

“Sobre a morfologia do microrganismo da lepra”*

Nota Introdutória

Em 1886, A. Lutz apresentava seus estudos sobre a estrutura e biologia dos microrganismos da lepra e da tuberculose. Publicado apenas quatro anos após a descoberta do bacilo da tuberculose, o trabalho era, sob muitos aspectos, adiantado demais para a época em que foi divulgado. Nos setenta anos subseqüentes, suas diversas observações foram comunicadas, por outros autores, como se fossem novas descobertas.

Ao estudar a estrutura dos bacilos da lepra e da tuberculose, Lutz descreveu minuciosamente seu aspecto granular, mostrando que os grânulos ocorrem livres ou se alinham ao longo dos bastonetes, até suas extremidades arredondadas. Colorações descontínuas e formações granulares já haviam sido observadas; Lutz revelou sua técnica para colocá-las em evidência de maneira consistente em todos os microrganismos de um preparado. O próprio Koch havia visto grânulos como corpúsculos brilhantes em preparações não coradas, e também obtivera bactérias com coloração descontínua. Chegara à conclusão de que as partes não coradas destas correspondiam a grânulos, e por algum tempo supôs que fossem esporos. Neisser chegara a conclusões bem parecidas com relação à lepra. A. Lutz mostrou claramente que as granulações em preparados corados correspondiam àquelas dos não-corados; mostrou, ainda, que os interstícios não deviam ser considerados como esporos e que não tinham a forma esporular com que eram representados então. Os grãos enfileirados ao longo dos bastonetes tampouco eram esporos.

Lutz descreveu também um segundo tipo de granulações. Encontradas em número bem menor, possuíam paredes espessas, como

* Nota introdutória redigida em inglês, provavelmente por Gualter Adolpho Lutz, em junho de 1956, à mesma época em que Bertha Lutz providenciava a tradução, do alemão para o português, do artigo de seu pai ao qual se referem estes comentários. Encontram-se diversas versões manuscritas e datilografadas corrigidas destes textos em BR. MN. Fundo Adolpho Lutz, caixa 22, pasta 256. Ambos os empreendimentos ocorreram logo em seguida às comemorações do centenário de nascimento de Adolpho Lutz. A versão em português da nota introdutória foi revista para a presente edição.

se fossem formas de resistência, e eram de tamanho maior; localizavam-se numa das extremidades dos bastonetes ou ocorriam livremente; por vezes, absorviam o corante de contraste em sua porção central. Tais granulações também foram redescritas por outros como novidade (ver a bibliografia até 1918 em F. Löhnis, *Studies upon the Life Cycles of Bacteria*, parte I, publicação da National Academy of Sciences, 1922, p.81-4, 85, 105, 107, 124, 137, 159, 160, 162, 163, 173-5, 194 e estampas J e R).

Lutz se ocupou, também, das aglomerações de bactérias constitutivas das zoogléias ou formações globosas que, em sua opinião, não eram inclusões intracelulares; de acordo com sua explicação, a substância incrustada nos bastonetes era originária dos próprios microrganismos da lepra.

Como foi capaz de demonstrar a presença constante das formas granulosas, não as considerava como bacilos degenerados. Tal interpretação tem sido proposta com frequência por aqueles que, utilizando outros métodos de coloração, só enxergavam os grânulos ocasionalmente, e por acaso. Lutz via as granulações como elementos vivos capazes de se desenvolver. Este seu trabalho prístino raramente é mencionado nos estudos que até hoje se empreendem sobre o ciclo evolutivo dos microrganismos acidorresistentes. No começo do século XX, despertaram grande atenção as opiniões de H. Much sobre as formas granulares dos bacilos da tuberculose, e sobre a capacidade de os grânulos originarem novos bastonetes. Em larga medida, isso era o que Lutz já havia demonstrado, exceto a afirmação adicional de Much de que os grânulos podiam ser encontrados até mesmo onde não houvesse bacilos acidorresistentes.

Contudo, o método de coloração proposto por Much é, de um modo geral, praticamente idêntico à modificação do método de Gram usado por Lutz, e Unna já havia assinalado que a forma granular de Much nada mais era que a estrutura de *Coccothrix* descrita por Lutz.

As observações feitas por este sobre a morfologia e biologia dos microrganismos da lepra e da tuberculose levaram-no a retirar tais bactérias do gênero *Bacillus* e a criar novo gênero para acolhê-las. Propôs, então, o gênero *Coccothrix*, família Coccothricaceae, e apresentou um diagnóstico e sucinta descrição dos caracteres genéricos. A inserção dos aludidos germes em um gênero separado, e em família própria, hoje é aceita em taxonomia bacteriana. A adoção de outro nome, proposto dez anos mais tarde, pode ser atribuída, em parte, ao fato de Lutz haver publicado muito cedo em periódico dedicado à dermatologia e não à microbiologia. Datando de 1886, o nome genérico *Coccothrix*, acompanhado da respectiva descrição, tem indiscutível prioridade sobre *Mycobacterium* Lehmann e Neumann, 1896, e deveria, pois, ser usado em consonância com as regras aceitas de nomenclatura botânica e bacteriológica.

