

ESTUDO COMPARADO DAS LESÕES PROVOCADAS PELA INJEÇÃO INTRADÉRMICA DE SUSPENSÕES DE *M. LEPRAE* E *M. TUBERCULOSIS* EM COBAIOS NORMAIS

W. A. HADLER*

A observação comprovada (macro e microscópica) das lesões produzidas, em cobaias normais, pela injeção de suspensões contendo *M. leprae* e *M. tuberculosis*, faculto o estudo das diferenças e analogias das reações tissurais suscitadas por essas duas Mycobactérias, as quais têm por finalidade principal a eliminação da causa injuriante; além disso permite avaliar, se bem que de modo imperfeito e de acôrdo com as possibilidades do método, o comportamento dos bacilos em face da reação inflamatória dos tecidos, isto é, a resistência por êles oposta à lise e à eliminação.

Sendo excluída a vitalidade da célula bacteriana (trabalhando-se com germes mortos pelo calor), o comportamento dos bacilos passa a depender de particularidades estreitamente relacionadas com sua estrutura e composição química e com suas propriedades fisico-químicas; a resistência oposta pela célula bacteriana à destruição, provavelmente está subordinada a essas particularidades.

O *M. leprae* parece apresentar maior resistência à lise por parte dos fagócitos, em comparação com o *M. tuberculosis*, a julgar pelas conclusões de Metalnikov & Toumanoff¹⁶ e Metalnikov¹⁵, em larvas de *Galleria mellonella*; êsses autores verificaram que o *M. leprae* e o *M. lepraemurium* são destruídos com grande dificuldade pelos fagócitos das larvas de *G. mellonella*, ao contrário do que sucede com o *M. tuberculosis* que é usado e facilmente eliminado em poucos dias

Em tecidos de mamíferos fôra observado a longa permanência do *M. leprae*, morto pelo calor, quando inoculado experimentalmente; são, por isso, produzidas lesões à distância, idênticas às provocadas por bacilos vivos^{10,11,20}.

Em relação ao homem, a observação clínica levou Floch^{5,6} a concluir que o *M. leprae* é destruído, nos tecidos de doentes de lepra, bem mais lentamente que o *M. tuberculosis*.

Porém, não há trabalho experimental dedicado ao estudo do comportamento dessas duas Mycobactérias, frente às reações inflamatórias por elas suscitadas; em tecidos de mamíferos; com essa finalidade escolhemos o

* Médico da Secção de Patologia Experimental do Serviço de Pesquisas Científicas do D.P.L., São Paulo, Brasil.

cobaio normal, cujo macrófago possui capacidade de lisar tanto o *M. leprae* como o *M. tuberculosis*. Além da observação macroscópica as reações provocadas por esses dois bacilos foram estudadas histológica e bacterioscopicamente. Baseados nesses elementos procurou-se avaliar a velocidade de destruição e eliminação das Mycobactérias, imposta pelas células da área lesada.

MATERIAL E MÉTODO

Em 92 cobaios jovens, com peso compreendido entre 280,0 e 360,0 g (50 machos e 42 fêmeas), em boas condições de saúde aparente (normais), injetou-se 0,1 ml de tuberculina a 1/10, por via intradérmica. Após as leituras de 24 e 48 horas, que evidenciaram ausência de reação em todos os cobaios, foram eles divididos em quatro lotes:

Lote 1 — 32 cobaios injetados por via intradérmica com suspensão de *M. tuberculosis* (BCG.), previamente aquecida a 100°C. durante 2 horas, contendo 3,3 mg de bacilos por ml. Os animais foram inoculados com 0,1 ml (0,33 mg de bacilos) em dois pontos diferentes; uma das reações serviu para a observação macroscópica da evolução da lesão e a outra forneceu material para exame histológico.

Lote 2 — 20 cobaios injetados com 0,1 ml de "lepromina" *, por via intradérmica. A "lepromina" utilizada continha aproximadamente 0,74 mg de *M. leprae* por ml (determinou-se o peso de bacilos segundo o método descrito em outro trabalho⁸. Todos os animais receberam aproximadamente 0,074 mg de bacilos em cada um dos flancos; uma das reações foi utilizada para a observação macroscópica e a outra para estudo microscópico.

Lote 3 — 20 cobaios injetados com "lepromina" contendo aproximadamente 3,4 mg de *M. leprae* por ml** (a quantidade de bacilos foi determinada por método já descrito⁸) ; em todos injetou-se 0,1 da suspensão, por via intradérmica (contendo aproximadamente 0,34 mg de bacilos), em dois pontos diferentes, proporcionando material para o estudo da evolução macroscópica e da estrutura da lesão.

Lote 4 — 20 cobaios injetados concomitantemente com 0,1 ml de suspensão contendo 0,33 mg de BCG. (previamente aquecida a 100°C. durante 2 horas), em um dos flancos e com 0,1 ml de "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 mg de bacilos, no outro flanco. Os animais deste lote

A "lepromina" foi preparada pelo Dr. M. de Sousa Lima, segundo o método de Hayashi⁹.

Esta "lepromina" é igual à anterior, tendo sido apenas concentrada por redução do volume do veículo (centrifugação).

foram utilizados apenas para o estudo histológico das lesões; permitem comparação da estrutura microscópica, de reações provocadas por idêntica dose de bacilos, em um mesmo animal.

Em todos os cobaios dos três primeiros lotes fez-se o exame macroscópico do local injetado, diariamente até o 6° dia, cada 3 dias até o 30° dia e cada 10 dias até o 50° dia. Foram anotados os caracteres e as dimensões (em mm) da lesão papulosa.

O exame microscópico da reação foi feito em 20 cobaios do lote 1, em 10 do lote 2, em 10 do lote 3 e nos 20 do lote 4; fez-se biópsia em períodos sucessivos da evolução da lesão, em correspondência com o exame macroscópico. O material foi fixado em solução de formal a 10%, incluído em parafina e corado pela H.E., Ziehl-Neelsen modificado, Mallory e método de Gomori para reticulina. Na maioria dos casos foram feitos vários cortes em diferentes profundidades das lesões.

RESULTADOS

1 — *Macroscópicos:*

Lote 1 — Cobaios injetados com 0,1 ml de suspensão contendo 0,33 mg de BCG.: A reação macroscópica tem início 3 a 6 horas após a injeção, aparecendo sob a forma de pequena zona eritematosa, levemente infiltrada, com 3-5,0 mm de diâmetro; sua intensidade aumenta para atingir o máximo 24 horas após a injeção, quando a pápula eritematosa tem 3,94 mm de diâmetro médio, sendo o diâmetro máximo 7,0 mm (há grandes variações individuais; ver quadro I). A reação regride lenta e progressivamente até o 24° dia que sucede à inoculação e desaparece sem deixar vestígios, na maioria dos casos.

Em 15,62% dos cobaios a lesão papulosa ulcerou-se, contamina-se com germes piógenos e então involui deixando pequena cicatriz.

De acordo com os dados expostos no quadro I e projetados no gráfico 1, verifica-se que a reação macroscópica, em todos os animais, apresenta-se com diâmetro inferior a 5,0 mm, 48 horas após a injeção do BCG.. No 21° dia a maior parte dos cobaios (93,75%) não mais apresenta reação local, havendo apenas em 6,25% dos casos, pequena pápula com diâmetro inferior a 1,0 mm.

Lote 2 — Cobaios injetados com "lepromina" contendo aproximadamente 0,074 mg de bacilos, em 0,1 ml: Os resultados são idênticos aos verificados em cobaios normais injetados com "lepromina"; a reação atinge intensidade máxima, 24 horas após a inoculação (diâmetro médio 3,15 mm, diâmetro máximo 5,0 mm) e regride lentamente até o 30° dia, quando desaparece totalmente (ver quadro 2 e gráfico 1).

Ao compararmos a reação macroscópica produzida pelo BCC., com a provocada pela "lepromina" contendo cerca de 0,074 mg de bacilos, em

cobaios normais, usaremos os dados expostos em trabalho anterior ⁷; êsses, além de idênticos aos encontrados nos cobaios do lote 2, referem-se a observações mais numerosas e, portanto, são mais significantes.

