

REVISTA BRASILEIRA DE LEPROLOGIA

(2.ª Série da Revista de Leprologia de São Paulo)
ORGÃO OFICIAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE LEPROLOGIA
E DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEPROLOGIA

VOLUME 18

DEZEMBRO DE 1950

NÚMERO 4

AÇÃO DOS COLÓIDES ELECTRO-NEGATIVOS SOBRE A EVOLUÇÃO DA LEPRO MURINA

A. C. Mauri (*)

W. A. Hadler (*)

Desde a primitiva descrição da lepra murina as células leprosas do rato foram consideradas como elementos endoteliais, dado seu aspecto morfológico (Stefansky¹⁶). Esse conceito, confirmado pelos autores que posteriormente estudaram o assunto (Marchoux & Sorel⁹ e outros), foi ampliado com o emprêgo dos colóides electro-negativos, cuja capacidade de fixação sobre as células do S.R.E. é bem conhecida (função granulopéxica).

Oliver¹² e Henderson⁶ mostraram, com o auxílio do azul de tripan, que as células que fagocitam os bacilos da lepra murina são as mesmas que têm capacidade de captar os grânulos desse corante. Afanador¹, Lowe⁸, Pinkerton & Sellards¹³ e Linhares⁷ confirmaram os achados anteriores tendo o último autor verificado relação inversa entre o número de bacilos e o de grânulos captados pelas células.

Em trabalho anterior, Hadler & Mauri⁴, estudando a evolução da lepra murina, chamaram a atenção para o fato de que as lesões leprosas do rato formam-se principalmente nos órgãos ricos em S.R.E. e a partir dos elementos desse sistema; mesmo que possam ser encontrados bacilos em células não histiocitárias, seu número é sempre pequeno, não sobrevivendo a formação da verdadeira célula leprosa.

Uma vez que a patogenia da lepra murina acha-se em estreita relação com o S.R.E., julgamos interessante estudar a evolução dessa moléstia, em ratos cujo sistema histiocitário fôra anteriormente submetido à ação de colóides electro-negativos em doses variáveis, com a finalidade de obter-se "bloqueio", ou "estímulo", desse mesmo sistema (Pittaluga¹⁴).

(*) Dos laboratórios da Fundação Paulista Contra a Lepra e do "Serviço de Pesquisas Científica" do Departamento de Profilaxia da Lepra, Secção de Patologia Experimental, Instituto Conde de Lara, São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

Para esta experimentação foram usados 150 ratos das raças McCollum e Wistar, com 40-60 dias de idade e 60-80 gramas de peso, os quais foram divididos em 5 lotes (lotes A, B, C, D e E), de 30 animais cada.

Lote A — Injetados com azul de tripan (Tripan Blau Grübler), em suspensão aquosa a 1%, preparada no momento do uso, segundo a técnica de McClung ⁸; injetou-se 1 ml. da suspensão diariamente, por via peritoneal, durante os 6 primeiros dias, e cada 3 dias até o final da observação. O corante injetado nesta dosagem tem ação "bloqueante" sobre o S.R.E. do rato.

Lote B — Injetados com azul de tripan em suspensão aquosa a 0,02%, preparada segundo a mesma técnica; injetou-se 1 ml. da suspensão por via peritoneal, cada 2 dias nos primeiros 8 dias e cada 5 dias até o final da observação. A dosagem empregada teve por finalidade determinar o "estímulo" (ou "excitação") do S.R.E. do rato.

Lote C — Injetados com suspensão coloidal de partículas de carvão, preparada segundo recomenda McClung ⁸, a partir da tinta Higgens diluída a 1:1 em água destilada; injetou-se 1 ml. da suspensão, por via peritoneal, diariamente durante os 6 primeiros dias e cada 3 dias até o final da experimentação. Essa dosagem tem ação "bloqueante".

Lote D — Injetados também com tinta Higgens, porém diluída a 1:50 em água destilada; injetou-se 1 ml., por via peritoneal, cada 2 dias nos primeiros 8 dias e posteriormente cada 5 dias, com a finalidade de obter-se "estímulo" do S.R.E.

Lote E — Grupo de animais não injetados com suspensões coloidais, servindo para controle.

Todos os animais pertencentes aos 5 lotes acima foram, no mesmo dia, inoculados por via peritoneal com 0,5 ml. de uma mesma suspensão de *M. leprae muris*, preparada segundo Hadler & Mauri ⁴; a inoculação dos animais dos lotes A, B, C e D foi feita 8 dias após o início da administração das suspensões coloidais.

Um animal de cada lote foi sacrificado diariamente a partir do primeiro dia que sucedeu à inoculação bacilar, até o 10.º dia; posteriormente, foram sacrificados cada 5 dias até o 30.º dia e cada 10 dias daí por diante, até o final da observação (6 meses).

Constituiu finalidade deste trabalho o estudo da evolução da lepra murina em ratos cujo sistema histiocitário fôra anteriormente "bloqueado", ou "estimulado". Com essa orientação, os animais foram observados sob ponto de vista anátomo-patológico e bacterioscópico, comparando-se os achados dos lotes A e C ("bloqueio"), com os dos lotes B e D ("estímulo") e com os do lote E (controle).

Para os preparados histológicos empregou-se: o método de Ziehl-Neelsen modificado por Faraco ³, a hematoxilina-eosina e a simples coloração de fundo pelo lítio-carmim.

RESULTADOS

Analisaremos antes os resultados obtidos nos animais que receberam dose "bloqueante" (lotes A e C) e, depois, nos que receberam dose "estimulante" (lotes B e D), sempre confrontando-se os achados com os animais controles (lote E).

Lotes A e C — O "bloqueio" do S.R.E., de uma maneira geral, retarda a evolução da lepra murina principalmente nos três primeiros meses de evolução. O retardamento do ritmo de evolução é diretamente proporcional à intensidade do "bloqueio".

A observação dos animais dos lotes A e C, comparados com os controles, demonstra que a ação do "bloqueio" manifesta-se desde os primeiros dias que sucedem à inoculação da carga bacilar.

Nos animais controles, os bacilos introduzidos na cavidade peritoneal atingem, em grande parte, as vias linfáticas, sendo retidos nos gânglios retroperitoneais e mediastinais. No primeiro dia que sucede à inoculação observa-se proliferação e mobilização das células endoteliais do seio marginal, as quais são observadas contendo bacilos no citoplasma. Tanto a proliferação, como a mobilização e a fagocitose são mais nitidas no 3.º ou 4.º dia após a inoculação, ocasião em que se originam os primeiros infiltrados leproso ganglionares; os seios radiais passam a ser invadidos após o 4.º-5.º dia. Por volta do 6.º-8.º dia delimitam-se os primeiros nódulos leproso nas áreas atingidas.

Nos animais injetados com doses elevadas de colóides electro-negativos (no sentido de obter-se "inibição funcional" do S.R.E.), os bacilos inoculados por via peritoneal são retidos com dificuldade nos gânglios linfáticos regionais, porquanto, as células do seio marginal, e dos seios radiais acham-se carregadas de grânulos, desempenhando pequena atividade fagocitária; em relação ao *M. leprae muris*, portanto, o aspecto é diferente do observado nos animais controles, caracterizando-se pelo número bem menor de bacilos nas células endoteliais. A proliferação retículo-endotelial nos animais dos lotes A, C e E é comparável em intensidade, porém, é mais difusa nos animais "bloqueados", demonstrando relacionar-se, principalmente, aos efeitos do colóide. Os infiltrados leproso são mais tardios (5.º-7.º dia); os primeiros nódulos formam-se após o 10.º dia que sucede à inoculação. têm menor tendência à delimitação e são menos ricos em bacilos que nos animais controles.

A observação histológica demonstra, nos animais "bloqueados" e nos controles, nódulos histiocitários localizados principalmente na camada cortical dos gânglios linfáticos regionais, distinguíveis entre si, apenas por detalhes microscópicos. A proliferação histiocitária é semelhante nos dois grupos, tanto no que se relaciona à intensidade como na morfologia das células que os constituem. Porém, a distinção se faz em virtude da presença de grande número de grânulos de corante e pequeno número de bacilos, nos animais "bloqueados", e grande número de bacilos nos controles.