Sobre a morfologia do microrganismo da lepra*

Pelo Dr. Adolpho Lutz

Com uma ilustração em xilogravura

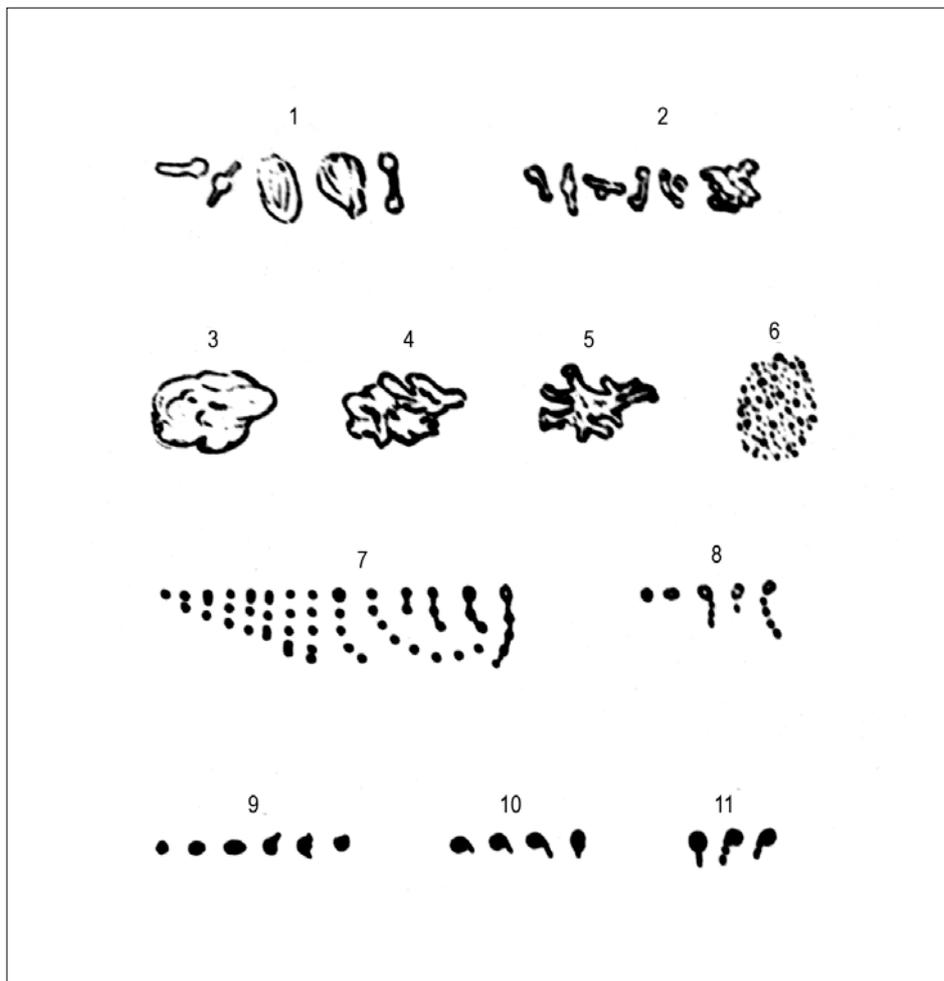
Os microrganismos geralmente denominados bacilos da lepra são encontrados no líquido dos tecidos, no pus e em cortes de órgãos afetados, ora isolados, ora em aglomerações. Estas acham-se sempre incluídas em volumoso invólucro de aparência gelatinosa, que as mantém firmemente unidas, ao passo que os microrganismos isolados não raro se apresentam desprovidos de tal invólucro. Entre estes dois estados ocorre um número de formas de transição que permitem reconstruir, em parte, o ciclo vital desses organismos, a partir dos bacilos isolados, aparentemente desprovidos de invólucro, que representam, indubitavelmente, a fase mais primitiva.

A fim de verificar os fatos apresentados a seguir, convém não partir apenas da coloração diferencial comum, mas aplicar, sucessivamente, uma série de métodos de observação. Uma vez estabelecido, com segurança, o diagnóstico de lepra pela coloração diferencial, é lícito considerar todo preparado de nódulos como cultura pura, desde que os tubérculos não estejam ulcerados, e os líquidos empregados se encontrem livres de contaminação. (Organismos introduzidos acidentalmente seriam reconhecidos por sua raridade e, ademais, por sua morfologia.) Costumo proceder ao exame em diversos meios (ar, água, bálsamo-do-canadá etc.), tinjo com corantes diversos, acompanhando sua ação por meio do microscópio e, finalmente, completo o estudo investigando os efeitos da descoloração sobre as preparações supercoradas. Por estes processos alcanço resultados que divergem, em diversos pontos, das idéias até agora aceitas.

Cortando um nódulo fixado em álcool ou ácido ósmico imediatamente após a extirpação, e raspando a superfície do corte com um bisturi, ou preparando um esfregaço do líquido do tecido de um nódulo não ulcerado, enquanto ainda estiver fresco, obtém-se sempre uma quantidade suficiente de bastonetes, principalmente se forem utilizadas as partes situadas imediatamente abaixo da superfície do nódulo seccionado.

Procedendo-se ao exame, ora em água, ora após prévio dessecação no ar, encontram-se, ao lado de bastonetes aparentemente nus e lisos, outros que mostram, ora num dos pólos, ora na região equatorial, um espessamento irregular que, nos preparados úmidos, tem a configuração de gotículas; quando o espessamento está mais desenvolvido, envolve todo o bastonete ou deixa livre apenas uma de suas extremidades. Existindo, lado a lado, várias dessas formações, elas confluem de maneira a formar um invólucro comum que, na maioria das vezes, parece muito volumoso em relação ao

* Separata de *Dermatologische Studien*, editado por Dr. P. G. Unna, 1^a caderno, 1886. Editora de Leopold Voss em Hamburgo e Leipzig, p.1-24. Publicado também em *Monatshefte für Praktische Dermatologie*, 1886, p.77-100.



