

## MYXOMATOSE EXPERIMENTAL EM ORYCTOLAGUS SP. E SYLVILAGUS SP.

A. VALLEJO-FREIRE, B. OLIVEIRA FILHO e A. BRUNNER Jr.

*Secção de Virus, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil*

A myxomatose, infecção grave, específica dos coelhos, foi reconhecida numa epizootia em laboratório, no Uruguai e descrita pela primeira vez por Sanarelli (1) em 1898. Epizootias ocorrem nas Américas do Sul, Central e Oeste da América do Norte.

Sanarelli reproduziu experimentalmente a doença e estudou os tumores subcutâneos característicos, afirmando serem eles devidos a proliferação de células de formas dendríticas que denominou "células myxomatosas". Incluiu a myxomatose entre as doenças causadas por virus, em virtude de ter mostrado sua natureza infecciosa, não encontrando formas bacterianas nas preparações feitas com aquele material; denominou o agente infectante de "vírus myxomatogênico". É um vírus classificado entre os do grupo pox (2), embora se comporte quanto a algumas propriedades adotadas como critérios taxonômicos, de modo diverso em relação aos demais componentes do grupo.

Splendore (3) descreveu inclusões em tecido tumoral corado pelo Giemsa e comparou-as com os corpos de inclusão descritos por Halberstaedter e Prowazek nas lesões tracomatosas. Moses (4) não confirmou a presença de inclusões citoplasmáticas, mas demonstrou que o agente infectante atravessa as velas esterilizantes Berkefeld, comprovando, assim, tratar-se de um vírus filtrável. Aragão (5) também não evidenciou corpos de inclusão no citoplasma, mas descreveu inclusões intranucleares, reconhecendo, posteriormente, tratar-se de acúmulos de cromatina (6). Torres e Almeida Cardoso (7) descreveram inclusões intranucleares em células não caracterizadas admitindo, porém, a possibilidade de contaminação dos animais por um vírus intranuclear.

Foi Aragão (5) quem primeiramente reconheceu partículas intracitoplasmáticas, identificando-as como sendo o vírus do myxoma, muito semelhante ao vírus da varíola e do molluscum contagiosum. Lipschütz (8) e Findlay (9) constataram também a presença de corpúsculos no citoplasma das células myxomatosas, às vezes agrupados, formando massas mais ou menos extensas.

O tecido tumoral subcutâneo, é de natureza edematosa, não proliferativa, segundo Findlay (9). Rivers (10), todavia, observou um processo proliferativo, seguido da destruição dos elementos celulares.

Alterações no epitélio foram descritas por Rivers (11), com ocorrência de hipertrofia das células seguida da formação de uma inclusão eosinófila que pode ocupar grande parte do citoplasma. Verificou também inclusões azurófilas e, concomitantemente, uma rarefação do núcleo, disposto excêntricamente.

Além de partículas azurófilas intracitoplasmáticas, foram descritos também corpos esféricos basófilos, de 2 a 3  $\mu$  de diâmetro, que por vêzes davam reação positiva ao Feulgen (12).

Van Rooyen e Rhodes (13) observaram pelo método de Paschen, corpúsculos elementares em sedimentos obtidos por centrifugações da suspensão do material colhido de lavagens da conjuntiva de coelhos infectados; as primeiras eletromicrografias do vírus parcialmente purificado foram obtidas por Borries e col. (14).

Este trabalho tem por objetivo mostrar aspectos decorrentes da infecção pelo vírus do myxoma em coelhos domésticos e silvestres nos tecidos epitelial e conjuntivo da pele.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Inóculo* — A amostra do vírus do myxoma foi fornecida pelo Dr. Paulo Mello Freire, do Instituto Biológico de São Paulo, isolada em 1954 de coelho doméstico (*Oryctolagus*), em Itaquaquecetuba. Foram feitas duas passagens em coelho e os tumores mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em glicerina a 50%.

Os tumores cutâneos eram triturados com areia e as partículas suspensas em salina com tampão fosfato de pH 7,2 — 7,4. As inoculações eram feitas por via intradérmica ou subcutânea, com 0,1 a 1,0 ml da suspensão. Diariamente, em dois períodos, eram verificadas as temperaturas dos animais (*Oryctolagus* sp e *Sylvilagus* sp.).

O coelho doméstico apresentava febre no 2.º ou 3.º dia após a inoculação, que regredia no 7.º ou 8.º dia e a morte sobrevinha geralmente no 10.º dia apresentando o animal todos os sintomas característicos da doença.

As biópsias dos tumores cutâneos, eram feitas de 3 a 10 dias e a pele do local da inoculação, de 4 a 24 horas após a infecção.

O coelho silvestre apresentava temperaturas variáveis e o animal se recuperava em torno de 60 dias. O material era colhido de 7 a 48 dias após a inoculação.

*Microscopia Eletrônica* — Fragmentos de pele, de 1-2 mm<sup>3</sup> aproximadamente, foram fixados em ácido ósmico a 1% em tampão veronal-acetato, isotônico, de pH 7,4 ou em subtosan, durante 1-2 horas, desidratados na série alcoólica e incluídos em metil-butil metacrilatos misturados na proporção de 3:7, contendo 1% de peróxido de benzoila. A polimerização se processou a  $54^{\circ}\text{C}$ , durante 12 a 24 horas.

O sangue foi colhido da veia marginal da orelha, no 3.º ou 5.º dia e no período agônico, fixando-se e incluindo 2 ou 3 gotas nas mesmas condições que os fragmentos de tecido, por centrifugações e decantações sucessivas.