Esse fato demonstra que a proliferação histiocitária nos animais "bloqueados" está relacionada tanto com os bacilos como com os grânulos de corante.

O "bloqueio" dificulta a evolução da lepra murina, retardando a formação e desenvolvimento das lesões histológicas principalmente durante os três primeiros meses de evolução da moléstia, sendo êsse efeito mais nítido entre o 45.º e o 75.º dias após a inoculação. Nessa época, as lesões observadas nos animais "bloqueados" são menos numerosas, menos extensas, não confluentes e menos ricas em bacilos, em relação aos animais contrôles; êsse fato pode ser verificado comparando-se as fotomicrografias que ilustram o texto.

Com a evolução da moléstia, o número de bacilos nas lesões dos animais "bloqueados" aumenta lentamente, em oposição ao que ocorre com os animais contrôles. Idêntico comportamento observa-se nos outros órgãos cujas lesões da lepra murina são freqüentes.

A ação retardadora do "bloqueio" sôbre o ritmo de evolução da moléstia, torna-se menos nítida após o 3.º mês de evolução e por volta do 5.º mês desaparece praticamente; daí por diante as lesões dos animais "bloqueados" comparam-se com as dos animais contrôles.

Em resumo, o emprêgo de doses elevadas de colóides electro-negativos retarda a evolução da lepra murina, mas não paralisa a progressão da moléstia; em outras palavras, os animais cujo S.R.E. tenha sido "funcionalmente inibido" ("bloqueado"), quando inoculados com o *M. leprae muris*, apresentam evolução lenta das lesões e retardamento da disseminação da moléstia.

Os resultados expostos são idênticos empregando-se azul de tripan, ou suspensão de partículas de carvão.

Lotes B e D — O emprêgo de pequenas doses de suspensões coloidais, cuja finalidade é obter-se o "estímulo funcional" do S.R.E., acelera a evolução da lepra murina, ao contrário do que se observa quando são empregadas doses fortes.

Desde os primeiros dias que sucedem à inoculação, o ritmo evolutivo das lesões, nos gânglios linfáticos regionais, é mais rápida que nos animais contrôles. Os bacilos que atingem os gânglios regionais são fâcilmente fagocitados pelas células endoteliais do seio marginal e dos seios radiais, as quais apresentam-se proliferadas em virtude da ação das partículas coloidais injetadas. A proliferação das células do sistema histiocitário, cuja atividade fagocitária é normal, contribue para a formação de infiltrados leprosoz mais precoces (2.º - 3.º dia), em maior número e mais exuberantes que nos animais contrôles; a invasão ganglionar pelas lesões se processa em ritmo acelerado, de modo que, em pouco tempo, o órgão mostra-se quase totalmente tomado pelo processo. Histologicamente, o aspecto das lesões é difuso desde o início, havendo menor tendência à delimitação de nódulos que nos animais contrôles.

Em relação a outros órgãos ricos em S.R.E. ("fígado, baço, medula óssea, etc.), observa-se que o "estímulo funcional" dêsse sistema age sempre no mesmo sentido, isto é, acelera a evolução das lesões. O exame histopatológico de animais que recebem doses pequenas de colóides electro-negativos, praticado 60 dias após a inoculação, mostra lesões exuberantes, com-

paráveis em extensão e riqueza bacilar aos animais contrôles com 120 dias de evolução; as fotomicrografias demonstram esse fato.

Após o 3.º mês a aceleração do ritmo de evolução das lesões torna-se progressivamente menos evidente, até que por volta do 5.º mês deixa praticamente de existir.

Em resumo, nos animais em que se provocou "estímulo" do S.R.E., as lesões são mais precoces, têm evolução mais rápida e a quantidade de bacilos é sensivelmente maior, em relação aos animais contrôles.

DISCUSSÃO

As injeções repetidas de colóides electro-negativos determinam aumento do número de elementos diferenciados do S.R.E., tanto pela multiplicação dos histiocitos em função granulopéxica, como pelo "estímulo" que exercem sobre as células indiferenciadas; a proliferação histiocitária pode, em certos casos, dar origem a nódulos com aspecto granulomatoso. A granulopexia e a proliferação são fenômenos concomitantes.

Quando são empregadas suspensões muito concentradas, a captação sobrepuja a proliferação, originando-se o "bloqueio", com inibição funcional do sistema histiocitário. Ao contrário, empregando-se pequenas doses de suspensões pouco concentradas, a proliferação assume papel predominante, havendo "estímulo funcional".

Como o S.R.E. desempenha papel de relêvo nas funções de defesa, em parte pela capacidade de fagocitose, é claro que a introdução maciça de um colóide electro-negativo irá, perturbando a função fagocitária, influir sobre a resistência do organismo em face às infecções. Realmente, toda vez que se "bloqueia" o S.R.E. de um animal e após isso inocula-se determinado agente patogênico, a moléstia evolue mais rapidamente e assume maior gravidade; esse fato é de observação geral.

A análise dos resultados expostos neste trabalho demonstra que, em relação à lepra murina, não se observa esse comportamento, uma vez que o "bloqueio" apresenta ação retardadora sobre a evolução da moléstia ao contrário do "estímulo" do S.R.E.

Como vimos, a injeção de suspensões concentradas de partículas coloidais electro-negativas retarda, sensivelmente, a evolução da lepra murina; as lesões leprosas são pouco numerosas, apresentam menores dimensões evoluem lentamente e contêm bacilos em menor quantidade que nos animais contrôles. Por outro lado, a introdução de suspensões diluídas determina evolução mais acelerada da moléstia, formando-se nódulos leprosos de grandes dimensões em vários órgãos; a tendência da lepra murina é evoluir com maior rapidez que nos animais contrôles.

Esses fatos, que à primeira vista parecem paradoxais, comparados com o que se passa com a generalidade das moléstias microbianas, estão relacionados a particularidades patogênicas e a exigências biológicas do *Mycobacterium leprae muris*.

Constitue observação corrente que uma célula do sistema reticular, fortemente carregada de grânulos de um determinado colóide electro-negativo, dificilmente capta grânulos de outra suspensão coloidal, mesmo que a con-

centração hemática desta última seja elevada; quando há captação o novo colóide deposita-se em tórno dos grânulos do primeiro.

Por outro lado, a granulopexia (ou atrocitose) e a fagocitose são idênticas na primeira fase (fase de adsorção à superfície celular); em relação às fases subseqüentes, as opiniões variam, havendo autores que consideram os dois fenômenos distintos (Mollendorf ¹¹), enquanto outros os identificam (De Hann ², Seemann ¹⁵). A semelhança entre a atrocitose e a fagocitose é admitida por todos, sendo considerados fenômenos correlatos.

Em relação à lepra murina, a influência da atividade granulopéxica sobre a captação dos bacilos pelas células histiocitárias é evidente. Estudos citológicos demonstram que, quando as células do sistema histiocitário encontram-se carregadas de grânulos, possuem menor capacidade de captação em relação ao *M. leprae muris*; a ação do "bloqueio" é facilmente observada nos preparados histológicos, onde se nota uma relação inversa entre o número de bacilos e o de grânulos captados, como, aliás, verificou Linhares'. As observações de Oliver ¹², Henderson ⁶ e Linhares ⁷ evidenciam que a grande célula leprosa, cujo citoplasma está carregado de bacilos e cujo núcleo geralmente é picnótico e deslocado para a periferia, tem reduzida ação captadora sobre as partículas coloidais electro-negativas. Nossos achados demonstram que, nos animais "bloqueados", à medida que os bacilos de Stefansky conseguem penetrar no interior das células e que seu número aumenta, por reprodução, a atividade granulopéxica dessas células diminui progressivamente, apesar das injeções repetidas do colóide. Como conseqüência, à medida que evolue a infecção leprótica, é cada vez menor a influência de partículas coloidais cuja captação pelas células histiocitárias diminui progressivamente. Uma vez que a ação inibidora sobre a evolução das lesões é limitada no tempo, o emprêgo das suspensões coloidais concentradas, em doses elevadas, não apresenta possibilidades de aplicação terapêutica.

