ESTUDOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA

por **Manuel José Pereira-Filho** *

É o presente trabalho o terceiro duma série de comunicações que vou publicando pouco a pouco sôbre o fungo da Doença de Lutz.

Quero hoje apreciar:

1.º) O saprofitismo e as portas de entrada do agente dessa micose.

2.º) O diagnóstico diferencial entre os cogumelos determinantes das diversas blastomicoses humanas.

3.º) A citológica dêsse fungo vista nos cortes de testículos de cobaios inoculados experimentalmente com material humano.

Tentarei explicar, em poucas palavras, de onde provêm os achados verificados e a origem dos comentários hauridos e inspirados nos tesouros da micologia nacional e estrangeira. Mas ver-se-á também quanto resta ainda por fazer.

Escolas brasileiras diversas, mas igualmente importantes, pois, ministraram ensinamentos de valia indiscutível, são os núcleos de micólogos cariocas, paulistas e mineiros.

Especializo os nomes de Olímpio da Fonseca Filho, Floriano de Almeida, Arêa Leão, Carlos Lacaz, Amadeu Cury, Luigi Bagliolo e Oscar Versiani, entre outros.

Tento de falar primeiro do **Saprofitismo** e das **portas de entrada do parasito no organismo humano.**

Não há negar que se desconhece ainda a vida saprofitua do agente da blastomicose sul-americana.

Nos "Dados estatísticos sôbre **granulomatose paracoccidioidica** (Blastomicose sul-americana ou paracoccidioidose), publicados por Floriano de Almeida, Carlos da Silva Lacaz e Aderbal Carlos da Cunha, na Revista Brasileira de Medicina (1946), dizem êsses pesquizadores da Faculdade de Medicina de São Paulo: "No reino vegetal é que se encontraram, possìvelmente, em estado de vida saprófita, os parasitos agentes da paracoccidiose e, portanto, os trabalhadores rurais pagam um tributo maior a essa micose".

Lacaz, em bela síntese sôbre a Blastomicose de Lutz, divulgada pelos Anais do Instituto Pinheiros (Julho de 1948), considera o reino vegetal como habitáculo natural dêsse fungo.

Estirpes do cogumelo cultivadas em agar-Sabouraud foram semeadas, com proveito, em vários vegetais: ipé, peroba, fôlhas de café e pedaços de jacarandá.

Não foi possível conseguir, entretanto culturas do fungo, semeando fragmentos de gramíneas ou sementes vegetais, retiradas do solo.

Como fizeram outros investigadores, chama a atenção para o penetrar do parasito pelas mucosas da bôca e do faringe, e ainda pelo ânus, em indivíduos que se utilizam de fôlhas para a limpeza anal.

Essa última modalidade de contágio, enquanto a mim, está demonstrada pela observação de Sodré e Cerruti (1930). O mesmo ocorre com o caso de Monteiro e Fialho (1940), com localização ano-retal blastomicósica primitiva.

Com Edison de Oliveira, Carlos da Silva Lacaz, pelo "O Hospital" (1948), falanos sôbre Blastomicose da região ano-retal, registrando duas observações dessa micose com lesões para o lado do reto.

É lícito ainda afirmar localizações primitivas na pele e nas mucosas nasal e conjuntivas (caso de Belfort, 1930).

O Prof. Ramos e Silva verificou recentemente a forma cutânea pura, de início, da blastomicose de Lutz.

Quanto às lesões pulmonares é indis-

*) Comunicação ao Congresso Médico do Cinqüentenário da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre (março, 1949).
**) Catedrático de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre.

farçável que provêm ora de inhalações do cogumelo, ora da propagação das infecções das mucosas bucal ou taríngea, ora ainda resultam das disseminações linfáticas ou também por via sanguínea.

Para o Prof. Cunha Motta, o contágio por aspiração é menos importante que a infecção por via hemática.

Bogliolo (1946), em caso de forma na aparência primitivamente linfática, estudou, cuidadosamente, granuloma apical (dentário) determinado pelo **Paracoccidioides brasiliensis":** daí admitir que o agente da doença de Lutz pode penetrar no organismo através dos dentes cariados.

Haberfeld admite, desde 1919, que os parasitos possam atingir os gânglios, através das amígdalas, sem haver nelas lesões paracoccidióidicas de Rafael Nova (1940), de impossível diagnóstico macroscópico.

De um caso de blastomicose generalizada, com extensas lesões cutâneas, Alcântara Madeira, Lacaz e Forattini conseguiram hemoculturas positivas (em média, 1 cc. de sangue em quatro tubos de caldo-Sabouraud).

Moacir Santos da Silva, do Rio de Janeiro, em trabalho sôbre Blastomicose pulmonar, apresenta fotografia de um paciente de 23 anos, lavrador, que tinha hábito de mascar fôlhas de café (Rev. Med. Brasileira, 1946).

As estatísticas demonstraram, por sua vez, que essa micose é mais freqüente nos homens, entre 20 a 50 anos.

Todos os doentes que observei são agricultores, do interior do nosso Estado: todos êles fumadores de cigarro de palha, colhida a esmo nos galpões das fazendas, nos celeiros ou nos paióis de milho, sem nenhum cuidado de conservação higiênica.

É hábito trivial dos trabalhadores do campo "amaciar" as palhas nos lábios antes de utilizá-las para o preparo dos cigarros.

Daí partiram as investigações que realizei sôbre o saprofitism do agente etiológico da micose de Lutz.

Eis a marcha das pesquizas realizadas:

Palhas de milho,* encontradas no comércio, foram mergulhadas até 1/4 do seu comprimento em diversos meios líquidos, contidos em tubos de ensaio.

Num primeiro grupo de tubos, havia meios culturais ricos em substâncias nutritivas: caldo glicosado (2%) e glicerinado (5%), Sabouraud glicosado (líquido), caldos de fígado, de baço, de rins, de testículos, de ovário (de procedência bovina) e de placenta humana, peptonados e glicerinados (5%), com pH=7,4.

Um outro grupo de tubos continha decôto de palha de milho, diluição de suco de milho verde ou decôto de "pendão" ou estigmas de milho.

Num último grupo dêsses tubos, mergulharam-se simplesmente palhas em água destilada.

Todo êsse material foi esterilizado na autoclave a 120°, durante minutos.

Semeei nos tubos dos três grupos, sôbre as palhas, estirpe de **Paracoccidióides brasiliensis** ou **Lutziomyces histoporocellularis,** recentemente isolada (amostra Rodrigueiro). Passou-se depois ao fechamento dos tubos com rôlhas de cortiça e 30 dias após, na temperatura ambiente, verificaram-se os resultados seguintes:

Nos meios com caldos de placenta humana, de ovário, de testículo, de fígado, de baço e de rins, peptonados e glicerinados, as culturas obtidas sôbre as palhas, são salientes cerebriformes, abundantes, de matiz levemente amarelado e sem aspecto algodonoso, no fim de 2 meses.

Nos meios com caldo ordinário glicosado e glicerinado e no Sabouraud líquido, glicosado a 2%, o cogumelo produziu sôbre as palhas culturas cerebriformes abundantes, amareladas ou pardacentas, que apresentaram depois aspecto algodonoso em alguns pontos.

Nos tubos com decôto de palha, com suco de milho verde diluído ou com decôto de estigmas de milho, as culturas cresceram logo com aspecto algodonoso ou em pêlo de **rato branco.** Essas culturas podem ser transplantadas em série nos meios do segundo grupo (decôtos de palha ou de estigmas de milho), sempre com aspecto algodonoso.

Foi possível observar que as culturas obtidas nos meios do primeiro grupo, de aspecto cerebriforme, levadas aos decôtos do segundo grupo, adquirem o aspecto algodonoso típico.

Nos tubos do terceiro grupo, com água destilada estéril, depois adicionada de sangue humano recentemente colhido (misturas em partes iguais), as sementeiras do fun-

*) Palhas de milho (Zéa Mays) dobradas em duas fôlhas no sentido longitudinal.

go produziram sôbre as palhas colônias cerebriformes, menores do que as desenvolvidas nos tubos do primeiro grupo. Há pontos algodonosos.

Pelo que deixo dito, é bem possível concluir que o fungo, em saprofitismo, vive sob a fase algodonosa.

Abriu-se assim uma verêda para novas investigações, dirigidas especialmente para descobrir o cogumelo em palhas de milho, mantidas em más condições higiênicas nos galpões ou nos celeiros. Inicialmente, procurei nelas, com auxílio de lentes, vegetações algodonosas que se assemelhassem ao aspecto do cogumelo nas culturas obtidas em palhas de milho molhadas em decôto de palha ou em diluições de suco de milho verde.

Identificou-se aí um achado interessante que apresenta muita semelhança, nas mesmas amplitudes óticas, com os preparados de culturas do parasito obtidas em palha molhada no decôto de milho verde diluído.

Consinta-se, pois, que considere as palhas de milho, mantidas em más condições higiênicas nos galpões, nos celeiros ou nos paióis, como um dos possíveis veiculadores vegetais do **Lutziomyces histosporocellularis ou Paracoccidióides brasiliensis.**

Diagnóstico diferencial entre os agentes das blastomicoses humanas.

Apenas tocarei de leve naqueles pontos que têm importância essencial para a diagnose dêsses fungos.

Cite-se primeiro a classificação das blastomicoses humanas do Prof. Flávio Niño — tão clara e de tanta valia —, com ligeira modificação de Rabelo, Portugal, Antunes e Rocha:

Primeiro grupo: Blastomicoses genuínas, cujo tipo é a micose de Busse-Buschke, produzida pelo **Cryptococcus neoformans (Torula histolytica).**

Segundo grupo: Parablastomicoses, que compreendem a micose de Gilchrist ou blastomicose dermatítidis **(Gilchristia dermatítidis, Zymonema dermatítidis)** e a micose de Lutz ou blastomicose sul-americana pelo **Parococcidióides brasiliensis** ou **Lutzziomyces histosporocellularis.** Neste grupo, julgo acertado incluir também a micose de Lôbo, pela **Glenosporella loboi.**

Terceiro grupo: Pseudoblastomicoses, com a micose de Posadas — Dickson (granuloma coccidióidico), produzida pelo — **Coccidióides immitis** e também a micose de Seeber (granuloma rinosporidiósico pelo **Rhinosporium Seeberi.**

Quarto grupo: Histiocitomotoses blastomicóides, com a micose de Darling (histoplesmose), produzida pelo **Histoplasma capsulatum.**

Todos os agentes cultiváveis das blastomicoses chegam nas culturas ao aspecto algodonoso, com exceção apenas do **Cryptococus neoformans,** que conserva sempre o tipo de levedura, seja qual fôr a temperatura do seu crescimento ou a composição do meio cultural.

No agar-glicose de Sabouraud a 37°, produz colônias de coloração **cremosa** e de aspecto **mucóide.**

Na temperatura ambiente, nesse meio cultural, forma também colônias tipo levedura, inicialmente brancas e úmidas, depois se vê nelas aparência rugosa ou granulosa.

Não se conseguiu observar aí **formações de filamentos** ou de **ascos.** Não coagula o leite, nem liqüefaz a gelatina.

Ao microscópio, identificam-se sòmente células ovais ou ligeiramente alongadas, de 5 a 15 micras de diâmetro, em gemulação, sem cápsulas de revestimento e, por vêzes, há pequenos tubos germinativos.

Em face ulterior, notam-se **exclusivamente células** em gemulação com cápsulas espêssas, cujos contornos são percebidos claramente nos preparados feitos com tinta da China.

Quanto ao **Blastomyces dermatítidis** ou **Gilchristia dermatítidis,** Norman Conant aproxima-o do **Lutziomyces histosporocelluris** ou **Paracoccidióides brasiliensis** porque ambos apresentaram a fase de **tipo leveduriforme** a 37° e ainda a fase **tipo filamentoso,** na temperatura do laborório.

As culturas de **Blastomyces dermatítidis,** no meio de Sabouraud glicosado a 2%, a 37°, são precoces: no fim de 8 dias, apresentam-se abundantes, levemente amarelados úmidas e cerebriformes.

O exame microscópico revela nelas a presenca:

1.°) de conídios **ovóides** ou arredondados. com 3 a 4 micras de diâmetro;

2.°) de conídios piriformes ou circulares. de 4 a 5 micras;

3.°) de células maiores, de paredes muito espêssas, de 7 a 20 micras, algumas com a conformação de **coração de carta de jogar,** apresentando centro granuloso, onde há núcleos perfeitamente visíveis (colora-

ção vital pelo soluto aquoso de Rosa de Bengala a 1%, adicionado no **momento das sementeiras e durante o desenvolvimento cultural** (Estampa 19).

Êsses clamidospóricos nunca foram encontrados nas culturas de **Paracoccidióides brasiliensis (ou Lutziomyces histosporocellularis),** nas mesmas condições experimentais: são, pois, **excelentes** elementos para a diferenciação das culturas dos dois cogumelos agentes das **blastomicoses norte** e **sul-americanas.**

Além disso, há células gemulantes com um único brôto. Excepcionalmente, notei **dois** brotos numa célula. Nunca, porém, havia a disposição em **criptosporulação, própria do fungo de** Lutz-Almeida.

As membranas das formas gemulantes vistas nessas culturas são muito espêssas, muito semelhantes às dos tipos celulares encontradas nos tecidos.

Como demonstrou DeLamater, os elementos celulares, na fase de lêvedo, são quase todos **multinucleados;** há, todavia, exceções. Dessas suas pesquisas, sabe-se ser variável o número de núcleos.

Tais estudos experimentais confirmam os achados de Emmons, que observara anteriormente essa condição multinucleada do **Blastomyces dermatítidis.**

Nas culturas em que se produzem hifas, aéreas, o micélio filamentoso é hialino, ramificado, septado e provido de dilatações em **raqueta.**

Os estudos de Dodge e os de Moore (1933) sôbre os aspectos microscópicos do **Blastomyces dermatítidis** são verdadeiramente magistrais. Benham (1934), Ciferri e Redaelli (1933) e Norman Conant (1939) merecem ser citados pelo rigor dos pormenores microscópicos descritos nessas culturas.

Morris Moore identificou nas culturas dêsse fungo, formas perfeitas de reprodução: os **ascos,** que se originam pela cópula de duas células terminais.

Nas culturas de **Blastomyces dermatítidis** (estirpe 1900, do laboratório de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz), em gelose-tryptose a 2%, na temperatura ambiente, o fungo apresenta **nìtidamente** a fase espinhosa, de matiz amarelo (7 dias) — Vide estampa n.º7.

Vejam-se agora as relações entre o **Lutziomyces histosporocellularis (ou Paracoccidióides brasiliensis)** e a **Glenosporela loboi,** produtora de lesões quelóides, magistralmente estudadas pelo Prof. Jorge Lôbo, da Faculdade de Medicina de Recife.

A Escola micológica do Instituto Oswaldo Cruz, representada pelos Profs. Arêa Leão, Amadeu Cury, Milton de Mello e Masáo Goto, numa interessante comunicação sôbre **Blastomicose Queloidiana ou doença de Jorge Lôbo,** Novas formas do parasito em culturas (Hospital, 1946), verificaram, nas sementeiras dêsse fungo em agar-sangue (a 37°), formas redondas, de tamanho variável, globosas, com dois tipos de gemulação: a **simples** e também a **múltipla** ou **criptosporulação.**

Há, incontestàvelmente, dizem aquêles mestres de Manguinhos, grande afinidade dêsse fungo com o agente da doença de Gilchrist ou blastomicose norte-americana e ainda com o cogumelo da doença de Lutz ou blastomicose sul-americana: daí admitirem a possibilidade de inclusão dêsses três agentes etiológicos de doenças blastomicósicas num mesmo gênero, constituído por três espécies diversas.