Os cortes foram obtidos num micrótomo Porter-Blum e fotografados no microscópio Siemens UM100b com aumentos de x1300 a x15000.

### RESULTADOS E CONCLUSÕES

*Sylvilagus* — Nos coelhos silvestres observamos uma tumoração apenas no local da inoculação do vírus, ocorrendo uma recuperação dos animais ao redor de 60 dias, os quais adquiriram inclusive imunidade. Quanto ao aspecto ultramicroscópico do epitélio, podem-se salientar as alterações que ocorrem no tecido, devidos à intensa infestação pelo vírus, como se observa na fig. 1. É uma região próxima à camada basal, em que as células se apresentam com distribuição e contornos irregulares. Os

núcleos, excêntricos e também irregulares, apresentam com freqüência uma rarefação possivelmente correlacionada com o processo de desenvolvimento dos corpúsculos elementares no citoplasma. Nos núcleos e no citoplasma observam-se membranas cujas secções, aproximadamente circulares, envolvem material de menor ou igual densidade que a zona circunvizinha. Há poucos desmosomas, estando as células, em extensas regiões, apenas apostas umas às outras. A fig. 2 corresponde a uma célula epitelial, com o citoplasma totalmente ocupado por partículas de vírus. Há regiões pouco densas aos eletrons, limitadas por membranas simples ou múltiplas, de contornos irregulares. Observa-se, aproximadamente no centro do citoplasma, uma região granular, homogêneamente densa, já descrita em outras infecções por vírus do grupo pox, como o vacínico (15, 16, 17, 18, 19) e o molluscum contagiosum (20). No centro dessa região granular há uma massa compacta e densa de aproximadamente 1200 x 400 m $\mu$ . Não se observam mitocôndrias e retículo endoplasmático, que estão presentes nas fases iniciais do desenvolvimento do vírus, diminuindo aquêles em número e êste em extensão, até o total desaparecimento, à medida em que aumenta o número de partículas, o que pode ser considerado como uma consequência da infecção. O núcleo, alongado e excêntrico, apresenta uma rarefação contendo no seu limite uma formação elíptica, densa aos eletrons. Junto à membrana há duas vesículas, contendo uma delas uma partícula da mesma densidade e dimensões que as de um corpúsculo elementar. Êste aspecto pode corresponder a uma invaginação nuclear coincidente com a presença de uma partícula naquela região do citoplasma.

Algumas células apresentam, além de partículas livres, aglomerados de corpúsculos, bem delimitados, semelhantes aos corpos de Bollinger da varíola aviária, quanto a densidade e compacticidade, descritos por Eaves e Flewett (21). Uma das células da fig. 3 contém duas inclusões desse tipo. A maior contém regiões mais ou menos circulares pouco densas, em cujos limites se dispõem aglomerados de partículas de vírus.

Na fig. 4 observa-se uma formação de secção circular, constituída na sua periferia por uma massa granular, densa aos eletrons. A maior parte dessa formação é constituída por regiões circulares pouco densas, delimitadas umas com as outras por finos cordões de citoplasma nos quais se dispõem as partículas. Ê, possivelmente, o citoplasma de outra célula, invaginado numa célula não infectada.

Numa fase, ao que se supõe, mais adiantada do parasitismo, o citoplasma se desintegra apresentando apenas vesículas em cujos limites se observam os corpúsculos elementares (fig. 5). Ê interessante observar que em algumas regiões do epitélio, as células apresentam diferentes graus de intensidade de parasitismo, havendo mesmo algumas, apostas a células de aspectos semelhante à da fig. 5, cujas secções não apresentam partículas.

Com a regressão do tumor, o epitélio sofre descamação, seguida da completa destruição do tecido. As células se desintegram e as partículas de vírus são liberadas (fig. 6), o que pode explicar, em parte, a disseminação do vírus no campo e a consequente aquisição de imunidade pelos coelhos silvestres. O epitélio se regenera, a partir da camada basal, tomando as características normais do tecido.

As partículas aparentemente livres das estruturas citoplasmáticas apresentam-se menos densas na região central, com secção circular, enquanto que as incluídas no citoplasma, ou mesmo no tecido já desintegrado, porém, próximas a vestígios de estrutura celular, apresentam secção elíptica e são mais densas aos eletrons.