Legenda das figuras

1. Bastonetes com invólucro gelatinoso úmido.
2. Bastonetes com invólucro gelatinoso ressecado.
- 3, 4, 5. O mesmo conglomerado de bastonetes em estado úmido, meio ou totalmente ressecado.
6. Um conglomerado de bastonetes distinguíveis através da coloração de Gram e descoloração com álcool nítrico, com um grupo de pequenas esferas semelhantes a cocos. (Devem-se considerar os grânulos individuais um pouco mais regulares e completamente redondos.)
7. Bastonetes que se podem distinguir com formas de ponto, cólon, 'i', estreptococos e *Coccothrix*. (Forte supercoloração com fucsina, permanência longa em ácido nítrico aquoso a 25%, descoloração com álcool a 60-70%.)
8. Células de paredes espessas não coradas, isoladas e em conjunto.
- 9, 10 e 11. Células grandes que podem ser coradas com o corante de contraste, vistas isoladamente e na extremidade de bastonetes homogêneos ou descontínuos.

Para a realização das figuras foram usadas ocular 5 de Hartnack e objetiva de imersão a óleo 1/12 de Leitz.

limitado número de micróbios incluídos; logo que o invólucro ultrapassa certo volume, aliás bem modesto, desaparecem os contornos apenas esboçados dos bastonetes individuais, sendo necessário empregar métodos especiais de observação para reconhecer a natureza desses conglomerados (Figuras 1 e 2).

A substância de inclusão dos bastonetes desempenha papel importante na constituição da neoformação lepromatosa, pois representa a maior parte dos conglomerados bacilares; como estes compõem parte considerável, até mesmo preponderante, do volume do nódulo, conforme se vê nos bons cortes, é evidente que este produto de proliferação participa energicamente do intumescimento da pele. Denominarei, por ora, tal substância de “invólucro gelatinoso” ou “mucoso”, porque vejo nele grande semelhança com os invólucros assim denominados, tão freqüentes nas classes das algas e dos fungos; em diversas espécies são produzidas com tal abundância que influem no comportamento físico das colônias inteiras, e estas adquirem o aspecto macroscópico de membranas ou massas gelatino-mucosas (como *Mycoderma aceti*, *Nostoc* etc.).¹

Em estado úmido, o invólucro mucoso apresenta-se homogêneo, bastante refringente, com aspecto vítreo nos fragmentos menores e, nos maiores, com brilho sedoso. Enquanto se mantém turgescendo, apresenta contornos arredondados uniformes, tendo os conglomerados maiores, ramificados, um aspecto de drusa (Figura 3). Quando o invólucro se encolhe por dessecação, os contornos ficam dentados, e a superfície, enrugada ou angulosa. As arestas refrangem a luz de maneiras diversas, podendo dar a impressão ilusória de bacilos, muito embora os microrganismos incluídos na massa não sejam, absolutamente, visíveis. Os bastonetes com invólucro mucoso parcial parecem fragmentos de uma massa friável, e facilmente podem ser tomados por detritos amorfos de tecido (Figura 2). Nestas condições, adicionando-se aos preparados soluções fracas de corantes usuais de anilina, verifica-se, sem dificuldade, que o invólucro mucoso seco cora de modo rápido e intenso. O invólucro apresenta-se incolor após o uso dos métodos usuais devido, unicamente, ao fato de realizar-se com a mesma facilidade a descoloração. Entretanto, pela coloração forte com genciana e anilina, tratamento com solução de iodo-iodeto de potássio e descoloração por solução alcoólica de ácido nítrico a 3% (método de Gram), não raro se obtêm preparações em que o invólucro se apresenta nitidamente vermelho-azulado, em oposição aos tecidos incolores ou tingidos em cores contrastantes. Tal coloração indica que o invólucro dos bacilos da lepra tem composição semelhante à da cápsula dos pneumococos de Friedlaender, também corável pela genciana. O simples tratamento das preparações com genciana pela solução aquosa de ácido nítrico (1:4) e álcool diluído com freqüência permite encontrar corada a substância do invólucro. Por outro lado, em preparações de líquidos de tecido fresco, tratadas com fucsina, segundo o método de Ehrlich, verifiquei que os invólucros gelatinosos tomavam, às vezes, fraca coloração de contraste com o azul de metileno.

A refringência do invólucro mucoso não apenas é muito mais intensa que a do ar, como mais forte que a da água; portanto, ele é visível em ambos os meios, porém mais evidente no primeiro. Posto em meio que refrange mais fortemente, similar ao vidro, o

¹ Segundo de Bary, estas massas gelatinosas, pelo que a análise apurou até agora, são constituídas por uma substância análoga à celulose.

que se consegue, facilmente, por mistura de álcool e sulfeto de carbono, desaparecem os contornos acentuados. Depois de desidratado e incluído em bálsamo-do-canadá, o invólucro só é reconhecível se estiver corado.