Lote 3 — Cobaios injetados com "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*, em 0,1 ml: A reação macroscópica é muito semelhante à produzida pela "lepromina" com 0,074 mg de bacilos; tem início na 3^a- 6^a hora, manifestando-se sob a forma de eritema; 24 horas após a injeção apresenta-se como pápula eritematosa, cujo diâmetro médio é de 3,4 mm (diâmetro máximo 6,0 mm). A reação regride lenta e progressivamente até o 40^o dia que sucede à inoculação (quadro 3, gráfico 1), desaparecendo sem deixar cicatriz (a não ser em 15% dos animais, nos quais a pápula ulcera-se durante o decorrer da evolução). No 30^o dia

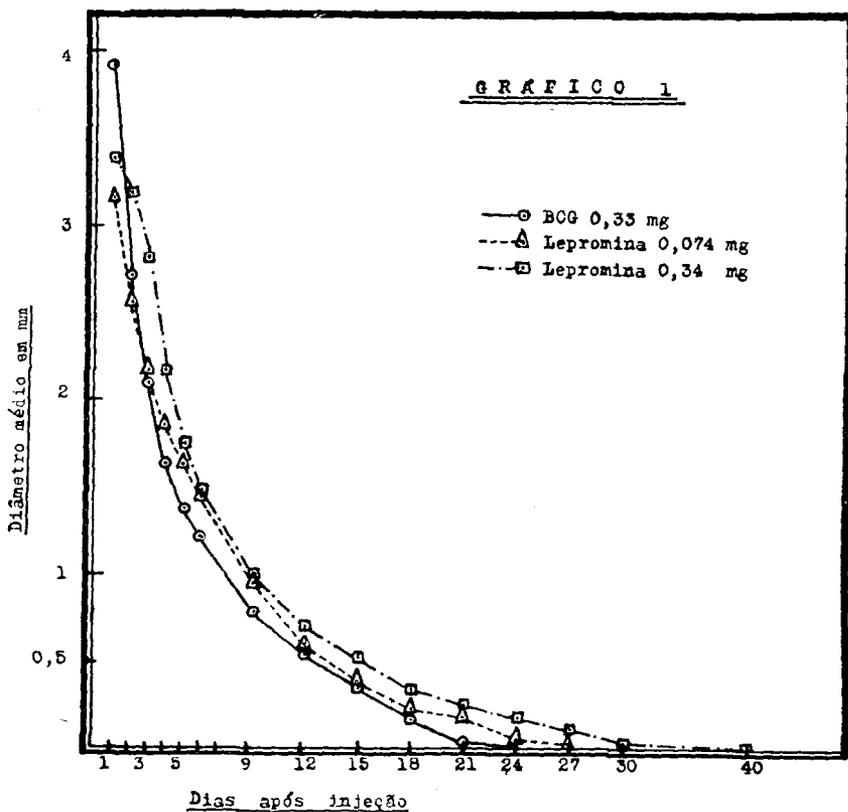


Gráfico n^o 1 — Evolução da reação macroscópica em cobaios injetados, por via intradérmica, com 0,33 mg de BCG., ou coin "lepromina" contendo aproximadamente 0,074 mg, ou 0,34 mg de *M. leprae*.

há pequena lesão com 0,5 mm de diâmetro, em apenas 10,0% dos animais.

A comparação dos resultados obtidos, em cobaios, pela injeção de "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*, com as normas estabelecidas para a leitura da "Reação da lepromina" no homem ²⁴. evidencia que tanto a reação precoce (leitura de 48 horas), como a tardia (leitura de 21 dias), enquadram-se entre as reações negativas, em todos os animais observados.

II — Microscópicos:

Lote 1 — Cobaios injetados com 0,1 ml de suspensão contendo 0,33 mg de BCG.: A reação inflamatória inicial tem caráter exsudativo, agudo, havendo discreto edema, congestão vascular e infiltrado celular com domínio de neutrófilos.

As lesões com 24-48 horas de evolução têm limites mal definidos e atingem o derma e a porção superficial do hipoderma; são constituídas por grande número de neutrófilos, alguns monócitos, células linfóides e eosinófilos (fotomicrografia n° 1). Os neutrófilos são mais numerosos na área central da reação e geralmente apresentam alterações de tipo degenerativo (picnose nuclear, micro-vacuolização do citoplasma), sem no entanto haver formação de verdadeiro micro-abscesso. Ao redor da zona central há grande número de "células fixas ativadas" e alguns "macrófagos fixos", com citoplasma vacuolizado.

Os bacilos são relativamente numerosos e geralmente encontrados no interior de monócitos e de neutrófilos (em geral há 2-4 bacilos em cada célula, mas podem ser observados até 50) ; são mais freqüentes na área central da reação, tornando-se progressivamente mais raros à medida que se afasta do centro. Predominam os bacilos com alterações morfológicas.

3° — 6° dia: Os fenômenos exsudativos diminuem progressivamente de intensidade, ao mesmo tempo que os macrófagos tornam-se mais freqüentes e se dispõem em estrutura de aspecto sincicial, principalmente no centro da lesão (fotomicrografias n° 2 e 3) ; entre eles há numerosos neutrófilos (a maioria com alterações degenerativas), alguns monócitos, células linfóides e raros eosinófilos. Os macrófagos apresentam intensa atividade fagocitária, tanto em relação aos bacilos, como aos leucócitos; raros deles apresentam-se em diferenciação "pré-epitelióide".

Os bacilos continuam numerosos e principalmente intra-celulares (são muito raros os bacilos livres) ; são encontrados no interior de macrófagos e especialmente de leucócitos situados na área central da lesão; os fagocitados por macrófagos, com freqüência, apresentam alterações morfológicas.

6° — 9° dia: O aspecto histológico da reação é comparável ao do período anterior. Há, entre os feixes do colágeno e junto aos vasos san-

güíneos. pequenos acúmulos de macrófagos, leucócitos e "células pré-epitelióides"; estas são mais freqüentes e tendem para a "transformação epitelióide"; porém, as "células epitelióides" não são numerosas.

Há poucos bacilos, encontrados principalmente no interior de neutrófilos.

9° — 12° dia: As lesões são de preferência peri-vasculares, com tendência à disposição focal; as "células epitelióides" tornam-se progressivamente mais numerosas, sem predominarem sobre os macrófagos.

Observam-se raros bacilos apenas na área central da lesão, geralmente fagocitados por neutrófilos.

12° — 21° dia: Acentua-se o caráter nodular da lesão. A princípio os macrófagos predominam sobre os demais elementos da inflamação; por volta do 15°-18° dia são as "células pré-epitelióides" que prevalecem e após o 18° dia as "células epitelióides" sobrepujam as outras (fotomicrografia n° 6) ; são observadas células com 2-4 núcleos e raramente gigantócitos mal formados. Os elementos citados dispõem-se em estrutura relativamente densa, entre os quais há pequeno número de leucócitos; faz exceção a porção central da lesão onde os neutrófilos são numerosos e geralmente apresentam alterações degenerativas, havendo, em alguns casos, formação de pequeno micro-abscesso.

Os bacilos são muito raros e encontrados em raros macrófagos e alguns leucócitos situados na área central da lesão.

21° — 27° dia: O quadro histológico apresenta-se constituído por uma zona central, em que predominam os neutrófilos (em alguns casos com micro-abscesso), envolvida por tecido granulomatoso, não tipicamente tuberculóide (fotomicrografia n° 8) ; são numerosas as "células epitelióides", algumas das quais se apresentam degeneradas. Há macrófagos apenas nas proximidades da coleção de neutrófilos, os quais fagocitam ativamente leucócitos em degeneração. Raras "células epitelióides" transformam-se em fibrócitos, com produção de fibras colágenas. São observadas raras células gigantes, inclusive do tipo Langhans.

Aos 21 dias de evolução os bacilos são muito raros, mesmo na área central da lesão; no 24° dia não mais são encontrados bacilos.