A análise dos fatos expostos evidencia: 1) a captação intensa de partículas coloidais pelas células do sistema histiocitário, diminuindo a função granulopéxica e a atividade fagocitária, tem ação frenadora sobre a evolução da lepra murina; esse comportamento está relacionado com a "inibição funcional" do S.R.E.; 2) a captação reduzida de partículas coloidais electro-negativas determina "estímulo funcional" do sistema histiocitário, acompanhado de proliferação celular, cujas células, individualmente, continuam a possuir capacidade granulopéxica e de fagocitose normais; em tais circunstâncias há exuberância na evolução da moléstia.

Êsses fatos são concordes com a observação de Hanks ⁵ que, empregando suspensão de partículas de carvão, verificou influência favorável das mesmas sobre o desenvolvimento dos lepromas subcutâneos de ratos, nos primeiros estadios.

Como se pode verificar, a fagocitose bacilar, ao contrário do que se observa em outras moléstias, não tem influência favorável na defesa contra a lepra murina, sendo mesmo necessária à evolução normal da moléstia. Êstes fatos só podem ser explicados admitindo-se que o bacilo de Stefansky possua capacidade normal de reprodução, apenas após ter sido fa-

gocitado pelas células histiocitárias, o que evidenciaria uma verdadeira dependência do bacilo à célula; em outras palavras, o bacilo exigiria o citoplasma celular para na reprodução normal. O "bloqueio" do S.R.E. (determinando redução da atividade fagocitária) e o "estímulo" do sistema reticular (que condiciona aumento dessa mesma função) teriam influência indireta sobre a multiplicação bacilar.

A bacteriemia nos ratos com o S.R.E. "bloqueado" tem a mesma intensidade e a mesma duração, que nos animais do grupo controle; a diminuição da capacidade de fagocitose do sistema histiocitário, nos animais "bloqueados", deveria determinar grande bacteriemia se o *M. leprae muris* tivesse reprodução extra-celular normal. Tudo faz crer, portanto, que o *M. leprae muris* apresente um parasitismo estrito às células do S.R.E.; o "bloqueio" desse sistema além de determinar diminuição da função fagocitária inibiria, indiretamente, a reprodução bacilar. Não queremos, no entanto, afastar completamente a possibilidade de reprodução extra-celular, a qual, porém, teria papel secundário.

Devido à diminuição da atividade fagocitária dos histiocitos e à diminuição da capacidade de reprodução, o "bloqueio" age como retardador da evolução da lepra murina. Ao contrário, o "estímulo" do sistema histiocitário, devido à proliferação celular e à maior capacidade de fagocitose, facilita a reprodução bacilar e, por conseguinte, a evolução da moléstia.

RESUMO

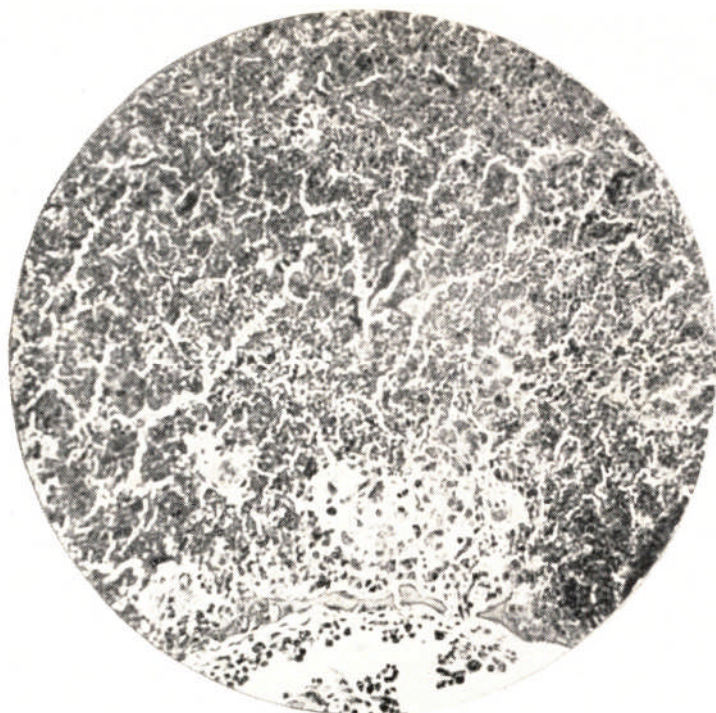
Os AA. estudaram a evolução da lepra murina em ratos experimentalmente inoculados, aos quais administraram previamente suspensões de partículas coloidais de "azul tripan" e carvão em doses variáveis, no sentido de obter "bloqueio" ou "estímulo funcional" do sistema retículo-endotelial.

O estudo comparativo dos resultados obtidos com os animais que receberam "dose bloqueante", em confronto com os que receberam "dose estimulante" e com os respectivos animais contrôles, evidenciou que o emprego de doses elevadas de colóides electro-negativos ("dose bloqueante") retarda a evolução da lepra murina, mas não paralisa a evolução da moléstia; em outras palavras, os animais cujo S.R.E. tenha sido "funcionalmente inibido" ("bloqueado"), quando inoculados com o *Mycobacterium leprae muris*, apresentam evolução lenta das lesões e retardamento da disseminação da moléstia.

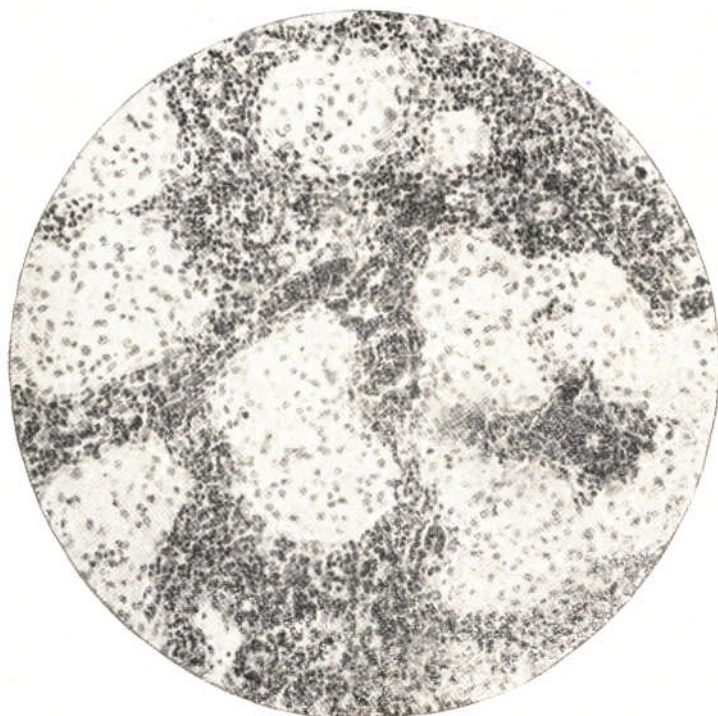
Nos animais em que se provocou o "estímulo" do S.R.E., as lesões são mais precoces, mais extensas, têm evolução mais rápida e a quantidade de bacilos é sensivelmente maior, em relação aos animais contrôles.

Esses fatos poderiam ser explicados pela correlação entre fagocitose e reprodução endocelular dos bacilos.

