

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 22

JUNHO DE 1954

NÚMERO 2

ESTUDO COMPARADO DAS LESÕES PROVOCADAS POR SUSPENSÕES DE “*M. LEPRÆ*” DE *M. TUBERCULOSES*, INJETADAS POR VIA INTRADÉRMICA, EM COBAIOS PRÉVIAMENTE VACINADOS PELO BCG

W. A. HANDLER (*)

As reações inflamatórias suscitadas pelo *M. leprae* e pelo *M. tuberculosis*, em cobaios normais injetados por via intradérmica, possuem a mesma constituição citológica, havendo identidade morfológica e funcional das células que integram as lesões. No entanto, a bacterioscopia, a intensidade da reação e o seu ritmo evolutivo, revelam diferenças quantitativas. A verificação bacterioscópica, apesar de imprecisa, permite avaliar, comparativamente, o comportamento dessas duas micobactérias em face da reação inflamatória dos tecidos, isto é, indica o mecanismo de destruição e a época em que as lesões se tornam histologicamente abacilares. De modo semelhante, o ritmo evolutivo das lesões, que provavelmente constitui dependência indireta da resistência oposta pela célula bacteriana à lise por parte dos macrófagos, reflete a velocidade com que os bacilos são destruídos nos tecidos lesados².

Portanto, a observação histológica e bacterioscópica das lesões provocadas pelo *M. leprae* e pelo *M. tuberculosis*, em cobaios normais, permite não somente o estudo da reação inflamatória, que se produz no local injetado, como proporciona dados que se relacionam direta ou indiretamente com a lise das micobactérias. Baseado nesses elementos, assinalou-se que o *M. leprae* é mais resistente à ação lítica desempenhada pelo macrófago do cobaio normal, em relação ao *M. tuberculosis*².

No entanto, as diferenças de intensidade, que se apresentam durante todo o decurso evolutivo das lesões suscitadas pelas micobactérias referi-

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

das, no cobaio normal, prejudicam o estudo comparativo. O *M. tuberculosis* produz reação exsudativa inicial relativamente intensa, com grande afluxo de leucócitos e formação de um micro-abscesso; o caráter supurativo da lesão exerce influência indireta sobre a lise dos bacilos².

A ausência de micro-abscesso nas lesões provocadas pelo *M. leprae*, em idênticas condições de trabalho, determina heterogeneidade no material de estudo, a qual dificulta a interpretação dos resultados.

Devido às razões apontadas e com o objetivo de efetuar observações em material menos heterogêneo, as reações inflamatórias provocadas pelo *M. leprae* e pelo *M. tuberculosis* serão estudadas comparativamente, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Nestas circunstâncias, as lesões são mais semelhantes entre si, proporcionando condições mais apropriadas para o estudo comparado. Apesar de persistirem diferenças quanto à intensidade da reação inflamatória, são elas de pequeno grau, exercendo menor interferência na interpretação dos resultados.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 98 cobaios de ambos os sexos, com peso compreendido entre 380,0 e 570,0 g e em boas condições de saúde aparente.

Após ter sido verificado que a injeção intradérmica de 0,1 ml de tuberculina bruta a 1/10 não revelara hipersensibilidade tuberculínica, os animais foram divididos em 8 lotes e inoculados com suspensão de BCG em solução de cloreto de sódio a 0,85%.

Lote 1 — Cobaios vacinados pelo BCG e posteriormente injetados com suspensão de "M. tuberculosis", por via intradérmica. — Compreende 58 cobaios assim distribuídos: 32 injetados, por via intraperitoneal, com 2,0 ml de suspensão de BCG contendo 33,0 mg de bacilos; 26 injetados, por via intramuscular, com 1,0 ml de suspensão de BCG contendo 33,0 mg de bacilos.