27° — 30° dia: E' freqüente o micro-abscesso central, o qual possui reduzidas dimensões; o tecido granulomatoso apresenta maior tendência à fibrose (fotomicrografia n° 10) e contém raras células gigantes. Em alguns casos verifica-se reabsorção do micro-abscesso, tendo a lesão aspecto nitidamente involutivo.

Não são encontrados bacilos.

40° dia: Geralmente as lesões se apresentam em franca involução, com fibrose e pequeno número de "células epitelióides" dissociadas, a maioria

com tendência à transformação fibrocítica, ou com micro-vacuolização do citoplasma (fotomicrografia n° 12).

50° dia: As "células epitelióides" são ainda menos numerosas; a involução da lesão apresenta-se completa em alguns casos, havendo pequena cicatriz fibrosa (a cicatriz atinge porção restrita do derma e geralmente não é observada macroscopicamente).

Lote 2 — Cobaios injetados com 0,1 ml de "lepromina", contendo aproximadamente 0.074 mg de *M. leprae*: O quadro histológico apresenta-se igual ao verificado e descrito em trabalho anterior', no qual estudou-se o comportamento do cobaio normal em face da injeção intradérmica de "lepromina"; por essa razão será feito apenas um breve resumo.

24-48 horas: Discreta reação exsudativa, não supurativa, com predomínio de neutrófilos; alguns macrófagos; são observados bacilos livres e fagocitados por macrófagos e leucócitos.

3° — 6° dia: Aumento numérico dos macrófagos e redução dos neutrófilos; bacilos numerosos e situados no interior de leucócitos e de macrófagos (nos vacúolos destes últimos).

6° — 9° dia: São observadas as primeiras "células pré-epitelióides"; bacilos pouco numerosos e distribuídos por toda a lesão.

9° — 12° dia: As lesões apresentam raras "células epitelióides", mas são formadas principalmente por macrófagos; bacilos raros.

12° — 21° dia: Predomínio de macrófagos; presença de algumas células gigantes; algumas "células epitelióides" tendem para transformação fibrocítica; os neutrófilos são pouco freqüentes e os bacilos raros.

21° — 27° dia: Há células gigantes bem constituídas (predominam as de tipo corpo estranho). As lesões atingem o máximo de desenvolvimento histológico e são constituídas principalmente por "células epitelióides", mas contêm não raros macrófagos; possuem forma irregular, são discretas, apresentam estrutura frouxa e aspecto geralmente não tuberculóide. Após o 24° dia os bacilos são excepcionais.

Depois do 27° dia são verificadas alterações degenerativas em algumas "células epitelióides" e maior tendência à transformação fibrocítica; os bacilos estão ausentes. As lesões envolvem lentamente até o 50° dia e regridem sem deixar cicatriz fibrosa, a não ser nos casos em que houve ulceração durante a sua evolução.

Lote 3 — Cobaios injetados com 0,1 ml de "lepromina", contendo aproximadamente 0.34 mg de *M. leprae*: O aspecto histológico das lesões nos animais deste lote é muito semelhante ao verificado no lote 2, havendo apenas algumas variações quantitativas de pequena significação; a reação exsudativa inicial é ligeiramente mais intensa e a lesão granulomatosa posterior pouco mais evidente.

Na lesão exsudativa, observada 24-48 horas após a inoculação, há grande afluxo de leucócitos (principalmente neutrófilos) sem contudo haver formação de micro-abscessos. O número de macrófagos e especialmente o de leucócitos, é maior que o verificado nos cobaios do lote 2; porém, qualitativamente a citologia é idêntica (fotomicrografia n° 4). São numerosos os bacilos livres e fagocitados por macrófagos, neutrófilos e monócitos.

Entre o 3° e o 27° dia a citologia, a estrutura e a evolução das lesões identificam-se com o que se observa nos cobaios inoculados com "lepromina" contendo aproximadamente 0,074 mg de bacilos (lote 2) ; as reações tissurais são, porém, mais intensas, o que está em relação com o maior número de bacilos encontrados nos tecidos. O ritmo evolutivo da lesão não sofre alteração: as "células pré-epitelióides" são verificadas a partir do 6° dia, as "células epitelióides" após o 9° dia e as células gigantes depois do 12° dia.

Entre o 12° e o 21° dia os bacilos são observados com freqüência, sem ser numerosos,

As lesões atingem pleno desenvolvimento histológico após o 21° dia; são menos discretas que as apresentadas pelos cobaios do lote 2, mas formadas pelos mesmos elementos citológicos, os quais também se dispõem em estrutura frouxa; geralmente não constituem tubérculos típicos.

Raros bacilos são encontrados nas lesões com 27 dias de evolução; após o 27° dia as lesões são abacilares (método bacterioscópico).

A involução da reação histológica também se processa de forma idêntica à dos animais do lote 2, sendo, porém, ligeiramente mais lenta. No 40° dia ainda são verificados pequenos focos de "células epitelióides", entre fibrócitos e fibras colágenas (fotomicrografia n° 13) ; mesmo no 50° dia não está completa a regressão, em alguns casos. A lesão desaparece sem deixar cicatriz fibrosa (com exceção dos casos cuja pápula ulcerou-se no decorrer da evolução).

Em resumo, as diferenças verificadas entre os cobaios do lote 3, em relação aos do lote 2, dizem respeito apenas à intensidade da reação histológica e ao número e permanência dos bacilos nas lesões; o ritmo evolutivo, a citologia e a estrutura são idênticos.

Lote 4 — Cobaios injetados com 0,1 ml de "lepromina", contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*, em um dos flancos e com 0,33 mg de BCG, no outro flanco: Nos animais deste lote serão comparadas as lesões histológicas provocadas por pêso idêntico de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (BCG.), quando introduzidos na derma de cobaios normais. No entanto, deve ser feita a seguinte ressalva: a suspensão de BCG. foi feita em solução de cloreto de sódio a 0.85% e contém apenas bacilos; ao contrário, a "lepromina" além do *M. leprae* encerra outros elementos dos lepromas triturados, os quais também suscitam reações tissurais. Êste fato

constitui causa de êrro que deve ser considerada. Sua justificativa está na impossibilidade de separação do *M. leprae*, dos tecidos triturados, a não ser quando são utilizados dissolventes orgânicos, ou soluções fortemente hipo ou hipertônicas; estas substâncias atuando sobre a composição química, ou sobre as propriedades fisico-químicas dos bacilos, devem constituir causa de êrro ainda maiores.

Serão analisadas com mais atenção as fases tardias da reação histológica e o comportamento dos bacilos frente a essa reação; êsses elementos parecem não sofrerem tanto a influência da heterogeneidade das suspensões.

24-48 horas: A reação exsudativa inicial apresenta a mesma citologia nas reações produzidas pelos dois bacilos. Há diferenças de intensidade: as lesões provocadas pelo BCG. são mais intensas e contêm maior número de leucócitos (comparar fotomicrografias n° 1 e n° 4). Os bacilos são numerosos em ambas as reações e fagocitados por células do mesmo tipo.

3° — 6° dia: Nas lesões produzidas pelo BCG. há maior quantidade de leucócitos, os quais predominam sobre os macrófagos (ao contrário do, que sucede com as lesões causadas pelo *M. leprae* (fotomicrografias n° 2, 3 e 4) ; êstes são pouco numerosos, mas apresentam tendência para a transformação em "células pré-epitelióides", as quais são encontradas em lesões. com 5 dias de evolução (nos animais injetados com "lepromina" as "células pré-epitelióides" somente são observadas após o 6° dia). O estudo morfológico dos bacilos, principalmente os fagocitados por macrófagos, revela alterações mais evidentes do *M. tuberculosis* que do *M. leprae*; porém, não é possível evidenciar diferenças quantitativas entre as duas Mycobactérias.

6° — 9° dia: As lesões produzidas pelo BCG. são mais evidentes e apresentam maior número de leucócitos, que as devidas ao *M. leprae*. Há maior freqüência de "células pré-epitelióides" e presença de raras "células epitelióides" nos cobaios injetados com *M. tuberculosis*. As alterações morfológicas são menos pronunciadas e há bacilos mais numerosos e distribuidor com maior uniformidade, nas lesões dos animais injetados com "lepromina".

