade por Hanseníase, no ano de 1974, encontrou 2.303 casos de H. Indeterminada correspondendo a 27,68%. Por outro lado, a instituição do tratamento interrompe a tendência instável e evolutiva dos casos I, estabilizando-as até a cura.

Assim sendo como é possível ignorá-las e deixá-las à margem de uma Classificação? A Tabela II resume a observação de Rabelo Neto *et al.* (33) quanto ao papel do tratamento.

TABELA II

HANSENIASE INDETERMINADA

Evolução de 75 casos sob tratamento no período de 1949/1960

Dispensário de Nova Iguaçu. Rio de Janeiro Brasil

RESULTADOS DO TRATAMENTO	N.º CASOS	%
C Cura ou melhora	67	89,4
I Inalterados	4	5,4
P Piorados	2	2,6
M Mutação para T	2	2,6

observação: os pacientes inalterados, piorados e que sofreram mutação para Tuberculóide fizeram tratamento irregular, descontinuo.

8.2 Tipo Tuberculóide

A coloração de lipídios foi negativa nos 964 casos de H. Tuberculóide quiescente. Nos 307 casos Tuberculóides reacionais a pesquisa foi também negativa para o lipídio patológico, isto é, não ocorreu deposição do corante idêntica à observada no citoplasma das células de Virchow. Nestes casos, entretanto, o edema que dissocia o granuloma nas fases reacionais tem a propriedade de solubizar parte do corante conferindo uma cor amarelo-pálida di-

fusa e uniforme. Isto se deve, provavelmente à fração lipóidica normal existente no plasma extravasado. Uma interessante comprovação pode ser feita:

— Nódulos de células epitelióides unidas, compactas, sem edema, não apresentam esta imagem tintorial presente naqueles em que o edema começa a surgir. A concomitância na mesma lâmina de granulomas em repouso e outras entrando em reação permite, do ponto de vista histopatológico, um laudo mais apurado, expressivo dessa transição: Hanseníase Tuberculóide em reação. Convém assinalar que nesta fase os bacilos são raros, ao contrário do período francamente reacional.

Há autores que referem a presença de lipídio patológico em casos tuberculóides reacionais como, por exemplo, Rath de Souza & Alayon (38), Campos (8), Davison *et al.* (2), e Portugal (31). Partilhamos da mesma opinião de Azulay & Andrade (4) — seriam realmente negativos devido ao aspecto incomum apresentado ou então Dimorfos.

Em revisão por nós realizada de 58 pacientes classificados como TR e em tratamento no Ambulatório do ex-Instituto de Leprologia do Rio de Janeiro verificamos que o resultado da pesquisa pelo Sudão III, em 80 lâminas, foi o seguinte:

Negativa	— 74	(92,5%)
Positiva	— 2	(2,5%)
Não realizada	— 4	(5,0%)

O reexame dos 2 casos com lipídio positivo mostrou tratarem-se de indubitáveis Dimorfos.

Notamos atualmente uma tendência para englobar os casos Tuberculóides reacionais como Dimorfos. Acreditamos que tal atitude decorre da abusiva

adoção da Classificação de Ridley & Jopling (34) proposta para fins de experimentação — passaram simplesmente a "Borderline" — (BT). Dois fatores a nosso ver concorrem para este comportamento :

8.2.1 a não realização da coloração para lipídios e o desconhecimento da imagem difusa do corante pelo edema;

8.2.2 a confusão persistente entre Tuberculóides reacionais e surtos transitórios de reação.

Souza Campos & Rath de Souza (39) consideram a Tuberculóide reacional como uma variedade de T, bem definida, perfeitamente individualizada por suas características clínicas, bacteriológicas, imunológicas e estruturais. Procuram mostrar as diferenças entre T. Reacional e "Reação leprótica em Tuberculóide ou Reativação tuberculóide", que ocorre em surtos. Consideram que o edema na Reativação Tuberculóide permite caracterizar bem os granulomas ao passo que na Tuberculóide Reacional há uma desestruturação maior inclusive do halo linfocitário.

Acreditamos também que com os TR ocorre fato similar ao observado com os casos I — o tratamento fixa na forma e interrompe a tendência instável evolutiva. O acompanhamento da amostra de casos TR, em tratamento durante 1 a 4 anos ou mais, mostrou através do exame histopatológico o seguinte (Tabela III) :

TABELA III

HANSENIASE TUBERCULOIDE REACIONAL
Estudo evolutivo de 80 exames histopatológicos
Instituto de Leprologia — Rio de Janeiro —
Brasil

Granuloma tuberculóide	67 (83,75%)
Inflamação crônica inespecífica	11 (13,75%)
Hanseníase Virchowiana	2 (2,50%) *

* Observação — Estes 2 laudos permitiram reclassificar como Dimorfos.