Repetiu-se a reação tuberculínica (0,1 ml de tuberculina bruta a 1/10, por via intradérmica), 30 dias após a inoculação do BCG, em todos os animais, tendo sido verificado hipersensibilidade evidente. No 40º dia que sucedeu a inoculação do BCG injetou-se, por via intradérmica, 0,05 ml de suspensão de *M. tuberculosis* (BCG) contendo 0,165 mg de bacilos. Esta suspensão fora previamente aquecida a 1000C durante duas horas. A injeção foi efetuada em dois pontos diferentes (uma em cada flanco), tendo sido um deles utilizado para a observação macroscópica e o outro para o estudo histológico da lesão.

Lote 2 — Cobaios vacinados com BCG e posteriormente injetados com lepromina por via intradérmica. — Compreende 22 cobaios injetados, por via intraperitoneal, com 2,0 ml de suspensão de BCG contendo 33,0 mg de bacilos.

A reação tuberculínica (0,1 ml de tuberculina bruta a 1/10), repetida 30 dias após a inoculação do BCG, foi nitidamente positiva nos 22 animais que fazem parte do lote. Deve ser assinalado que 3 cobaios não reagiram de forma evidente à tuberculina, tendo por isso sido excluídos, não constando da cifra citada.

Na mesma época que os animais do lote 1, isto é, 40 dias após a inoculação do BCG, os cobaios do lote 2 foram injetados, por via intradérmica, com 0,1 ml

de lepromina (*) contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae* (a determinação da quantidade de bacilos foi efetuada por método descrito em trabalho anterior ⁴). Foram injetados dois pontos diferentes (um em cada flanco), tendo um deles servido para o estudo macroscópico e o outro para a verificação microscópica da reação.

Lote 3 — Cobaios vacinados com BCG e injetados, concomitantemente, com suspensão de "M. tuberculosis" (BCG) e de "M. leprae" (lepromina), por via intradérmica. — Compreende 20 cobaios inoculados, por via intraperitoneal, com 2,0 ml de suspensão de BCG contendo 33,0 mg de bacilos.

A reação tuberculínica, efetuada com 0,1 ml de tuberculina bruta a 1/10 (via intradérmica), 30 dias após a administração do BCG, revelou hipersensibilidade evidente em todos os animais. No 40° dia que sucedeu a inoculação do BCG, os cobaios foram injetados, concomitantemente, com suspensão de *M. tuberculosis* e de *M. leprae*; para isso inoculou-se, em um dos flancos, 0,05 ml de suspensão de BCG contendo 0,165 mg de bacilos, e, no outro flanco 0,1 ml de suspensão de *M. leprae* (lepromina), contendo aproximadamente 0,170 mg de bacilos (**). Os animais deste lote foram utilizados apenas para a observação das lesões.

O estudo da reação macroscópica, provocada pela suspensão de BCG ou pela lepromina, foi efetuado mediante a verificação dos caracteres e do diâmetro da reação nodular que se formou no local injetado. A observação foi diária até o 6° dia, cada 3 dias até o 30° dia e cada 10 dias até o 50° dia.

Nos mesmos períodos as lesões suscitadas pelas duas micobactérias foram estudadas histologicamente, tendo sido praticadas 76 biópsias. O material, após fixação em solução de formol a 10,0%, foi incluído em parafina e corado pela hematoxilina-cosina, eosina, Ziehl-Neelsen, Mallory e método de Gomori para reticulina.

RESULTADOS

I - MACROSCÓPICOS:

*Lote 1 — Cobaios vacinados com BCG e posteriormente injetados, por via intradérmica, com 0,165 mg de "M. tuberculosis" (BCG). — A reação macroscópica tem início 1-3 horas após a inoculação intradérmica do *M. tuberculosis* e acentua-se progressivamente; atinge o máximo 24 horas após a injeção, traduzindo-se por nódulo eritematoso cujo diâmetro médio é 20,12 mm (há grandes variações individuais: ver quadro 1). O nódulo geralmente ulcera-se no 3°-4° dia e involue lentamente até o 30° dia que sucede a inoculação (ver quadro 1 e gráfico), deixando pequena cicatriz fibrosa, na maioria dos casos.*

Lote 2 — Cobaios vacinados com BCG e posteriormente injetados, por via intradérmica, com 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de "M. leprae". — A reação macroscópica tem início 1-5 horas após a injeção da lepromina e acentua-se até a 24° hora, quando atinge a intensidade máxima e se apresenta sob aspecto nodular e eritematoso. A involução da reação nodular é lenta, atingindo 40° dia que sucede a inoculação. Geralmente há ulceração (73,56% dos casos), a qual é responsável por pequena cicatriz fibrosa residual.