9° — 12° dia: São mais freqüentes os leucócitos (coletados principalmente na área central da reação) e as "células epitelióides" nos animais inoculados com BCG.; estas são raras nas lesões produzidas pela "lepromina", nas quais predominam os macrófagos. Comparativamente, há menor número de bacilos nas lesões dos cobaios injetados com *M. tuberculosis*, os quais são observados apenas na zona central da lesão, geralmente no interior de neutrófilos.

12° — 21° dia: Nos cortes histológicos de cobaios inoculados com BCG. verifica-se predomínio progressivo de "células pré-epitelióides" (15°-

18° dia) e "epitelióides" (18°-21° dia) (fotomicrografia n° 6); as células gigantes são pouco freqüentes e os bacilos muito raros e situados exclusivamente no centro da lesão, no qual é algumas vezes nítida a constituição de micro-abscesso (nas lesões produzidas pela "lepromina" os bacilos são mais numerosos e mais uniformemente distribuídos). Por volta do 12°-15° dia verificam-se, nas lesões provocadas pelo *M. tuberculosis*, estruturas de aspecto nodular (não tipicamente tuberculóide) ; esse fato ocorre mais tardiamente (após o 21° dia) nas lesões de cobaias injetados com "lepromina". Nestes não há tendência à formação de micro-abscesso central e predominam os macrófagos vacuolizados e as "células pré-epitelióides", sobre as "células epitelióides" (fotomicrografia n° 7). Além disso, as lesões provocadas pelo BCG. são mais extensas e possuem estrutura menos frouxa que as produzidas pela "lepromina".

21° — 27° dia: Nos animais inoculados com BCG., além de maior tendência à formação de micro-abscesso central, as lesões são mais evidentes e têm estrutura mais compacta (fotomicrografia n° 3) ; há nítido predomínio de "células epitelióides", havendo raros macrófagos apenas na zona central. Os bacilos são muito raros no 21° dia e ausentes no 24° dia.

Nos cobaias inoculados com "lepromina" as lesões são mais discretas e têm estrutura mais frouxa; não possuem micro-abscesso central, são menos localizadas e dispõem-se em focos péri-vasculares; estes estão constituídos por "células epitelióides", "pré-epitelióides" e macrófagos, sem predomínio nítido de um tipo celular sobre o outro, o que confere aspecto pleomorfo à estrutura histológica (fotomicrografia n° 9). São observados raros bacilos nas lesões com 27 dias de evolução; após o 27° dia o exame bacterioscópico é negativo.

27° — 30° dia: Nos cobaias injetados com BCG. o quadro histológico consta de micro-abscesso central, circundado por tecido granulomatoso denso, com tendência à fibrose (fotomicrografia n° 10). As lesões produzidas pela "lepromina" não possuem micro-abscesso, têm estrutura frouxa (microfotografia n° 11) e ainda apresentam raros macrófagos.

40° — 50° dia: A involução das lesões provocadas pelo *M. tuberculosis*, que já era evidente no período anterior, acentua-se progressivamente (fotomicrografia n° 12), havendo cicatrização praticamente completa, 50 dias após a inoculação; geralmente forma-se pequena cicatriz fibrosa microscópica.

Nos cobaias injetados com *M. leprae* os processos involutivos são mais lentos; no 50° dia as lesões ainda não se apresentam em completa regressão; geralmente não há formação de cicatriz fibrosa (fotomicrografia n° 13). As lesões produzidas pela "lepromina", com 40 dias de evolução, correspondem citologicamente às verificadas 30 dias após a injeção de BCG., abstração feita da densidade celular.

As diferenças assinaladas no decorrer da evolução histológica das lesões provocadas, em cobaias, pelas duas Mycobactérias em estudo, podem

ser assim resumidas: 1 — maior afluxo de leucócitos (principalmente neutrófilos) nas lesões produzidas pelo BCG., durante todo o decurso da reação, com tendência à formação de micro-abscesso, nas fases tardias; 2 — transformações citológicas mais precoces e mais rápidas, nas lesões dos cobaios inoculados com BCG.; 3 — permanência prolongada dos macrófagos nas lesões devidas a "lepromina", do que advém pleomorfismo celular; 4 — maior intensidade da reação inflamatória nos animais injetados com *M. tuberculosis*; 5 — desaparecimento mais precoce dos bacilos nas lesões produzidas pelo BCG.; 6 — involução mais lenta das lesões provocadas pelo *M. leprae*.

DISCUSSÃO

A injeção intradérmica de suspensão de BCG., em cobaios normais, produz reações macroscópicas inicialmente mais intensas, cuja involução se completa no 24° dia; as lesões papulosas provocadas pela injeção de "lepromina" (cuja intensidade apresenta relação com a dose de bacilos) são de início mais fracas, mas envolvem com maior lentidão, permanecendo até o 30°-40° dia. Essas diferenças persistem inclusive quando são injetadas quantidades equivalentes dos dois bacilos; porém, deve ser considerado que as suspensões injetadas não são idênticas (a "lepromina" possui, além do *M. leprae*, outros elementos passíveis de provocar reações).

A observação histológica evidencia identidade do tipo de reação dos tecidos do cobaio normal, quando inoculados com essas duas *Mycobactérias*; tanto em relação à fase aguda inicial como à fase crônica, a reação inflamatória, suscitada por ambos os bacilos, é constituída pelos mesmos elementos citológicos (leucócitos, macrófagos, "células pré-epitelióides" e "células epitelióides"), que se dispõem em estrutura idêntica. Há apenas diferenças quantitativas.

Porém, a dinâmica da reação histológica, isto é, sua evolução, apresenta-se com ritmo diferente para os dois bacilos; as lesões produzidas pelo BCG. possuem decurso mais rápido, envolvendo e desaparecendo com maior brevidade. O estudo bacterioscópico revela que nas lesões provocadas pela "lepromina", os bacilos persistem maior tempo, durante o decurso da reação. Esses fatos sugerem relação entre a rapidez de destruição bacilar e o ritmo da evolução histológica (a citada relação é intuitiva, porquanto a primordial finalidade da inflamação é a eliminação da causa injuriante).

No cobaio normal, o estudo microscópico do local injetado com "lepromina" permite verificar que o *M. leprae* é fagocitado por "macrófagos fixos", em cujo citoplasma é destruído. A lise bacilar precede ao aparecimento das "células pré-epitelióides" e "epitelióides", sendo provável que substâncias libertadas pelos bacilos destruídos sejam responsáveis pelas modificações do caráter citológico das lesões⁷. Baseado na observação histológica das fases sucessivas da reação inflamatória, pode-se supor que o ma-

crófago após ter usado o *M. leprae*, seja suscitado a se transformar na "célula epitelióide"; esta tem por função metabolizar os produtos oriundos da destruição bacilar (tornando-os solúveis, isto é, passíveis de eliminação), os quais são responsáveis pela sua formação ⁷.

Excluída a lesão exsudativa inicial, a reação crônica dos tecidos do cobaio, inoculado com "lepromina", pode ser esquematicamente dividida em duas fases, as quais possuem caracteres morfológicos, mas são principalmente funcionais: 1 — fase de use bacilar, na qual desempenham papel principal os macrófagos (fase dos macrófagos) ; 2 — fase de degradação e eliminação dos produtos libertados pelos bacilos usados, desempenhada especialmente pelas "células epitelióides" (fase das "células epitelióides").

Em relação ao *M. tuberculosis* as reações dos tecidos são idênticas, verificando-se as mesmas fases; os bacilos são também destruídos no interior de vacúolos dos macrófagos, os quais posteriormente se transformam em "células epitelióides", de modo comparável ao que fôra observado em cultura de tecidos infectados com BCG. ²³.

O estudo comparado dessas duas fases, em cobaios inoculados com *M. tuberculosis* e *M. leprae*, proporciona mais elementos para a análise da interação *bacilos-células do hospedeiro*.