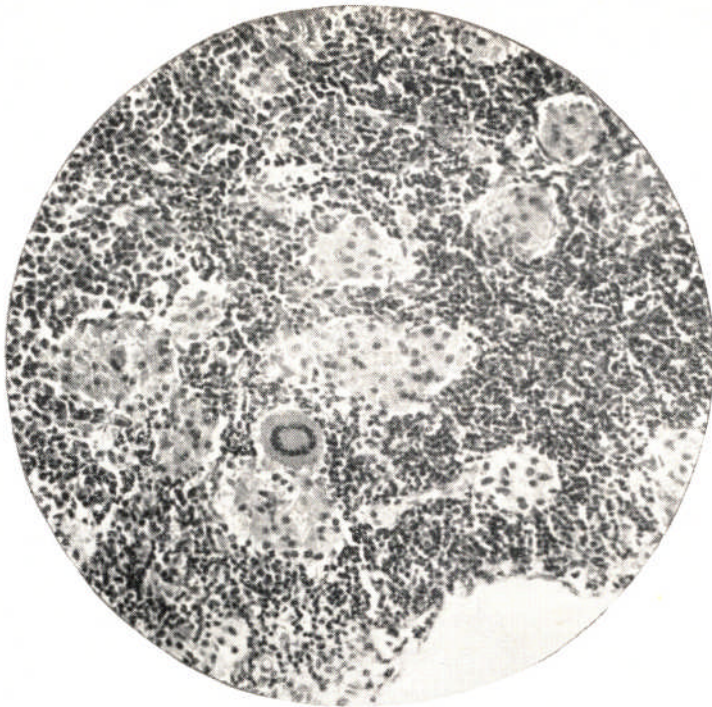
Devido à diminuição da atividade fagocitária dos histiocitos, a qual condicionaria diminuição da capacidade de reprodução bacilar, o "bloqueio" age como retardador da evolução da lepra murina. Ao contrário, o "estímulo" do sistema histiocitário, devido à proliferação celular que condiciona maior capacidade de fagocitose, facilitaria a reprodução bacilar e, por consequência, a evolução da moléstia.



Fotomicrografia N.º 1



Fotomicrografia N.º 2



Fotomicrografia N.º 3

Fotomicrografias n.ºs 1, 2 e 3. Cortes histológicos de gânglios linfáticos de animais inoculados há 30 dias; comparar a diferença de intensidade das lesões. Coloração H.E. Aumento: 200 x

Photomicrographs ns. 1, 2 and 3. Lymph node histological sections corresponding to animals 30 days after inoculation; compare different intensity of lesions. All of them was stained by the hematoxylin-eosin method; 200 X magnifications.

N.º 1. Rato 251: "Bloqueio do S.R.E. — Nódulo cortical constituído por células histiocitárias (lesão pauci-bacilar); notar na zona medular áreas com granulopexia intensa.

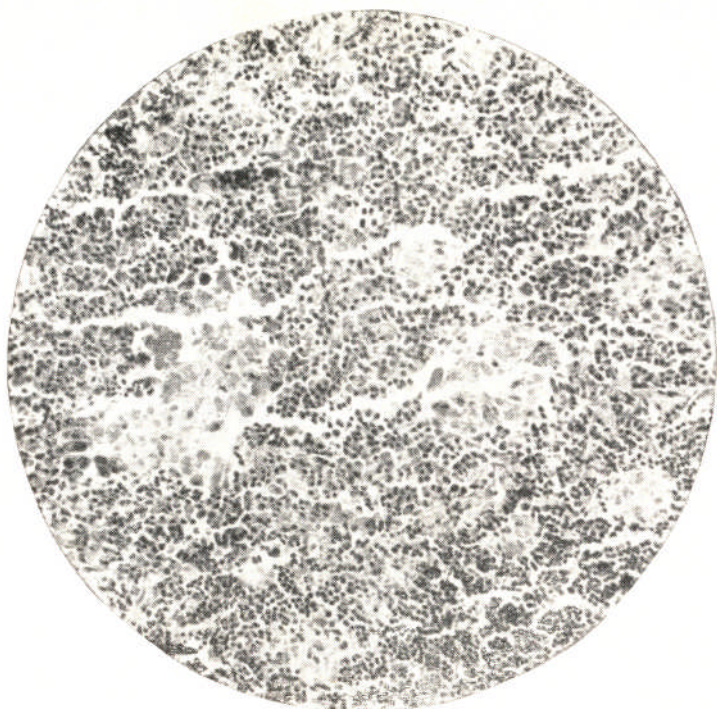
Rat 251: "*Blockade*" reticulo-endothelial system. Cortical nodule constituted by histiocytary cells (containing few bacilli) ; note areas in the medular zone with intense granulopexy.

N.º 2. Rato 202: "*Estímulo*" do S.R.E. — Numerosos nódulos constituídos por células histiocitárias (lesões ricas em bacilos).

Rat 202: "*Stimulated*" reticulo-endothelial system. Numerous nodules constituted by histiocytary cells (lesions rich in bacilli).

N.º 3. Rato 327: *Contrôle*. Nódulos lepróticos na evolução natural da moléstia aos 30 dias.

Rat 327: *Control*. Leprous nodules in the normal evolution of the disease on the 30th day.



Fotomicrografia N.º 4



Fotomicrografia N.º 5



Fotomicrografia N.º 6

Fotomicrografias n.ºs 4, 5 e 6. Cortes histológicos de gânglios linfáticos de animais inoculados há 70 dias; comparar a diferença de intensidade das lesões. Coloração H.E. Aumento: 200 x.

Photomicrographies ns. 4, 5 and 6. Lymph node histological sections corresponding to animals 70 days after inoculation; compare different intensity of lesions. All of them was stained by the hematoxylin-eosin method; 200 x magnification.

N.º 4. Rato 288: "*Bloqueio*" do S.R.E. Pequenos nódulos cujas células apresentam nitida atividade granulopéxica (pequeno número de bacilos nas lesões).

Rat 288: "*Blockade*" reticulo-endothelial systems. little nodules which cells show intense granulopetic activity (sonic bacilli in the lesions).

N.º 5. Rato 232: "*Estímulo*" do S.R.E. Numerosos nódulos confluentes (grande quantidade de bacilos).

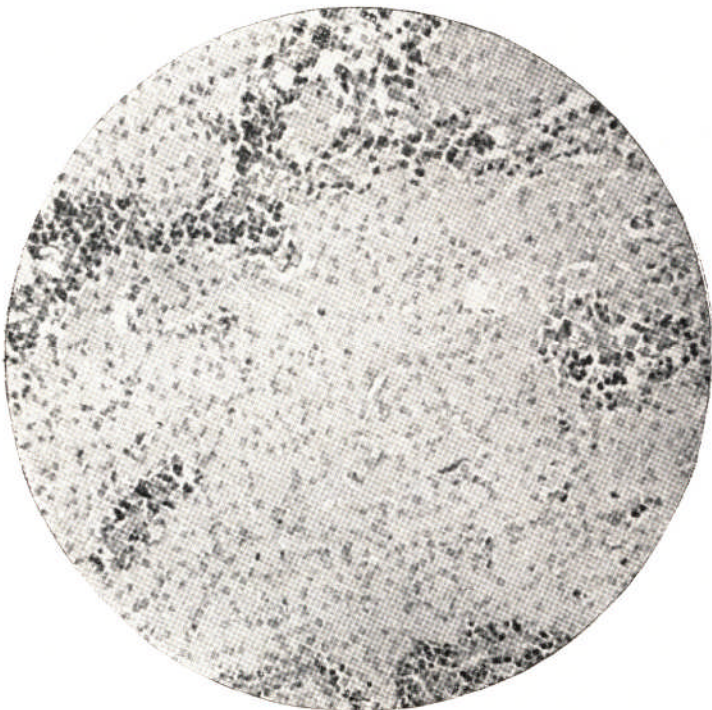
Rat 232: "*Stimulated*" reticulo-endothelial system. Numerous and confluent nodules (lesions very rich in bacilli).

N.º 6. Rato 144: *Contrôle*. Aspecto das lesões na evolução natural da moléstia aos 70 dias.