(*) A lepromina foi preparada, segundo o método de Hayahi⁵, pelo Dr. M. de Souza Lima, a quem agradecemos.

(**) A lepromina injetada neste lote foi concentrada por redução correspondente do volume do veículo.

Os resultados assinalados são idênticos aos expostos em outro trabalho ³ e referentes à reação da lepromina em cobaias previamente vacinados com o BCG; por essa razão, serão utilizados os dados nêles referidos, como termo de comparação, porquanto estão baseados em maior número de observações (quadro 2 e gráfico).

A comparação das reações macroscópicas provocadas, em cobaias previamente vacinados com o BCG, pela injeção intradérmica de *M. leprae* e do *M. tuberculosis* revela: a) a suspensão de BCG produz reações inicialmente mais intensas, as quais regridem totalmente em 30 dias; b) a lepromina induz reações mais fracas, porém mais duradouras. Convém acentuar que a referida comparação é falha porquanto foram empregadas doses diferentes das duas microbactérias; no entanto, apesar da quantidade de *M. leprae* ser comparativamente menor, a reação por êle suscitada possui maior duração (ver quadro 3 e gráfico).

Dias após a inoculação	Diâmetro médio (em milímetros)	
	0,165 mg de BCG	Lepromina contendo ap. 0,074 mg de <i>M. leprae</i>
1	20,12	6,19
2	15,55	5,86
3	13,21	5,13
4	12,24	4,45
5	12,17	4,23
6	12,20	4,66
9	11,24	4,48
12	10,31	4,06
15	7,41	3,77
18	5,03	3,32
21	3,48	2,84
24	1,34	2,33
27	0,08	1,78
30	0,00	1,05
40	0,00	0,00

Quadro 8 — Comparação entre o diâmetro médio (la reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de BCG e lepromina, em cobaias previamente vacinados pelo BCG.

II — MICROSCÓPICOS:

Lote 1 — Cobaias vacinados com BCG, e posteriormente injetados, por via intradérmica, com 0,165 mg de "M. tuberculosis". — O estudo da reação histológica será dividido em períodos, o que facilita a exposição, além de estar relacionado com etapas evolutivas das lesões.

24-48 horas: A reação inflamatória inicial é bastante intensa, atinge o derma e as áreas próximas do hipoderma e tem caráter exsudativo agudo; há edema evidente e grande afluxo leucocitário (neutrófilos, monócitos, alguns linfócitos e costi-

Dias após inocul.	Ausência de reação		0,1 — 2,0 mm		2,1 — 4,0 mm		4,1 — 6,0 mm		6,1 — 8,0 mm		8,1 — 10,0 mm			
	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%		
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3,45		
3	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3,45	6	10,84		
4	—	—	—	—	—	—	—	3	5,17	3	5,17	10	17,24	
5	—	—	—	—	—	—	—	4	6,89	4	6,89	10	17,24	
6	—	—	—	—	—	—	—	2	3,45	2	3,45	10	17,24	
9	—	—	—	—	—	—	—	4	6,89	4	6,89	14	24,14	
12	—	—	—	—	—	—	3	5,17	6	10,34	15	25,86		
15	—	—	—	—	1	1,72	12	20,69	28	48,27	98	48,27	10	17,24
18	—	—	—	—	16	27,58	28	48,27	11	18,96	18,96	3	5,17	
21	—	—	9	15,52	30	51,72	15	25,86	4	6,89	—	—		
24	14	24,14	29	50,00	13	22,41	2	3,45	—	—	—	—		
27	53	91,38	5	8,62	—	—	—	—	—	—	—	—		
30	58	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
40	58	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
50	58	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