Os macrófagos são menos numerosos nas lesões produzidas pelo BCG., após o 4°-6° dia de evolução, o que sugere apresentarem êles duração mais efêmera, devido sua rápida transformação em "células epitelióides"; em outras palavras, a fase de lise bacilar parece ser mais breve nas lesões provocadas pelo *M. tuberculosis*, sendo mais precoce a fase de "células epitelióides". Pode-se supor, de acôrdo com o estudo histológico da evolução das lesões que o *M. tuberculosis* seja usado com relativa rapidez pelos macrófagos do cobaio, o que seria responsável pela presença de "células epitelióides" desde o 6° dia de evolução, pela estrutura pouco pleomorfa da lesão, pelo predomínio de "células epitelióides" desde o 18° dia e principalmente, pelas alterações morfológicas observadas nos bacilos desde o 3° dia e pela ausência de Mycobactérias nas lesões com 24 dias.

Na reação histológica dos cobaios injetados com "lepromina" os macrófagos são encontrados com maior freqüência e persistem até o 24°-27° dia de evolução, o que confere aspecto pleomorfo à lesão; as primeiras "células epitelióides" são assinaladas sômente após o 9° dia e os bacilos persistem até o 27° dia. Todos esses fatos parecem depender do prolongamento da fase de lise bacilar, conseqüência de maior resistência à lise oposta pelo *M. leprae*.

A presença de bacilos nas lesões produzidas pelo BCG., até o 24° dia de evolução, parece relacionada, ao menos em parte, com a forte afluência leucocitária suscitada pelo *M. tuberculosis*, quando injetado, na dose empregada (0,33 mg), no derma de cobaios normais. Numerosos bacilos são fagocitados pelos leucócitos coletados na área central da lesão. Fôra assinalado ^{18, 21, 12, 13} que o *M. tuberculosis* permanece sem ser molestado,

quando no interior de granulócitos e monócitos, o que está de acôrdo com nossa observação; a lise bacilar apenas se verifica após fagocitose dos leucócitos (contendo bacilos), pelos macrófagos. O grande afluxo e a atividade fagocitária dos leucócitos, protege temporariamente os bacilos, impedindo a lise imediata por parte dos macrófagos.

Apesar do *M. leprae* determinar menor afluxo de leucócitos, são encontrados bacilos inclusive em lesões com 27 dias de evolução.

O método histológico sugere, portanto, que o *M. tuberculosis* é lisado com maior brevidade que o *M. leprae*, pelo macrófago do cobaio normal; estas observações, realizadas em tecidos de mamíferos, concordam com o que fôra verificado em larvas de insetos^{15, 16}.

A desigualdade de comportamento dos dois bacilos, em face da reação inflamatória dos tecidos, é independente da vitalidade (foram injetados germes mortos pelo calor), devendo relacionar-se com a estrutura, composição química e propriedades físico-químicas da célula bacteriana; isto é, o *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, de acôrdo com suas propriedades químicas e físico-químicas, constituiriam substratos sôbre os quais as enzimas dos macrófagos atuariam com maior ou menor eficiência e rapidez. Em se tratando de cobaios normais (excluída a resistência adquirida) as enzimas responsáveis pela lise não são específicas, sendo comparáveis às lisozimas de Fleming^{3, 4}.

A importância do conteúdo em lípidos, na resistência dos bacilos AAR. frente aos agentes físicos e químicos, foi assinalada por Shen¹⁹, o qual evidenciou relação direta entre êsses dois fatores.

Os lípidos podem ser apontados como os principais responsáveis pela diferença de comportamento do *M. tuberculosis* e do *M. leprae*, em face das enzimas dos macrófagos (a "substância estromática" das Mycobactérias é constituída, principalmente, por um complexo de lípidos e glúcides²). Várias observações concordam com êste modo de ver: foi verificado que o *M. lepraemurium* préviamente tratado pelo tolueno, é mais facilmente destruído pelos tecidos do rato experimentalmente inoculado; tivemos ocasião de observar que suspensões de *M. leprae* contendo bacilos separados dos restos de tecidos, pelo clorofórmio, produzem lesões, em cobaios, cuja evolução é mais rápida que as provocadas pela "lepromina" (bacilos não tratados pelo clorofórmio).

Os estudos sôbre a composição química do *M. tuberculosis* (principalmente relacionados com os lípidos), em comparação com o *M. leprae*, são até agora insuficientes para assinalar diferenças possivelmente responsáveis pela desigualdade de comportamento dos bacilos, quando introduzidos nos tecidos do cobaio. Há grandes variações quantitativas relacionadas com a virulência, com os meios de cultura nos quais os bacilos se desenvolvem, etc.; além disso, o bacilo da lepra estudado quimicamente não constitui o verdadeiro *M. leprae* e sim germes cultivados a partir de lesões leprosas 1 e 22.

Sôbre as propriedades físico - químicas das duas Mycobactérias muito

pouco se conhece, principalmente no que se refere à observação comparada (o *M. leprae* é mais refringente que o *M. tuberculosis*).

O *M. leprae* produz, nos tecidos humanos, lesões histológicas de dois tipos fundamentais: as pertencentes ao tipo tuberculóide identificam-se às lesões provocadas pelo *M. tuberculosis*, no homem; porém, as lesões do tipo lepromatoso diferem fundamentalmente das tuberculosas. Na lesão lepromatosa o *M. leprae* não é destruído pelo macrófago, o qual armazena bacilos no seu interior e se transforma na célula leprosa; ao contrário, nas lesões tuberculóides os bacilos são lisados pelo macrófago. Esses dois tipos fundamentais de reação dos tecidos humanos dependem, em última análise, da capacidade funcional do macrófago⁷. A injeção intradérmica de "lepromina" (Reação de Mitsuda) permite averiguar essa capacidade funcional.

O estudo comparado das lesões provocadas pela injeção intradérmica de suspensão de BCG. e de "lepromina", no homem ⁵, revelou que o BCG. produz "reação positiva", mesmo nos casos em que a "lepromina" apresenta "reação negativa" (a "reação positiva" equivale à formação de lesão com estrutura tuberculóide, isto é, significa destruição dos bacilos e metabolização dos produtos libertados pelos bacilos lisados; a "reação negativa" tem como caráter histopatológico a presença de células leprosas, que não destroem os bacilos) ; essa observação, realizada em leprosos ⁵, revela que o macrófago humano com capacidade de lisar o *M. tuberculosis* injetado no derma, nem sempre está apto para destruir o *M. leprae* injetado pela mesma via. Êste último parece opor maior resistência à lise, inclusive em relação ao macrófago humano.

SUMMARY

The study of the tissue reactions suscitated by *M. leprae* and *M. tuberculosis* and the fate of inoculated bacterial cells, were made in normal guinea-pigs injected intracutaneously.

92 normal and tuberculin negative guinea-pigs were divided in 4 lots:

- 1) 32 injected with 0.1 ml of a suspension containing 0.33 mg of BCG.;
- 2) 20 injected with 0.1 ml of "lepromin" containing nearly 0.074 mg of *M. leprae*;
- 3) 20 injected with 0.1 ml of "lepromin" containing nearly 0.34 mg of *M. leprae*;
- 4) 20 injected with 0.1 ml of a suspension containing 0.33 mg of BCG. on one side and 0.1 ml of "lepromin" containing nearly 0.34 mg of *M. leprae* on the other side.

The cutaneous reaction was observed macroscopically in the animals of the lots 1, 2 and 3; microscopic examination was made in 60 guinea-pigs of the 4 lots.

The macroscopic results shows: a) BCG. injection produce stronger initially reaction, which presents total involution 24 days after inoculation; b) the "lepromin" (containing 0.34 mg of bacilli) produce weaker initial reaction, but the involution is slower, disappearing only 30-40 days after inoculation.

Histologically both Mycobacteria suscite reactions of the same type and with the same cytological constitution; there are only small quantitative differences. But the histological evolution of the lesions shows definite differences: the BCG. suscite lesions which presents less slow evolution and remain early without bacilli.

