

EFEITO DA VACINAÇÃO PELO BCG SOBRE A EVOLUÇÃO DA LEPRO MURINA; OBSERVAÇÃO EM RATOS INOCULADOS, POR VIA PERITONEAL, COM PEQUENA DOSE DE "M. LEPROAEMURIUM" (*)

W. A. HADLER (**)

L. M. ZITI (***)

A inoculação de ratos normais com dose conveniente de *M. lepraemurium*, por via intraperitoneal, produz infecção em 100% dos animais. As lesões apresentam evolução lenta e progressiva, cujo ritmo é regular e constante, na maioria dos casos; a morte sobrevém após tempo relativamente longo⁵. A cronicidade da lepra murina experimental assim induzida e a regularidade do seu decurso evolutivo, permitem o estudo de fatores que eventualmente podem interferir na evolução da moléstia.

Baseados nesses fatos foi estudada a influência de suspensões coloidais eletro-negativas sobre a evolução de lesões provocadas pelo *M. lepraemurium*, em ratos inoculados por via peritoneal⁸. Este método pode ser aplicado ao estudo do efeito da vacinação prévia com micobactérias, sobre o andamento evolutivo da lepra murina; isto é, faculta o estudo da resistência eventualmente conferida ao rato, por bacilos aar., em face da inoculação experimental com o *M. lepraemurium*.

Desde 1909 fôra verificado que a injeção de *M. lepraemurium* morto pelo calor, em ratos, aumenta a resistência dos animais, de forma que a inoculação posterior do bacilo vivo não produz infecção¹²; essa observação foi confirmada apenas parcialmente, porquanto assinalou-se que a injeção prévia de *M. lepraemurium* desengordurado⁷ ou não¹¹, retarda a evolução da lepra murina, sem contudo impedir o seu desenvolvimento; haveria a formação de "leproma retardado"¹¹ e, por vezes, regressão espontânea das lesões.

O *M. tuberculosis* apresenta algumas semelhanças antigênicas com o *M. lepraemurium*, o que pode ser revelado inclusive pela sensibilização tuberculínica desenvolvida no cobaio normal inoculado com este último bacilo⁶; porém, a co-sensibilização assim observada não implica na presença

(*) Trabalho realizado na Secção de Quimioterapia do Instituto Butantan. (**) Médico da Secção de Patologia Experimental do Serviço de Pesquisas Científicas do D.P.L., São Paulo, Brasil.

(***) Assistente da Secção de Quimioterapia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

de resistência cruzada, a qual pode ser averiguada estudando-se o efeito da administração do BCG em ratos posteriormente inoculados com *M. lepraemurium*.

A ação da forma atenuada do *M. tuberculosis* (BCG) sôbre o decurso da lepra murina fôra anteriormente estudada ¹⁰, injetando-se o referido bacilo 5 a 7 meses após a inoculação de *M. lepraemurium*; o BCG, assim aplicado, produziria atenuação da moléstia e tendência à cicatrização das lesões, isto é, exerceria ação curativa sôbre a lepra do rato. Fôra também verificado que a inoculação prévia da forma atenuada do *M. tuberculosis*, por via subcutânea ou intraperitoneal, retardaria a evolução das lesões induzidas no rato pelo *M. lepraemurium*, inoculado no tecido subcutâneo ou na cavidade peritoneal ¹; o BCG teria a capacidade de conferir resistência, retardando o decurso da lepra murina.

Devido à maior regularidade da evolução da lepra murina experimental, quando é utilizada a via intraperitoneal para a inoculação do bacilo (em comparação com a inoculação subcutânea)⁹, deve a referida via ser preferida em trabalhos desta natureza; os animais quando injetados com dose relativamente pequena de bacilos (com a finalidade de tornar mais lento o decurso da moléstia), permitem melhor observação, favorecendo a interpretação dos resultados. E' necessário, porém, o emprêgo da histologia, uma vez que as doses reduzidas geralmente não provocam lesões macroscópicas evidentes, inclusive 15 meses após a inoculação.