Em outra publicação, igualmente valiosa, da Secção Micológica do Instituto Oswaldo Cruz (1948), ao tratar da **"Infecção experimental de animais pela Glenosporella loboi** Fonseca e Leão, 1940", Arêa Leão, Amadeu Cury e Masáo Goto, mencionaram resultados positivos da inoculação de culturas dêsse fungo em agar-sangue (a 37°), nos testículos de cobaio e em camondongos por via peritoneal.

No puz da orquite produzida no cobaio, identificaram formas esféricas, com gemulação simples e múltipla. Não observaram, entretanto, a generalização do processo infectante.

Lacaz opina: "que as lesões quelóides observadas em primeiro lugar por Lôbo, devem constituir uma **entidade clínica especial,** mas cremos também na identidade entre **Glenosporella** loboi e **Paracoccidióides brasiliensis;** quando muito poderia ser considerada como uma outra espécie dentro do gênero **Paracoccidióides** (1948)".

A par disso, a **Glenosporella loboi** vegeta, a princípio, no meio de gelose Sabouraud maltose e rapadura (sacarose bruta), mantido à temperatura ambiente, em culturas glabras, salientes e cerebriformes.

Com o envelhecimento, adquirem elas **aspecto algodonoso** (vide estampa 10).

Nas culturas velhas do agente da doença de Lutz obtidas, à temperatura de 37°, na batata glicerinada (5%) e glicosada

(2%), em 10% de CO^2, vêem-se **células esféricas** que se assemelham aos parasitos encontrados nas lesões quelóides da micose de Lôbo (estampa 16).

Estudos cada vez mais minucioso dos micólogos paulistas e cariocas demonstraram que não é possível a confusão entre as culturas do agente da blastomicose sul-americana e as do **Coccidióides immitis:** em primeiro plano, merecem ser salientadas as notáveis pesquisas de **Floriano de Almeida,** de **Souza Campos,** de **Olímpio da Fonseca Filho,** de **Adêa Leão** e de **Carlos Lacaz.**

A obra perfeita de um grande pesquisador argentino, que morreu aos 32 anos, é recordada com admiração, porque foi êle mestre exímio e cientista da mais sólida cultura experimental. Quero referir-me a Alejandro Posadas que, em 1891, ainda estudante de medicina, no laboratório do Prof. Roberto Wernicke, identificou **corpúsculos especiais** em cortes de pele, num soldado argentino do exército de cavalaria, sito no Pampa central: era uma suposta micose fungóide.

Em 1894, Rixford, no Estado da Califórnia, publicou novos casos, que foram identificados ao de Posadas.

Douglas Montgomery, em 1900, conseguiu culturas do **Coccidióides immitis,** o agente dessa micose.

No meio de Sabouraud glicosado a 2% ou na gelose ordinária glicosada (2%), na temperatura ambiente, as colônias dêsse cogumelo são, inicialmente, membranosas e aderentes à superfície do meio cultural. Logo depois cresce micélio algodonoso, aéreo, abundante, branco, que, mais tarde, adquire matiz pardacento.

Ao microscópio, vêem-se hifas ramificadas, septadas, entrecruzadas, com dilatações em raquetas. Há formação de artrospórios ou elipsóides, em cadeias, por vêzes de 15 a 20 elementos, com 2,5 a 4 micras.

A tese magnífica de Posadas demonstrou que, nos tecidos, há **endoesporulação** e ausência total de **gemulação.**

Até 1946, num lapso de meio-século, foram estudados, na República Argentina, cinco casos de **granuloma coccidióidico** 1.º) caso de Posadas, publicado em 1892; 2.º) doente de Mazza e Parodi (1927); 3.º) observação de Canal Feijó (1934); 4.º) paciente de Mosto e Schema (1935) e, finalmente, o 5.º) caso, brilhantemente documentado por José Manuel Jorge, Flávio L. Niño e Ramon Latienda (1946). Quatro dêsses doentes procediam do Chaco e um outro do Pampa central.

Insausti e Colab observaram ainda doente de Cordoba com estado inicial gripal, seguido de disseminação metastásica (meningite).

P. Negroni, Briz de Negroni e Dáglio mencionaram ùltimamente um caso de coccidioidomicose generalizada em Rio Colorado (Território Nacional do Rio Negro).

Realizada a prova da intra-dermoreação com coccidioidina a 1%, conseguiram êsses notáveis pesquisadores reações positivas fortes em muitos casos: daí propôrem, como medida profilática, a irrigação do solo para reduzir o perigo da endemia micósica.

Paulo Negroni estudou, magistralmente, nas culturas em meios sólidos, micélio vegetativo e micélio de frutificação (ou reprodutor), que nasce de micélio aéreo.

Nas formações vegetais, descreveu clamidospórios terminais e intercalares, bem como micélio em raqueta, apressório, funículo, anastomoses vegetativas e esclerotos rudimentares.

No micélio reprodutor, observou **"proconídio",** que se septa em direção basípeta, e também células férteis: **endospórios** ou **talospórios.**

Os caracteres morfológicos e biológicos de oito estirpes norte-americanas e três outras, isoladas na República Argentina, apresentaram ùnicamente variações mínimas (Negroni).

Tentarei, finalmente, resumir em poucas linhas o diagnóstico micológico da **histoplasmose,** cujo agente se apresenta em células do tipo levedura, de 1 a 5 micras, nos macrófagos e nos grandes monucleares.

Nas culturas, há dimorfismo evidente:

1.º) **Fase de levedura:** a 37°, no agar-sangue, surgem colônias, brancas, úmidas, constituidas por células **ovóides,** germinantes, de 1 a 5 micras. Há também fragmentos de micélio.

2.º) **Fase hifomicetiforme:** no agar-Sabouraud, na temperatura do laboratório, forma-se lentamente micélio algodonoso, aéreo, a princípio branco, depois de côr cinza ou pardacenta. Identifica-se aí emaranhado de hifas alongadas, ramificadas, segmentadas, com esporos piriformes ou arredondados, de 2,5 a 3 micras de diâmetro.

São típicos os **clamidospórios tubercu-**

lados, desenvolvidos na gelose glicosada, na temperatura ambiente.

É possível levar o fungo da fase hifomicetiforme à fase de levedura: bastam sementeiras em meios de culturas a 37°, em tubos fechados com rôlha de cortiça, para evitar o dessecamento.

No Brasil, a histoplasmose foi estudada, pela primeira vez, por Eudoro Villela e Madureira Pará (1914). Encontrou-se ainda na República Argentina e na Venezuela. No Uruguai, há duas observações de José Cancella Freijó, uma de 1944 e outra de 1947, cuja documentação é notável pela perfeição e riqueza de pormenores clínico-laboratoriais.

Passo, a seguir, à parte especial relativa às **inoculações do fungo da doença de Lutz em cobaios machos, em ratos e em camondongos brancos.** (estampas 11, 12, 13, 14, e 24).

De há muito se conhece o poder patogênico do **Paracoccidióides brasiliensis** (ou **Lutziomyces histosporocellularis**) para animais de laboratório: as inoculações experimentais feitas por Adolfo Lutz com êsse cogumelo deram resultado positivo numa cobaia que "depois de seis meses, ofereceu muitas glândulas linfáticas hipertrofiadas contendo o fungo em forma de pseudococcídios" (Brasil médico, 1908, p. 142).

Cabe, na verdade, a João Montenegro, de São Paulo, o melhor testemunho do valor prático da reprodução da blastomicose em cobaios pela injeção intratesticular de suspensão aquosa de cultivos em meio de Sabouraud ou de diluições de triturados de tecidos blastomicósicos.

Cobaios inoculados com material de seis doentes, deram 100% de resultados positivos, em 1 a 2 meses: produção de orquites com numerosos "blastomicetos típicos" (Brasil Médico, 1927).

Em Setembro de 1926, Floriano Paulo de Almeida, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, iniciou seus valiosos trabalhos de blastomicose experimental.

No Boletim Biológico de 1929 (Junho, 30), divulgou que foi possível, pela inoculação testicular de 14 cobaios, com pus conservado a menos de 10 dias na geladeira, determinar dez orquites específicas (positividade de 78,5%).

Mostrou-nos ainda, através da Ciência Médica (1928), a localização cutânea da Blastomicose em uma cobaia inoculada, experimentalmente, no testículo.

No mesmo ano, teve oportunidade de estudar novo caso de localização micósica na pele de cobaio, depois da inoculação testicular dum espécime que sofrera três passagens nesses animais.

Francisco Fialho e Padilha Gonçalves, em excelente trabalho apresentado à II Reunião Anual dos Dermato-sifilógrafos Brasileiros (Belo Horizonte), em 1945, conseguiram acompanhar, principalmente, a marcha das alterações histo-patológicas de testículos de cobaios inoculados com o agente da doença de Lutz: observaram a precocidade da reação reticuloendotelial e também duas fases de lesões: uma exsudativa (com abcessos) e outra produtiva (com granulomas). Além das formas diminutas do fungo, conseguiram presenciar a **gemulação** e a **criptosporulação micósica** nos tecidos.

Não houve **generalização do processo infectante** nesses animais inoculados e depois sacrificados em diferentes períodos.

Em linhas gerais, eis os resultados, das minhas investigações: em cortes de testículos de cobaios inoculados para o isolamento do fungo da blastomicose sul-americana, e corados pela hematoxilinaférrica de Heidenhaim e eritrosina, não foi difícil surpreender fases do ciclo evolutivo do parasito, inteiramente comparáveis às encontradas nas culturas do **Paracoccidióides brasiliensis (ou Lutziomyces histosporocellularis)** em batata glicerinada (5%) e glicosada (2%), numa atmosfera de CO^2 a 10% (estirpe recentemente isolada).

São os seguintes os aspectos mais salientes:

1.°) Células há com tubos germinativos que atravessam a membrana do parasito para dar origem a células filhas externas: é a **criptosporulação;**

2.°) em outros exemplares do fungo reconhece-se a multiplicidade dos núcleos nas células maiores;

3.° identificam-se células gemulantes bi, tri, ou multilobulados: são mais comuns nas formas exsudativas;

4.°) Notam-se células em campânulas, em concha ou caliciformes e, também, outras inteiramente vazias; vêem-se células muito pequenas iguais às identificadas nas culturas (vide fotomicrografias das estampas 12, 13 e 14).

4.°) consegui ver exemplares de fungos com membrana franjada;

6.º) as células parasitárias em ouriço são cortadas pelo micrótomo em diferentes planos: daí a sua aparência parcial, em roda de leme.

Em dois ratos brancos, inoculados por via testicular, e em dois camondongos brancos, injetados intraperitonealmente com a estirpe Rodrigueiro (recentemente **isolada),** verifiquei, em todos êsses animais, a generalização da micose, com formação de nódulos brancos caseificados, principalmente no fígado, baço e pulmões: esfregaços positivos para o fungo da doença de Lutz. Essa generalização não foi verificada nos cobaios inoculados.

Chegando, assim às conclusões dêste estudo, devo acentuar:

1.º) A impregnação das culturas de cogumelos, **tipo levedura,** desde o momento das sementeiras, com soluto aquoso de **Rosa de Bengala** (a 1%), permite estudar com segurança a citologia dos agentes das blastomicoses humanas, nessa fase de seu crescimento cultural.

2.º) Com essa técnica, demonstrei, nas culturas de **Blastomyces dermatítidis,** a 37°, a existência de **clamidospórios** em forma de **coração de carta de jogar,** com paredes muito espêssas.

3.º) Não vi, nessas culturas, criptosporulação nas células de **Blastomyces dermatítidis:**

Há nelas brotamento simples ou único, muito excepcionalmente duplo e nunca múltiplo.

4.º) O agente da micose sul-americana, em saprofitismo na natureza, pode ser veiculado pelas palhas de milho, inquinadas, no solo dos celeiros, dos galpões e dos paióis das fazendas ou estâncias.

5.º) Conseguiu-se o desenvolvimento dêsse fungo, na fase algodonosa, em palhas molhadas com decôto de estigmas de milho, com decôto da própria palha e com diluição do suco de milho verde.

6.º) As palhas mergulhadas nos caldos de baço, de fígado, de ovário, de rins e de testítulo bovinos ou de placenta humana peptonados e glicerinados, permitem o desenvolvimento de culturas cerebriformes, salientes, de matiz amarelado ou pardacento, **sem** aspecto algodonoso (em 2 meses).

7.º) Em palhas impregnadas pelo caldo glicosado (2%) e glicerinado (a 5%) ou pelo meio líquido de Sabouraud glicosado a 2%, o cogumelo produz culturas cerebriformes abundantes, amareladas, que apresentam depois aspecto algodonoso em diversos pontos (em 2 meses).

8.º) Em todos os meios citados, o **Blastomyces dermatítidis** e o **Coccidióides immitis** crescem mais ràpidamente do que o fungo da doença de Lutz, com aspectos macro e microscópicos inteiramente inconfundíveis.

9.º) Nos cortes de testículos de cobaios, inoculados para o isolamento do fungo da blastomicose sul-americana, e corados pela hematoxilina férrica de Heidenhaim e eritrosina, observam-se perfurações das células em **ouriço** pelos tubos germinativos, para dar origem a criptosporulação.

Há células gemulantes bi, tri ou multilobuladas, predominantemente nas formas exsudativas.

10) Nunca notei, nesses cobaios inoculados por via testicular, a **generalização do processo infectante,** como conseguiu ver nos ratos brancos inoculados por via testicular e nos camondongos brancos injectados intra-peritonealmente com a estirpe "Rodrigueiro", recentemente isolada (estampas 11 e 24).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, Floriano Paulo, 1928 — Sôbre a localização cutânea da "Blastomycose em uma cobaia inoculada experimentalmente no testículo, Separata.

Almeida, Floriano P., 1928 — Lesões cutâneas da Blastomicose em cobaios experimentalmente infectados, Annaes da Faculdade de Medicina de São Paulo, 3.º vol. Separata.

Almeida, Floriano P., 1929 — **Boletim Biológico,** Número publicado em homenagem à Academia Nacional de Medicina do Rio de Janeiro por ocasião do 1.º Centenário da sua fundação, 30 de Junho, Fasc. 15, pág. 20-22.

Almeida Floriano P., 139 — Mycologia Médica.

Almeida, Floriano de, **Lacaz,** Carlos da Silva e **Cardoso da Cunha,** Aderbal, 1946 — Dados estatísticos sôbre a granulomatose paracoccidióidica (Blastomicose sul-americana ou Paracoccidioidose), Revista Brasileira de Medicina, Fev. pág. 91-94.

Arêa Leão, A. E., **Cury,** Amadeu, **Mello,** Milton T. e **Goto,** Masáo, 1946 — Blastomicose queloidiana ou Doença de Jorge Lôbo. Novas formas do parasito em cultura (Nota prévia), — O "Hospital", Vol. 30, n.º 6, dezembro, págs. 929-935.

Arêa Leão, A. C., **Goto**, Masáo e **Cury**, Amadeu, 148 — Infecção experimental de animais pela **Glenosporella loboi** "Foncesa & Leão, 1940, O "Hospital", Vol. 33, n.º 2, fev., págs. 273-278.

Bogliolo, L., 146 — Granuloma apical (dentário) por "**Paracoccidióides brasiliensis**" (Splendore) Almeida 1929, Brasil-médico, págs. 341-342,

Cancella Freijó, José, 147 — Histoplasmosis de Darling. Segundo caso observado en el Uruguay, Hoja Tsiológica, tomo VII, Setiembro, págs. 205-211.

Connant, Norman F., **Martin(Smith, Baker, Callaway**, 1944 — Manual of Clinical Mycology.

Le Lamater, Edward, 1948 — The Nuclear Cytology of **Blastomyces dermatitidis**, Mycologia, Vol. XL, págs. 430-444.

Dodge, Carroll William, 1935 — Medical Mycology.