In normal guinea-pigs injected intracutaneously with "lepromin", the *M. leprae* is phagocytosed and lysed by macrophages; the substances liberated by lysis induce the transformation of the macrophage into "epithelioid cells". This latter appear to be endowed of high metabolic activity and produces splitting of substances liberated by bacillary lysis. The normal guinea-pig tissue reactions against *M. leprae* (excluded the initial acute phasis) can be divided into two phasis: 1—phasis of lysis of bacilli, or macrophages phasis; 2 —phasis of splitting and elimination of the lysis products, or "epithelioid cell" phasis.

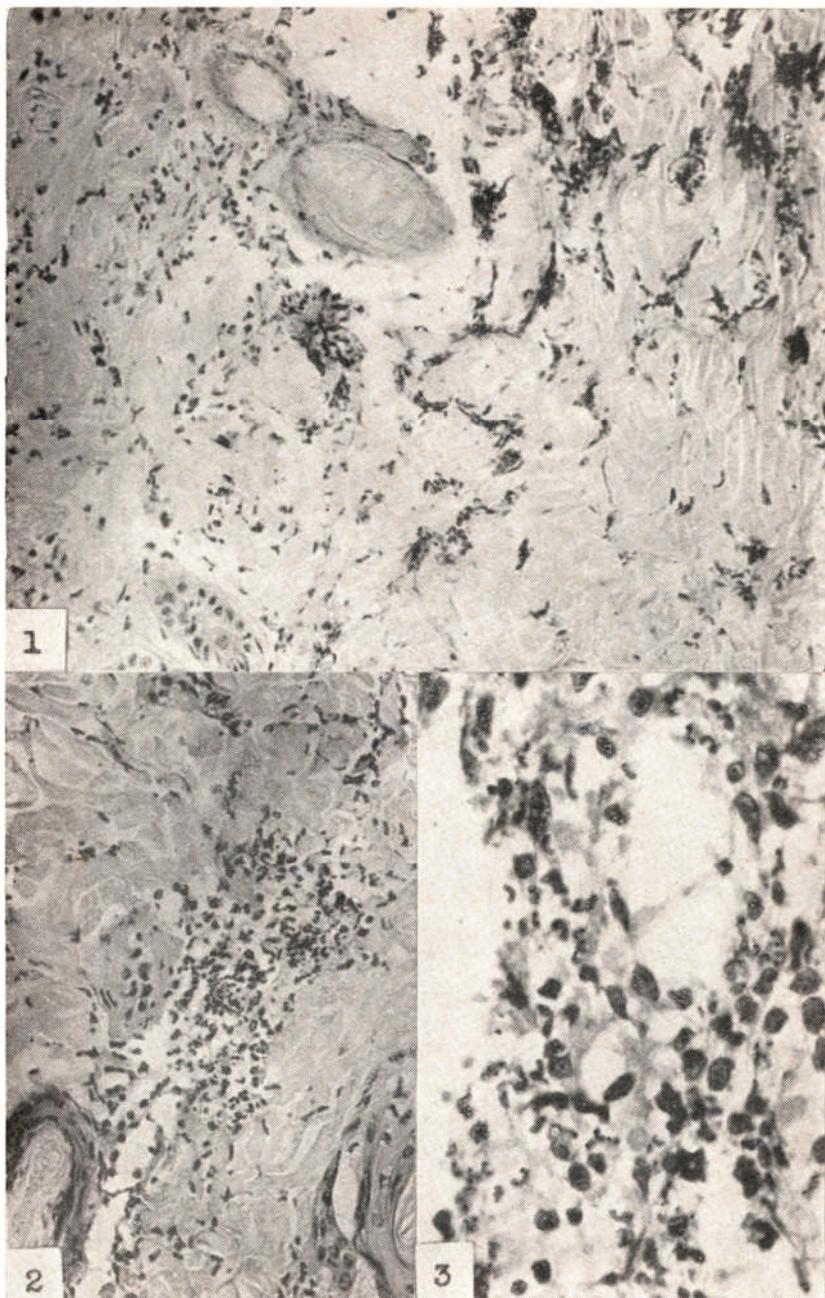
The reactions suscitated by *M. tuberculosis* shows these same two phasis, but the "macrophage phasis" is shorter and the "epithelioid cell phasis" comes earlier ("epithelioid cells" can be seen 6 days after inoculation). In the lesions produced by "lepromin" the "macrophages phasis" take up a good deal of time and the "epithelioid cells phasis" comes later.

The quicker evolution of the lesions, the earlier disappearance of the bacilli, the shorter "macrophages phasis" and the earlier presence of "epithelioid cells", in the reactions suscitated by BCG. injection (compared with "lepromin" lesions), support the view that the *M. tuberculosis* lysis is more rapid (than *M. leprae* lysis), in guinea-pigs tissues. On the other hand the *M. leprae* lysis likes to be more slow.

The unlike lysis speed of these two Mycobacteria (by the guinea-pig macrophages), probably is determined by differences of structure, chemical composition and physico-chemical properties. These properties make the bacterial cell more or less resistant against the non specific lytic enzym of the macrophage. The lipids contained in these two acid fast bacilli probably have a great account in this matter.

The higher resistance opposed by *M. leprae* against lysis can explain the two fundamental types of histological structures which this bacillus suscite in human tissues. In the lesions with the lepromatous type of structure, the macrophages are not able to destroy the bacilli, and undergo the transformation into the lepromatous cells. In the tuberculoid type of structure the bacilli are lysed by the macrophages, which undergo the transformation into "epithelioid cells".

The "lepromin reaction" also show these two types of structures included in non-leprosy persons, showing that the human macrophages not always have ability to destroy *M. leprae*. On the other hand the intracutaneous injection of *M. tuberculosis* in human beings (included in lepromatous cases) shows always the only one type of structure: the tuberculoid granulomatoma, with bacillary lysis.

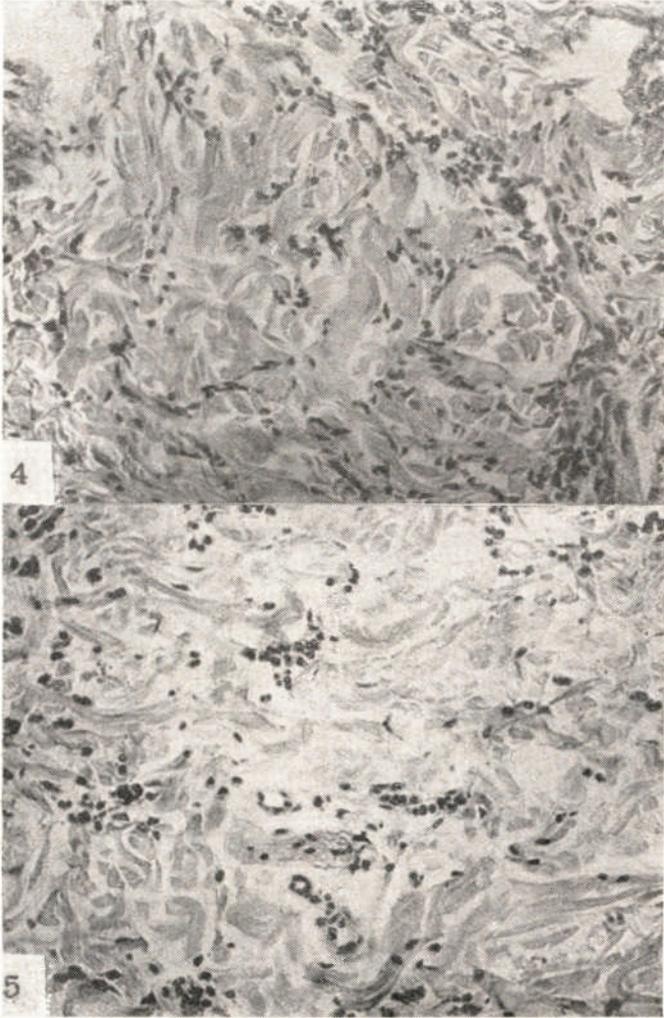


Fotomicrografias ns. 1, 2 e 3. Corte histológico de lesões produzidas pela injeção intradérmica de 0,33 mg de BCG., em cobaias normais; H.E..