MATERIAL E MÉTODO

Em 50 ratos jovens, do sexo masculino, com pêso inicial entre 95,0 e 120,0 g e presumivelmente normais, injetou-se 0,1 ml de tuberculina a 1/10, via intradérmica; após as leituras de 24 e 48 horas, que foram negativas em todos os animais (*), foram êles divididos em 4 lotes e inoculados com suspensão de BCG em solução de cloreto de sódio a 0,85%.

Lote 1: — 13 ratos vacinados por via oral, com 5,0 mg de BCG; a vacinação foi repetida cada 10 dias por mais 4 vezes, perfazendo um total de 25,0 mg de bacilos; o BCG foi introduzido diretamente no estômago, por meio de sonda de borracha.

Lote 2: — 12 ratos vacinados por via oral, com 5,0 mg de BCG; a introdução foi efetuada por sonda.

Lote 3: — 12 ratos injetados por via intramuscular, com 5,0 mg de BCG.

Lote 4: — 13 ratos não vacinados com BCG (contrôles).

Os animais dos 4 lotes foram inoculados por via intraperitoneal, 90 dias após completada a vacinação, com 2,0 ml de uma suspensão de *M. lepraemurium* contendo aproximadamente 0,03 mg de bacilos; a inoculação foi efetuada em duas doses de aproximadamente 0,015 mg, com intervalo de 7 dias. A dose inoculada (miligramas de bacilos) foi determinada segundo método descrito em outro trabalho ⁶.

(*) Deve ser assinalado que o rato reage negativamente à tuberculina, injetada intradérmicamente, mesmo quando portador de tuberculose evolutiva.

Desde o início da experimentação até o seu término (150 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*), fez-se o registro ponderal dos animais dos quatro lotes, sendo a pesagem efetuada cada 30 dias até o 210º dia e cada 60 dias até o 450º dia; tomou-se como termo de comparação o peso médio de cada lote, corrigido para a base 100 no início da experimentação. O peso médio absoluto dos lotes era, nessa época, bastante próximo, porém, não idêntico (ver quadro 1).

Dias de evolução antes da inoculação do <i>M. lepraemurium</i>	Peso médio dos ratos							
	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4	
	Nº relativo	Nº absoluto	Nº relativo	Nº absoluto	Nº relativo	Nº absoluto	Nº relativo	Nº absoluto
0	100	110	100	111	100	106	100	104
30	184	168	187	169	164	155	166	160
60	217	198	230	207	229	216	229	221
90	253	231	262	236	254	240	258	249
Dias de evolução após inoculação do <i>M. lepraemurium</i>								
30	264	240	277	250	274	259	281	271
60	255	232	303	273	274	259	290	280
90	274	250	290	261	296	279	312	301
120	250	228	289	260	298	281	309	298
150	265	241	307	277	315	297	320	309
180	268	244	309	279	341	322	333	321
210	280	255	300	270	357	337	300	289
270	284	259	292	263	375	354	368	355
330	290	264	305	275	375	354	365	352
390	325	296	330	297	393	371	400	386
450	348	317	364	338	390	368	385	372

Quadro 1 — Registro ponderal; peso inicial corrigido para base 100. Comparação entre ratos vacinados e não vacinados pelo BCG.

Sacrificou-se um animal de cada lote cada 30 dias até o 210º dia e cada 60 dias até o 450º dia de evolução da moléstia, data em que foi encerrada a experimentação, tendo sido sacrificados todos os animais restantes. Todos os ratos foram necropsiados e estudados macro e microscópicamente; o material foi fixado em solução de formol a 10,0%, incluído em parafina e corado pela HE e Ziehl-Neelsen modificado.

RESULTADOS

O acréscimo ponderal médio verificado nos quatro lotes (observado pelos valores expostos no quadro 1 e projetados no gráfico correspondente) revela discretas diferenças. Aparentemente os animais do lote 3 (vacinados com 5,0 mg de BCG por via intramuscular) e do lote 4 (não vacinados com BCG), apresentam valores médios mais elevados, em comparação com os do lote 1 (vacinados com 25,0 mg de BCG, por via oral) e do lote 2 (vacinados com 5,0 mg de BCG, via oral). Essa diferença é apenas aparente e, em parte, proporcionada pela desigualdade do pêso absoluto inicial dos quatro lotes, o qual é bastante aproximado sem ser idêntico. Deve-se, além disso, considerar que nos períodos mais próximos ao final da experimentação é progressivamente menor o número de animais de cada lote e, portanto, maior o erro do pêso médio obtido.