8.3 Grupo Dimorfo

A coloração pelo Sudão III foi positiva 129 vezes em 170 casos, representando 75,9%. Este fato aproxima os Dimorfos mais do pólo Virchowiano. Nos 41 casos em que a pesquisa de lipídio patológico foi negativa a imagem difusa foi freqüentemente observada.

Convém lembrar que a confirmação histopatológica da maioria dos casos Dimorfos (+ 90%) se faz através de 2 laudos, procedentes de lesões diferentes e cada uma apresentando a estrutura correspondente de um dos pólos.

8.4 Tipo Virchowiano

Na amostragem de 2.887 casos de HV em atividade a pesquisa foi positiva em 2.862 (99,2%) e negativa em 25 (0,8%). Este grupo de negativos foi bem estudado anteriormente por Azulay & Andrade (4) que considerou como estágio inicial, ainda precoce para a evidência da degeneração lipoidica.

Acreditamos que cortes seriados ou biópsias de outras lesões pudessem despistar as células de Virchow com o seu duplo componente citoplasmático bacilolipídio.

Em 976 casos de HV em regressão a positividade ao Sudão III foi registrada em 972, isto é, 99,6%, apenas em 4 (0,4%) não ocorreu. Nos casos de HV residual a presença de lipídio foi assinalada em 121 lâminas (99,2%) e a ausência em 1 (0,8%) :

Verificamos assim que o Sudão III revelou a existência de lipídio anormal em mais de 99% dos casos de Hanseníase Virchowiana e possivelmente o estudo de cortes seriados e biópsias de outras lesões aumentariam este percentual.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Relendo o trabalho de Kooij (24) verificamos que o autor considerou que o "julgamento histopatológico da lepra é muito difícil". Chegou a esta conclusão após a discrepância dos laudos emitidos por 7 patologistas a quem enviara preparações coradas pela Hematoxilina eosina. A conclusão não poderia ser outra e não é surpreendente pois faltavam as 2 colorações *indispensáveis* de apoio para maior precisão dos laudos.

Reiteradas manifestações de hanse-nólogos e patologistas brasileiros, algumas bem recentes, enfatizam a

necessidade do tripé das colorações histopatológicas. Assim, no "Encontro de Patologistas" (14), realizado em Bauru e no "Retrospecto sobre a doutrina da Hanseníase" de Rabello (32) há unanimidade de opiniões sobre:

8.4.1 a obrigatoriedade das 3 colorações:

8.4.2 maior rigor na observância dos critérios ainda vigentes da Classificação Internacional da Hanseníase até que surjam novos parâmetros pois senão regressaremos ao "caos" tão temido por Latapi (26).

ABSTRACT

- 1) Lipid-staining techniques of histological sections should be used routinely, in addition to Hematoxylin-Eosin and staining for bacilli, to enhance diagnostic precision of the clinical forms of Hanseniasis.
- 2) The use of the Sudan III In 8972 consecutive cases lead us to the conclusion that, despite the slight disadvantages of easy cristalization and long term loss of stain in the preparations, it is essential for a correct histological diagnosis.
- 3) In Indeterminate Hanseniasis lipid staining is always negative. Some cases, clinically considered as Indeterminate forms were actually shown to be incipient Virchowian or transitional forms through the finding of typical Virchow cells containing both bacilli and lipids. The early discovery of such cases can only be carried through systematic search for lipids on specifical staining.
- 4) In Tuberculoïd Hanseniasis with quiescent granulomas, lipids are never found.
- 5) In Reactional Tuberculoïd Hanseniasis, pathological lipids are not found but a yellowish hue, light and diffuse, is observed due to the edema fluid which permeates and disrupts granulomas. This is due to partial solubilization of the stain in the edema fluid which contains a fraction of normal lipid; Pathologists unacquainted to such an image might consider it positive: thus it is a false-positive reaction.
- 6) Tuberculoïd Hanseniasis is considered in reaction when only some of the granulomas show edema disjoining epithelioid cells; the diffuse yellowish tone is observed exclusively in those undergoing such a transitional phase.
- 7) In active Virchowian Hanseniasis lipid search is positive over 99% of the cases.
- 8) In regressive and residual Virchowian Hanseniasis, lipids are present in practically all cases (100%).
In terminal stages lipid-deposits are found also in big vacuoles, cavities and inside the cytoplasm of giant foreign-body cells.
- 9) In Borderline Hanseniasis lipids were found in 758% of cases.
- 10) In Borderline Hanseniasis it is particularly important to distinguish between the two types of lipid-images because both can be found in the same preparation:
 - localized lipid finely granulous or in droplets, inside Virchow cells;
 - diffuse, light yellow lipoids, in tuberculoïd granulomas with edema.