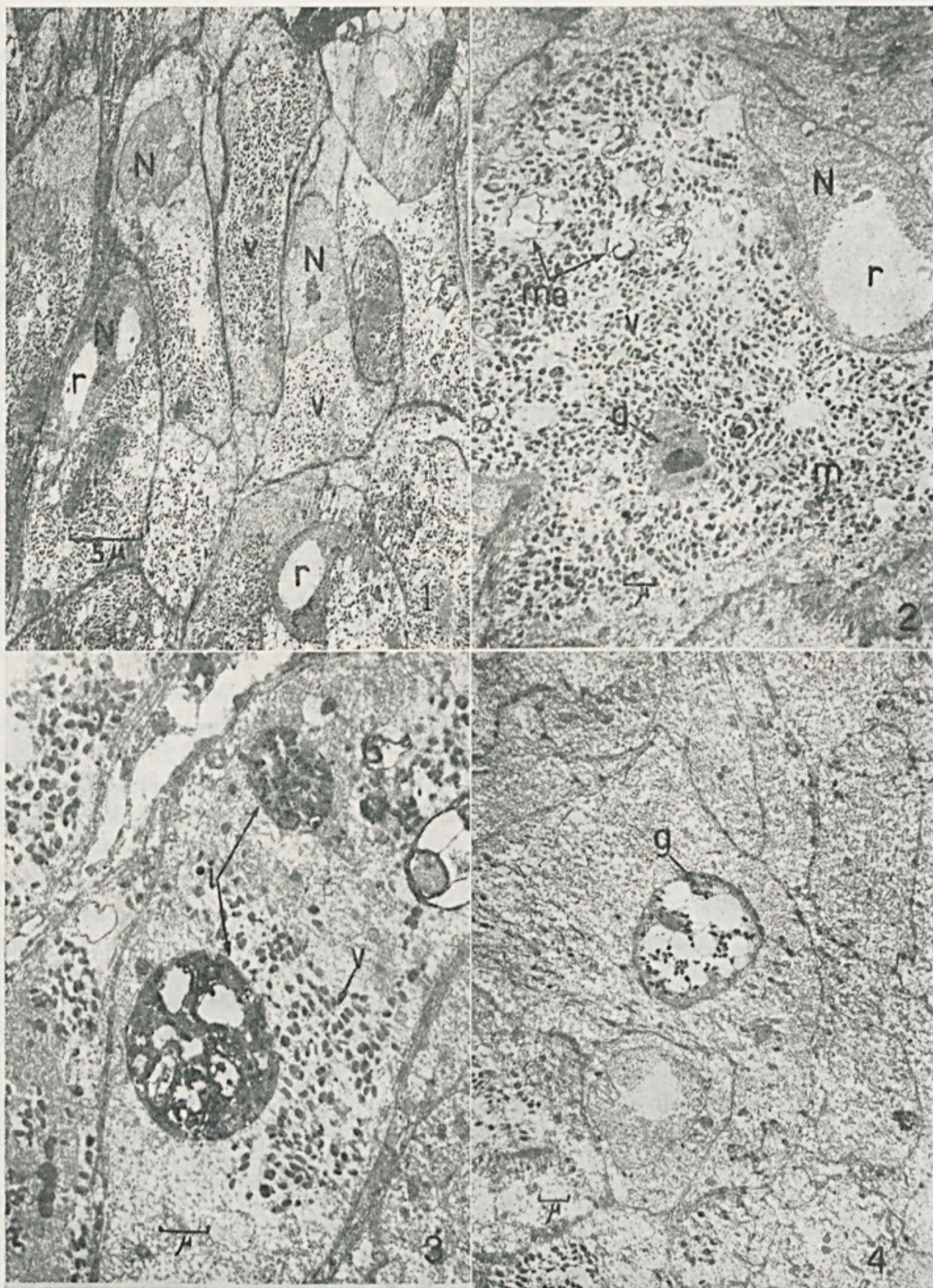
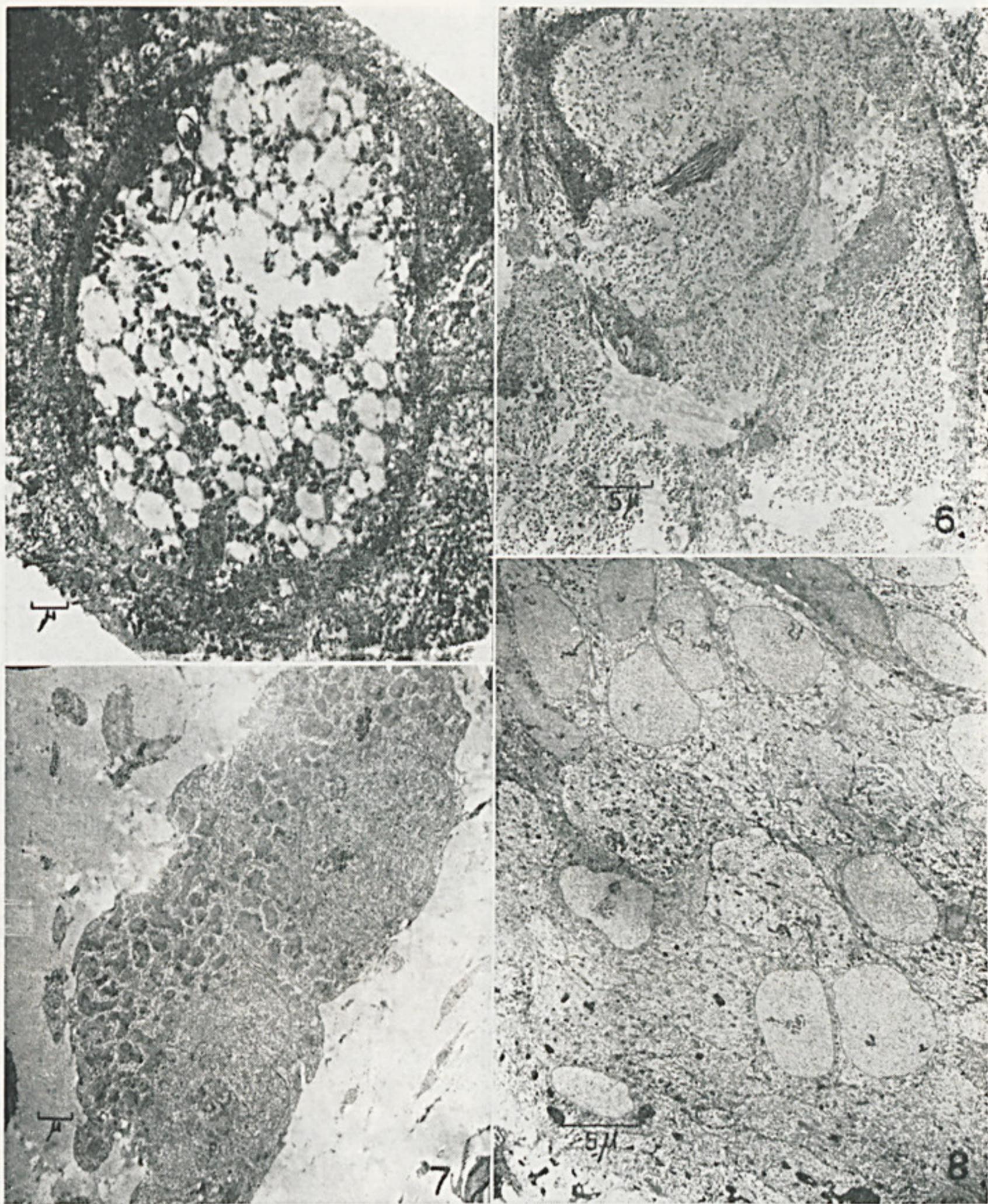