Feitas essas considerações, pode ser admitido que as curvas ponderais dos quatro lotes, comparadas entre si, não apresentam diferenças significativas, o que, aliás, é comprovado estatisticamente (teste de X₂); isto é, a vacinação pelo BCG efetuada nas condições assinaladas, não exerce influência sôbre o desenvolvimento ponderal de ratos jovens, inoculados com aproximadamente 0,03 mg de *M. lepraemurium* por via intraperitoneal.

O estudo histopatológico das lesões e o decurso evolutivo da moléstia, durante o período estudado (450 dias), não evidenciam, também, diferenças de comportamento entre os animais dos quatro lotes. Tanto nos ratos vacinados com BCG como nos não vacinados (contrôles) a moléstia apresenta o mesmo decurso lento e as lesões são incipientes, microscópicas e localizadas principalmente nos gânglios linfáticos, grande epíploo, fígado e baço.

A injeção intraperitoneal da dose assinalada de *M. lepraemurium* produz (tanto nos ratos vacinados como nos não vacinados pelo BCG), 30 dias após a inoculação, algumas lesões leprosas de pequenas dimensões, não confluentes, geralmente, com aspecto histológico correspondente ao do período de estado, localizadas nos gânglios linfáticos mediastínicos e cervicais; as células leprosas contêm número relativamente pequeno de bacilos. No grande epíploo há lesões leprosas com os mesmos caracteres das ganglionares. Dos outros órgãos, apenas o fígado apresenta freqüentemente proliferação de células conjuntivas fixas, localizadas na adventícia vascular; porém, não são verificadas lesões com células leprosas.

No 60° dia que sucede A inoculação as lesões ganglionares e epiplóicas possuem a mesma intensidade que no 30° dia, mas algumas delas apresentam alterações involutivas de tipo inicial ²; os bacilos são menos numerosos e nem sempre morfológicamente íntegros. No fígado a proliferação de células adventíciais, com núcleo linfóide, é mais constante, verificando-se, além disso, entumescimento das células de Kupffer.

Entre o 60° e o 150° dia as lesões dos gânglios linfáticos e do grande epíploo são discretamente mais intensas, sendo, no entanto, maior o número de lesões com alterações involutivas (em geral de grau inicial ou médio) ; os bacilos são pouco numerosos e geralmente alterados morfológicamente. O fígado apresenta o mesmo quadro descrito aos 60 dias de evolução; raramente são verificadas, além disso, pequenas lesões leprosas juxtavasculares, contendo poucos bacilos. No baço podem ser assinaladas raras lesões leprosas paucibacilares.

No período compreendido entre o 150° e 270° dias, as lesões ganglionares e epiplóicas, em alguns casos, possuem o mesmo aspecto descrito anteriormente; outras vezes são mais intensas (maiores e mais numerosas), mais ricas em bacilos e possuem estrutura das lesões em período de estado. No fígado e no baço o quadro histopatológico é idêntico ao do período anterior, sendo apenas mais freqüentes as lesões hepáticas.

Entre o 270° e o 450° dia são mais freqüentemente encontradas lesões ativas nos gânglios linfáticos e no grande epíploo, as quais contêm numerosos bacilos;

porém, são também verificados casos cujas lesões se apresentam em involução e possuem raros bacilos alterados morfológicamente. As lesões hepáticas e esplênicas continuam incipientes (havendo raras exceções) e idênticas às observadas no período anterior.

Em resumo, a inoculação de 0,03 mg de *M. lepraemurium*, por via intraperitoneal, em ratos jovens, produz apenas lesões microscópicas localizadas especialmente em alguns gânglios linfáticos e no grande epíploo. As lesões evoluem com grande lentidão, parecendo haver certo "equilíbrio" entre os bacilos e os tecidos do hospedeiro. O referido "equilíbrio" mantém-se, em alguns casos, durante todo o decorrer da experimentação (450 dias); outras vezes há tendência à progressão e à intensificação das lesões, aumentando o número de bacilos; mais raramente as lesões tendem à regressão, sem no entanto desaparecerem completamente.