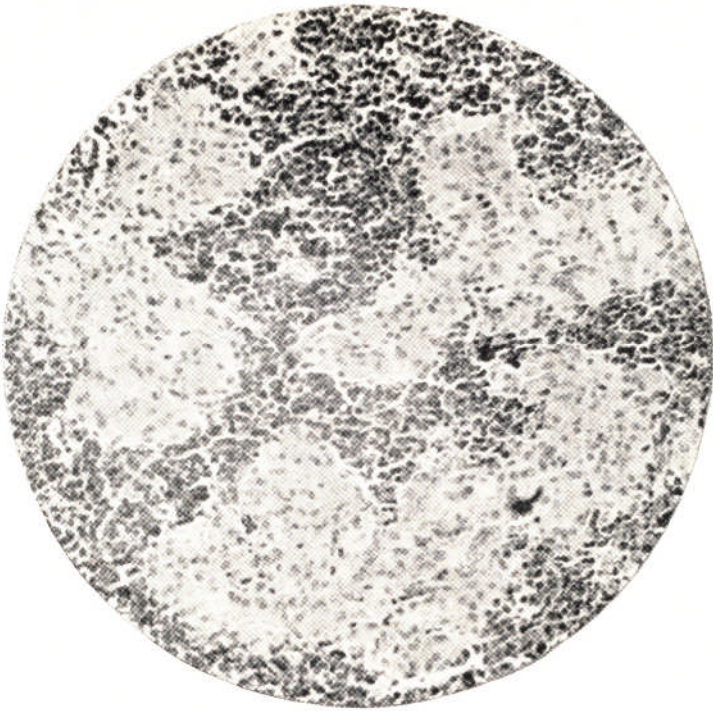
Rat 144: *Control*. Lesions in the normal evolution of the disease on the 70th day.



Fotomicrografia N.º 7



Fotomicrografia N.º 8



Fotomicrografia N.º 9

Fotomicrografias n.ºs 7, 8 e 9. Cortes histológicos de gânglios linfáticos de animais inoculados há 100 dias; comparar a diferença de intensidade das lesões. Coloração H.E. Aumento: 200 X.

Photomicrographies ns. 7, 8 and 9. Lymph node histological sections corresponding to animals 100 days after inoculation; compare different intensity of lesions. All of them was stained by the hematoxylin-eosin method; 200 X magnifications.

N.º 7. Rato 193: "*Bloqueio*" do S.R.E. Nódulos pequenos e mal delimitados.

Rat 193: "*Blockade*" reticulo-endothelial system. A few leptotic nodules not delimited at all.

N.º 8. Rato 261: "*Estímulo*" do S.R.E. Nódulos coalescentes abrangendo grandes áreas do tecido linfóide.

Rat 261: "*Stimulated*" reticulo-endothelial system. Confluent leptotic nodules; note the great reduction of the lymphoid tissue.

N.º 9. Rato 310: *Contrôle*. Nódulos lepróticos na evolução natural da moléstia aos 100 dias.

Rat 310: *Control*. Leptotic nodules in the normal evolution of the disease on the 100th day.

THE EFFECT OF ELECTRONEGATIVE COLLOIDS ON THE DEVELOPMENT OF MURINE LEPROSY

The leprosy cells of rat leprosy according to their morphologic aspect have been considered as endothelial elements since the first description of the disease (Stefansky ¹⁶). Subsequently this conception was studied by Marchoux & Sorel ⁹, and amplified by means of electronegative colloids which are known to be capable of fixing upon the cells of the reticulo-endothelial system (granular storage of colloids). Oliver ¹² and Henderson ⁶ employing the trypan blue showed that the cells which phagocytize the murine leprosy bacilli are the same which have the capability of holding the stain granules. Afanador ¹, Lowe ⁸, Pinkerton & Sellards ¹³ and Linhares confirmed the anterior findings, and inverse relation between the number of bacilli and the storage granules being verified by the latter.

In a former work on the evolution of murine leprosy Hadler & Mauri ⁴ have drawn attention to the fact that leprosy cells of rats are chiefly formed in organs enriched with reticulo-endothelial system cells, and from the elements of this system. Even when bacilli are found in non-histiocytary cells they are always so small in number that the real leprosy cell is not formed.

Since there is a close relationship between the pathology of murine leprosy and the reticulo-endothelial system, we have thought it of interest to study the evolution of this disease in rats, in which, the histiocytary system was formerly submitted to the action of changeable doses of electronegative colloids, having in mind to obtain the "blockade" or "stimulation" of this system (Pittaluga ¹⁴)

MATERIAL AND METHOD

One hundred and fifty Mc Collum and Wistar rats from 40-60 days of age and weighing from 60-80 grams were used in this experiment. They were divided into 5 groups (A B C —D — E), each grouping 30 animals.

Group A: According the McClung ⁸ technic this group was injected with trypan blue (Trypan Blau Grübler) in 1% aqueous suspension prepared at the moment of usage. Doses of 1 ml. were daily injected through the peritoneal via during the first 6 days and subsequently every 3 days up to the end of the observation. This dosage has a "blocking" action upon the reticulo-endothelial system.

Group B: Following the same technique this group was injected with trypan blue in an aqueous suspension of 0,02%. Doses of 1 ml. were injected through the peritoneal via every 2 days for the first 8 days, and then every 5 days till the end of the observation. This dosage was employed to determine the "stimulation" (or "excitation") of the reticulo-endothelial system.

Group C: According to McClung's ⁸ technic the animals were injected with colloidal suspension of coal particles from Higgins ink diluted to 1:1 in water. Doses of 1 ml. were daily injected through the peritoneal via during the first 6 days and subsequently every 3 days up to the end of the experiment. This dosage has a "blocking" action.

Group D: Also injected with Higgins ink, but diluted to 1:50 in water to determine the "stimulation" of the reticulo-endothelial system. One ml. was injected through the peritoneal via every 2 days during the first 8 days, and subsequently every 5 days.

Group E: A group of controls non-injected with colloidal suspensions.

On the same day, all animals of these 5 groups received through the peritoneal via 0,5 ml. of a same suspension of *Mycobacterium leprae muris* prepared according to Hadler & Mauri ⁴. The inoculation of the groups A, B, C, and D were performed in 8 days after the beginning of the administration of the colloidal suspensions.

From the first day of bacillar inoculation up to the tenth day one animal of each group was killed. Subsequently they were killed every 5 days up to the 30th day and then every 10 days till the end of the observation (6 months).

The purpose of this experiment was to study the evolution of marine leprosy in rats of which the reticulo-endothelial system had been "blockade" or "stimulated" before.

Following this conception the animals were observed on the bacterioscopic and histological point of view comparing the findings of Groups A and C ("blockade") with those B and D ("stimulation") and those of Group E (control).

The Ziehl-Neelsen method modified by Faraco ³, the hematoxylin-eosin, and the "back" coloration by the lithium carmine, were employed to stain the histologic sections.

RESULTS

First we will analyse the results of those animals which received a "blocked" dose (Groups A and C) and then those that received a "stimulating" dose (Groups B and D) always checking these results to the controls (Group E).

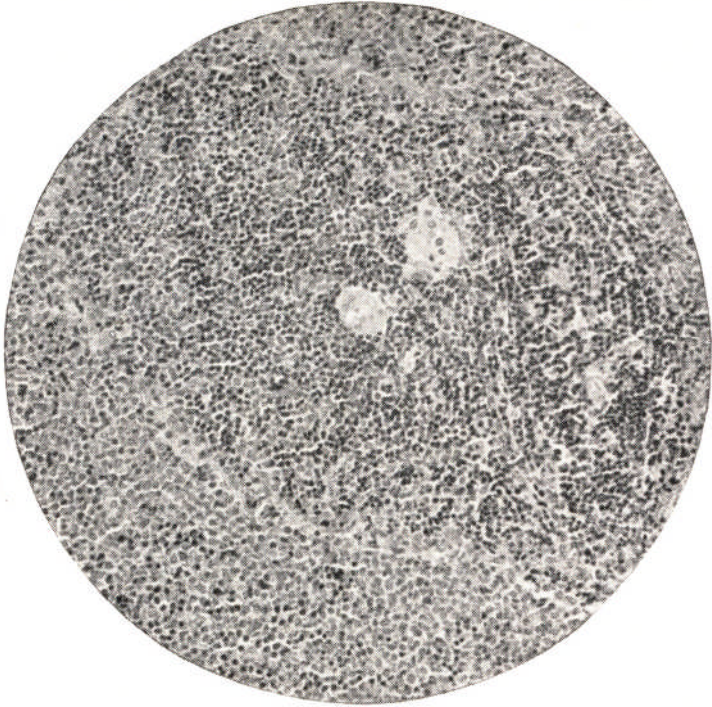
Groups A and C. The reticulo-endothelial system "blockade" usually delays the evolution of murine leprosy during the first 3 months. This delay is in a direct proportion to the "blockade" intensity. The observation of Groups A and C compared to the controls shows that the "blockade" action appears within the first days after the bacillar inoculation. In the controls a great part of the bacilli injected in the peritoneal cavity reaches the lymphatic vessels and are retained in the retro-peritoneal and mediastinal lymph nodes. On the first day after the inoculation a mobilization and a proliferation of the endothelial cells of the marginal sinus, which phagocytize the bacilli, appears. The proliferation as well as the mobilization and the phagocytose are more intensive on the 3rd and 4th days after the inoculation, when the first leprosy infiltrates of the lymph nodes appears after the 4th-5th day the radial sinus are reached. Up to the 6th-8th day the first leprosy nodules are limited to the reached areas.