Nº 1 — 24 horas após a injeção; grande afluxo de leucócitos que se coletam nos interstícios do colágeno, sem formação de micro-abscesso; 200 x.

Nº 2 — 72 horas após a injeção; coleção de neutrófilos; ausência de micro-abscesso; 200 x.

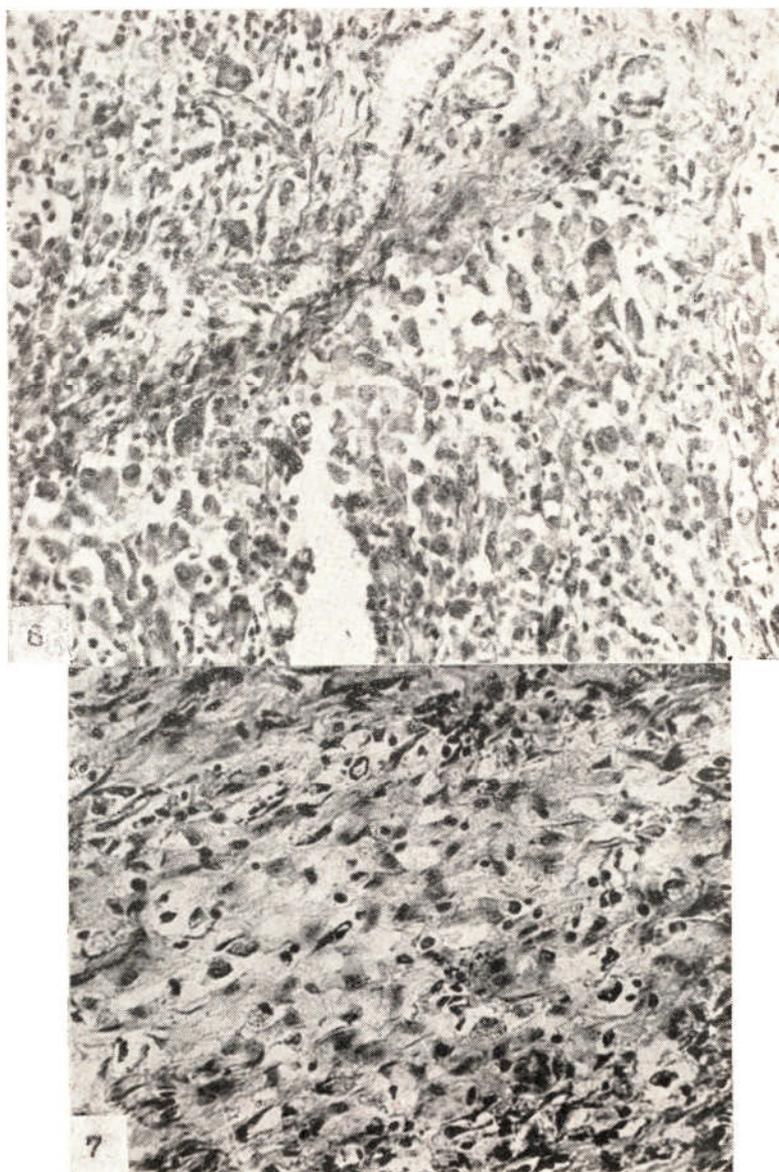
Nº 3 — 72 horas após a injeção; numerosos neutrófilos e "macrófagos vacuolizados"; 350 x.



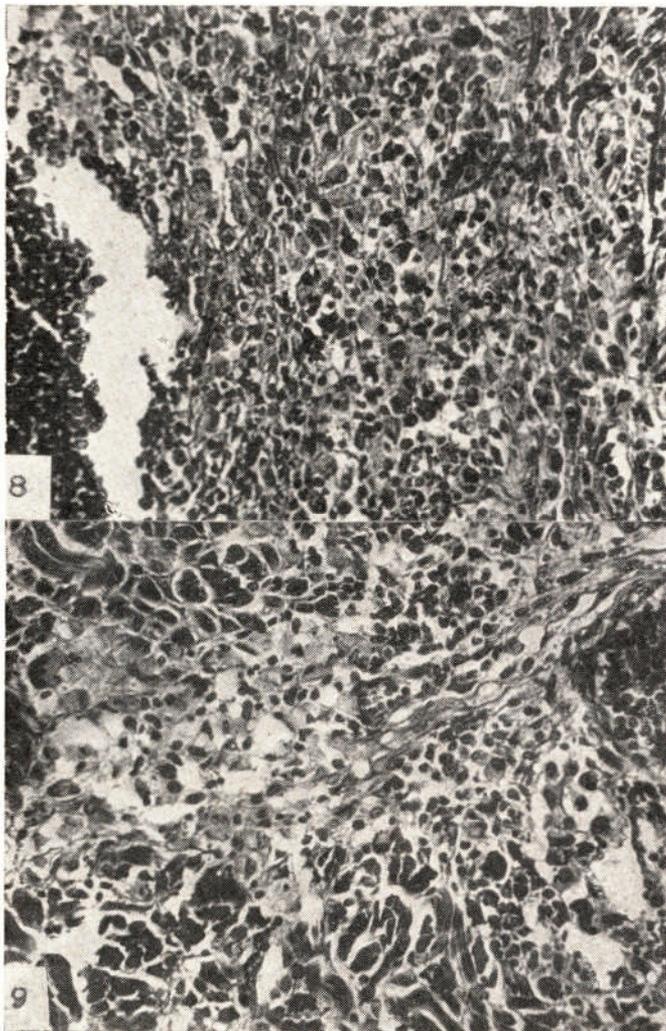
Fotomicrografias ns. 4 e 5. Corte histológico de lesões produzidas pela injeção intradérmica de "lepromina", contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*, em cobaias normais; H.E.; 200 x.

Nº 4 — 24 horas após a injeção; discreto infiltrado leucocitário; comparar com a fotomicrografia nº 1.

Nº 5 — 72 horas após a injeção; infiltrado leucocitário muito discreto (comparar com a fotomicrografia nº 2); numerosas "células fixas ativadas" e "alguns macrófagos vacuolizados".

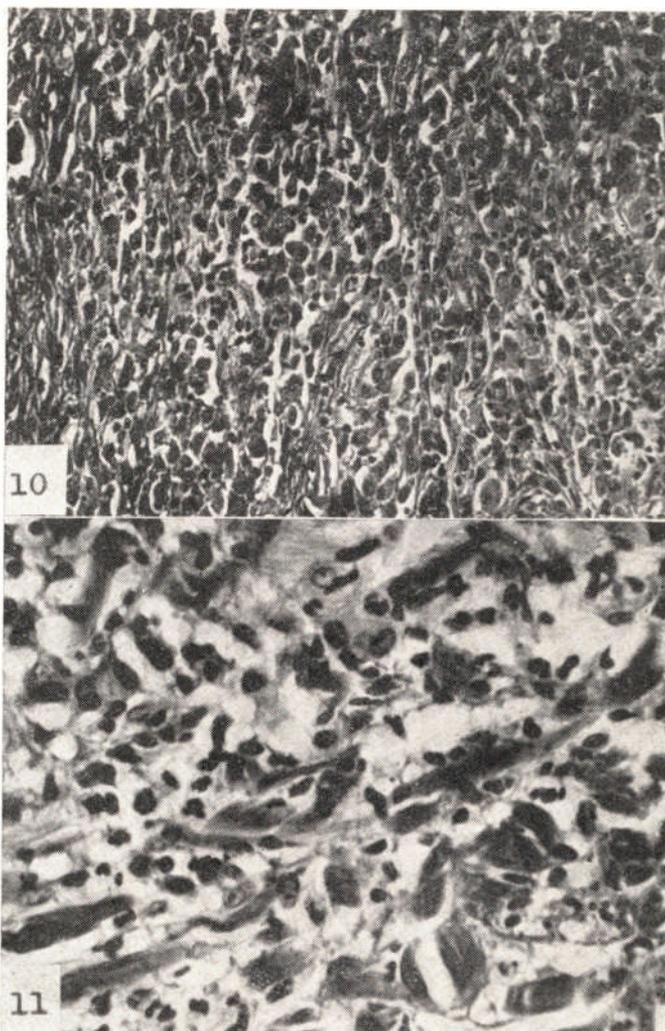


Fotomicrografia n° 6 — H.E.; 200 x. Cobaio injetado com 0,33 mg de BCG.; lesão com 18 dias de evolução; predomínio de "células epitelióides", dispostas em estrutura relativamente densa.
Fotomicrografia n° 7 — H.E.; 200 x. Cobaio injetado com "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 de *M. leprae*; lesão com 18 dias de evolução, constituiria principalmente por "células pré-epitelióides" e "macrófagos fixos".