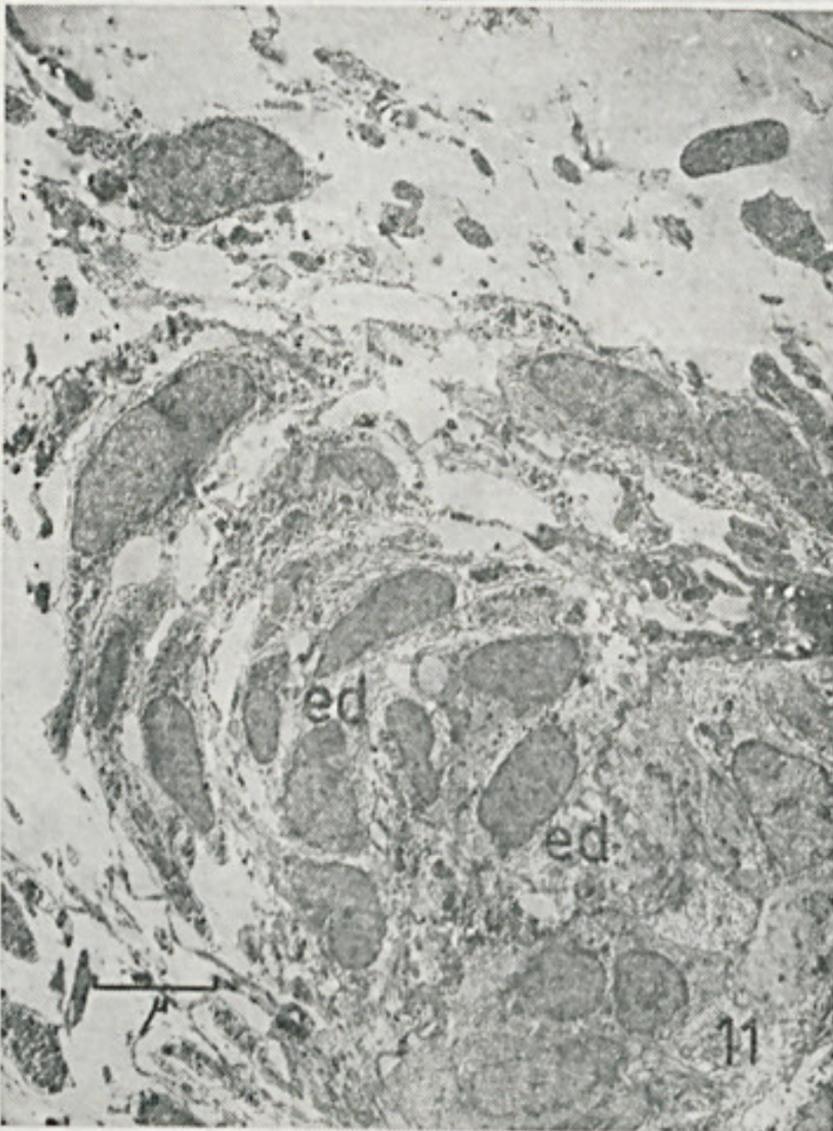