In animals injected with high doses of electronegative colloids (for the purpose of obtaining the "functional inhibition" of the reticulo-endothelial system), the bacilli injected through the peritoneal via, are retained in the regional lymph nodes with difficulty, as the cells of the marginal and radial sinuses are loaded with granules playing a small phagocytary activity. Therefore, its feature is different from what is observed in controls because of a smaller number of bacilli in the endothelial cells. The reticulo-endothelial proliferation in Groups A and C and control E group, may be compared in intensity, but it is more diffuse in "blocked" animals, showing a relationship, chiefly to the effects of the colloid. The leprosy infiltrations appear more latter (5th-7th day). The first nodes are formed after the 10th day of inoculation and they have a smaller tendency to delimitation and are not so rich in bacilli as the controls are. The "blockade" makes the evolution of murine leprosy difficult delaying the formation and the development of the histologic lesions during the first 3 months of the evolution of the disease. This effect is more evident between the 45th and the 75th days after inoculation. At this time the observed lesions in "blocked" animals are smaller in number, less extensive, non convergeable and poorer in bacilli, compared to the controls. This fact may be verified comparing the photomicrographies.

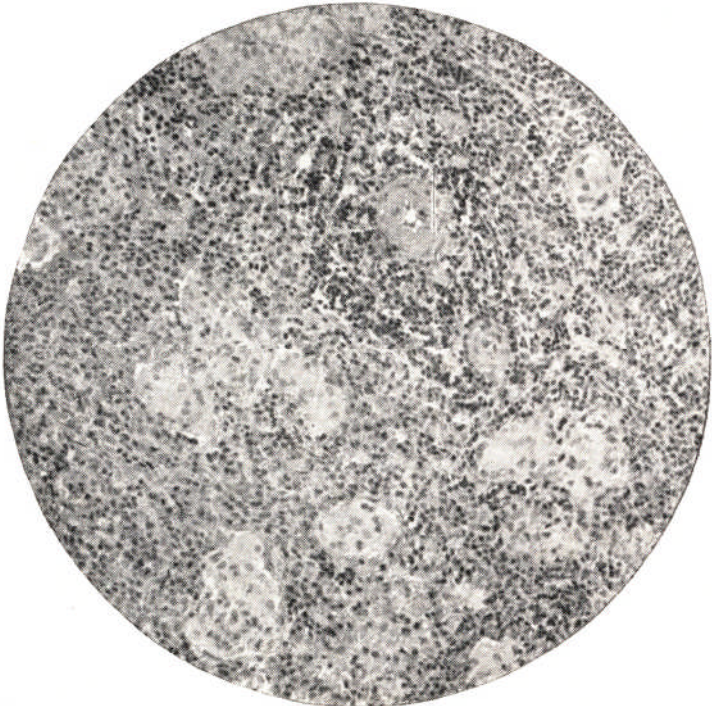
Contrary to what happened with the controls, the number of bacilli in the lesions of "blocked" animals increase slowly during the course of the disease. An equal behavior is observed in other organs in which the lesions of marine leprosy is frequent.

The delay action of the "blockade" upon the evolution of the disease becomes less evident after the 3rd month of evolution and almost disappear by the 5th month. From this time the lesions on the "blocked" animals are compared to the controls.

In short, the employment of high doses of electronegative colloids delays the evolution of marine leprosy, does not stop the development of the disease. In



Fotomicrografia N.º 10



Fotoniicrografia N.º 11

other words, the animals which the reticulo-endothelial system have been "functionally inhibited" ("blocked"), when injected with *Mycobacterium leprae muris*, show a slow evolution of the lesions, and a delay of the dissemination of the disease. The same results are obtained when trypan blue or a suspension of carbon-black are employed.

Groups B and D. When small doses of colloidal suspensions are employed, in order to obtain the "functional stimulation", it accelerates the evolution of murine leprosy, contrary to what happens when high doses are employed. The evolution of the lesions in regional lymph nodes is more rapid in the controls from the first day after inoculation. The bacilli which reach the regional lymph nodes are easily phagocytized by the endothelial cells of the marginal and radial sinuses which are proliferated and without alterations in the functional activity. The proliferation and phagocytary activity add to the formation of early leprosy infiltrations (2nd-3rd day), which are greater in number and more fertile than in controls. The invasion of lymph nodes is very rapid so in a short time the organ is almost totally seized by the lesions. From the beginning, the histological feature of the lesions are diffuse showing a smaller tendency to the delimitation of nodules than to the controls.

Concerning other organs rich in reticulo-endothelial cells (liver, spleen, bone-marrow, etc), we observe that the "functional stimulation" of this system always acts in the same direction, this is, it accelerates the evolution of the lesions. In animals which received small doses of electronegative colloids the histopathologic examinations taken 60 days after inoculation shows exuberant lesions which can be compared in bacillar richness and extension to controls with 120 days of evolution. The photomicrographies demonstrate this fact.

After the 3rd month the acceleration of the evolution of the lesions becomes less evident, so that around the 5th month it practically disappears.

In short, in animals with "stimulation" of the reticulo-endothelial system the lesions were less precocious, having a more rapid evolution and an evident greater number of bacilli compared to the controls.

DISCUSSION

The repeated injections of electronegative colloids produce a greater number of distinctive elements of the reticulo-endothelial system, not only by increasing the histiocytes in granuloplectic function, as well as by the "stimulation" that they make

Fotomicrografias n.ºs 10 e 11. Cortes histológicos de baço de animais inoculados há 120 dias. Comparar a diferença de intensidade das lesões. Coloração H.E. Aumento: 200 x.

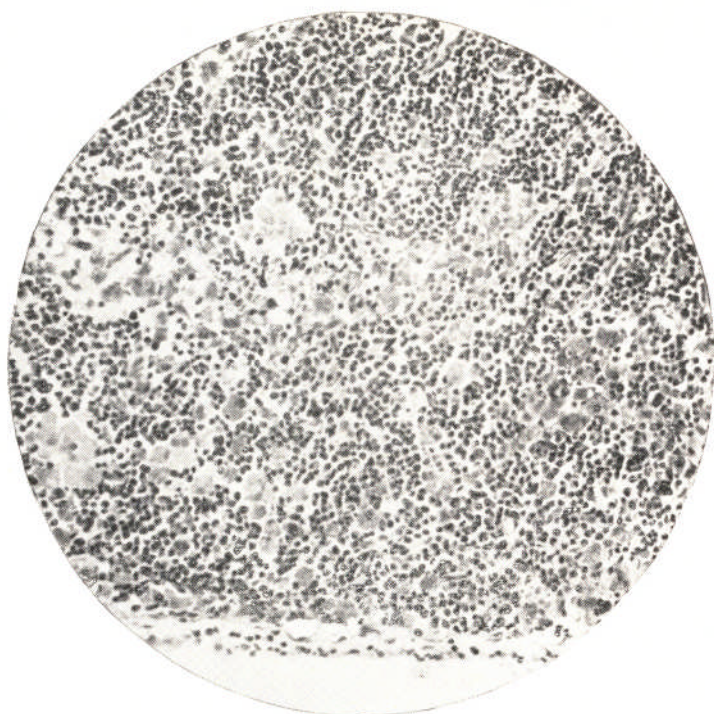
Photomicrographies ns. 10 and 11. Spleen histological sections corresponding to animals 120 days after inoculation; compare different intensity of lesions. All of them was stained by the hematoxylin eosin method; 200 X magnifications.