O estudo histológico revela que a vacinação prévia pelo BCG, executada como foi referido, não exerce influência favorável ou desfavorável, sobre a evolução das lesões da lepra murina e não aumenta o número de casos cuja moléstia tende à regressão. Nos ratos previamente injetados com BCG, tanto a intensidade como a morfologia e a evolução das lesões provocadas pelo *M. lepraemurium* não são influenciadas pela administração da forma atenuada do *M. tuberculosis*.

DISCUSSÃO

A vacinação prévia de ratos com 5,0 a 25,0 mg de BCG por via oral, ou com 5,0 mg por via intramuscular, efetuada 90 dias antes da inoculação da lepra murina, não interfere no desenvolvimento ponderal dos animais e não altera o ritmo evolutivo das lesões produzidas pela inoculação intraperitoneal de aproximadamente 0,03 mg de *M. lepraemurium*. Tanto nos animais vacinados como nos não vacinados (contrôles), as lesões são inicialmente discretas, localizadas principalmente nos gânglios linfáticos mediastínicos e cervicais e no grande epíploo. Nos períodos sucessivos as lesões evoluem lentamente, parecendo existir certo "equilíbrio" entre os bacilos e o hospedeiro; o decurso da moléstia é tórpico, o que favorece a experimentação no que se refere ao estudo da interferência do BCG na resistência à lepra murina.

O estudo histológico revela que a vacinação pelo BCG, não provoca alteração no ritmo evolutivo e na estrutura das lesões da lepra murina; é permitido supor que a vacinação prévia com a forma atenuada de *M. tuberculosis* não confere resistência ao rato, em face do *M. lepraemurium*. As lesões produzidas por pequena dose deste bacilo (inoculado na cavidade peritoneal) são idênticas e evoluem igualmente nos ratos vacinados com BCG e nos não vacinados. Os aspectos estruturais que correspondem às lesões em involução são verificados com a mesma freqüência e com igual intensidade, tanto nos animais vacinados como nos não vacinados.

As citadas alterações estruturais, que caracterizam as lesões em involução, não constituem modificação do tipo fundamental da estrutura das lesões; dependem, principalmente, de processos degenerativos que atingem a célula leprosa², deprimindo sua atividade funcional. A ausência de lise exibida pelo macrófago do rato normal, em face do *M. lepraemurium*³,

continua a ser observada após a vacinação com o BCG, a qual, portanto, não tem capacidade de dotar o macrófago de atividade lítica em relação ao bacilo referido.

Em resumo, a vacinação pelo BCG, nas doses e vias empregadas, não confere resistência ao rato inoculado experimentalmente com aproximadamente 0,03 mg de *M. lepraemurium* (por via peritoneal), demonstrável pelo método histológico. Êstes fatos estão em desacôrdo com o que fôra assinalado por Azulay ¹, o qual, no entanto, usou dose e via de inoculação diferentes para a vacinação com o BCG (*) .

Há aparente contradição entre o efeito da vacinação pelo BCG, no rato e no cobaio. Neste último a vacinação prévia com a forma atenuada do bacilo da tuberculose, altera a reatividade cutânea em face da lepromina, cuja alteração depende do desenvolvimento de hipersensibilidade cruzada e de provável resistência adquirida⁴. No cobaio previamente vacinado com BCG, portanto, a injeção intradérmica de lepromina produz reações mais intensas (com formação de nódulo evidente), devido ao desenvolvimento de co-sensibilização; além disso, há formação acelerada da lesão tuberculóide, a qual, provávelmente, depende do aumento da atividade lítica dos macrófagos, em relação ao *M. lepraemurium* ⁴. Ao contrário, com base nos resultados expostos, verifica-se que no rato a vacinação prévia pelo BCG não tem a propriedade de induzir atividade lítica ao macrófago, em face do mesmo bacilo; daí advêm a aparente contradição.