Unna já explicou, minuciosamente, que estas massas de inclusão não são células nem se acham no interior delas. Complementando os argumentos expostos em seu trabalho, posso acrescentar o comportamento acima indicado com relação à genciana. Já que o tratado mais recente de anatomia patológica, de autoria de Ziegler, ainda aponta a ocorrência dos micróbios da lepra no interior de células, devo expressar aqui minha convicção de que o ponto de vista original de que os bacilos estão depositados dentro de células baseia-se em falsa interpretação das imagens microscópicas, pela qual se considera o contorno da zooglêia como limite celular, e a substância gelatinosa, como protoplasma celular. Daí resultou a busca improfícua do núcleo correspondente. Se Touton, em seu mais recente trabalho (*Fortschritte der Medizin*, 1886, n.2), dá nova acolhida a este ponto de vista, deslocando a zooglêia para o interior de uma célula, cujo núcleo seria, então, empurrado de encontro à parede celular, deixando-o até mesmo ficar achatado pela massa bacteriana, ele não pode alicerçar tal representação dos fatos sobre a autoridade de observadores progressos, já que a interpretação deles era totalmente diversa. Touton tem o dever de apresentar fundamentação própria para sua nova interpretação. Aos observadores futuros, caberá dizer se conseguiu fazê-lo. Pessoalmente, julgo que suas razões não parecem ser convincentes o bastante para provar que a localização dentro de células seja a regra, já que, na maioria dos casos, eu, ao contrário, posso excluir tal localização com segurança. É evidente que, dependendo da natureza do objeto, algumas imagens são ambíguas e permitem certa latitude de interpretação, de acordo com os preconceitos de cada observador. Quando Touton desloca seus núcleos para dentro de uma camada protoplásmica periférica delimitada por um segundo contorno (celular), deve ter tido, como embasamento de seu ponto de vista, imagens que poderiam facilmente ser interpretadas de modo diverso por um microscopista não menos experiente. Células fusiformes e núcleos alongados numa direção, achatados na outra, são bastante freqüentes no interior do nódulo lepromatoso, e também alhures, e, sem dificuldade, podem ocorrer justapostos a uma aglomeração bacteriana. Ser-me-á, portanto, concedido que as preparações feitas pelas técnicas usuais não evidenciam claramente os contornos celulares, e que pela simples forma de um núcleo adjacente ainda não se deve concluir, a meu ver, que ele se acha imprensado entre a aglomeração de bactérias e uma parede celular.

Não cabe aqui a discussão pormenorizada das idéias de Touton (publicadas só depois da conclusão do presente trabalho). Não obstante, desejo ressaltar que, em minha opinião, a teoria da localização intracelular deve sua popularidade ao fato de ter sido descrita situação análoga para o miceto da tuberculose, morfológicamente semelhante. Não se deve, entretanto, raciocinar por analogia, já que também para esse microrganismo a célula não representa, propriamente, o meio nutritivo exclusivo, sendo provável sua multiplicação em linfa, sangue, secreção dos brônquios e cavidades, e certa em meio nutriente morto (soro sanguíneo). Ademais, por ora ninguém comprovou a presença de células gigantes nos nódulos lepromatosos, o que por si só já indica um comportamento diferente dos dois esquizomicetos em relação aos tecidos.

Deixemos agora o invólucro mucoso, e voltemo-nos para seu conteúdo, isto é, para os chamados bacilos. Veremos que formam bastonetes retos ou ligeiramente encurvados,

com diferentes feitios e comprimentos muito variáveis, podendo mesmo ser iguais ao diâmetro de uma hemácia. Esses bastonetes não são, em absoluto, homogêneos, compondo-se de duas substâncias diversas, de comportamento diferente, conforme os vários métodos de coloração; com os métodos de preparação em uso atualmente, é muito mais fácil verificar este fato do que obter bastonetes com coloração aproximadamente homogênea. Tal comportamento foi descrito por Neisser e outros como áreas claras que interrompem a continuidade dos bastonetes, e interpretada como formação intersticial de esporos. Não podemos de modo algum concordar com essa interpretação, já que, se assim fosse, as áreas claras apresentar-se-iam convexas quando voltadas para as escuras, pois só podemos imaginar esporos redondos, ou mais ou menos ovóides, e alongados; é fácil convencer-se de que ocorre exatamente o contrário: os esporos representam cilindros limitados por extremidades côncavas, enquanto as partes fortemente coradas são redondas. Voltolini, que observou a mesma condição em bacilos da tuberculose (após aplicação curta de ácido nítrico fumegante), parece atribuí-la a um produto da coagulação; mas não conseguiu produzi-la em bacilos da lepra existentes em preparados mais antigos. Mostrarei, contudo, que é precisamente nestes bacilos que a referida condição pode ser evidenciada com grande nitidez. Ela não é mero produto de artefato, nem tampouco uma diferenciação histológica qualquer que só se torna evidente por meio de reagentes ou coloração. Para provar isso, tomarei como ponto de partida preparações secas e fixadas pelo álcool ou ácido ósmico, preparações que não sofreram nenhuma alteração além da fixação comum. Examinemos, em primeiro lugar, os bastonetes bem curtos e retos que se vêem em abundância. Aproximando-se a objetiva deles, por abaixamento lento, aparecem, regularmente, primeiro, duas manchas claras, redondas, brilhantes, situadas nos dois pólos, que refratam a luz à maneira das superfícies convexas. Designo esta forma, assim como aquela, correspondente, das preparações coradas, de forma de cólon, em razão de sua semelhança com o sinal gráfico dois pontos. Por vezes, num dos pólos, o ponto é substituído por um traço mais longo, que designarei como forma 'í'; isso acontece mais raramente em ambos os pólos. Finalmente, encontra-se, com relativa freqüência, uma série inteira de tais áreas mais claras e salientes, de coloração mais intensa, eqüidistantes entre si (forma de estreptococo); muitas vezes, o eixo apresenta pequenas alterações de direção nos pontos, daí resultando curvaturas e leves envergamentos.

Examinando-se, agora, as imagens que se formam após colorações diversas, encontramos, em algumas preparações, em aumento moderado, bastonetes aparentemente homogêneos e corados de maneira uniforme. Tais imagens devem ter dado ensejo à designação de bacilo; tanto quanto eu possa julgar, hoje, elas aparecem principalmente quando, a uma coloração moderada, não se seguiu nenhuma descoloração, ou quando o corante foi extraído subsequente-mente por meio de álcool, clorofórmio ou óleos essenciais. (A técnica ideada por Koch para representar os bacilos da tuberculose parece prestar-se particularmente à formação de tais imagens. Aliás, os corantes, isoladamente, não apenas se comportam de modo diverso uns dos outros, como dão resultados diferentes conforme o método utilizado.)