Quadro 1 — Reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica

Presença de lesão nodular, eritematosa ou não, com:

10,1 — 12,0 mm		12,1 — 14,0 mm		14,1 — 16,0 mm		16,1 — 18,0 mm		18,1 — 20,0 mm		20,1 — 22,0 mm		22,1 — 24,0 mm		24,1 — 26,0 mm		26,1 — 28,0 mm		em mm
Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%													
1	1,72	1	1,72	3	5,17	10	17,24	14	24,14	14	24,14	7	12,07	5	8,62	3	5,17	20,12
4	6,89	10	17,24	17	29,31	15	25,86	6	10,34	3	5,17	1	1,72	—	—	—	—	15,55
11	18,96	23	39,65	9	15,52	5	8,62	2	3,45	—	—	—	—	—	—	—	—	13,21
18	31,08	16	27,58	6	10,34	4	6,89	1	1,72	—	—	—	—	—	—	—	—	12,24
17	29,31	16	27,58	6	10,34	4	6,89	1	1,72	—	—	—	—	—	—	—	—	12,17
16	27,58	17	29,31	8	13,79	4	6,89	1	1,72	—	—	—	—	—	—	—	—	12,20
21	36,21	12	20,69	4	6,89	3	5,17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11,24
21	36,21	10	17,24	3	5,17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10,31
5	8,62	2	3,45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,41
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,03
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,48
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,34
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,08
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,00
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,00
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,00

de 0,165 mg de *M. tuberculosis*, em cobaios previamente vacinados pelo BCG; diâmetro em milímetros. Nº de observações: 58.

Diâmetro

médio

Presença de pápula eritematosas,

Dias após a inocul.	Ausência de reação		0,1 — 1,0 mm		1,1 — 2,0 mm		2,1 — 3,0 mm		3,1 — 4,0 mm		4,1 — 5,0 mm		5,1 — 6,0 mm	
	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%
1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1,15	15	17,24	30	34,48
2	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2,29	20	22,99	32	36,78
3	—	—	—	—	—	—	1	1,15	13	14,94	24	27,59	32	36,78
4	—	—	—	—	1	1,15	6	6,89	22	25,29	30	34,48	24	27,59
5	—	—	—	—	1	1,15	8	9,19	23	26,44	30	34,48	22	25,29
6	—	—	—	—	—	—	5	5,74	14	16,09	40	45,98	20	22,99
9	—	—	—	—	1	1,15	7	8,04	17	19,54	35	40,23	22	25,29
12	—	—	—	—	1	1,15	7	8,04	40	45,98	23	26,44	13	14,94
15	—	—	—	—	3	3,45	13	14,94	41	47,12	19	21,84	9	10,34
18	—	—	1	1,15	4	4,59	30	34,48	33	37,93	13	14,94	5	5,74
21	2	2,29	3	3,45	7	8,04	40	45,98	24	27,59	8	9,19	3	3,45
24	5	5,74	8	9,19	12	13,79	41	47,12	16	18,39	5	5,74	—	—
27	12	13,79	16	18,39	16	18,39	29	33,33	12	13,79	2	2,29	—	—
30	22	25,29	24	27,59	26	29,86	12	13,79	3	3,45	—	—	—	—
40	87	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	87	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Quadro 2 — Reação macroscópica provocada pela lepromina em cobaios previamente va

ou não com:

Diâmetro

Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	Nº abs.	%	em mm
19	21,84	13	14,94	5	5,74	3	3,45	1	1,15			6,19
16	18,38	12	13,79	4	4,59	1	1,15					5,86
13	14,94	3	3,45	1	1,15							5,13
3	3,45	1	1,15									4,45
3	3,45											4,34
6	6,89	2	2,29									4,66
4	4,59	1	1,15									4,48
3	3,45											4,06
2	2,29											3,77
1	1,15											3,32
												2,84
												2,33
												1,78
												1,05
												0,00
												0,00

Finalizados com o BCG. Nº de observações: 87.