De Monbreun, W. A., 1933 — The cultivation and cultural characteristics of Darling's.

Histoplasma capsulatum — American Society of Tropical Medicine at Richmond, Va.

Fialho, Francisco e **Padilha**, Gonçalves, 146 — Contribuição ao estudo da blastomicose brasileira. Estudo experimental desta micose no cobaio. Separata — "O Hospital", Setembro.

Fonseca Filho, Olímpio da, 1939 — Sôbre o agente etiológico da granulomatose blastomicóide neotropical. Anais brasileiros de Dermatologia e Sifilografia, vol. 14, págs. 85-111.

Fonseca Filho, Olímpio da, 1943 — Parasitologia Médica, Parasitos e doenças parasitárias do homem.

Jorge, José Manuel, **Niño**, Flavio L., **Latienda** Ramón, 1946 — Granuloma coccidióidico (5.ª observación en la Argentina, La Prensa Médica Argentina, págs. 630-634.

Lacaz, Carlos da Silva, 1945 — Contribución brasileña para el estudio de la" Blastomicosis sud-americanas". Granulomatosis paracoccidióidica. Conferência pronunciada en el Instituto de Higiene de Montevidéo, el 24 Abril,Archivos Uruguayos de Medicina, Cirurgia e Especialidades, Tomo XXVII, n.º 2, págs. 167-181.

Lacaz, Carlos da Silva, e Oliveira, Edison, 1948 — Blastomicose da região ano-retal. Considerações sôbre dois casos, O Hospital, Vol. 33, n.º 6, págs. 845-854.

Lacaz, C. S. 1948 — Blastomicose sul-americana, Anais do Instituto Pinheiros, Vol. XI, n.º 22, págs. 23-53.

Lôbo, Jorge, 1933 — Contribuição ao escudo das blastomycosse, Tese, 96 págs. Recife.

Lutz, Adolfo, 1908 — Uma mycise pseudococcidica localizada na bôca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Brasil-médico, pág. 142.

Madeira, Alcântara J, **Lacaz**, Carlos da Silva, e **Forattini**, Oswaldo Paulo, 1947 — Considerações sôbre um caso de Blastomicose (granuloma para coccidióidico). "O Hospital" vol. 31, n.º 6, págs. 845-854.

Montenegro, João, 1927 — Acêrca da inoculabilidade da Blastomycose no Brasil, Brasil-médico, págs. 808-812.

Negroni, Pablo, 1948 — Estudios sobre el **Coccidióides immitis** Rixford y Gilchrist I. Micélio vegetativo y fructificatión, Revista Argentina de Dermatosifilologia, t. 32, n.º 1-2, Enero a Junio, págs. 50-57.

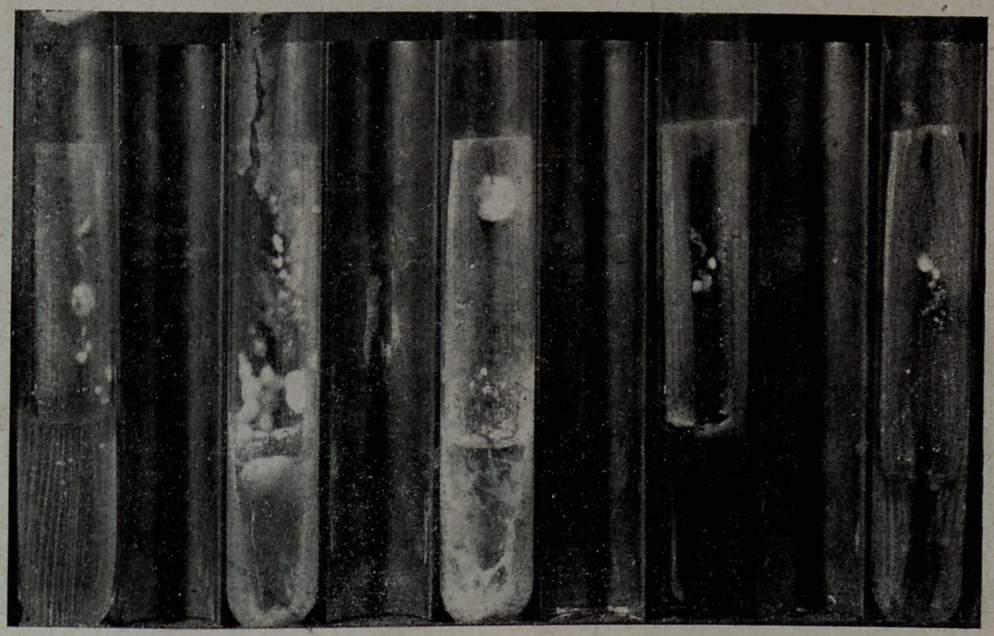
Negrono, Pablo, 1948 — Estudios sobre el **Coccidióides immitis** de las cepas autoctonas y revisión del granuloma coccidióidico en la Argentina, Revista Argnetina de Dermatosofilologia, t. 32, n.º 1-2, Enero a Junio, págs. 58-65.

Negroni, Pablo, 1948 — Estudios sobre el **Coccidióides immitis**. III. Estudio micológico comparativo de las sepas argentinas y norteamericanas, Revista Argentina de Dermatosifilologia, t. 32, n.º 3-4, — Julio a Diciembre, págs. 219-231.

Est. 1

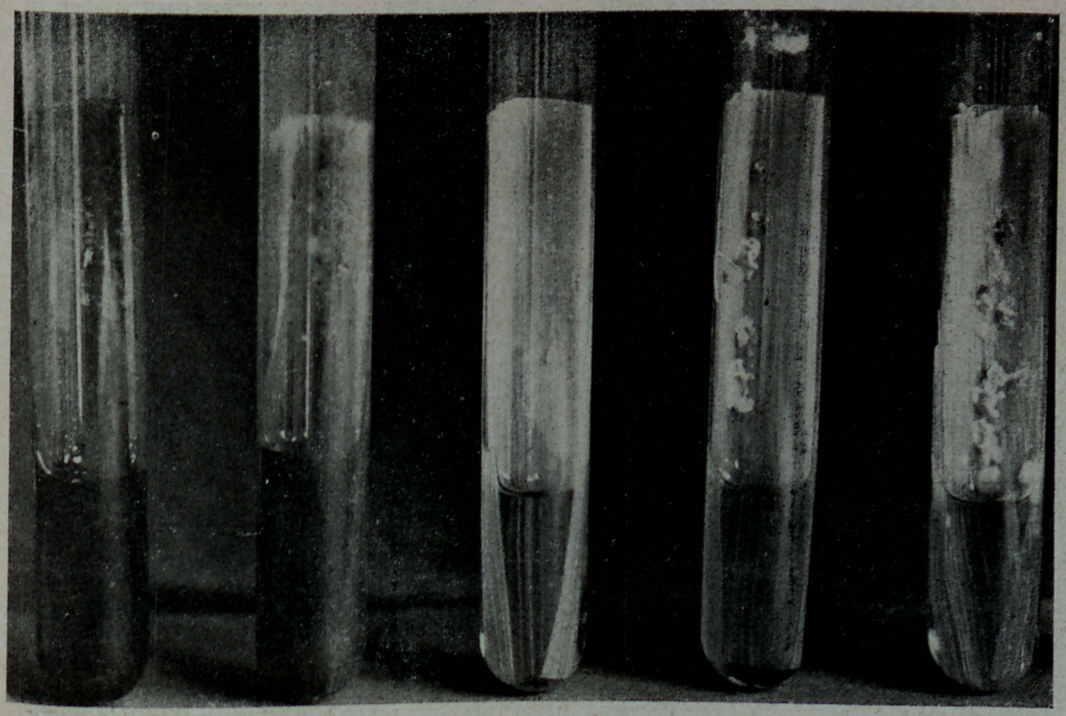
CULTURAS DO AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA
(fungo de Lutz-Almeida)

1 2 3 4 5



1 — Decôto de palha (2 meses)
2 — 3 — Suco de milho
4 — Decôto de estigmas de milho
5 — Cangica

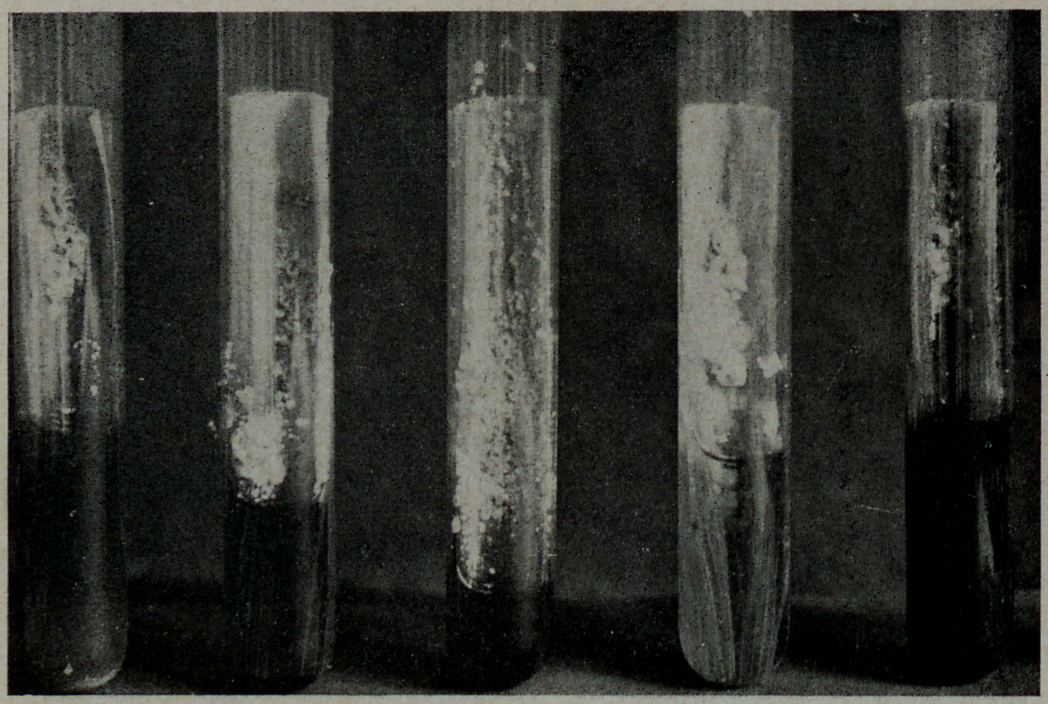
6 7 8 9 10



6 — Sangue humano + H^2O destilada
7 — Decôoto de estigmas de milho
8-9-10 — Meio de Sabouraud glicosado (2%)

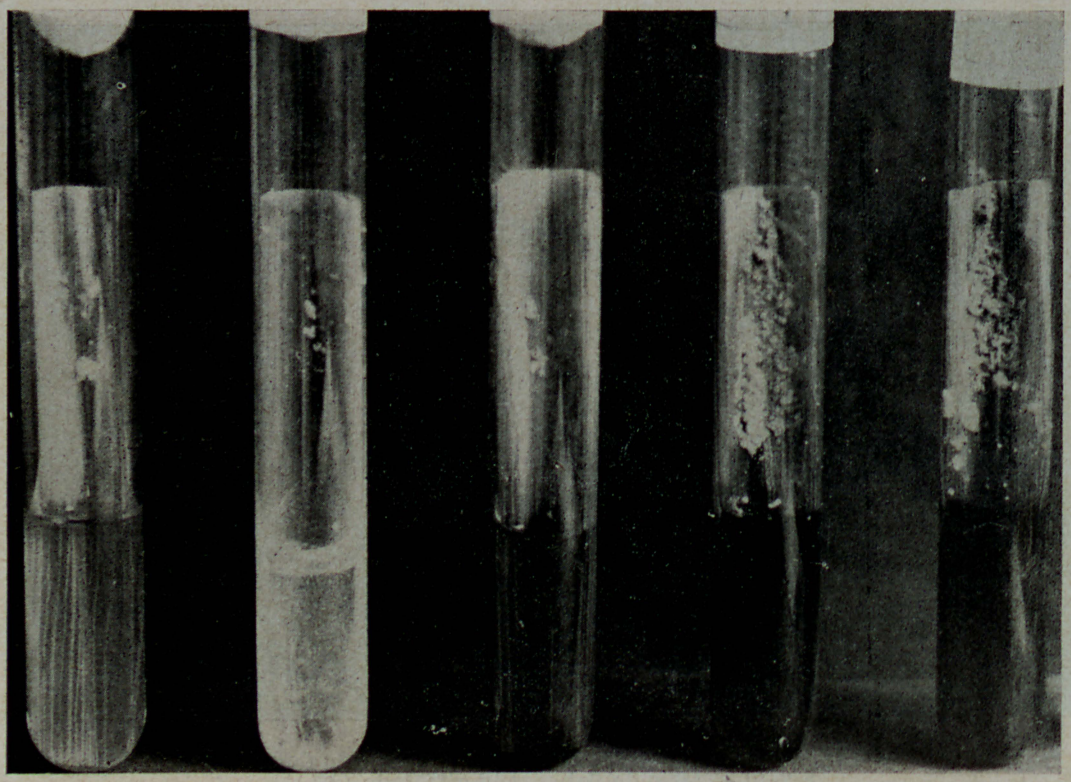
CULTURAS DO AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA.

11 12 13 14 15



11 — Caldo de rim peptonado e glicerinado
12-13 — Caldo glicosado e glicerinado
14 — Meio de Sabouraud glicosado (2%)
15 — Caldo de ovário peptonado e glicerinado

16 17 18 19 20



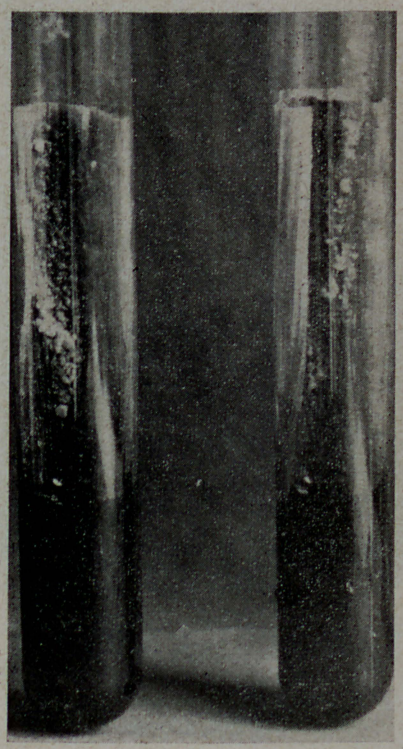
16 Decôto de palha de milho
17 — Suco de milho verde (diluído)
18 — Decôto de estigmas de milho
19 — Caldo de placenta humana peptonado e glicerinado
20 — Caldo de testículo peptonado e glicerinado

Est. 3

I) CULTURAS DA AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA (21,22).

II) CULTURAS DE AGENTES DAS BLASTOMICOSES HUMANAS (24 A e 24 B).