N.º 10. Rato 285: *Contrôle*. Pequenos nódulos na polpa branca: evolução natural da moléstia aos 120 dias.

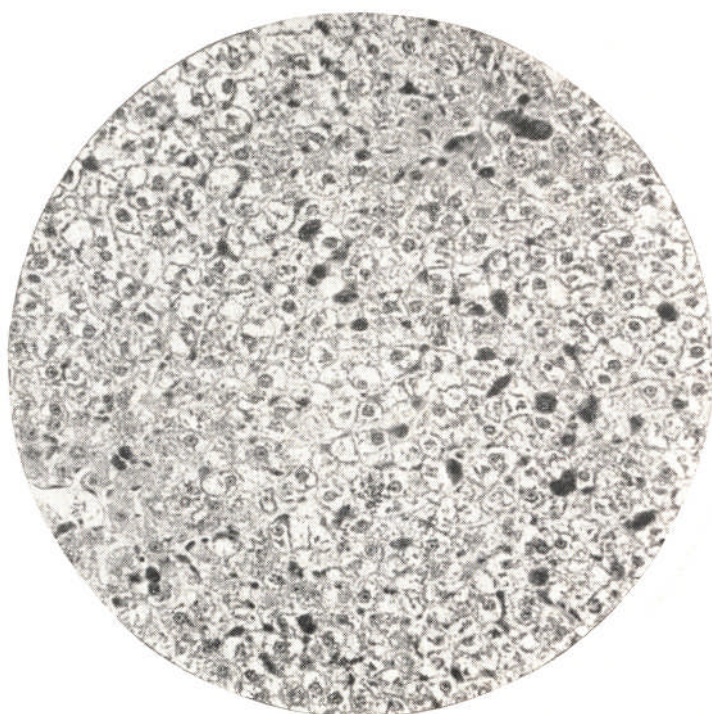
Rat 285: *Control*. Little nodule in the lymphoid follicule; normal evolution of the disease on the 120th day.

N.º 11. Rato 242: "*Estimulo*" do S.R.E. Nódulos lepróticos numerosos e com tendência k confluência. Notar a proliferação histiocitária na polpa vermelha.

Rat 242: "*Stimulated*" reticulo-endothelial system. Numerous confluent leprotic nodules; note the histiocytary proliferation in the red pulp.



Fotomicrografia N.º 12



Fotomicrografia N.º 13

on the non-distinctive cells. The histiocyte proliferation may, in certain cases, originate nodules of granulomantous aspect. Granulopexy and proliferation are concomitant phenomena.

When high concentrated suspension are employed, the captation is greater than the proliferation, producing the "blockade", with a functional inhibition of the histiocyetary system. On the contrary, when small doses of diluted suspensions are employed, the proliferation performs a significant rle and a functional stimulation takes place.

As the reticulo-endothelial system has a great rôle in the defense functions, chiefly by its capability to phagocytize, it is obvious that the mass introduction of an electronegative colloid will influence the organism resistance against the infection, disturbing the phagocytic function. Actually every time the reticulo-endothelial system of an animal is "blocked" and then a pathogenic agent is injected, the disease increases noire rapidly and becomes more serious. This fact is a general observation.

The results of the study" of these support show that the behaviour stated above is not observed in marine leprosy once that the "blockade" presents a delay action on the evolution of the disease contrary to the reticulo-endothelial system "stimulation".

As it has been stated, the injection of concentrated suspensions of colloidal *electronegative* particles delays the evolution of murine leprosy considerably. The leprous lesions are less numerous, showing smaller dimensions, develop slowly and have fewer bacilli than the controls.

On the other band, the introduction of diluted suspensions determine a more rapid evolution of the disease, being formed huge leprous nodules in several organs. The tendency of marine leprosy is to develop more rapidly than in controls.

These facts, which may appear incongruous compared to what happens with the bacterial diseases are generally related to pathogenic peculiarities and biological needs of *Mycobacterium leprae muris*.

It is commonly observed that a cell of the reticular system which has a great number of electronegative colloid granules, catches granules of another kind of colloidal suspensions with difficult, even when the hematic concentracion of the latter is high. When captation takes place the new colloid deposits itself around the granules of the former.

On the other hand, granulopexy or athrocytosis and phagocytosis are similar in the first phase (phase of adsortion to cellular surface). Opinions vary concerning

Fotomicrografias n.^{os} 12 e 13 demonstrando intensidade do "Bloqueio".

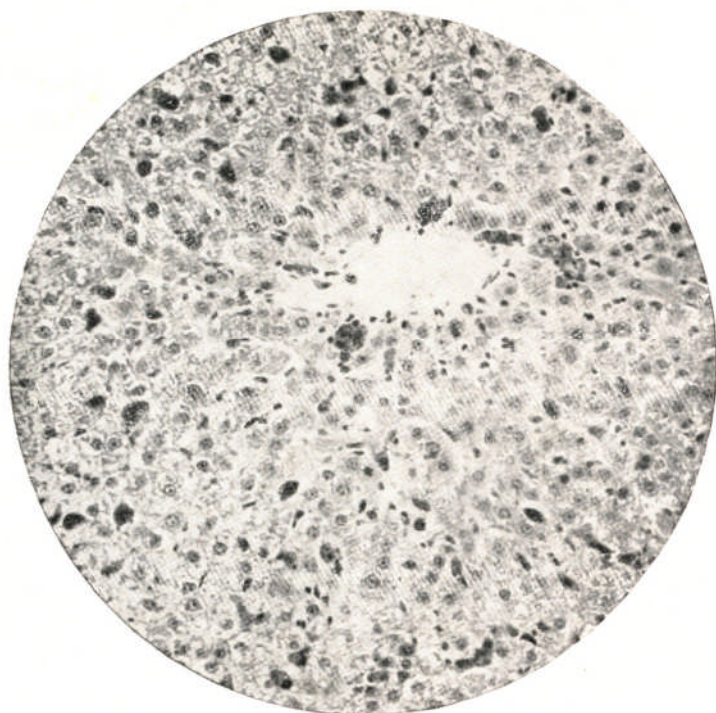
Photomicrographies 12 and 13 demonstrating the Blocking intensity.

N.º 12. Rato 224: "Bloqueio" do S.R.E. Corte histológico de gânglio linfático; coloração H.E. Aumento: 200 x. Proliferação e mobilização de células histiocitárias em atividade granulopexica. Os agrupamentos histiocitários simulam lesões incipientes de lepra murina, porém, não contém bacilos.

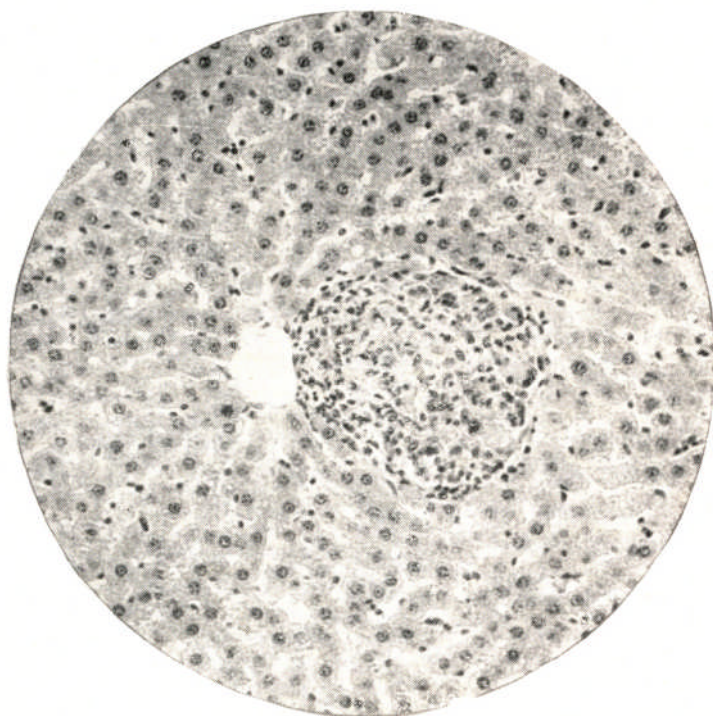
Rat 224: "Blockade" reticulo-endothelial system. Lymph node histological section; stained by the hematoxylin-eosin method; 200 x magnification. Proliferation and mobilization of the histiocyetary cells in granuloplectic function. Histiocyetary cells grouped simulating murine leprosy lesions, but without bacilli.