Imagens totalmente diferentes são obtidas quando se cora de maneira excessiva com fucsina ou violeta de genciana, e se descora, depois, por meio da ação prolongada de ácido nítrico e álcool. Então, em cada bastonete, encontra-se uma delimitação nítida entre uma substância fortemente corada, e outra incolor, ou fracamente corada. Por

vezes, obtém-se uma espécie de dupla coloração: com a fucsina, variando de vermelho-escuro a vermelho-claro; com a genciana, entre vermelho-cereja pálido e azul-violeta escuro. A substância corada de maneira mais intensa assume a já mencionada organização em cólon, em 'í' e em forma de estreptococos; não raro também se encontram microesferas completamente isoladas, sem ligações, semelhantes a cocos. Quando a substância intersticial está descorada por completo, — o que ocorre, em geral, em parte dos bastonetes —, revela-se sua existência pelo movimento passivo, em conjunto, das formações semelhantes a cocos (Figura 7). No caso de descoloração incompleta, tem-se a impressão de bastonetes descontínuos, como estão representados na estampa de Unna. De vez que é freqüente encontrar-se numa preparação bastonetes contínuos providos de lacunas esparsas, e outros dissolvidos, semelhantes a estreptococos, daí resulta a impressão de se estar em presença de fases evolutivas diversas. Tal suposição justifica-se de maneira apenas condicional, pois, na realidade, não existem bastonetes verdadeiramente homogêneos.

As mais belas preparações são obtidas pela aplicação de uma modificação do processo de Gram, descrito a seguir.

Cora-se, de preferência por tempo mais longo e com o auxílio de temperatura mais elevada, em uma solução diluída de violeta de genciana e anilina. (Em concentração maior resultam facilmente precipitados granulados de corante, extraordinariamente perturbadores.) Mesmo quando os cortes finos exibem um violeta azulado escuro, saturado, são passados sucessivamente para uma solução de iodo-iodeto de potássio, álcool absoluto adicionado de 10-50% de ácido nítrico fumegante e álcool absoluto não acidificado. Devem permanecer algum tempo em cada uma das soluções, repetindo-se várias vezes o processo; pode-se dispensar mais tarde a solução de iodo. Examina-se os cortes quando apresentam apenas um matiz azulado de ardósia. Uso como líquido para o exame, com predileção, a essência de timo (*Thymen*) preparada em alto grau de pureza pela firma Schimmel e Cia., de Leipzig. Não ataca a coloração, clareia muito bem e volatiliza-se rapidamente sob a ação do calor, sem deixar resíduo. Se os cortes ainda estiverem fortemente corados, utiliza-se o óleo de cravo, que proporciona um descoramento paulatino e eficaz. Durante o exame, encontra-se ou uma encantadora coloração diferencial, quase preto-azulada, das microesferas escuras que ficam no interior de um bastonete vermelho pálido, ou, caso a descoloração tenha ido além, vêem-se apenas as microesferas coradas de forma muito intensa.

Em cortes, resulta, assim, uma imagem de especial agrado, sobretudo quando se lhes aplica um corante diferente para destacar o núcleo. Os agrupamentos de bacilos parecem, então, flocos de neblina dissolvida semelhantes a nuvens transparentes salpicadas por muitos pontinhos e manchinhas em forma de chumaço.

Quando bem focalizadas, as pequenas esferas isoladas de um aglomerado têm sempre o mesmo tamanho (uma exceção será comentada mais adiante), e os intervalos entre elas também são bastante regulares, levando-se em consideração a curvatura do filamento. Ademais, são perfeitamente redondas, conforme pude me convencer com ocular n.5 e imersão 1/18 de Zeiss, dando ao observador desprevenido imagem idêntica à de estreptococos ou aglomerados de micrococos, cujos indivíduos isolados estivessem bem afastados uns dos outros. Conforme a intensidade da coloração, as esferas apresentam ligeira diferença de tamanho, parecendo ser um pouco maiores num matiz perfeitamente negro-azulado do que na coloração violeta que se encontra em

preparações insuficientemente coradas ou posteriormente clareadas. Contudo, são sempre bem menores do que os estafilococos comuns.

Estando ainda um pouco coradas as camadas mais internas da substância dos bastonetes, chega-se facilmente à convicção de que todos os chamados bacilos são passíveis de dissolução, e, portanto, trata-se aqui de um princípio geral e não de um mero estágio isolado de desenvolvimento. É esta prova que confere valor ao método e que, ao mesmo tempo, justifica dar-se especial ênfase a essas condições. Não obstante as mencionadas imagens já tenham sido todas vistas, tanto quanto eu saiba ninguém antes de mim comprovou sua validade de ordem geral.

Considerando-se que tais relações só podem ser avaliadas em preparações bem-sucedidas (cuja execução com frequência é difícil), antecipo-me refutando todas aquelas objeções que possam advir de preparações malsucedidas. Quando realizadas com êxito, obtêm-se imagens perfeitamente claras e inequívocas. Tendo em vista a importância fundamental deste método, tomo a liberdade de expor, sucintamente, minha experiência relativa ao assunto.