21 22



21 — Caldo de fígado peptonado e glicerinado
22 — Caldo de baço peptonado e glicerinado

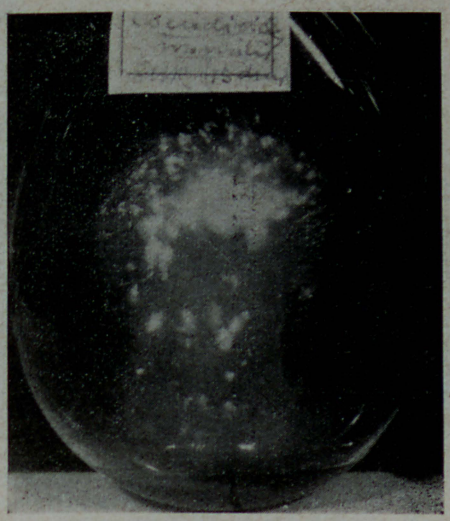
23

23 — Palha de milho inquinada

24 — (A)

Paracoccidióides brasiliensis
Gelose simples

24 — (B)



Coccidióides immitis

Est. 4

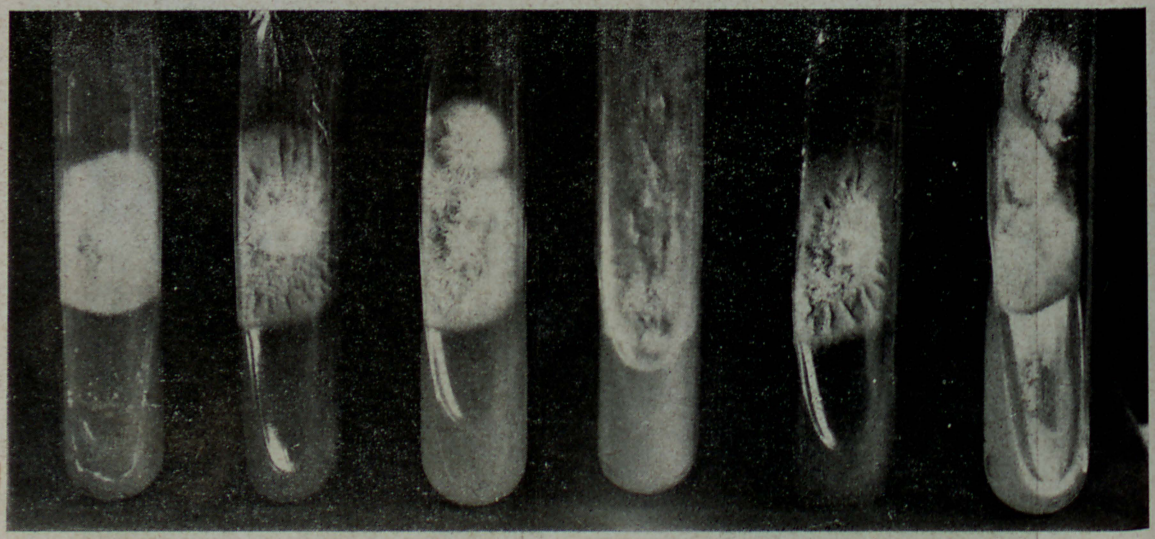
COCCIDIÓIDES IMMITIS

a b c d e

a) Cultura em gelose — pulmão
b) " " gelose — coração
c) " " gelose — tryptose
d) Cultura em gelose — ovário
e) " " gelose — cérebro

BLASTOMYCOSES DERMATÍTIDIS

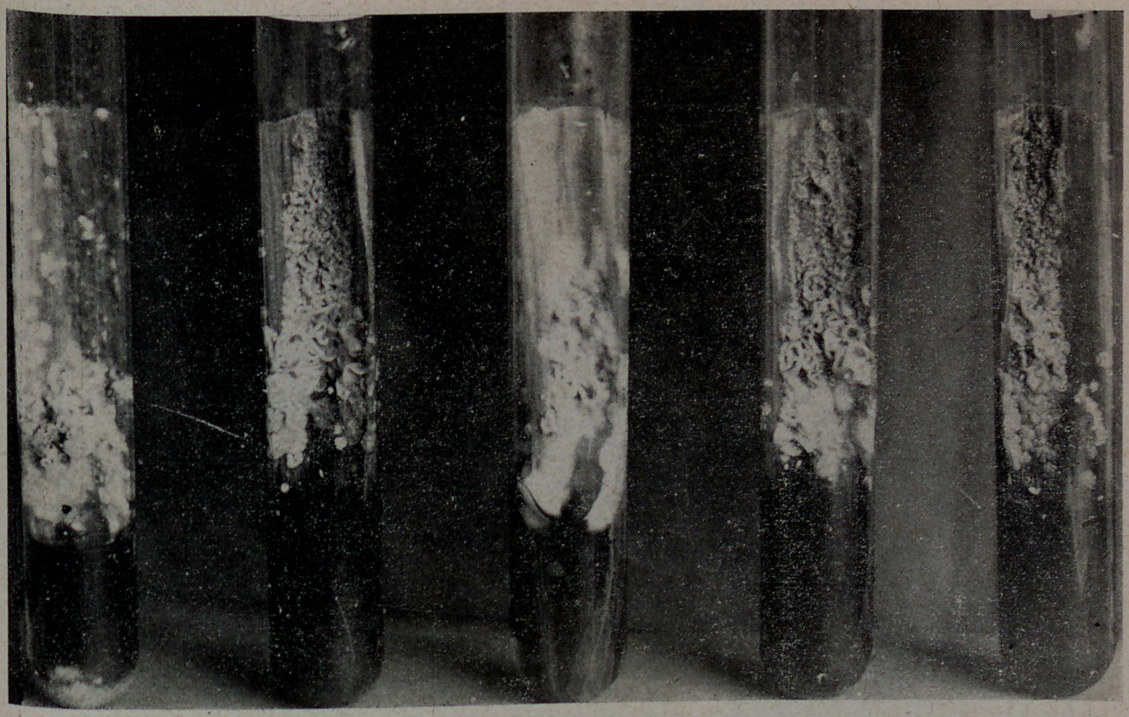
f g h i j k



f) Cultura em gelose — cérebro
g) " " gelose — ovário
h) " " gelose — coração
i) Cultura em gelose — tryptopse
j) " " gelose — testículo
k) " " gelose — pulmão

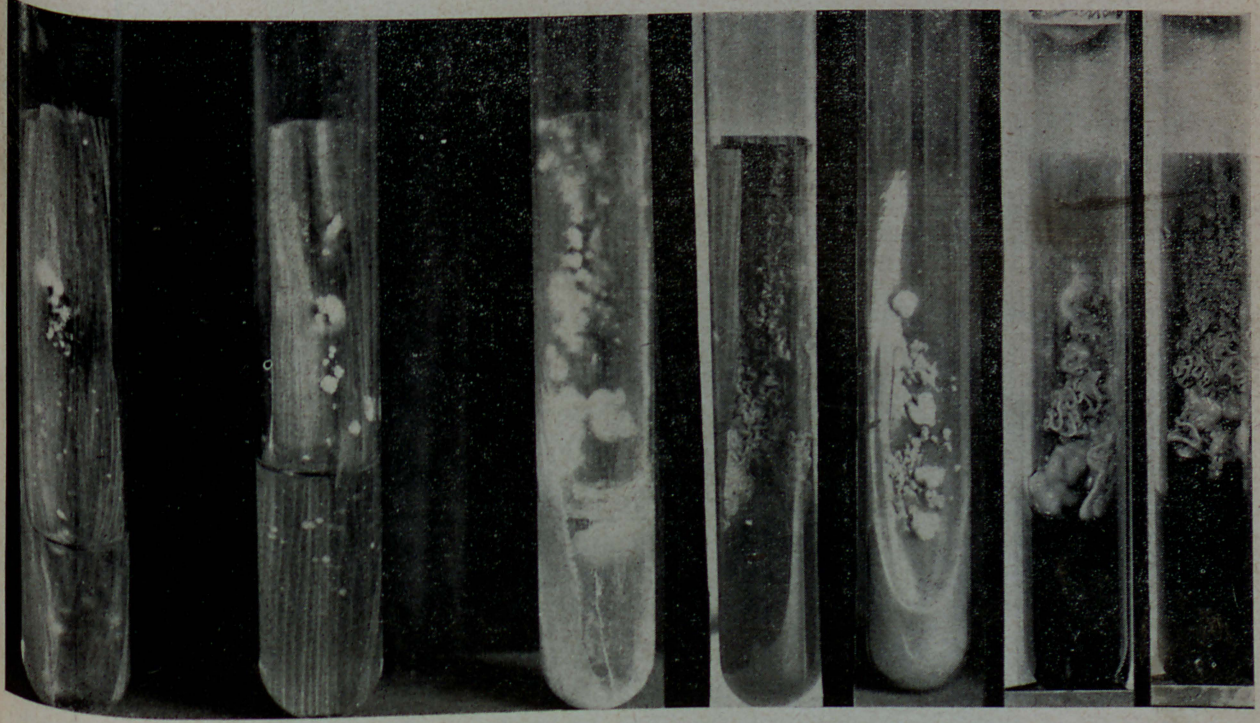
CULTURAS DO AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA.

25 26 27 28 29



25 — Caldo glicosado e glicerinado (2 meses)
26 — Caldo de testículo peptonado e glicerinado (2 meses)
27 — Meio de Cabouraud glicosado (2%) — 2 meses.
28 — Caldo de placenta humana peptonado e glicerinado (2 meses)
29 — Caldo de fígado peptonado e glicerinado (2 meses)

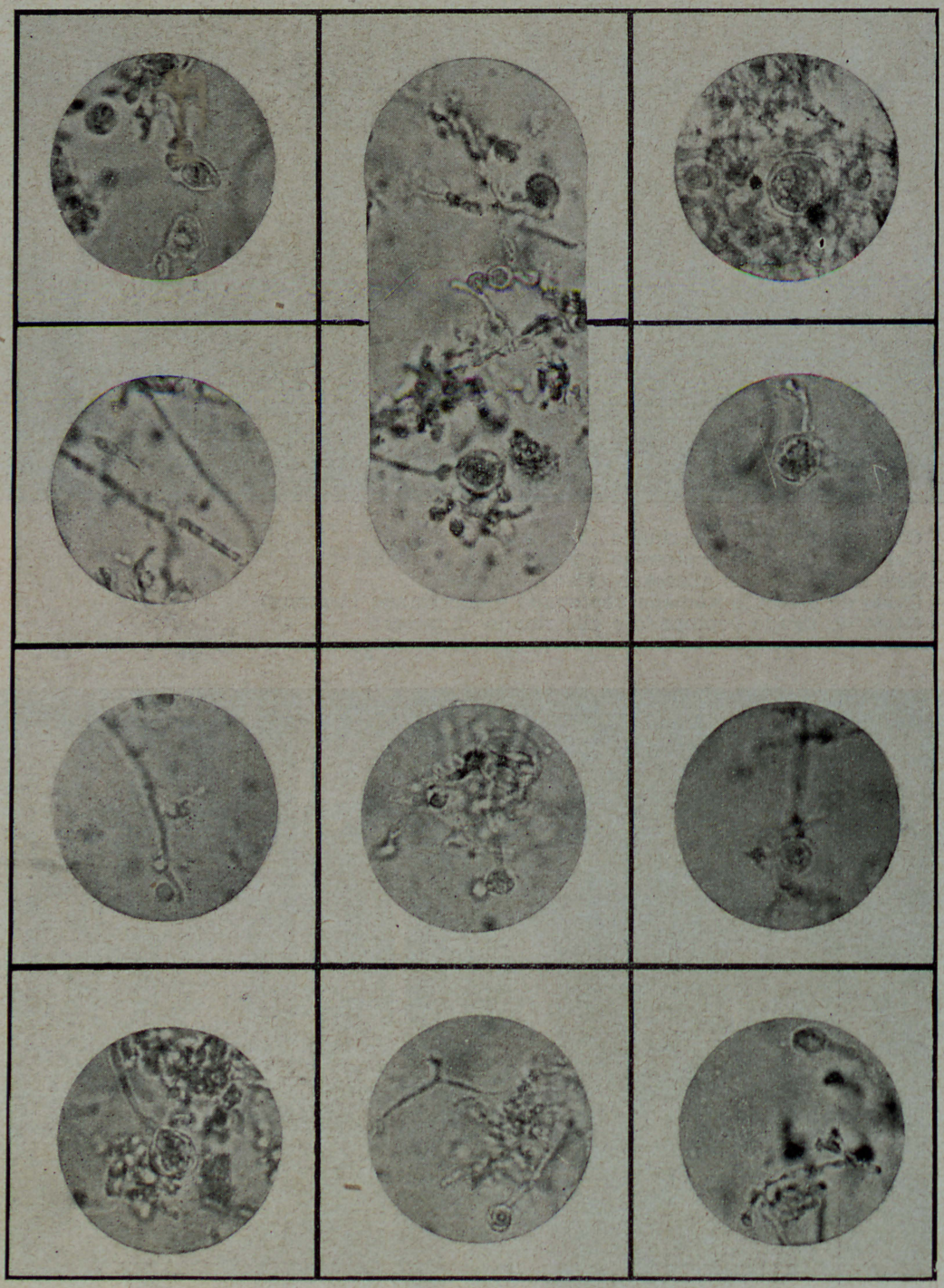
30 31 32 33 34 35 36



30 — Decôto de cangica
31 — Decôto de palha
32 — **Suco de milho (diluído)**
33 — Caldo de baço peptonado e glicerinado
34 — gelose-triptose.
35 — Meio de Sabouraud glicosado (2%) — 2 meses
36 — Caldo de placenta humana peptonado e glicerinado (2 meses)

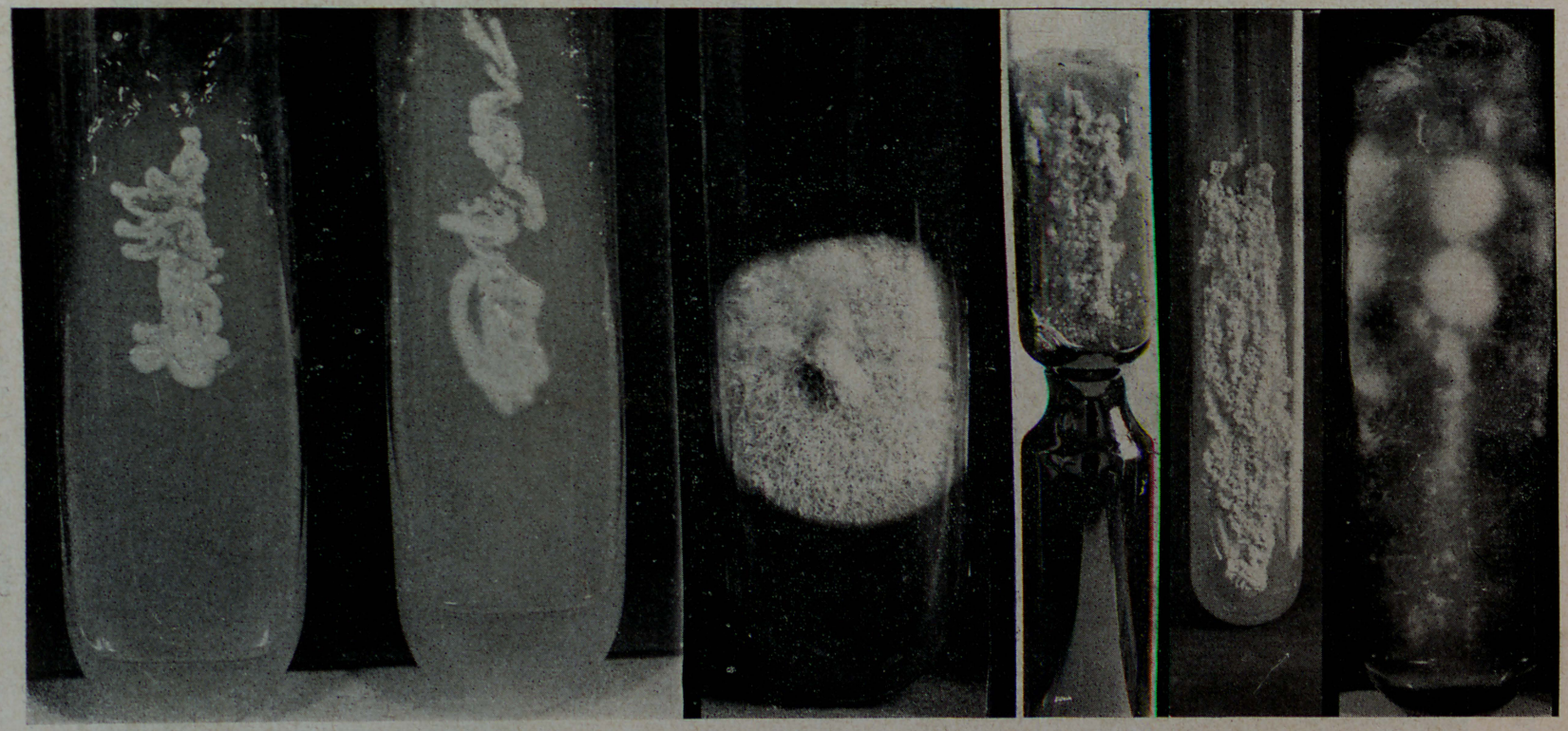
Est. 6

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOSPOROCELLULARIS



Cultura obtida em Palha + Suco de milho verde (diluído).
Preparados corados pela eritrosina (soluto a 1%). Objetiva de imersão Leitz 2mm. ocular 8x.