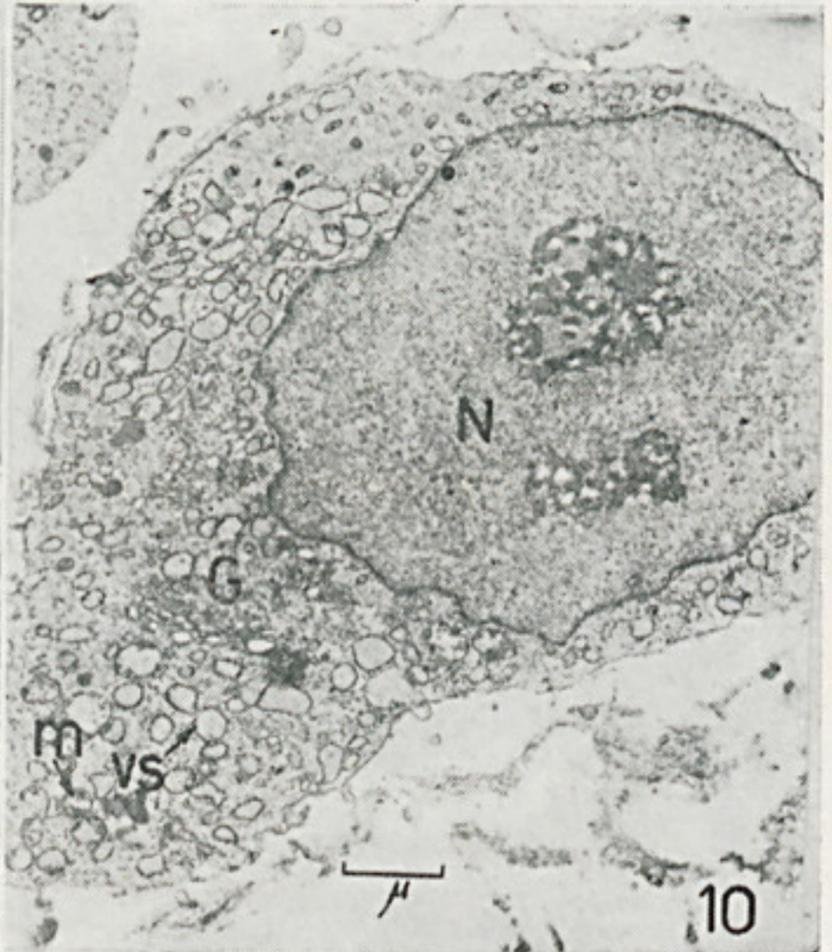
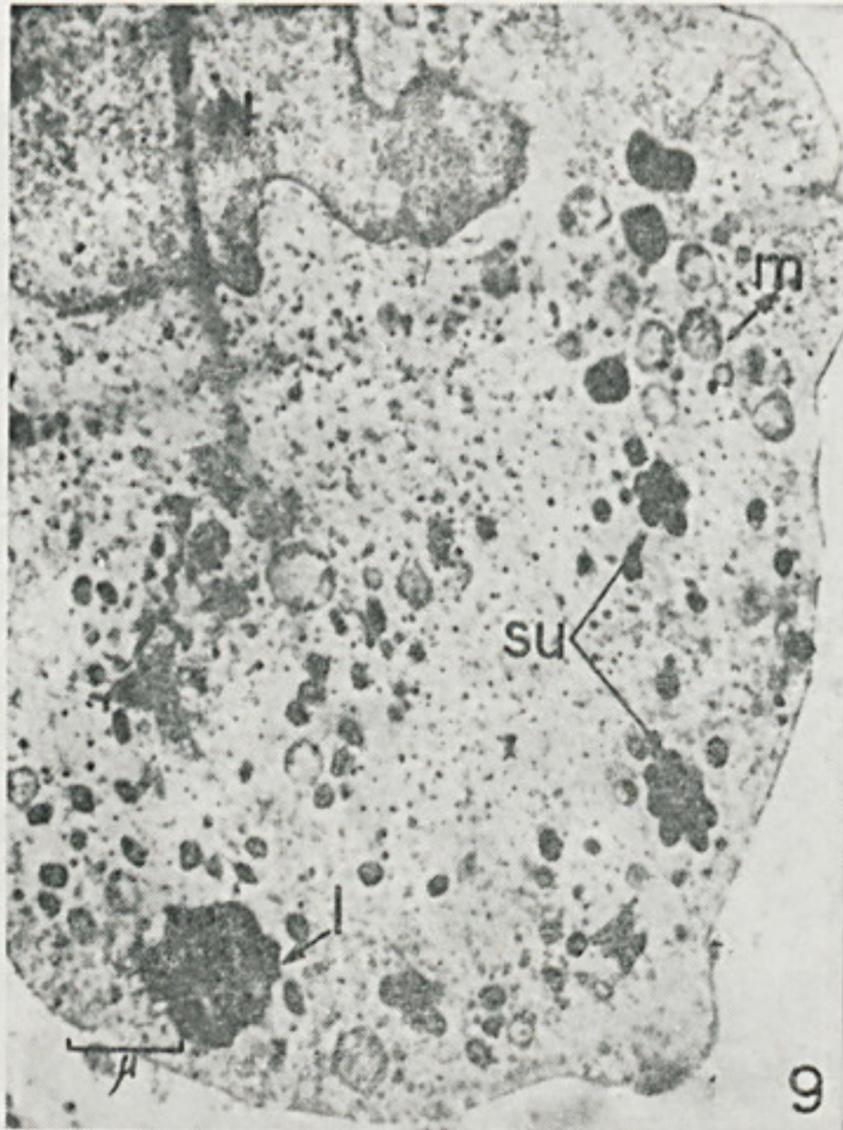