Durante a aplicação do método de Gram, e com descoloração por meio de álcool acidificado (que, em princípio, deveria conter 3% de ácido nítrico, mas que provavelmente atinge concentração maior em virtude da evaporação desigual), obtive, de início, imagens com a aparência de cocos enfileirados com regularidade, mas ainda ligados uns aos outros por um tênue filamento. (Ver as quatro últimas ilustrações parciais da Figura 7 e uma fotografia de Koch nas *Mitteilungen des deutschen Reichsgesundheitsamtes*, v.I, Figura 39.) Como eu pude realizar tais preparações com bacilos da tuberculose também, e como, por vezes, todos os bastonetes exibiam a referida estrutura, para mim ficou claro que não se tratava de um artefato, e sim da representação de condições normais. Um corte de lepra exibindo a mesma configuração ficara imerso vários dias em óleo de cravo, sendo, então, levado outra vez ao álcool absoluto. Ao examiná-lo, deparei-me, de súbito, com a referida imagem de fileiras soltas e aglomerados de cocos. Como aqui não houvera nenhum tratamento posterior de efeito enérgico, é evidente que só poderia se tratar de uma faculdade de descoloramento mais fácil atribuível à substância dos filamentos intersticiais.

Procurei, naturalmente, fazer mais cortes iguais e, após algumas tentativas malogradas, obtive diversas preparações em que eu havia conseguido a descoloração com álcool acidificado pelo ácido clorídrico, em parte com, em parte sem o auxílio de óleo de cravo. Seguiram-se, então, várias tentativas frustradas em que ora corava-se a zooglêia inteira, de modo difuso, ora ocorria a coloração homogênea dos bastonetes ou fortes precipitados nas preparações. Pouco a pouco, foram ficando claras as causas prováveis de erro: provinham de insuficiente coloração inicial, de permanência por demais abreviada na solução iodo-iodeto de potássio, ou de álcool com teor insuficiente de acidez. A escolha deve consistir, realmente, na ação do ácido clorídrico ou do nítrico, que podem ser utilizados em solução alcoólica em alta concentração, desde que não prejudiquem os cortes (que não devem ser nem muito grandes, nem muito finos). (Ao preparar a mistura, convém proceder com alguma cautela.) De preferência, deve-se usar o álcool absoluto somente na lavagem.

O óleo de cravo tem a vantagem de extrair o menos possível o corante das células semelhantes a cocos, realçando e corrigindo, assim, a coloração diferencial. Mas, incluído em bálsamo, acaba provocando, posteriormente, a deterioração das preparações.

Portanto, é necessário extraí-lo novamente com éter. Uma garantia de boa conservação dos cortes é proporcionada pela secagem (com prévia lavagem em água) e inclusão em bálsamo-do-canadá derretido e previamente dessecado (segundo o método de Unna).

Passando, agora, à substância intersticial dos bastonetes, verificamos que possui as seguintes propriedades: aceita com bastante facilidade a coloração pela anilina, mas cede essa coloração com facilidade; uma vez tratado com ácidos, perde de vez a capacidade de fixar os corantes de anilina. Por este motivo, as partes incolores dos bastonetes não aceitam qualquer coloração diferencial quando as preparações são feitas pelo processo habitual. Elas partilham todas essas propriedades com o invólucro mucoso. O desaparecimento de seus contornos dentro dele permite-nos afirmar, com segurança, que possuem aproximadamente o mesmo expoente de refração; pela mesma razão, um pedacinho de gelo isento de bolhas de ar ou de poeira escapa à nossa observação ao ser submergido em água, e certos crustáceos, em especial a *Leptodora hyalina*, normalmente bem visíveis no plano macroscópico, tornam-se imperceptíveis quando observadas vivas em seu próprio elemento.

Pequenas variabilidades que se manifestam, às vezes, em relação à refringência da luz e ao comportamento tintorial podem ser atribuídas a graus variáveis de turgescência. Que a refringência é outra para a substância túrgida, rica em água, em comparação com a desidratada, fica bem evidente por meio da visualização em bálsamo-do-canadá. (Ver a figura de focos túrgidos de Unna neste fascículo, assim como a conhecida imagem do método de Neisser que utiliza óleo para evidenciar células em Ziemssen, *Spezielle Pathologie und Therapie*, v. XIV.1.) As partes jovens e mais internas são as menos túrgidas, aquelas formadas mais recentemente talvez não sejam sequer coloidais e, por isso, fixam melhor o corante. Seu comportamento tintorial aproxima-se mais do das pequenas microesferas, de modo que, mesmo com o uso enérgico de ácido nítrico, formam com frequência uma ponte corada de uma microesfera a outra, por meio da qual se reconhece o local da última divisão. Somente pela ação sucessiva de iodo e de ácidos minerais fortes obtém-se uma imagem correta de todos os bacilos presentes num corte.

Explanados, assim, os fatos por mim observados, seja-me permitido expor, de maneira sucinta, idéias que, a meu ver, deixam-se explicar facilmente, e em concordância com outras ocorrências.

O componente elementar do esquizomiceto da lepra é a célula redonda, que possui uma membrana firme e delgada, a princípio, e que se torna, pouco a pouco, mais espessa e coloidal, por turgescência. A célula contida nela divide-se, sem co-participação do invólucro, em duas novas células que, aos poucos, afastam-se uma da outra, revestindo-se de novas membranas enquanto permanecem inclusas na membrana original. A divisão sempre se realiza em uma mesma direção, e cada vez que ocorre, leva à multiplicação do invólucro gelatinoso em uma nova camada, fenômeno que se pode acompanhar nitidamente em certas algas, a *Gloeocapsa*, por exemplo, com a diferença que, nesta, a divisão não se limita a um eixo só. O invólucro mais interno, no qual estão inclusas as pequenas células redondas, tal como sementes numa fava (de *Cassia fistula*, por exemplo), pode ser representado, no seu todo, como bacilo; camadas túrgidas externas constituem o invólucro gelatinoso, que pode se fundir com o das fileiras de células para formar uma zoogléia comum.