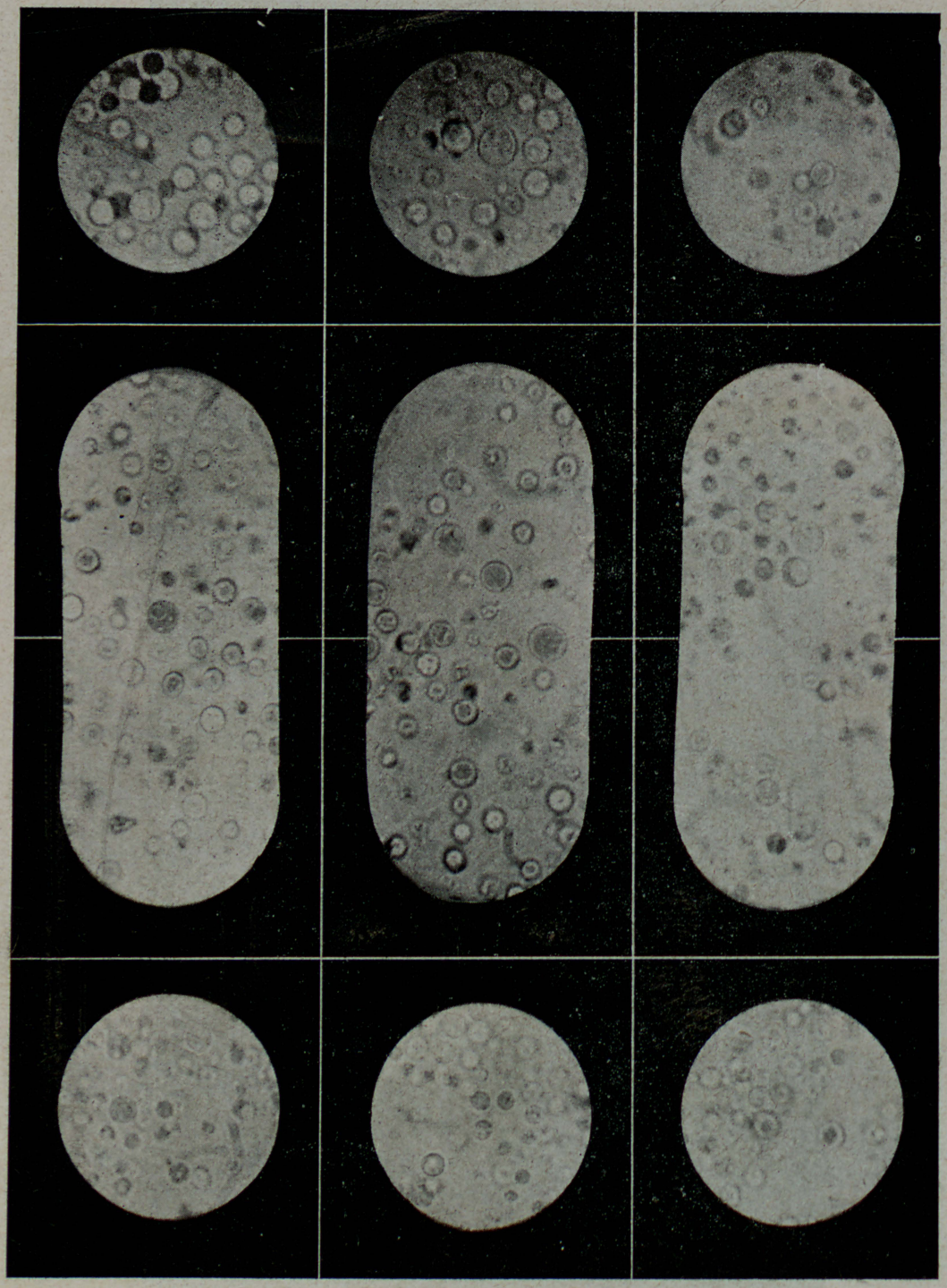
Est. 7



A e B — **Cryptococcus neoformans** (Sab. glic. 2%).
C — **Blastomyces dermatitidis** (gelose simples).
D — **Paracoccidióides brasiliensis** ou **Lutziomydes histosporocellularis,** (batata glicerinada).
E — **Blastomyces dermatitidis** (Sab. glic. 2%).
F — **Coccidioóides immitis** (Sab. glic. 2%).

Est. 8

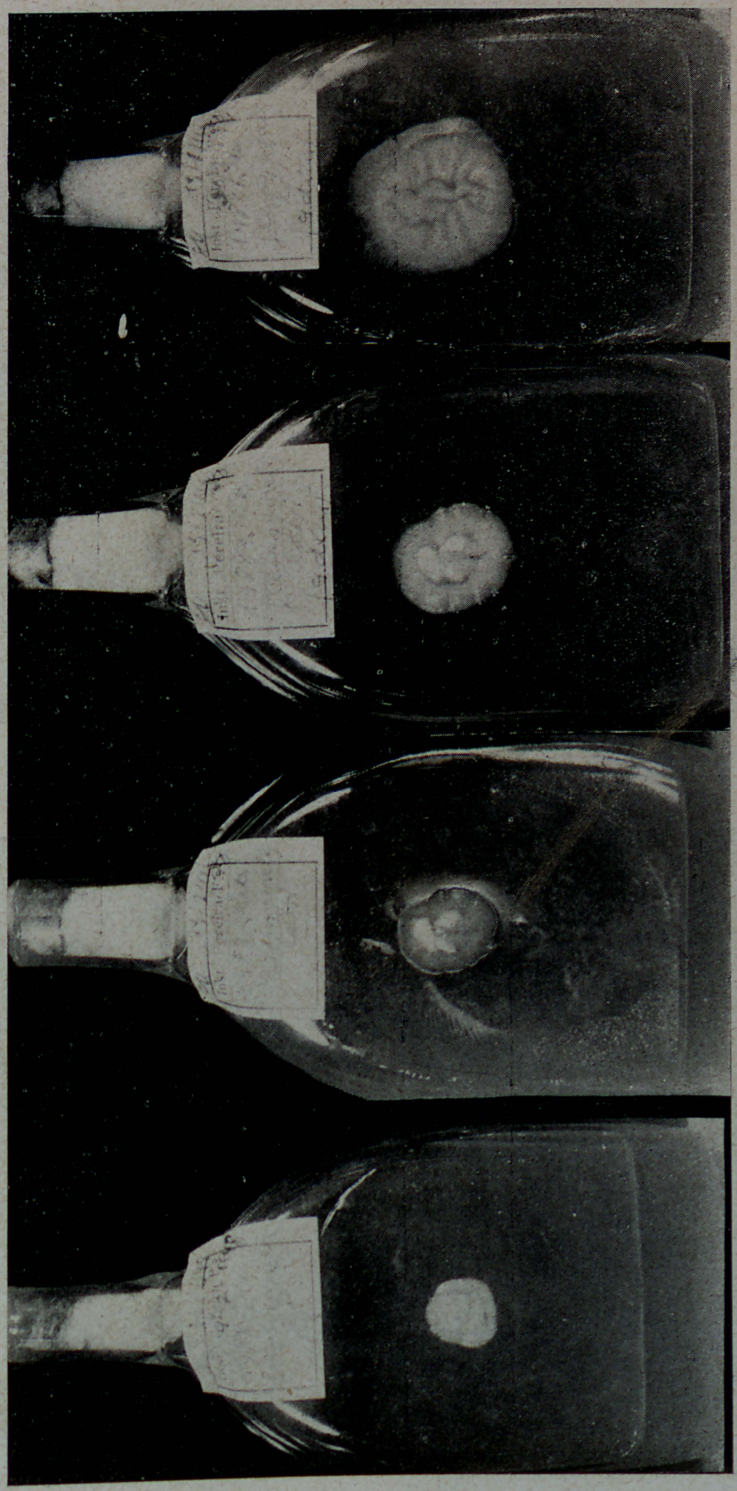
CRYPTOCOCCUS TUMEFACIENS (TORULA HISTOLYTICA)



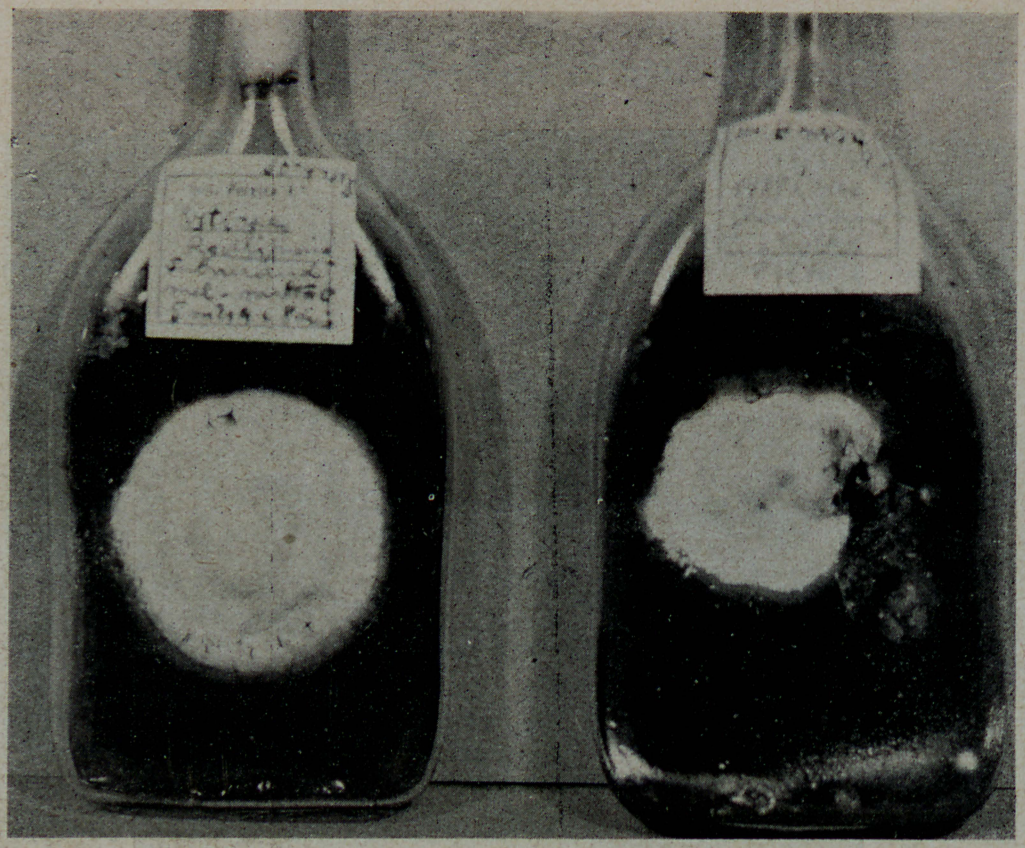
Cultura em
gelose simples temperatura ambiente.
(Coloração pelo soluto aquoso de **Rosa de Bengala**, a 1%)
objet. im. 2mm (Leitz) e ocular 8x.