Fig. 1 a 6 — Cortes do epitélio cutâneo de *Sylvilagus* inoculado com o vírus do myxoma.

- 1) Células de forma e distribuição irregulares, com núcleos (N) excêntricos e geralmente rarefeitos (r). No citoplasma observam-se numerosas partículas de vírus V.
- 2) Célula com o núcleo N excêntrico e rarefeito (r). O citoplasma contém numerosos corpúsculos elementares V, membranas me simples ou duplas, irregulares, e uma região G contendo uma massa densa aos eletrons. Observam-se alguns mitocôndrios m dispostos no citoplasma periférico; não há mais retículo endoplasmático.



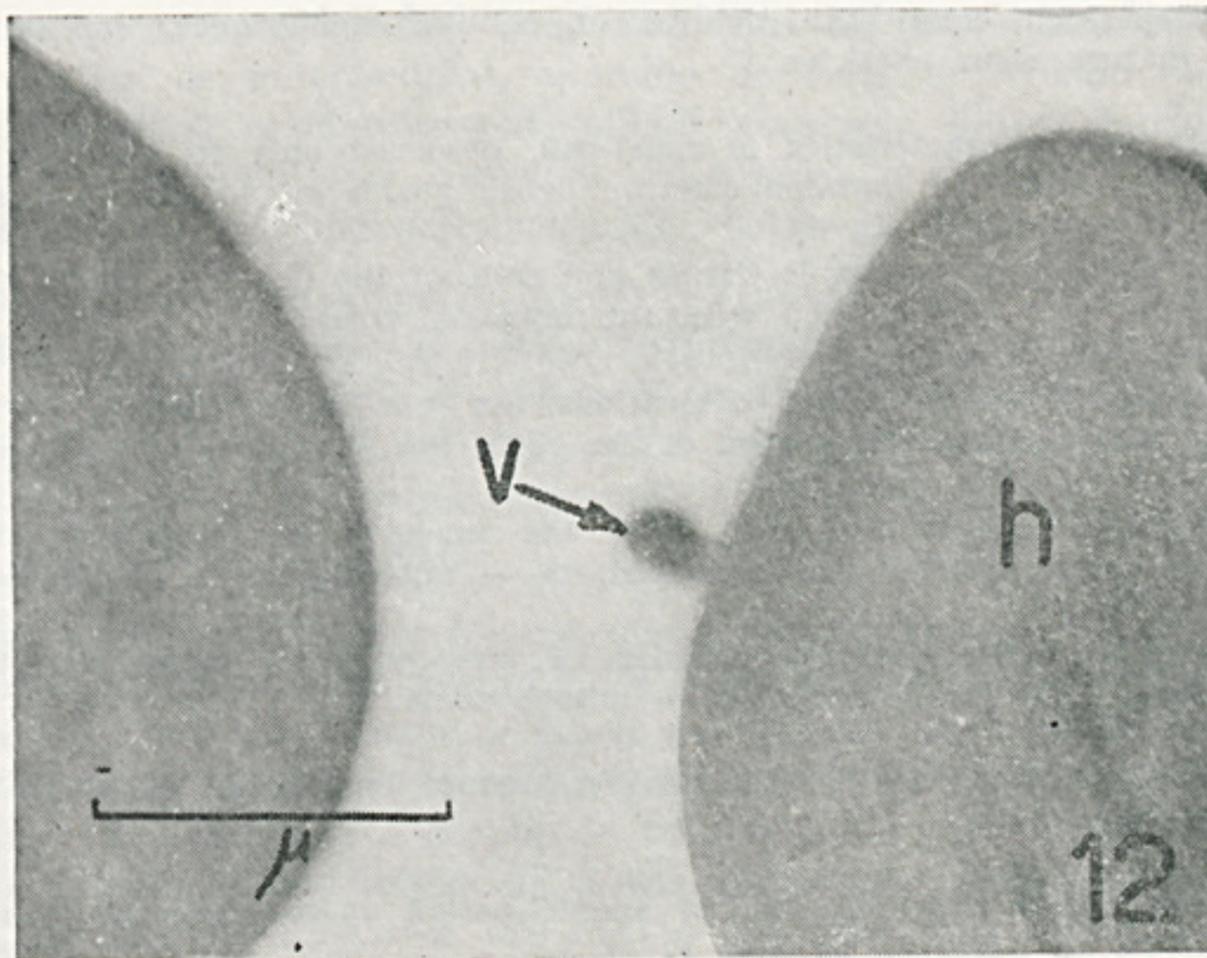
- 3) Célula com duas inclusões *i*, densas aos eletrons, constituídas por aglomerados compactos de partículas de vírus. A inclusão de secção maior, contém algumas vesículas pouco densas aos eletrons, e, próximas a essa inclusão, observam-se partículas de vírus *V* livres.
- 4) No centro da figura, observa-se uma formação aproximadamente circular, limitada por uma massa granular *G*. Esta formação contém vesículas delimitadas por finos cordões citoplasmáticos nos quais se dispõem partículas de vírus.
- 5) Célula com o citoplasma vesiculado, contendo partículas de vírus dispostas em cordões citoplasmáticos que delimitam as vesículas. Esta parece constituir uma fase adiantada de degeneração celular devida à infecção.



6) Células totalmente degeneradas, apresentando apenas vestígios de delimitação e contendo praticamente só partículas de vírus maturo.

Fig. 7 — Célula com características de mastócito, encontrada somente no tecido conjuntivo de *Sylvilagus*, contendo grãos de forma variável, densos aos eletrons.

Fig. 8 a 12 — Corte de células de coelho *Oryctolagus* inoculado com o vírus do myxoma.  
8) Epitélio cutâneo de *Oryctolagus*. As alterações do tecido são menores do que no *Sylvilagus*, quanto à forma e disposição das células.



- 9) Célula do tecido conjuntivo, não identificada, com o núcleo *N*, contendo subunidades *SU* das quais se originam as partículas de vírus; *m* — mitocôndrios; *l* — inclusão lipídica.
- 10) Célula myxomatosa com numerosas vesículas *VS* associadas aos grãos de ribonucleoproteínas; *N* — núcleo; *G* — zona de Golgi; *m* — mitocôndrios.
- 11) Capilar obliterado pela proliferação de células endoteliais *ed*, segundo alguns autores (12).
- 12) Hemácia *h* de sangue de coelho no período agônico da infecção, contendo uma partícula *V* adsorvida à membrana.

Fig. 1 to 6 — Sections of cutaneous epithelial cells of the wild rabbit *Sylvilagus*, infected by myxoma virus.