Em animais não submetidos à influência do BCG, a célula leprosa do rato é dotada de intensa função péxica e reduzida atividade enzimica, em oposição à célula epitelióide do cobaio, que possui reduzida função péxica e grande atividade enzimica ³. Portanto, o macrófago e a célula que dele se origina (sob a ação estimulante do *M. leprae* ou do *M. lepraemurium*, injetados nos tecidos), apresentam capacidades funcionais diversas, no rato no cobaio, o que impede a comparação entre as lesões produzidas por esses bacilos, nas duas espécies citadas. De modo idêntico, as células que constituem as lesões tuberculosas do rato não possuem o mesmo comportamento funcional que a célula epitelióide do cobaio ⁴; "a célula tuberculosa do rato" pode ser identificada com a "célula leprosa" do mesmo animal, quanto à morfologia, citogênese e, principalmente, quanto à sua atividade lítica.

A formação da "célula tuberculosa do rato" depende da ausência de destruição ativa das micobactérias pelos macrófagos; estes retêm os bacilos lagocitados e por isso sofrem transformações cito-morfológicas, originando-se a "célula tuberculosa". O processo é idêntico ao que ocorre com a formação da "célula leprosa" ³. Nas lesões provocadas pelo *M. leprae* ou pelo *M. tuberculosis*, em cobaios, os bacilos são destruídos ativamente pelos macrófagos, libertando produtos que suscitam a sua transformação na célula epitelióide ³.

(*) Em publicação mais recente Azulay confirma as observações anteriores (Rev. Brasil. Leprologia, 21:285, 1953).

A assinalada diversidade funcional do macrófago é responsável pela aparente discordância do efeito da vacinação pelo BCG, sobre a evolução de lesões suscitadas por micobactérias, nas duas espécies citadas.

SUMMARY

The peritoneal inoculation of *M. lepraemurium* in the rat produces generalized lesions and a disease which shows uniform evolution. The evolutive speed depends on the weight of inoculated bacilli. The inoculations of nearly 0.03 mg of *M. lepraemurium* provokes only histological lesions, which progress very slowly. This slow evolution permits the observation of the influence of previous mycobacterial vaccination upon the progress and the influence of the cytology of the lesions, allowing the study of the acquired resistance.

Fifty young rats were divided in 4 lots: 1) 13 rats vaccinated with 25 mg of BCG by oral route; 2) 12 rats vaccinated with 5 mg of BCG, by oral route; 3) 12 rats vaccinated with 5 mg of BCG, by intramuscular route; 4) 13 non vaccinated rats (controls).

All animals were inoculated 90 days after vaccination with a suspension containing approximately 0.03 mg of *M. lepraemurium* (by peritoneal route) and observed 450 days.

The gain of weight and the histological picture observed in vaccinated and control animals are identical; the disease shows the same evolution. The BCG vaccination does not suscite, in the rat, acquired resistance against *M. lepraemurium* demonstrable by histological methods. The lesions in the vaccinated and control groups reach the same intensity in the lymph nodes, liver and spleen, and show the same slow evolution. In the animals of both groups the lesions remain almost stationary (during the all observed time), or grow slowly and progressively, or more rarely undergo involution (without complete disappearing).

The histological method also shows that the macrophages of the normal rat have no ability to destroy the *M. lepraemurium*, *M. leprae* and *M. tuberculosis*; the BCG vaccination does not induce at the macrophages the aptitude to lyse these acid-fast bacilli. On the other hand, the macrophages of normal guinea pigs have the ability to lyse these mycobacteria; the BCG vaccination provokes in the guinea pig this physiological property. Because of this functional difference showed by the rat and the guinea pig macrophages, the lesions suscitated by mycobacteria are not comparable in these two animal species.

In consequence the action of previous BCG vaccination is also different and disagreeing in these animals; in the rat the BCG vaccination has no effect and does not alter the evolution of the lesions suscitated by *M. lepraemurium*; in the guinea pig the same vaccination modifies the evolution of the lesions produced by this bacillus.

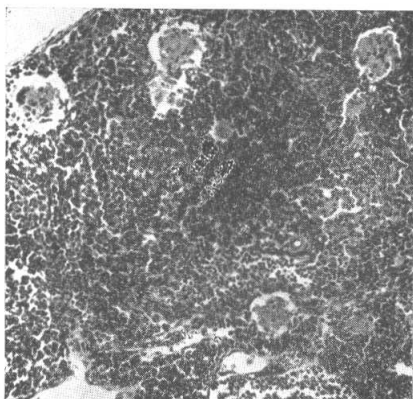
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1 — Azulay, It. D. — BCG e lepra. Bol. Serv. Nac. Lepra, 12:10, 1953.