Nas diversas formas de esquizomicetos encontram-se diferenças na forma da membrana distendida, assim como na metamorfose da gelatina, mais precoce ou mais

tardia, diferenças estas que se evidenciam, principalmente, pela coloração, dando margem a interpretações muito variadas. O invólucro gelatinoso pode estar contraído entre as células individuais, pode também passar por sobre elas em linha reta ou abaulada; quando corado o invólucro, resulta, de um diplococo, um coco ovalar; e de uma fileira de cocos (estreptococos), um bastonete de tamanho variável e cantos arredondados. De fato, várias vezes consegui desdobrar tais formações em duas ou várias células redondas, e julgo possível que os cantos arredondados representem critério fidedigno para se avaliar uma construção de células redondas. Parece-me, também, provável que a construção seja peculiar aos microrganismos de todos os tumores granuloses.

Já indiquei anteriormente que são apenas relativas as diferenças de coloração das várias camadas do invólucro gelatinoso; compreende-se, assim, que um bastonete ou um coco possam parecer mais delgados por um método do que por outro, que resultou numa camada mais corada.

Minhas pesquisas explicam, também, por que as descrições de um microrganismo consistem ora num bastonete, ora na forma de coco. De mais a mais, se Disse e Taguchi julgaram haver encontrado, no sangue de sífilíticos, esporos e bastonetes coráveis com genciana, então é provável que, nesse caso, sejam simples células redondas (não de esporos), que constituíam os componentes elementares dos bastonetes, idênticos, talvez, ao bacilo de Lustgarten. Talvez possam ser explicados assim outros achados de micrococos em doenças que hoje costumamos atribuir a bastonetes.

Poder-se-ia objetar, ainda, que as células redondas sejam esporos. A esta interpretação opõe-se uma série de fatos, entre os quais o caráter constante da ocorrência, o comportamento em relação aos corantes de anilina, a provável capacidade de divisão, que ainda não foi demonstrada para os esporos de bacilos; e, por fim, a ocorrência de outras células que, certamente, estão mais próximas dos esporos, como demonstrarei adiante.

Até aqui só mencionamos dois elementos que concorrem para a formação dos aglomerados de zoogléia; entretanto, existe ainda um terceiro, sem grande importância quantitativa, mas, provavelmente, um pouco mais importante do ponto de vista funcional. Refiro-me a peculiares elementos celulares, cuja relação especial com a reprodução da espécie pode ser considerada provável, por analogia.

Já nas preparações não coradas, encontram-se na extremidade dos bastonetes células isoladas que se diferenciam das demais por seu tamanho, sua forma e refringência. Configurações semelhantes mostram-se resistentes tanto às bases quanto aos ácidos, e aparecem isoladas, em parte dentro dos aglomerados de zoogléias, em parte espalhadas nos tecidos e até mesmo, ainda que raramente, no interior da camada epitelial.

Para estudar mais de perto esses corpúsculos e sua localização, é melhor começar com preparações coradas. Confeccionadas de acordo com as regras usuais, verifica-se o seguinte:

1. Na extremidade dos filamentos em forma de bastonetes vêem-se, com relativa raridade, células coradas na mesma cor, bem mais espessa e intensamente tingidas, e mais alongadas. O diâmetro maior dessas células é freqüentemente um tanto oblíquo, resultando daí uma forma que evoca a figura utilizada na música para uma semibreve ou mínima (com cabeça inclinada). Por vezes, acham-se formações de idêntica aparência também livres (Figuras 10, 11).
2. Depara-se o observador com certo número de corpúsculos muito semelhantes, aparentemente redondos ou ovais e que só se distinguem pelo fato de não

aceitarem a coloração, de possuírem duplo contorno e de serem muito mais refrangentes. Disso resulta que são facilmente reconhecíveis tanto no ar, na água e na glicerina como em diversos óleos, no bálsamo-do-canadá e também no sulfeto de carbono, mesmo quando se encontram no interior do conglomerado de zoogléia ou nas malhas dos tecidos. A maioria é encontrada livre, podendo facilmente ser tomada por um cisco; no entanto, contra isto falam seu comportamento em face das bases e dos ácidos, sua insolubilidade em sulfeto de carbono e, muito especialmente, a circunstância de que tais corpúsculos são encontrados ainda ligados aos chamados bacilos. Após atuação mais prolongada do corante, vê-se também aqui o conteúdo um tanto corado, mas não a membrana (Figura 8).

3. Nas preparações descoradas por meio de ácidos minerais fortes e submetidas à coloração de contraste por meio de outro corante, encontram-se, não raro, corpúsculos arredondados tingidos pela aludida coloração de contraste cujo diâmetro excede muito o das células cocóides. Quase não se poderia pensar numa relação entre ambos se uma pequena parte dessas formações coloridas de modo diferente não constituísse, indubitavelmente, a porção terminal de um bastonete. Tais formações se distinguem das formas anteriormente descritas não só pela cor, mas também porque geralmente são bem maiores, de configuração menos regular e desprovidas de brilho acentuado. Exibem freqüentemente um, raramente dois, prolongamentos curtos com aspecto de filamento muito tênue, cuja disposição geralmente não é radial, e sim tangencial, motivo pelo qual pode reaparecer forma similar à nota musical (Figura 9).

Quanto à interpretação das formas descritas, as conclusões que se seguem não deveriam parecer demasiado ousadas.