Est. 9

CULTURAS DE GLENOSPORELLA LOBOI

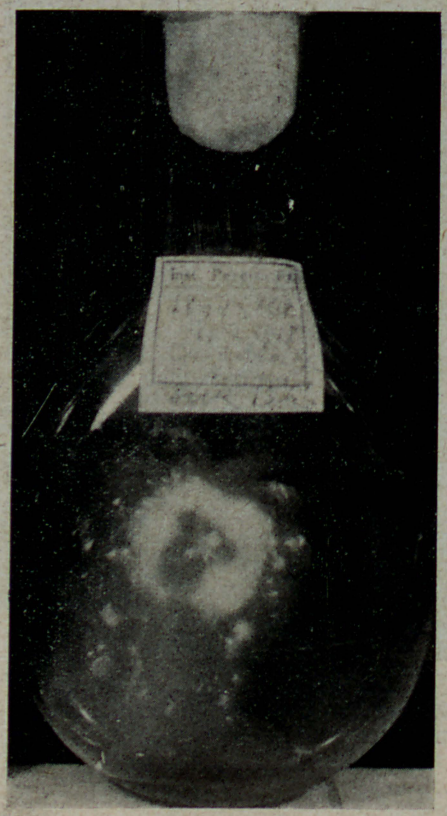


Meio de Sabouraud — mel



Paracoccidióides brasiliensis ou Lutziomyces histosporocellularis

Glenosporela loboi

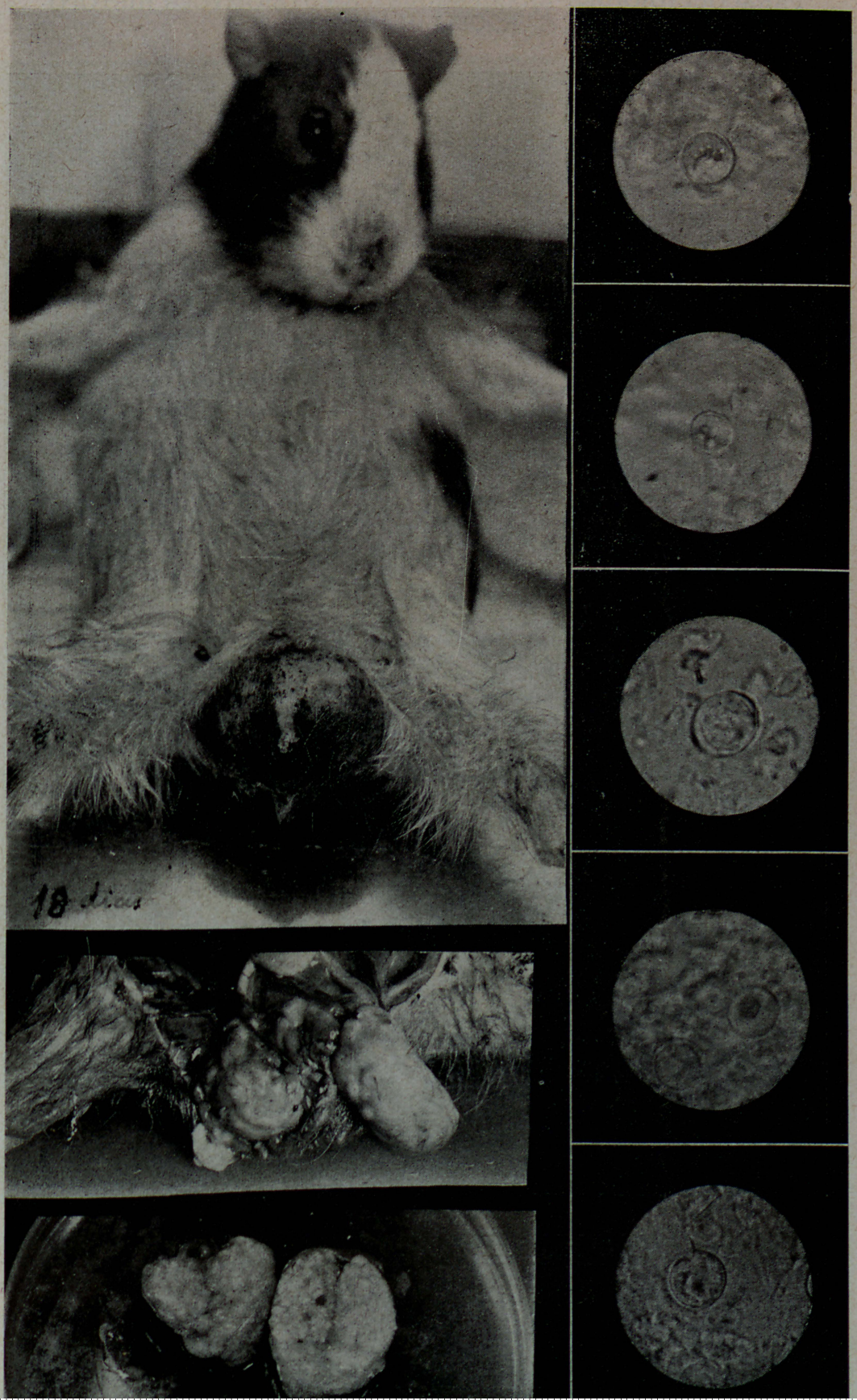


Coccidióides immitis

Coccidióides immitis

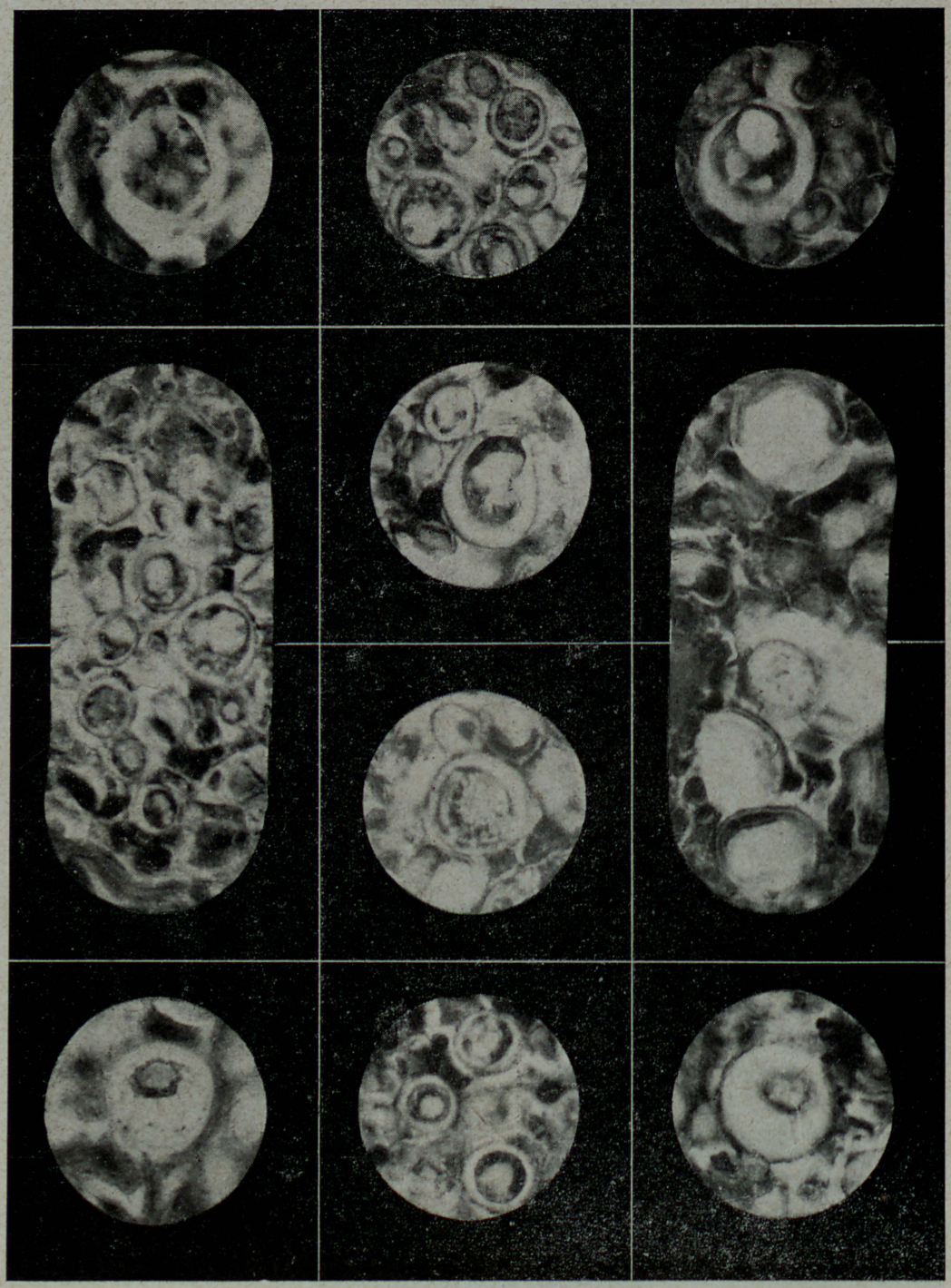
Est. 11

INOCULAÇÃO DO AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA EM COBAIO



Est. 12

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOPOROCELLULARIS

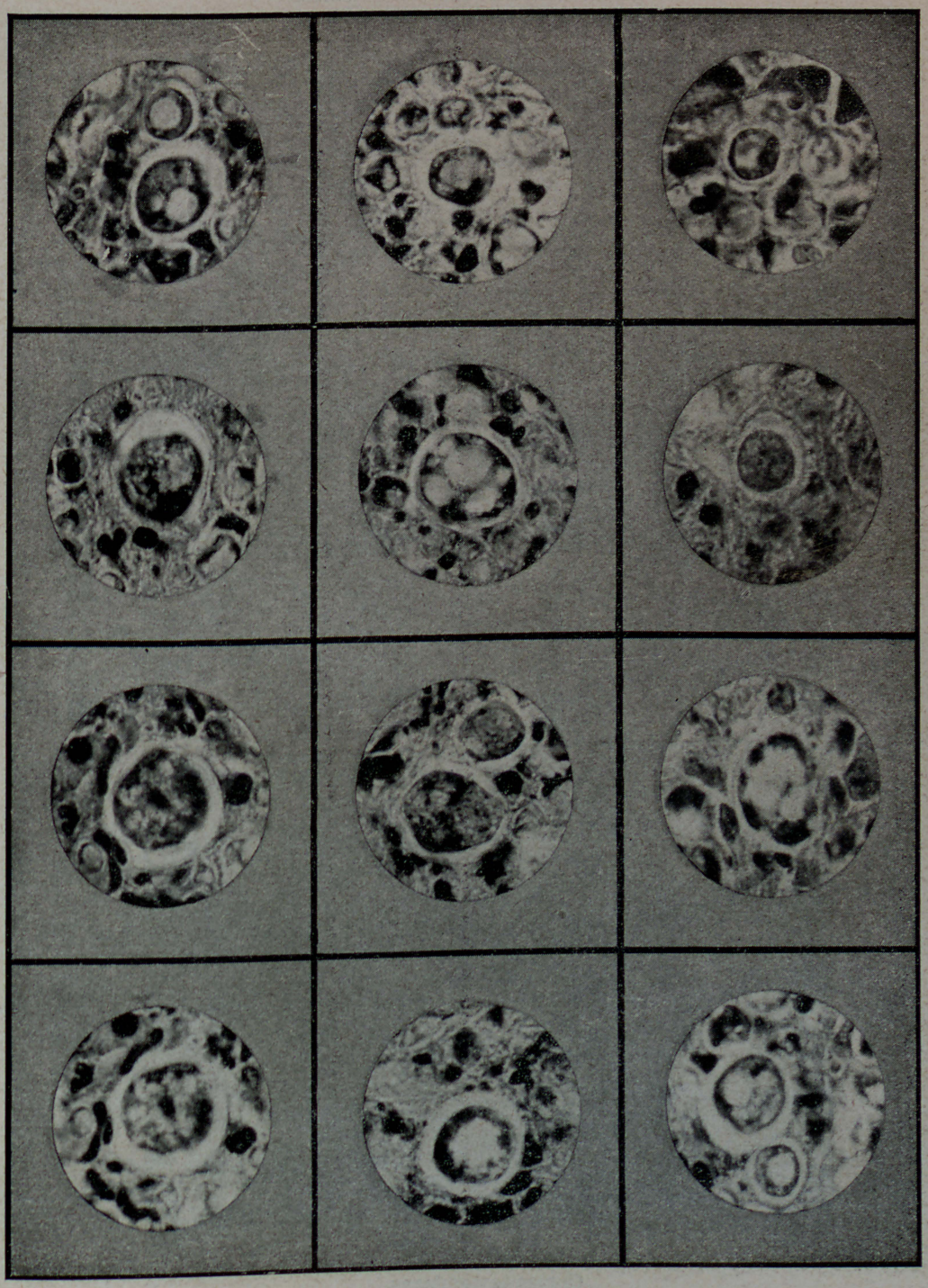


Cortes testiculares
corados pela hematoxilina férrica de Heidenhaim.

(Objet. im. 2 mm. Leitz e ocular 8x

Est. 13

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOPOROCELLULARIS



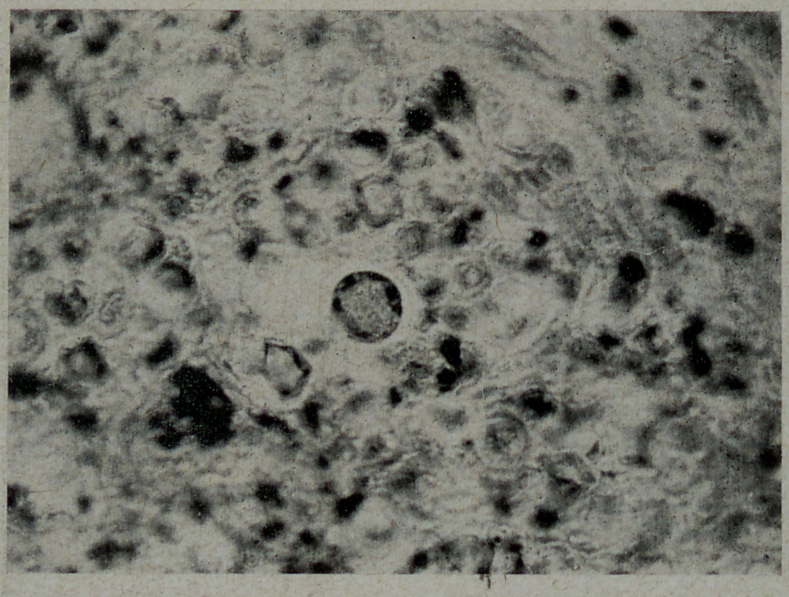
Cortes testiculares
corados pela hematoxilina férrica de Heidenhaim.

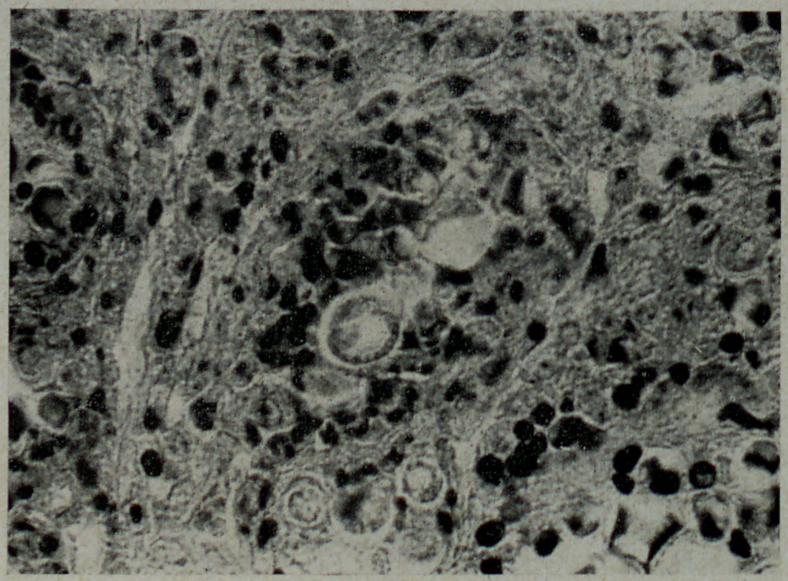
(Objet. im. 2 mm. Leitz e ocular 8x

Est. 14

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOPOROCELLULARIS

ASPECTOS HISTOPARASITÁRIOS





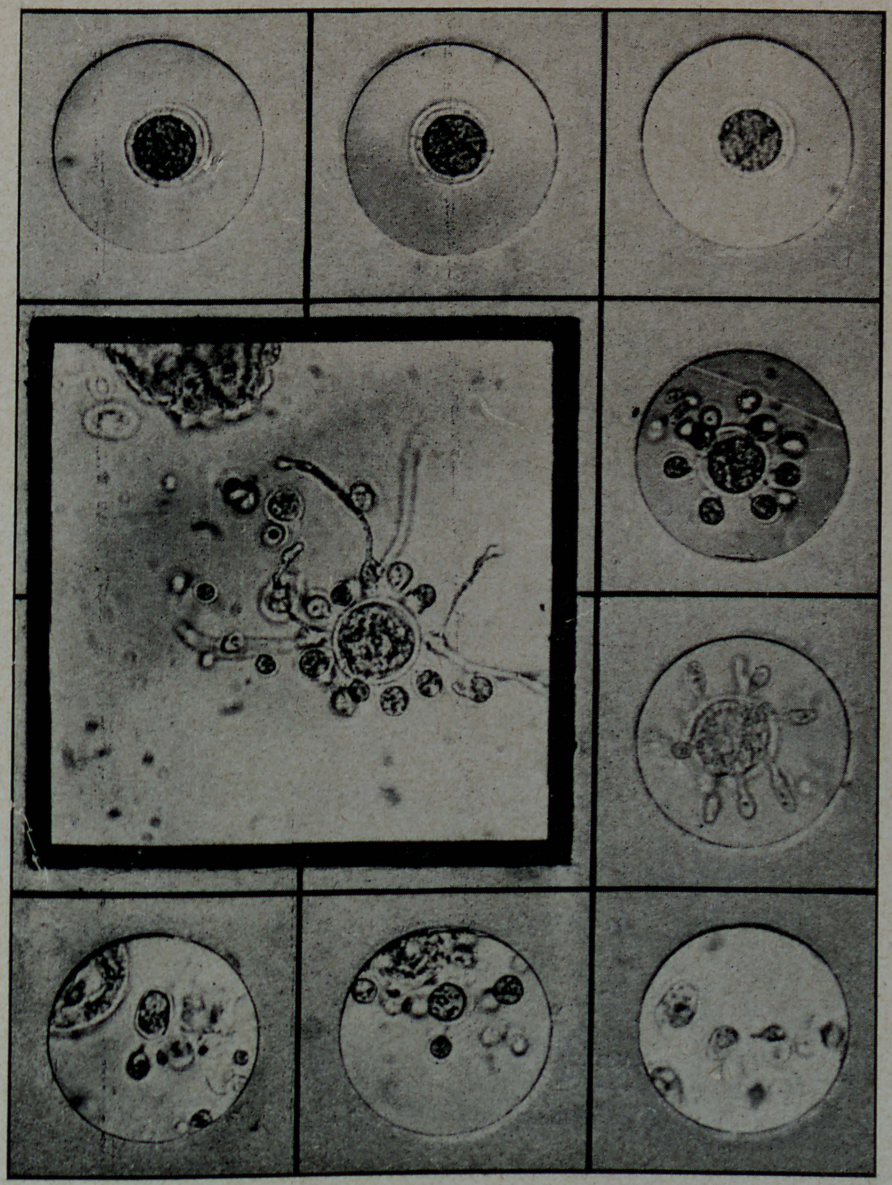
Cortes testiculares,

corados pela hematoxilina férrica de Heidenhaim. Tubos germinativos e criptospórios