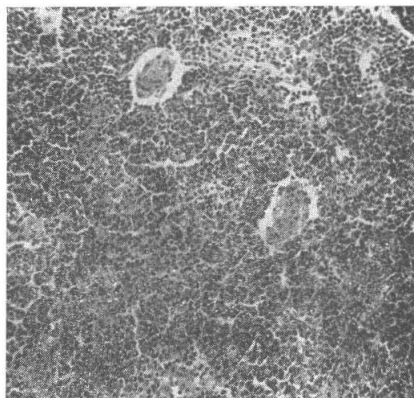
— Azulay, R. D. — O papel protetor do BCG na lepra. Bol. Serv. Nac. Lepra, 12:288, 1953.

2 — Hadler, W. A. — Estudo histológico das lesões de lepra murina em involução. Rev. Bras. Leprol., 19:75, 1951.

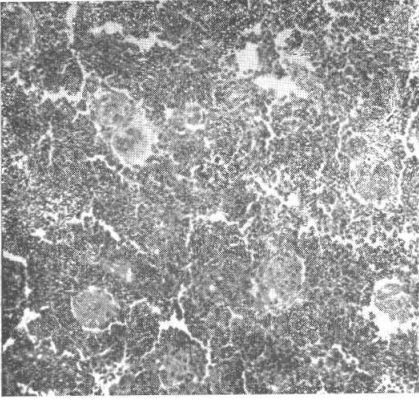
- 3 — Nadler, IV. A. Comportamento do cobaio e do rato, normais, injetados com "lepromina" por via intradérmica. Rev. Bras. Leprol., 21:165, 1953.
- 4 — Hadler, W. A. — 'Trabalho em publicação.
- 5 — Hadler, W. A. & Mauri, A. C. — Lepra murina: estudo patogênico-evolutivo no rato inoculado por via peritoneal. Rev. Bras. Leprol., 16:139, 1948.
- 6 — Hadler, W. A. & Ziti, L. M. — Estudo da sensibilidade tuberculínica em cobaios normais inoculados experimentalmente com *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis*. Rev. Bras. Leprol., 21:341, 1953.
- 7 — Markianos, J. — Recherches sur faction preventive, sur la lèpre des rats, de Tantigène de bacilles dégraissés. Bull. Soc. Path. Exot., 23:149, 1930.
- 8 — Mauri, A. C. & Hadler, W. A. — Ação dos colóides eletro-negativos sobre a evolução da lepra marina. Rev. Bras. Leprol., 18:155, 1950.
- 9 — Mauri, A. C., Hadler, W. A. & Carvalho, C. M. - Quimioterapia da lepra. 1 — Ação do 4,4'-diamino-difenil-sulfona na lepra murina. Rev. Bras. Leprol., 19:85, 1951.
- 10 — Valtis, J. & Markianos, J. — Influence du BCG sur la lèpre uterine. Compt. rend. Soc. Biol., 103:483, 1930.
- 11 — Watanabe, Y. — Experimental studies on animals concerning leprosy. VIII. On the influence of inoculation with heated emulsion of rat lepra tissue on the growth of rat leprosy. Kitasato Arch. Exper. Med., 14:125, 1937.
- 12 — Wherry, M. B. — Experiments on the vaccination against rat leprosy. J. Infect. His., 6:630, 1909.



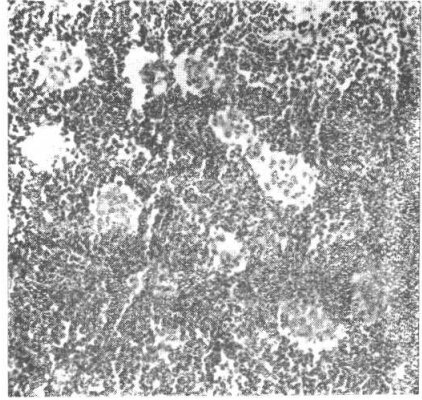
Fotomicrografia 1 — H.E.; 200x.; gânglio linfático. Rato vacinado com 25,0 mg de BCG, via oral. Lesões pequenas, não confluentes e em involução (grau médio), observadas 60 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*.