As células localizadas na extremidade dos filamentos devem ser consideradas como uma forma especial, semelhante a epitelíocitos de *Nostoc* (*Epitheliocytus limitans internus*). Enquanto não possuem ainda membrana mais densa, comportam-se como as outras células no tocante à capacidade de deixarem corar; mais tarde, adquirem espessa membrana, pouco permeável, como ocorre com freqüência nos esporos de fungos. Por fim, forma-se em volta da célula uma massa gelatinosa que pode ser corada, mas que cede facilmente o corante quando a descoloração é feita com ácidos. É difícil decidir se o invólucro gelatinoso provém do intumescimento da membrana ou se é segregado do conteúdo após o rompimento daquele; seja como for, os pequenos prolongamentos de uma membrana celular arrebatada poderiam ser interpretados como apêndices.

Parece provável, por analogia, que essas células tenham função especial, qual seja, a de reprodução, e a membrana mais espessa dá margem à suspeita de que seja uma forma de resistência. (Tal propriedade não é atribuída aos epitelíocitos de *Nostoc*.) Não pude me convencer, com segurança, de que ocorre a germinação, mas percebi aspectos que autorizam semelhante interpretação.

Até agora, só encontrei essas células numa das extremidades dos bastonetes (e não ao longo deles) ou, então, desconectadas e livres.

Da leitura de Mittenzweig (*Die Bakterienätiologie der Infektionskrankheiten*), deduzo que Flügge encontrou na lepra formações semelhantes a cones, além de bastonetes. Estes devem ser idênticos às células ovais que descrevi. Achados semelhantes foram relatados por Matterstock para o microrganismo da sífilis.

Se minha exposição estiver correta (e isso pode ser verificado com facilidade por meio de experimentos), dela decorre naturalmente que o nome *Bacillus* não se ajusta mais aos nossos organismos, uma vez que designa células ou complexos celulares em forma de bastonetes, sem outra diferenciação, e que formam esporos endógenos. Para o esquizomiceto da lepra e organismos correlatos, proponho que seja criada a divisão dos *Coccothricaceae* com o gênero *Coccothrix*. Este deverá ser definido da seguinte maneira:

Células pequenas, redondas, cocóides, que se dividem sem a co-participação da membrana celular, numa só direção, sendo encontradas, portanto, isoladas ou enfileiradas. Revestidas por membranas celulares distendidas, adquirem, aos poucos, consistência gelatinosa, por intumescência; entre as células individuais encontram-se interstícios maiores que o diâmetro celular. A coloração das camadas mais internas do invólucro membranáceo-gelatinoso dá origem a imagens que se parecem com pérolas enfileiradas ou com bastonetes. Vêm-se, ainda, células maiores, em parte ovais e de duplo contorno, ora livres, ora na extremidade das fileiras celulares.

No gênero *Coccothrix* desde já devem ser colocados, com certeza, os micetos da lepra e tuberculose. Ainda cabem aí vários fungos de putrefação por mim observados; também deveria ser incluído aquele mencionado atrás, que Koch fotografou, em razão de sua semelhança com o chamado *Bacillus malariae* Klebs e Tommasi.

Não pretendo me deter mais sobre este assunto, mas quero ainda dizer algumas palavras sobre o chamado bacilo da tuberculose.

O conceito por mim apresentado sobre esse bacilo está em decidida contradição com aquele de seu descobridor. Da figura que ele próprio apresenta dos interstícios claros (*Mitth. des Reichsgesundheitsamtes*, v. II, estampa X, Figura 47), depreende-se um comportamento quase oposto. A ocorrência dessas diferenças deve-se ao pequeno tamanho do objeto e aos diferentes métodos de coloração empregados. Compraz-me, no entanto, saber que os resultados por mim obtidos na lepra tenham sido já observados por outros na tuberculose, embora, pelo que eu saiba, ninguém tenha proferido, até agora, a última palavra, com a energia imprescindível à elucidação dos fatos. As primeiras preparações, com fucsina, de tuberculose vacinal, que me foram mostradas, em Nápoles, com os mais fortes aumentos, pelo Prof. Schrön, que as executara, apresentavam a forma de estreptococos, de maneira típica, e eu me recordo muito bem que o referido senhor chamou minha atenção especialmente para esse ponto. Se não me engano, naquela ocasião (isto é, antes do início de meus estudos sobre a lepra), o Prof. Schrön já havia observado a formação de esporos na tuberculose (naturalmente, não se refere aos interstícios claros). Embora eu não esteja familiarizado com os pormenores, desconfio que tenha visto o mesmo que eu vi na lepra, e sinto-me na obrigação de não preterir sua prioridade.

Voltolini, por sua vez, também encontrou, antes de mim, um estado caracterizado pela forma de fileira de pérolas nos chamados bacilos da tuberculose depois de tê-los tratado com ácido nítrico fumegante, mas considerou-o um produto de coagulação (veja *Breslauer ärztl. Zeitschrift*, 1885, n. 15). Gram, autor do método que, com algumas modificações, produz as imagens mais convincentes, fala, igualmente, de um aspecto granuloso dos bacilos da tuberculose, parecido com estreptococos. O primeiro deve corresponder ao estado de *Coccothrix* (filamentos com granulações inclusas), que eu também consegui obter, e muito bem, nos bacilos da tuberculose.

Devo o material do presente trabalho ao Dr. Unna, que me levou ao desejo de realizar estudos adicionais sobre essa interessante doença, que já conhecia de minha prática

clínica no Brasil. Sou-lhe profundamente grato pela oportunidade que me proporcionou, assim como pelo interesse amistoso com que acompanhou e estimulou esses estudos. Tomo ainda a liberdade de manifestar, aqui, o anseio de que sua iniciativa e seus ingentes esforços consigam despertar vivo interesse pela pesquisa e terapêutica da lepra, em lugar da indolência com a qual ainda se enfrenta, em geral, essa doença em sua vasta área de dispersão.