Key words: Lipids, Sudan III, Hanseniasis, Virchow cell, Indeterminate, Virchowian, Tuberculoïd, Borderline.

REFERENCIAS

1. ALONSO, A. M. Estados reacionais da lepra. *Med. Cut. Iber. Lat. Amer.*, 3(3):198-208, 1975.
2. ANDRADE, L. M. C. Histopatologia. In: BRASIL. Ministério da Saúde. *Noções de leprologia*. Rio de Janeiro, 1969. p. 31-39.
3. AZULAY, R. D. Histopathology of the skin lesions in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 33(2-II) :244-250, 1971.
4. AZULAY, R. D. & ANDRADE, L. M. C. Pesquisa do lípidio intra citoplasmático nas várias estruturas histopatológicas encontradas na lepra. *An. Brasil. Dermat.*, 44(3):181-189, 1969.
5. AZULAY, R. D. & ANDRADE, L. M. C. Pesquisa do lípidio nas várias formas clínicas de lepra: estudo realizado em 6536 casos. *Derm. Ibero Lat. Amer.*, 10(1) :51-56, 1968.
6. AZULAY, R. D. & ANDRADE, L. M. C. O valor da pesquisa de lípidio no diagnóstico dos vários tipos estruturais encontrados na lepra: estudo realizada em 1053 casos. *Arq. Serv. Nac. Lepra*, 10(1) :47-53, 1952.
7. BUENGELE, W. Patologia morfológica de las enfermedades tropicales: A. Enfermedades infecciosas causadas por bacterias. 2 - Lepra. In: HUEČEK, W. *Patologia morfológica*. Trad. J. G. Sanchez-Lucas e R. Alvarez Zamora. Buenos Aires, Editorial Labor 1944. p. 885-914.
8. CAMPOS, J. Lipoids in the reactional tuberculoid leprosy granuloma: their diagnostic value. *Int. J. Lepr.*, 18(2) :155-160, 1950.
9. CASTRO, I. Contribuição aos métodos histoquímicos aplicados it identificação de lípidios. *Bol. Serv. Nac. Lepra*, 14(3/4):99-106, 1955.
10. CEDERCREUTZ, A. Leprastudien, angeschlossen an einige neue histologische Beobachtungen bei Lepra Tuberosa. *Arch. Derm. Syph.*, 128:20-78, 1920.
11. DADDI. C. apud LISON, L. *Histochemie et cytochimie animales*. 2. ed. Paris, Gauthiers-Villars, 1953.
12. DAVISON, A. R.; KOOLIJ, R.; WAINWRIGHT, J. Classification of leprosy. II. The value of fat staining in classification. *Int. J. Lepr.*, 28(2) :126-132, 1960.
13. DUBOIS, A. La lèpre au Congo en 1938. *Mem. Inst. Royal Colonial*, 10(2), 1940.
14. ENCONTRO DE PATOLOGISTAS, Bauru, 14-09-1975. *Relatório final*.
15. FERNANDES M. C. *Métodos escolhidos de técnica microscópica*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1943. p. 297-298.
16. FITE, G. L. Leprosy from the histologic point of view. *Arch. Pathology*, 35:611-644, 1943.
17. FITE, G. L. The pathology and pathogenesis of leprosy. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 54(1) :28-33, 1951.
18. GHOSH, S.; SEN GUPTA, P. C.; MUKERJEE, N. Histochemical study of lepromatous leprosy. *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med.*, 10:102-105, 1962.
19. HANSEN, G. A. Zur pathologie des Aussatzes. *Arch. Dermat. Syph.*, 3:194, 1871.
20. HARADA, K. Histochemical studies of leprosy, specially the mode of formation of lepra cells. *Lepra*, 24 (1) :277-282, 1955.
21. HERXHEIMER, G. Sobre a célula leprosa. *Virchow's Arch. path. Anat.*, 245:403, 1923.
22. KEDROWSKY, W. The nature and source of the lipoids in the leprosy cells. In: CONGRÈS INTERNATIONAL LÈPRE, Cairo, 1938. *Brief Summary*. Cairo, 1938. p. 20-21.
23. KHANOLKAR, V. R. Pathology of leprosy. In: COCHRANE, R. G. & DAVEY, T. F. *Leprosy in theory and practice*. 2. ed. Bristol, John Wright, 1964. p. 125-151.