- 1) Cells with irregular forms and distribution with excentric and generally rarefacted (*r*) nucleus *N*. Numerous viruses particles *V* are seen in the cytoplasm.
- 2) A cell with an excentric and rarefacted (*r*) nucleus *N*. The cytoplasm contains numerous elementary corpuscles *V*, simple or double irregular membranes *me* and a granular region *G* with an electron dense mass. Some mitochondria *m* are disposed in the periphery of the cytoplasm. There is not endoplasmic reticulum.
- 3) A cell with two electron dense inclusions *i*, constituted of agglomerated virus particles. The greater section contains some vesicles of low electron density and near to this inclusion free virus particles *V* are seen.
- 4) In the center of this figure, an approximately circular formation limited by a granular mass *G*, is seen. This formation contains vesicles limited by fine cytoplasmic cords in which virus particles dispose themselves.
- 5) A vesiculated cell with virus particles disposed in the cytoplasmic cords. This seems an advanced phase of cellular degeneration due to the viral infection.

- 6) Totally degenerated cells with debris of cellular membranes, containing practically only mature virus particles.

Fig. 7 — A cell with characteristics of mast-cell, observed only in the *Sylvilagus* conjunctive tissue. It contains electron dense grains of variable forms.

Fig. 8 to 12 — Sections of cutaneous tissues and cells of the domestic rabbit *Oryctolagus*, inoculated with the myxoma virus.

- 8) Cutaneous epithelium in which alterations are not so evident as in *Sylvilagus*, concerning the form and disposition of the cells.
- 9) A not identified conjunctival cell, with the nucleus *N*, containing subunits *SU* from which virus particles are originated; *m* — mitochondria; *l* — lipidic inclusion.
- 10) Myxomatous cell with numerous vesicles *VS*, associated to ribonucleoprotein grains; *N* — nucleus; *G* — Golgi zone; *m* — mitochondria.
- 11) A blood capilar obliterated by the proliferation of endothelial cells *ed*, accordingly to some authors (12).
- 12) A red blood cell *h* of rabbit in the agonic period of the infection, containing on the membrane an adsorbed particle *V*.

No tecido conjuntivo não observamos inclusões a vírus nos vários tipos de células. Epstein e col. (22) mostraram partículas de dimensões e formas irregulares, o que não convence quanto a sua natureza viral, no citoplasma de células identificadas como sendo myxomatosas.

Encontramos com freqüência, células contendo numerosos grãos de forma e dimensões características que poderiam ser identificadas como mastócitos (fig. 7).

*Oryctolagus* — O epitélio cutâneo desses animais, se apresenta menos infestado por partículas de vírus do que o do coelho silvestre.

As células sofrem alterações em menor grau, quanto à forma, disposição no tecido e quanto a posição dos núcleos que se situam normalmente (fig. 8). Como no coelho silvestre, mitocôndrios e retículo endoplasmático diminuem em número e extensão, respectivamente, até o seu desaparecimento quando a célula está totalmente infectada.

Nestas células surpreendemos diferentes fases de desenvolvimento das partículas semelhantes às dos vírus integrantes do grupo pox, já descritas por vários autores, acima citados. Estas fases não são observadas com freqüência nas células epiteliais da pele de *Sylvilagus*, provavelmente por ser mais rápido o processo de desenvolvimento do vírus nêstes animais. Verificamos entre partículas maduras, mais densas na periferia, e, medindo 195x420 m $\mu$ , corpúsculos imaturos de 220 x 265 m $\mu$ . As partículas, à medida que se desenvolvem, diminuem em dimensões, e aumentam em densidade aos electrons. A fase inicial da evolução é semelhante à do vírus vacínico, já descrita por Vallejo-Freire e col. (16), surpreendida numa célula do tecido conjuntivo, não identificada. Os corpúsculos elementares se originam de regiões densas, denominadas subunidades, por um processo semelhante ao de um brotamento. As partículas se individualizam durante o desenvolvimento até se tornarem livres no citoplasma. As subunidades medem, aproximadamente, em secções, 800 x 460 m $\mu$  (fig. 9).

O tecido conjuntivo apresenta, com freqüência, células alongadas, às vezes de forma dendrítica, que seriam responsáveis pelo desenvolvimento da tumoração. São,

por êstes aspectos, consideradas como sendo as células chamadas myxomatosas (fig. 10). Além de mitocôndrios, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, estas células contêm, mantendo continuidade com esta última estrutura e distribuídas por todo o citoplasma, vesículas delimitadas por membranas associadas a grãos provavelmente de ribonucleoproteínas, dadas as dimensões que apresentam (150-200 Å). Não observamos no tecido conjuntivo de *Oryctolagus*, células com características de mastócitos. É comum surpreender capilares parcial ou totalmente obliterados. Esta obstrução é devida à proliferação das células endoteliais, fenômeno já observado por Hurst (12). Há destruição dos demais elementos dos vasos, podendo ocorrer um extravazamento de hemácias, que se dispõem nas proximidades dos mesmos (Fig. 11).

A infectividade do sangue foi constatada por Splendore (2) e Sanarelli (1) 48 horas após inoculação subcutânea e 24 horas quando a inoculação era endovenosa. A infectividade do sangue se inicia no segundo dia e perdura até o período agônico (6), tendo Moses (4) obtido um maior título nesta última fase da moléstia. Na fig. 12, observa-se a secção de uma hemácia, de sangue de *Oryctolagus* no período agônico, tendo adsorvida à sua membrana, uma partícula de secção elipsoídica, de dimensões (250 x 180 m $\mu$ ) e densidade aos electrons que se aproximam das do vírus do myxoma. Êste seria o meio de disseminação do vírus no organismo do animal, resultando na generalização da tumoração.