N.º 13. Rato 224: "Bloqueio" do S.R.E. Corte histológico de fígado; coloração pelo litio-carmim. Aumento: 200 x. Intensa atividade granulopexica das células de Kupffer. Ausência de lesões lepróticas.

Rat 224: "Blockade" reticulo-endothelial system. Liver histological section; stained by the lithium-carmine; 200 x magnification. Intense granuloplectic activity of the Knpffer cells. Absence of lesions.



Fotomicrografia N.º 14



Fotomicrografia N.º 15

the subsequent phases. There are authors who consider two different phenomena (Möllendorf ¹¹), whereas others think they are alike (De Hann ², Seemann¹⁵). Nevertheless all of them admit the similarity between the athrocytosis and phagocytosis. They are looked upon as a correlate phenomena, but they are not identical.

The influence of the granuloplectic activity upon the bacilli phagocytosis concerning the murine leprosy, it is evident. Cytologic studies show that when the cells of the histiocytary system have stored great number of granules they are less capable to phagocytize the *M. leprae muris*. The action of the "blockade" is evident in histological sections when an inverse relation is observed between the number of bacilli and the kept granules, as it was stated by Linhares ⁷.

Olliver ¹², Henderson ⁶ and Linhares ⁷ have show that the big leprous cell, of which the cytoplasm is loaded with bacilli and which nucleons is commonly picnotic and placed in the periphery, has a small capacity of holding the electronegative colloidal particles. Our findings show that in "booked" animals the Stefansky bacilli inoculated are able to penetrate the interior of the cells; in proportion to the increase of bacilli in number, by reproduction the granuloplectic activity of these cells diminish progressively in spite of the repeated injection of the colloid.

In consequence, the influence of colloidal particles, is progressively smaller while the leprotic infection increases because the particles captation by the histiocytary cells gradually diminishes. As the inhibition action on the evolution of the lesions is limited to time, the employment of high doses of concentrated colloidal suspensions does not present possible therapeutic application.

The study of these facts show: 1. the intensive captation of colloidal particles by the reticular cells, which diminish the granuloplectic and phagocytary activities, have a "blockade" action on the evolution of murine leprosy. This behavior is related to the "functional inhibition" of the reticulo-endothelial system.

2. The reduced captation of electronegative colloidal particles determine a "functional stimulation" of the histiocytary system with a cellular proliferation, each cell still having normal phagocytic and granuloplectic activities. In such considerations, the disease increases greatly.

These facts agree to Hanks ⁵ report who employed suspension of carbon particles verifying their favorable influence on the development of sub-cutaneous leprous nodules of rats during the first stages.

As it can be observed the bacillar phagocytosis has no favorable influence against murine leprosy, contrary to what is observed in other diseases, being even necessary in the normal evolution of the Stefansky disease. These facts can only be explained

Fotomicrografias n.ºs 14 e 15. Cortes histológicas de fígado de animais inoculados há 70 dias; comparar a diferença de intensidade das lesões. Coloração H.E. Aumento: 200 x.

Photomicrographies 14 and 15. Liver histological sections of animals 70 days after inoculation; compare different intensity of lesions. Stain: hematoxylin- eosin; 200 x magnifications.

N.º 14. Rato 288: "*Bloqueio*" do S.R.E. Pequenos nódulos peri-portais constituídos por células histiocitárias contendo, no citoplasma, raros bacilos e grande quantidade de grânulos de corante.

Rat 288: "*Blockade*" reticulo-endothelial system. Little nodules near the portal vein constituted by histiocytary cells containing in the cytoplasm a few bacilli and a great quantity of granules.

N.º 15. Rato: 168: *Contrôle*. Nódulo leprótico peri-portal na evolução natural da moléstia aos 70 dias.

Rat 168: *Control*. Leprotic nodule near the portal vein in the normal evolution of the disease on the 70th day.

when one admits that the *M. leprae muris* is normally capable of reproducing only after being phagocytized by the histiocytary cells which would show a real dependence of the bacilli to the cell.

In other words, the bacillus would demand a cellular cytoplasm for its normal reproduction. Both the reticulo-endothelial system "blockade" (which causes a reduction of the phagocytary activity) and the "stimulation" of the reticular system (which causes an increase of this same function) would have indirect influence on the bacillar multiplication.

The bacteriaemia have the same intensity and duration either in rats with "blockade" reticulo-endothelial system, or in controls. The smaller phagocytic capability of the histiocytary system of the "blocked" animals to phagocytize, should determine a great bacteriaemia, if the *M. leprae muris* had a normal extra-cellular reproduction. Therefore everything leads to believe that these bacilli has a parasitism limited to the cells of the reticulo-endothelial system. Besides, producing a decrease in the phagocytary function the "blockade" of this system would indirectly inhibited the bacillar reproduction. Nevertheless we do not wish to withdraw completely the possibility of extra-cellular reproduction which would have a secondary rôle.

Due to the decrease, both of the phagocytic activity of the histiocytes and the capability of reproduction, the "blockade" acts as a delayer of the evolution of murine leprosy. Contrary, the "stimulation" of the histiocytary system, owing to the cellular proliferation as well as the greater capability to phagocytize, helps the bacillar reproduction and, consequently the evolution of the disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Afanador, A. - Inoculation du haeille de Stefansky dans les veines cics rats bloques. - Compt. rend. Soc. Biol. 116:1260, 1934.
2. De Haan, J. - Die Speicherung saurer Vitalfarbstoff in den zellen mit Beziehung auf das Problem der Phagocytose and Zellpermeabilität. - Arch. f. ges. Phys. 201:393, 1923.
3. Faraco, J. - Bacilos de Hansen e cortes de parafina: método complementar para pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluido em parafina. - Rev. Brasil. Leprol. 6:177, 1938.
4. Hadler, W. A. & Mauri, A. C. - Lepra murina: Estudo patogênico-evolutivo no rato inoculado por via peritoneal. - Rev. Brasil. Leprol. 16:139, 1948.
5. Hanks, J. H. - The influence of carbon particles on the development of rat leprosy. - Int. J. Leprosy. 15:65, 1947.
6. Henderson, J. M. - A contribution to the pathology of cutaneous rat leprosy. - Indian J. Med. Res. 16:1, 1928.
7. Linhares, H. - Estudo sôbre a célula leprosa do rato. - Meia. Inst. "Oswaldo Cruz". 40:183, 1944.
8. Lowe, J. - Studies in rat leprosy. - Indian J. Med. Res. 22:187, 1934.
9. Marchoux, E. & Sorel, F. - La lepre des rats. Lepra. Bibliot. Internat. 13:171, 1913.
10. McClung, C. E. - Microscopical technic. - Ed. "Paul B. Hoeber Inc." New York, 2.^a edição, 1939.
11. Möllendorf, W. - Vitale Fûhrbungen an tierischen Zellen. - Ergebn. d. Phys. 18:141, 1920.
12. Oliver, J. - The origin of the lepra cell. - J. Exp. Med. 43:233, 1926.
13. Pinkerton, H. & Sellards, A. W. - Histological and cytological studies of marine leprosy. - Am. J. Path. 14:4.35, 1938.
14. Pittaluga, G. - La patologia de la sangre y el sistema reticulo-endotelial. Ed. Cultural S. A., La Habana, 1934.
15. Seemann, G. - Die Ablagerung von Farbstoffen in den Zellen der Froschleber: Beitr. z. path. Anat. 74:332, 1925.
16. Stefansky, W. K. - Eine lepraähnliche Erkrankung der Haut and der Lymphdrüsen bei Wanderratten. Centbl. f. Bald. 33:481, 1903.