24. KOOLIJ, R. The value of the histological criterion for the classification of leprosy: a study of reports by several examines of the same histological preparations. *Int. J. Lepr.*, 23 (3):301-306, 1955.
25. LANGERON, M. *Précis de microscopie*. 7. ed. Paris, Masson, 1949. 453 p.
26. LATAPI, F. Classification de la lepra. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE LA LE- PRA, 5.º, Habana, 1948. *Memoria*. Habana, CENIT, 1949. p. 481-487.
27. LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales*. 2. ed. Paris, Gauthiers-Villars, 1953. p. 354-355.
28. LILLIE, R. D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 2. ed. New York, Bla- kiston, 1954. p. 76-77, 302.
29. MITSUDA, K. The significance of the vacuole in the Virchow lepra cells and the distri- bution of lepra cells in certain organs. *Int. J. Lepr.*, 4(4):491-507, 1936.
30. PHILIPPSON, L. Die Histologie der Acut Entstehender Hyperemischen (Erythematösen) Flecke der Lepra Tuberosa. *Virchows Arch.*, 132(2):229-246, 1893.
31. PORTUGAL, H. Contribution to the study of the classification of leprosy: aspect of lesions antigenic response, and presence of microorganisms in histologic struture. *Int. J. Lepr.*, 15(2):162-168, 1947.
32. RABELLO, F. E. A doutrina da hanseníase na concepção dos hansenólogos de formação latina (1938-1974): um retrospecto com vistas ao Congresso Int. do México de 1978. *Med. Cut. Ib. Let. Amer.*, 4 (3) :217-226, 1976.
33. RABELO NETO, A.; ANDRADE, L. M. C.; NEVES, R. G.; ANDRADE, R. S.; SILVA N. C. Evolução dos casos indeterminados tratados no Dispensário de Nova Iguaçu no período de 1949 até 1960. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 8.º, Rio de Janeiro, 1963. *Anais*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional da Lepra, 1963. v. 1, p. 449-479.
34. RIDLEY, D. S. & JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev.*, 33(2):119-128, 1962.
35. ROMEIS, B. Zur Methodik der Fettfärbung mit Sudan III. *Virchow's Arch. path. Anat.*, 264:301-304, 1927.
36. SAKURAI, I. & SKINSNES, O. K. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipid in human leprosy. *Int. J. Lepr.*, 38(4):389-403, 1970.
37. SAKURAI, I. & SKINSNES, O. K. Studies on lipids in leprosy. 3. Chromatographic analysis of lipid in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 39(2) :113-130, 1971.
38. SOUZA, P. R. & ALAYON, F. L. Sobre a presença de lipídio nas lesões cutâneas de lepra. *Rev. Bras. Lepr.*, 10(4) :371-381, 1942.
39. SOUZA CAMPOS, N. & SOUZA, P. R. Reactional states in leprosy: lepra reaction tu- berculoid reactivation (tuberculoid leprae reaction) reactional tuberculoid leprosy bor- derline (limitantes) lesions. *Int. J. Lepr.*, 22(3) :259-273, 1954.
40. STEIN, A. A. Zur Morfologie der Leprareaktion. I. Mitteilung. Histologische Verän- derungen bei der. I. typus von Leprareaktion. *Int. J. Lepr.*, 7(2) :149-159, 1939.
41. STEIN, A. A. Zur Morfologie Leprareaktion. II. Mitteilung. Histologische Veränderun- gen bei der. II. Typus von Leprareaktion, *Int. J. Lepr.*, 7(3) :341-348, 1939.
42. SUGAI, K. Histopathological studies on human leprosy. IV. Histochemical analysis of abnormal fats in leprous lesions, especially on fat deposition in lymphnodes. *Lepra*, 27: 215-227, 1958.
43. VIRCHOW, R. *Die Krankhaften Geschwulste*. Berlin, Hirschwald, 1864. v. 2, p. 494.

Recebido para publicação em 5 de maio de 1977.