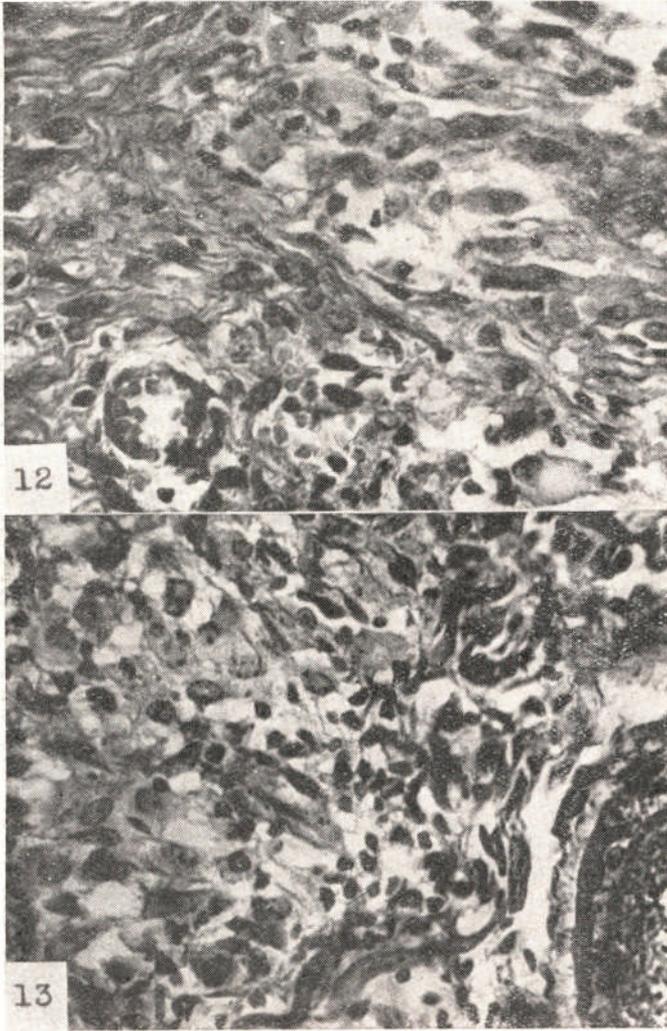
Fotomicrografia n° 8 — H.E.; 200 x. Cobaio injetado com 0,33 mg de BCG.; lesão com 24 dias de evolução; micro-abscesso e tecido granulomatoso constituído principalmente por "células epitelióides"; estrutura densa.

Fotomicrografia n° 9 — H. E.; 200 x. Cobaio injetado com "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*; lesão com 24 dias de evolução; pleomorfismo celular devido à persistência de macrófagos; "células epitelióides" pouco numerosas; estrutura frouxa; disposição perivascular.



Fotomicrografia n° 10 — H.E.; 200 x. Cobaia injetado com 0,33 mg de BCG.; lesão com 27 dias de evolução; estrutura densa; predomínio de "células epitelióides"; tendência à fibrose (alguns fibrócitos e discreta produção de colágeno).

Fotomicrografia n° 11 — H.E.; 400 x. Cobaio injetado com "lepromina" contendo aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*; lesão com 27 dias de evolução; estrutura frouxa; presença de macrófagos; não há tendência à fibrose.



Fotomicrografia n° 12 — H.E.; 400 x. Cobaio injetado com BCG. (0,33 mg), 40 dias de evolução; lesão em franca involução, com nítida fibrose; "células epitelióides" com alterações degenerativas.

Fotomicrografia n° 13 — H.E.; 400 x. Cobaio injetado com "lepromina" (aproximadamente 0,34 mg de *M. leprae*); 40 dias de evolução; discreta fibrose; alterações involutivas das "células epitelióides".

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Anderson, R. J. & Uyei, N. — The chemistry of the lipids of tubercle bacillus. XXVII. The composition of the phosphatide fraction of the *Bacillus leprae*. J. Biol. Chem. 97:617, 1932
2. Choucroun, N. — Tubercle bacillus antigens. Biological properties of two substances isolated from paraffin oil extract of dead tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. 56:203, 1947
3. Fleming, A. — On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. Royal Soc. Biol. 93:306, 1922
4. Fleming, A. & Allison, V. D. — Further observations on a bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. Royal Soc. Bact. 94:142, 1922
5. Floch, H. — Réaction de Mitsuda et intradermo-réaction au BCG. tué dans la lèpre. Conclusions théoriques et pratiques. Ann. Inst. Pasteur 82:517, 1952
6. Floch, H. — Discussions sur les résultats obtenus en prophylaxie antilépreuse par la vaccination B.C.G.. Arq. Saúde Publ. Goiânia 2:84, 1953
7. Radler, W. A. — Comportamento do cobaio e do rato, normais, injetados com "lepromina" por via intradérmica. Rev. Brasil. Leprol. 21:166, 1953
8. Hadler, W. A. & Zitti, L. — Trabalho em publicação
9. Hayashi, F. — Mitsuda's skin reaction in leprosy. Internat. J. Leprosy 1:31, 1933
10. Klingmueller, V. — Die Lepra. In Jadassohn, J. — Handbuch der Hunt-und Geschlechts Krankheiten. J. Springer, Berlin, 10:113, 1930
11. Leloir, H. — Essais d'inoculation de la lèpre aux animaux. Ann. Dermat. et Syph. 7:625, 1887
12. Lurie, M. B. — The fate of human and bovine Tubercle bacilli in various organs of the rabbit. J. Exp. Med. 48:155, 1928
13. Lurie, M. B. — The correlation between the histological changes and the fate of living Tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. J. Exp. Med. 55:31, 1932
14. Markianos, J. — Essai de traitement de la lèpre des rats par les bacilles dégraissés. Bull. Soc. Path. Exot. 23:145, 1930
15. Metalnikov, S. — L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles, *Galleria mellonella*. Monograf. Inst. Pasteur, Masson et Cie., Paris, 1927
16. Metalnikov, S. & Toumanoff, F. — La lèpre chez les insectes. Cump. rend. Soc. Biol. 89:935, 1923
17. Montel, M. L. R. — Affinités tintoriales du bacille de la tuberculose aviaire (méthode de Macchiavello). Comparaison avec le bacille de Koch, avec le bacille de Hansen et le bacille de Stefansky. Bull. Soc. Path. Exot 44:47, 1951
18. Sabin, F. R. & Doan, C. A. — The relation of monocytes and clasmatocytes to early infection in rabbits with bovine tubercle bacilli. J. Exp. Med. 46:627, 1927

19. Shen, T. H. — The Opine contents of Mycobacteria and their resistance against chemical disinfectants. *J. Shanghai Sci. Inst.* 1:167, 1934
20. Souza. Araujo, H. C. de — Experimental leprosy. *Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg.* 24:577, 1931
21. Tytler, W. H. — Allergy and immunity in tuberculosis. In *a System of Bacteriology in Relation to Medicine*, London, 5:228, 1930
22. Yyei, N. & Anderson, R. J. — The chemistry of the lipids of tubercle bacilli. XXVI Separation of the lipid fractions from the leprosy bacillus. *J. Biol. Chem.* 94:653, 1932
23. Wermel, E. M. — Reaktion der Zellen auf Tuberkelinfektion in den Gewebeskulturen. *Virchows Arch.* 281:297, 1931
24. Relatório da Comissão de Classificação da II Conferência Panamericana de Lepra. Rio de Janeiro, 1940. *Imunologia. Arq. Serv. Nac. Lepra* 5:185, 1947