Surpreendemos aspectos da myxomatose visando não somente a observação das alterações celulares mas também acompanhar as diferentes fases do ciclo evolutivo do vírus, o que oferece dificuldades, pois quando a tumoração se manifesta, as partículas encontram-se já numa fase adiantada de desenvolvimento. Fazendo-se a biópsia do local da inoculação, encontramos alterações que podem ser atribuídas também à ação mecânica exercida pela agulha, além das devidas à atividade do vírus. Afim de contornar estas dificuldades, estamos estudando o ciclo evolutivo do vírus utilizando a técnica de cultura de tecido epitelial de rim de coelho, o que constitui um sistema simples de trabalho para esta investigação.

#### SUMÁRIO

Tumores cutâneos de coelhos domésticos (*Oryctolagus* sp.) e Silvestres (*Sylvilagus* sp.), com myxomatose, foram estudados por meio de cortes ultra-finos ao microscópio eletrônico.

São analisadas não somente as alterações celulares devidas a infecção pelo vírus, mas também os diferentes aspectos correspondentes às várias fases do desenvolvimento das partículas, nos tecidos epitelial e conjuntivo da pele de ambos os gêneros. A viremia em alguns animais foi igualmente observada.

#### SUMMARY

Tumors of domestic (*Oryctolagus*) and wild (*Sylvilagus*) rabbits with myxomatosis, obtained by biopsy with the skin were studied through the electron microscopy of thin sections of the tissues.

Not only the cellular alterations, due to the viral parasitism, but also the different aspects of the corresponding phases of particles development in the epitelial and connective skin tissues of both genus were analysed. The viremia was also observed in some domestic animals.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Sanarelli, G.* — Das myxomatogene Virus. *Centralblatt Bakter.*, 23(20):865-873, 1898.
2. *Fenner, F.* — Classification of myxoma and fibroma viruses. *Nature*, 171:562-563, 1953.
3. *Splendore, A.* — Il virus mixomatoso dé conigli. *Rev. Soc. Cient. São Paulo*, n.º 1-2:13-15, 1908.
4. *Moses, A.* — O Virus do mixoma dos coelhos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3:46-53, 1911.
5. *Aragão, H. B.* — Sôbre o micróbio de myxoma dos coelhos. *Brasil Med.*, 47:471, 1911.
6. *Aragão, H. B.* — Myxoma dos coelhos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 20:225-236, 1927.
7. *Torres, C. M. e Almeida Cardoso, R. A.* — Transplantação de baço de coelho com myxoma infeccioso na câmara anterior do olho da cobaia. Sôbre a degeneração myxomatosa. Inclusões intranucleares. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53:367-377, 1955.
8. *Lipschütz, B.* — Untersuchungen über die Aetiologie der Myxomkrankheit des Kaninchens. *Wiener Klin. Wochschr.*, 40:1101-1103, 1927.
9. *Findlay, G. M.* — Notes on infectious myxomatosis of rabbits. *British Jour. Exptl. Path.*, 10:214-219, 1929.
10. *Rivers, T. M.* — Changes observed in epidermal cells covering myxomatous masses induced by Virus Myxomatosum (Sanarelli). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 24:435-437, 1926-27.
11. *Rivers, T. M.* — Infectious myxomatosis of rabbit. Observations on the pathological changes induced by Virus Myxomatosum (Sanarelli). *J. Exptl. Med.*, 51:965-976, 1930.
12. *Hurst, S. W.* — Myxoma and the Shope Fibroma. I. The Histology of Myxoma. *British J. Exptl. Path.*, 18:1-15, 1937.
13. *Rooyen, C. E. Van and Rhodes, A. J.* — Centrifugation of the elementary bodies of infectious myxomatosis of the rabbit. *Zentr. Bakt.*, 140:117-120, 1937.
14. *Borries, B. von, Ruska, E. und Ruska, H.* — Bakterien und virus in übermikroskopischer aufnahme. *Klin. Wosch.*, 17(27):921-925, 1938.
15. *Morgan, C.; Ellison, S. A.; Rose, H. M. and Moore, D. H.* — Structure and development of viruses observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowl pox viruses. *J. Exp. Med.*, 100:201-309, 1954.
16. *Vallejo-Freire, A.; Brunner, Jr., A. and Beçak, W.* — Vaccinia virus multiplication in rabbit-kidney cell cultures. Aspects of the evolution cycle. *Mem. Inst. Butantan*, 28:275-284, 1957-58.
17. *Peters, D.* — Morphologie menschen und tierpathogener viren. *Zentr. Bakt. Pars. Infekt. Hyg.* 176:259-295, 1959.
18. *Hygashi, N.; Ozaki, Y. and Ichimia, M.* — Electron Microscopy of Pox Virus to cell adsorption and the ultrastructure of developmental forms of pox virus. *J. Ultrastructure Res.*, 3:270-281, 1960.
19. *Flewett, T. H.* — Intracellular growth of some viruses of the pox group. An electron microscopic study of infected chick chorionic cells. *J. Hyg.*, 54:393-400, 1956.
20. *Dourmashkin, R. and Bernhard, W.* — A study with the electron microscope of the skin tumor of molluscum contagiosum. *J. Ultrastructure Res.*, 3:11-38, 1959.
21. *Eaves, G. and Flewett, T. H.* — The structure of fowl-pox inclusions (Bollinger Bodies). *J. Hyg.*, 53:102-105, 1955.
22. *Epstein, B.; Reissig, M. and De Robertis, E.* — Studies by Electron Microscopy of Thin Sections of Infectious Myxomatosis in Rabbits. *J. Exptl. Med.*, 96:347-354, 1952.