(Objet. im. 2 mm. Leitz e ocular 8x

Est. 15

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOPOROCELLULARIS

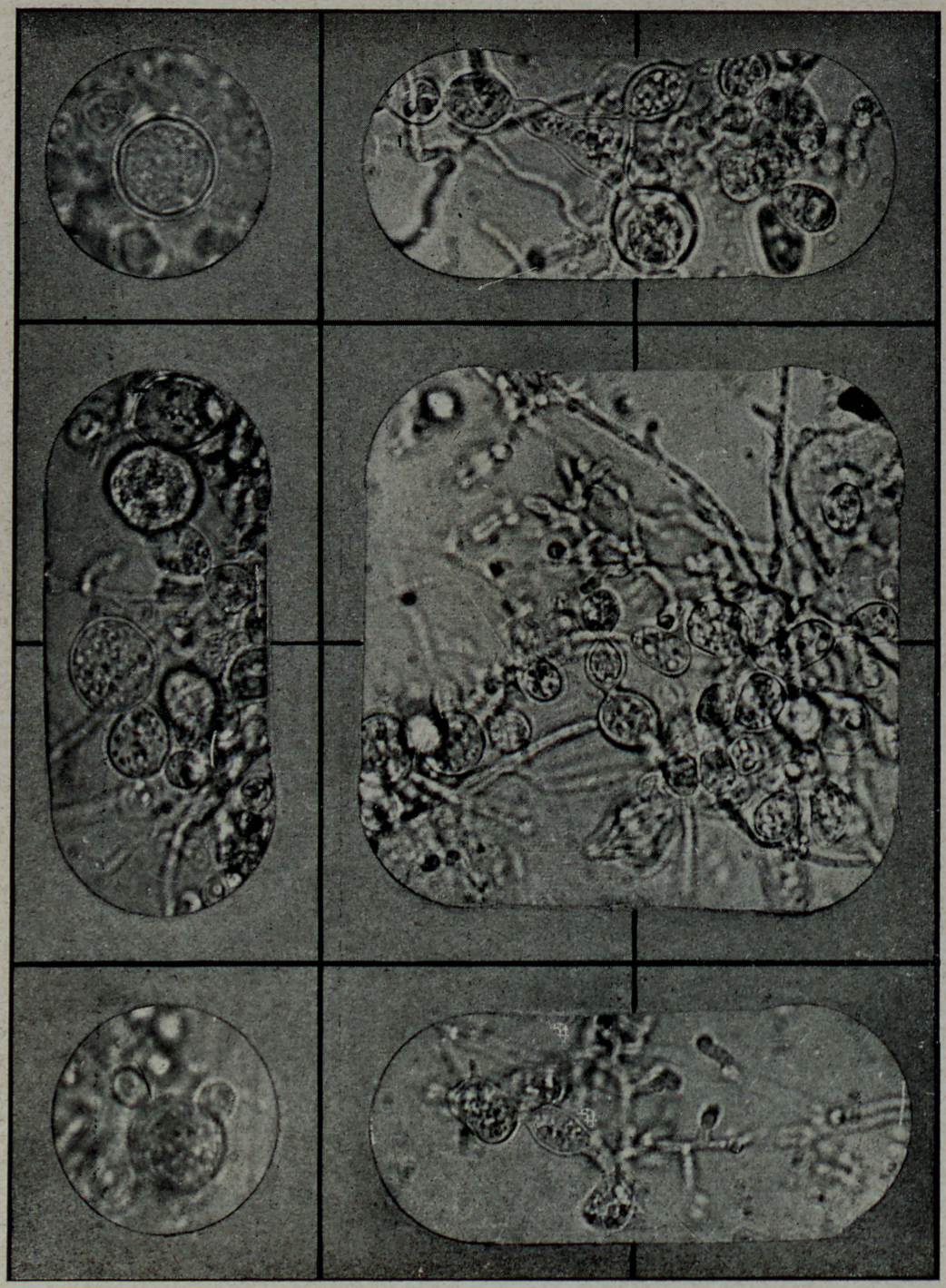


Preparados de culturas recentes em batata glicerinada e glicosada, a 10% de CC^2 e a 37°. Coloração pela eritrosina — soluto aquoso a 1%

Objetiva de imersão de Leitz (2 mm) e ocular 8x.

Est. 16

PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS OU LUTZIOMYCES HISTOPOROCELLULARIS



Preparados de culturas velhas em batata glicerinada e glicosada, a 10% de CO^2 e a 37° (coloração pela eritrosina — soluto aquoso a 1%).

Objetiva de imersão Leitz (2 mm) e ocular 8x.

Est. 17

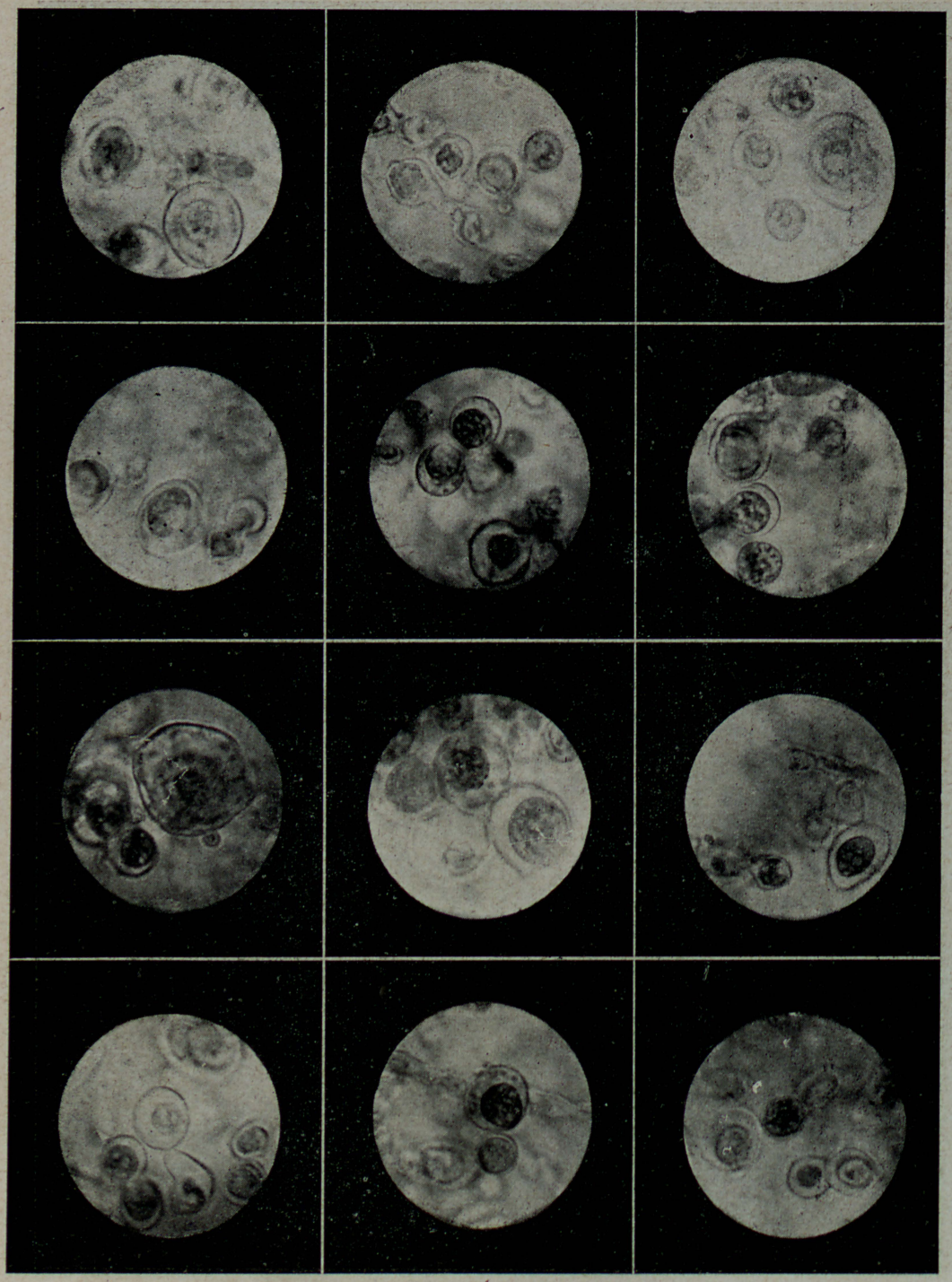
BLASTOMYCES DERMATÍTIDIS

Meio de Sabouraud glicosado a 2%
cultura a 37°, corada pela **Rosa de Bengala** (soluto aquoso a 1%)

(Obj. im. 2 mm Leitz, ocular 8x).

Est. 18

BLASTOMYCES DERMATÍTIDIS

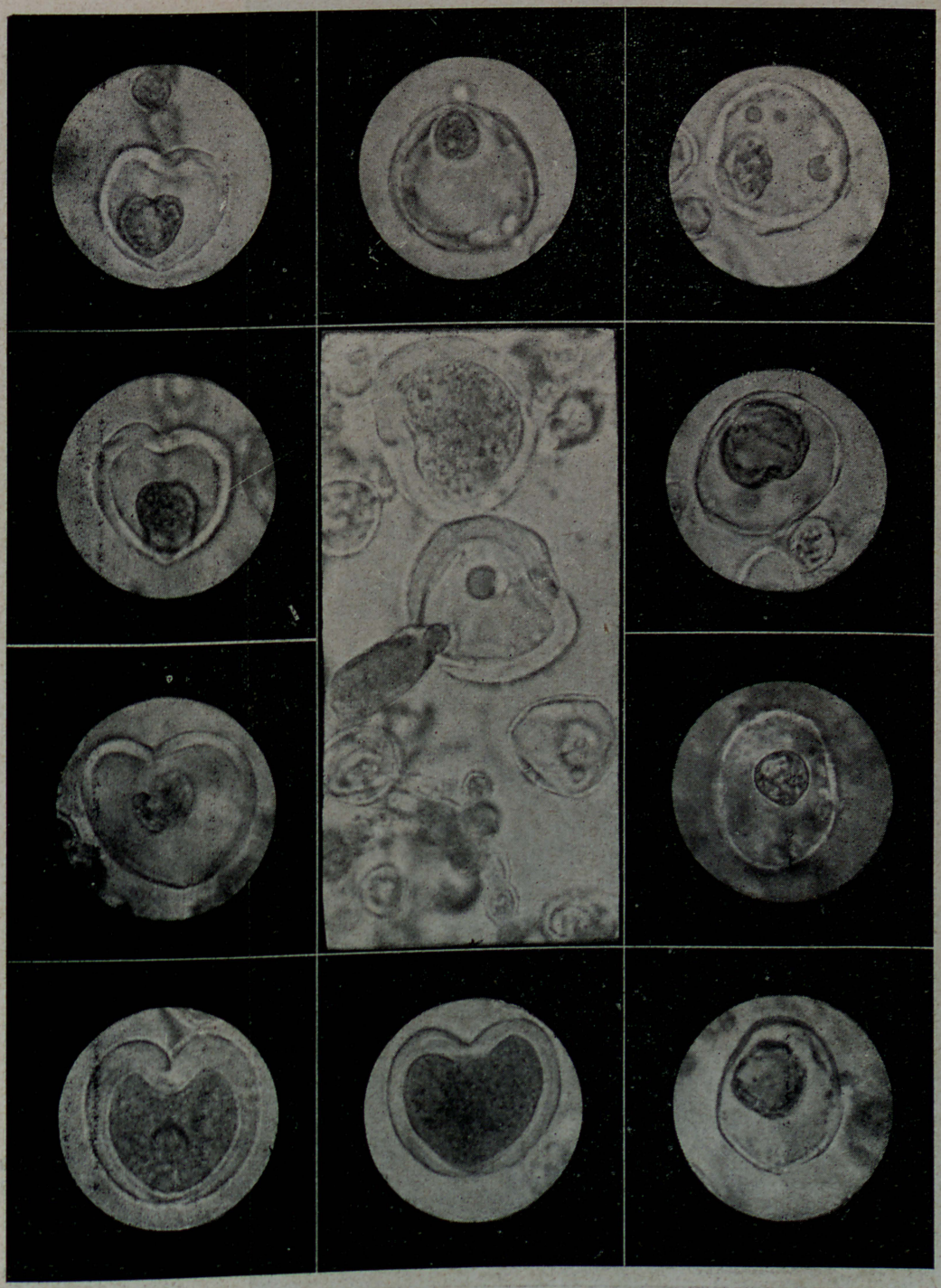


Meio de Sabouraud glicosado a 2%
cultura a 37°, corada pelo soluto de **Rosa de Bengala** (1%)

(Obj. im. 2 mm Leitz e ocular 8x)

Est. 19

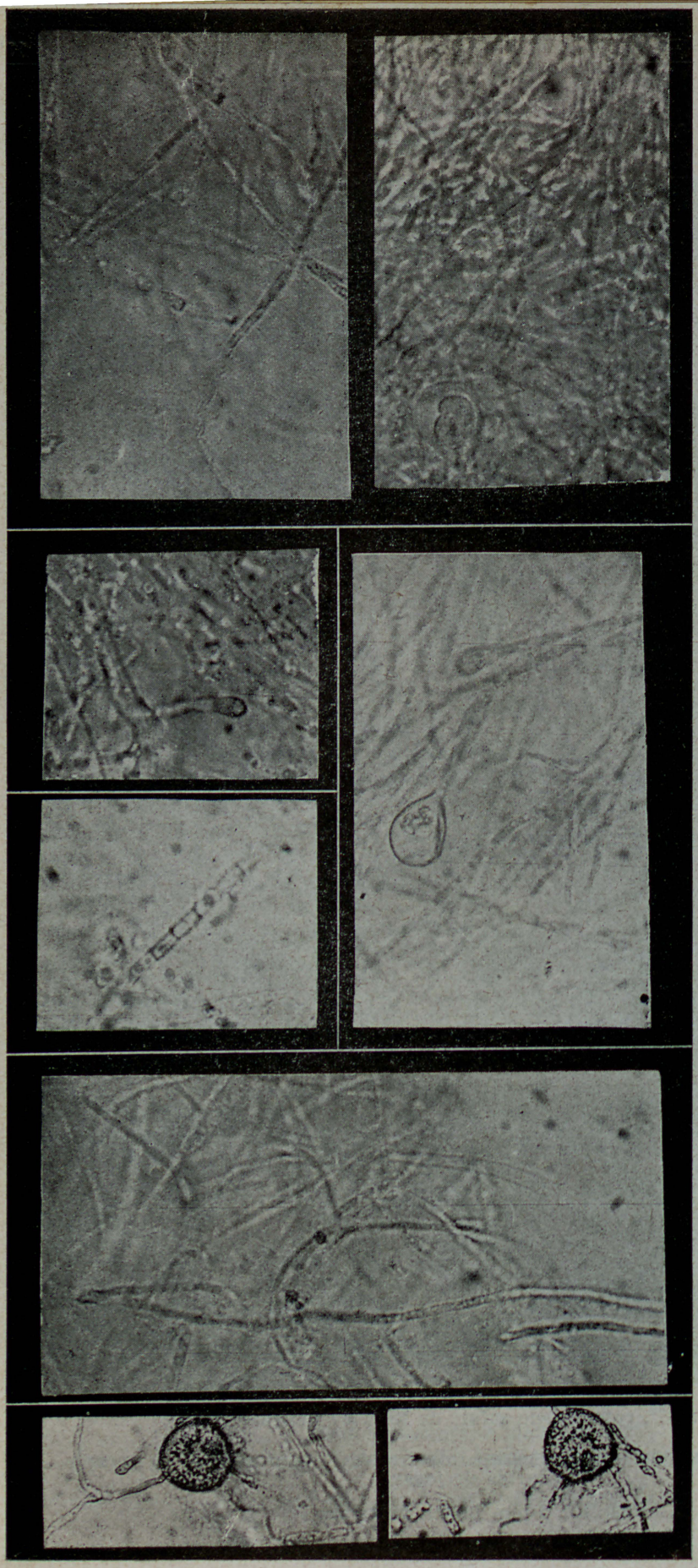
BLASTOMYCES DERMATÍTIDIS



Meio de Sabouraud glicosado a 2%
Cultura a 37°, corada pelo soluto de **Rosa de Bengala** (1%)

Clamidospórios, de paredes muito espêssas, alguns com a conformação de coração de cartas de jogar

(Obj. im. 2 mm Leitz, ocular 8x).