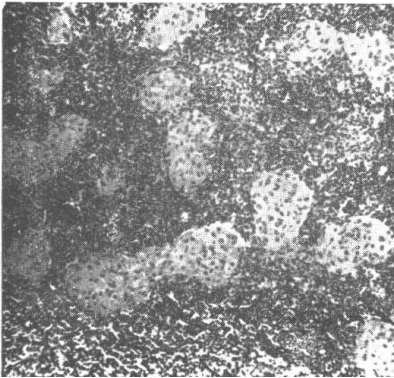
Fotomicrografia 2 — H.E.; 200x.; gânglio linfático. Rato não vacinado pelo BCG; 60 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*. Lesões comparáveis (no aspecto e na intensidade) As da foto anterior.



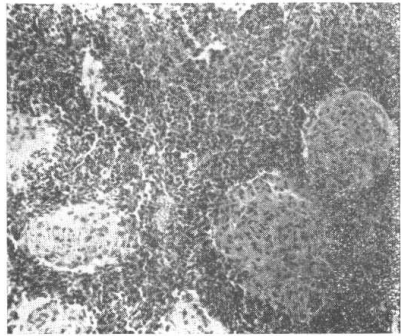
Fotomicrografia 3 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato vacinado com 25,0 mg de BCG, via oral. Lesões pequenas, não confluentes, em involução, verificadas 120 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*.



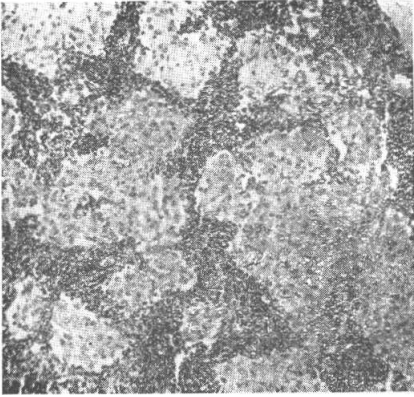
Fotomicrografia 4 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato não vacinado pelo BCG; 120 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*. Lesões comparáveis às da foto, anterior.



Fotomicrografia 5 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato vacinado com 5,0 mg de BCG, via intramuscular. Lesões pequenas, algumas confluentes; 330 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*.



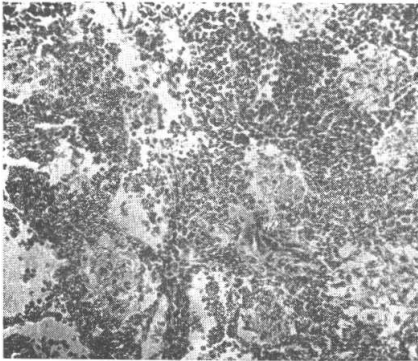
Fotomicrografia 6 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato não vacinado pelo BCG. Aspecto das lesões com 330 dias de evolução; comparar com a foto anterior.



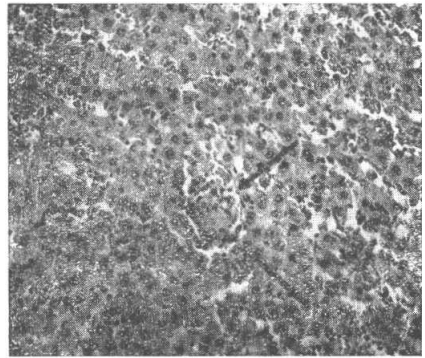
Fotomicrografia 7 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato vacinado com 5,0 mg de BCG, via intramuscular. Lesões pequenas, algumas confluentes; 450 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*.



Fotomicrografia 8 — H.E.; gânglio linfático. Rato não vacinado pelo BCG. Aspecto das lesões com 50 dias de evolução; comparar com a foto anterior.



Fotomicrografia 9 — H.E.; 200x; gânglio linfático. Rato não vacinado pelo BCG; 210 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*. Lesões em regressão avançada (tendência à cura espontânea da moléstia) aspecto idêntico é verificado em animais vacinados com BCG.



Fotomicrografia 10 — H.E.; 200x; fígado. Rato vacinado com 5,0 mg de BCG, via intramuscular. Lesões leprosas com esse aspecto são observadas tanto nos ratos vacinados como nos controles; 270 dias após a inoculação do *M. lepraemurium*.