Est. 20

COCCIDIÓIDES IMMITIS

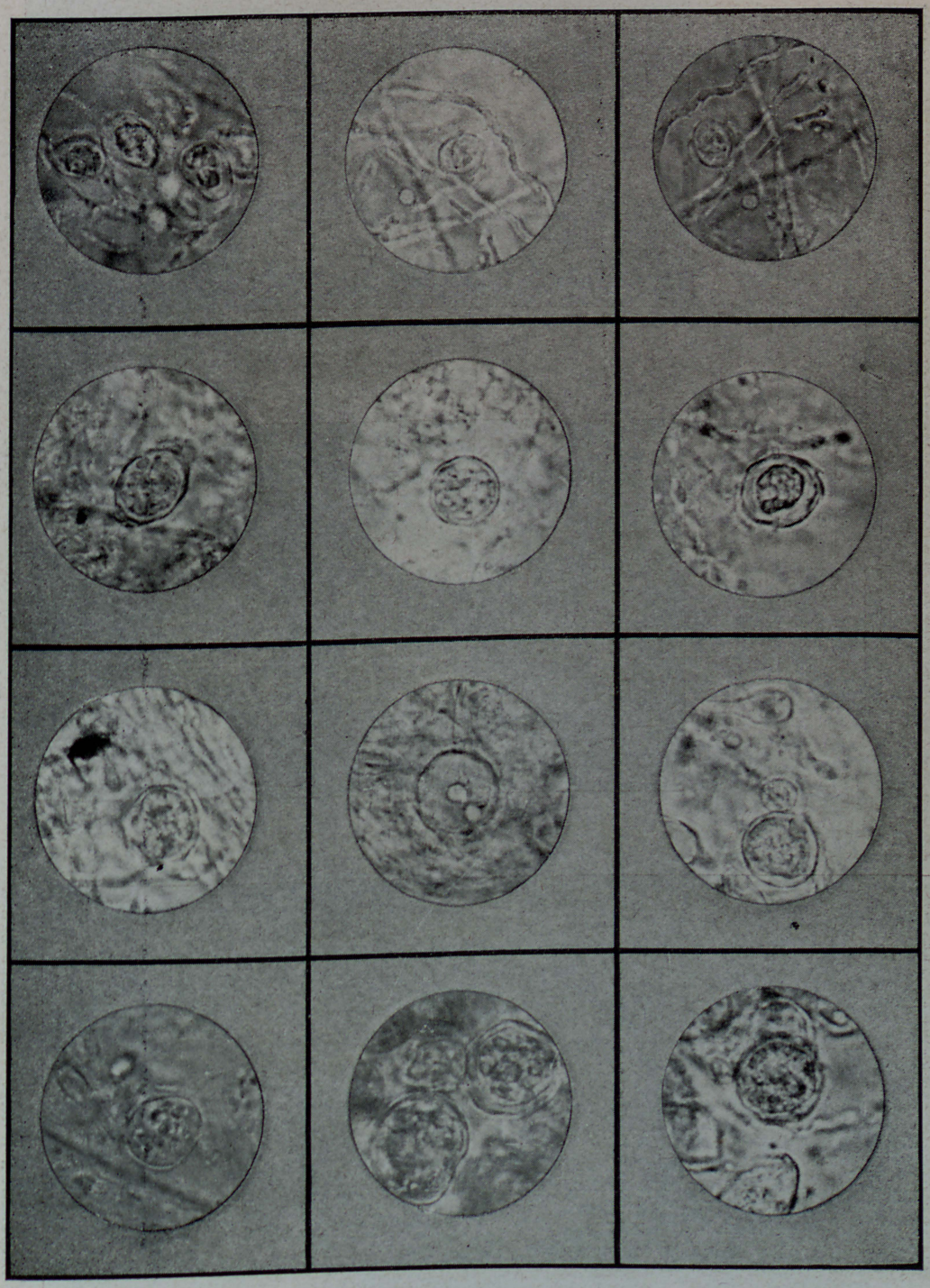
Cultura em batata glicerinada e glicosada — 10% de CO^2, a 37°.

Micélios vegetativos e de frutificação.

Micélio em raqueta e endospórios maduros. (Obj. im. 2 mm Leitz, ocular 8x).

Est. 21

COCCIDIÓIDES IMMITIS



Cultura em batata glicerinada e glicosada —

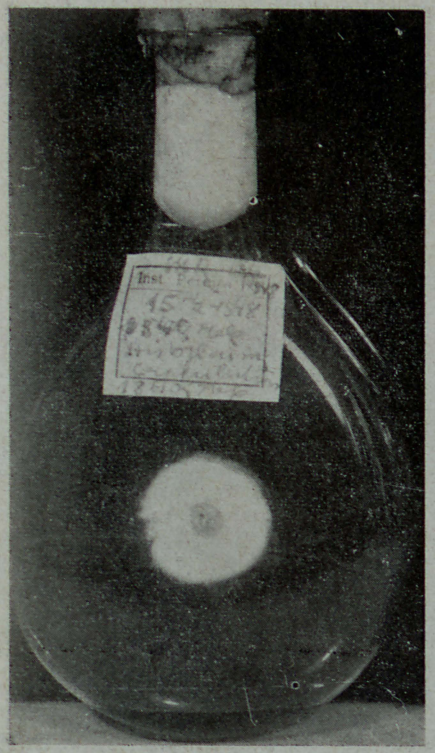
10% de CO^2, a 37°. (13 dias).

(Obj. im. 2 mm (Leitz) e ocular 8x).

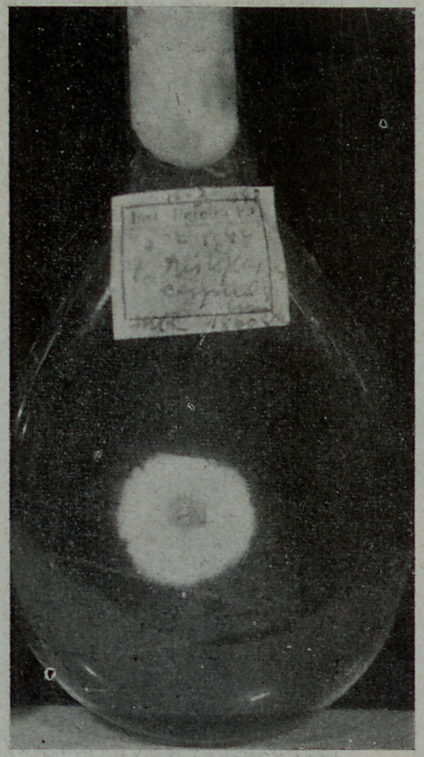
Est. 22

CULTURAS DE HISTOPLASMA CAPSULATUM

Meio de Sabouraud — mel — sacarose-bruta (temp. aum.: 2 meses e 15 dias).



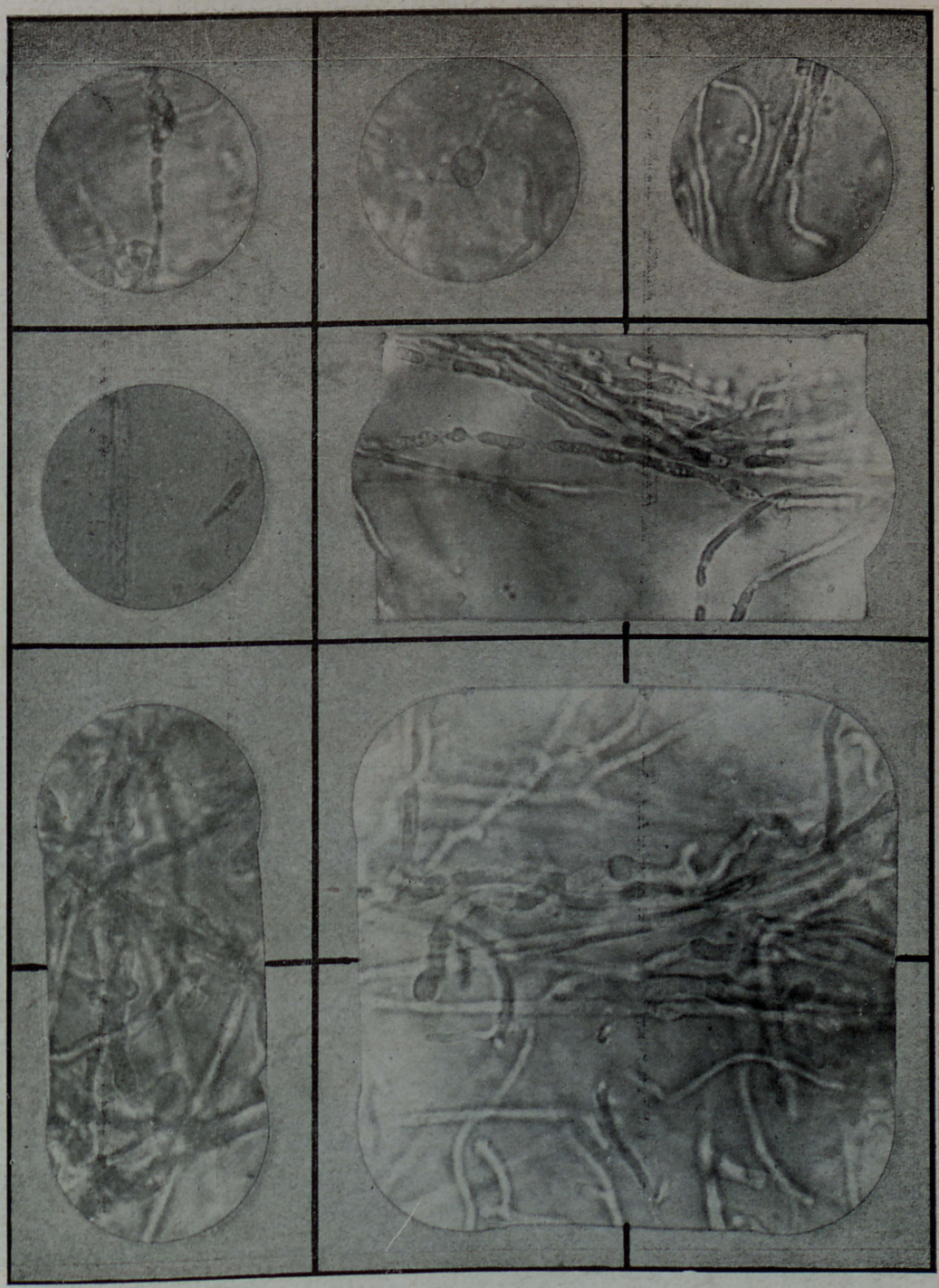
Sab. mel — sacarose-bruta.



Sab. mel — sacarose-bruta.

Est. 23

HISTOPLASMA CAPSULATUM

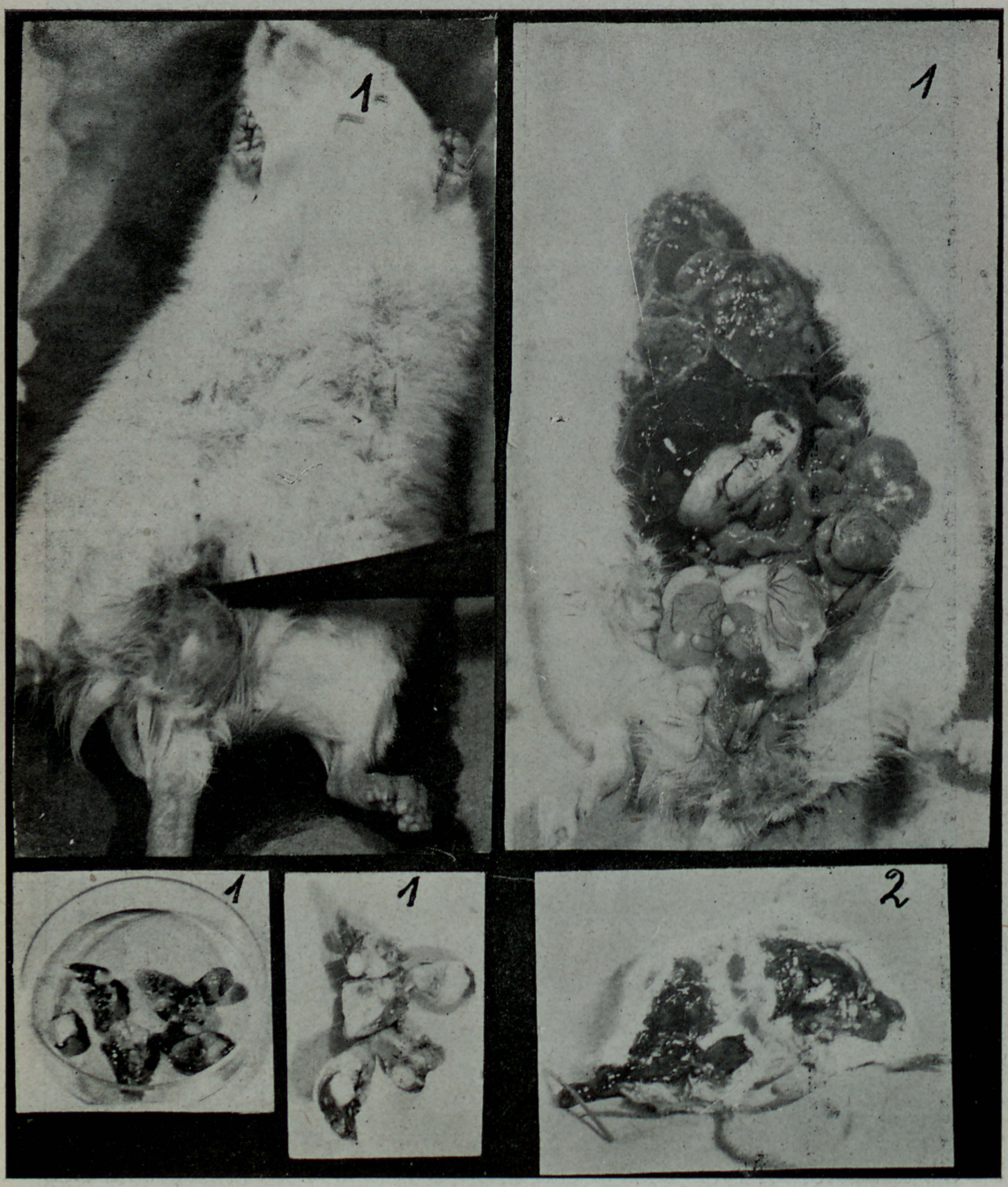


Cultura em
gelose — sangue, a 37°.

(Obj. im. 2 mm. Leitz e ocular 8x)

Est. 24

INOCULAÇÕES DO AGENTE DA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA EM RATO (1) E EM CAMONDONGO BRANCOS (2)



Generalização do processo infectante

1) Rato branco inoculado por via testicular.

2) Camondongo branco injetado intra-peritonealmente.