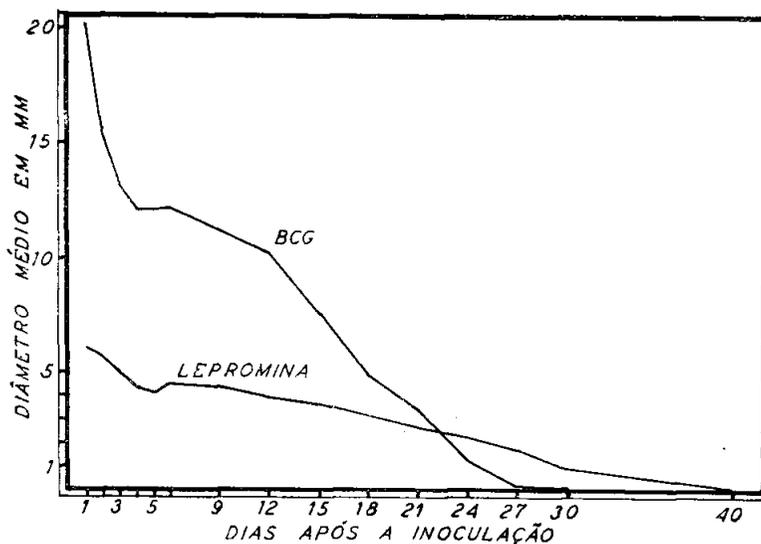


Gráfico 1 - Comparação entre os diâmetros médios da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de 0,165 mg de *M. tuberculosis* e aproximadamente 0,074 mg de *31. leprae* (lepromina), em cobaios previamente vacinados pelo BCG.

nófilos), principalmente na região central da lesão. :1 reação tem tendência à localização. Há intensas alterações degenerativas e necrose das células mais centrais, o que conduz à formação de micro-abscesso, inicialmente mal definido, o qual encerra os elementos degenerados (fotomicrografia 1).

Além disso, verifica-se intensa solitação das células conjuntivas fixas (intersticiais e perivascularares), havendo grande proliferação de "células fixas ativadas", as quais precocemente se transformam em células dotadas de citoplasma amplo e vacuolizado, que se dispõem em rede de aspecto sincicial; são os macrófagos fixos (fotomicrografia 1), presentes em grande número os quais, por sua vez dão origem a células pré-epitelióides e células epitelióides; estas últimas são pouco frequentes, raras observadas em lesões com 24-48 horas de evolução (verificam-se, inclusive, células epitelióides contendo 2-3 núcleos).

Dos elementos derivados das células conjuntivas predominam os macrófagos nas lesões corria 24 horas e as células pré-epitelióides nas lesões com 48 horas de evolução; dispõem-se em pequenos grupos situados, juntamente com leucócitos, nas proximidades do micro-abscesso.

Os bacilos são numerosos, isolados ou agrupados e localizados *de preferência* na área central da lesão; encontram-se livres, ou fagocitados por leucócitos (neutrófilos e monócitos). No interior dos macrófagos raramente há bacilos, os quais se apresentaram alterados morfológicamente; são observados macrófagos que encerram leucócitos contendo bacilos.

3º e 6º dia: A reação exsudativa e menos intensa que no período anterior, sendo menos numerosos os leucócitos, com exceção dos coletados no interior do abscesso; a lesão tem maior tendência à localização. As células epitelióides são numerosas e gradativamente passam a predominar sobre as demais; agrupam-se em pequenos

focos (fotomicrografia 3, nos quais são observadas raras células gigantes mal constituídas. Não há formação de estruturas tuberculóides, mas verifica-se disposição nodular em torno do abscesso. Os macrófagos constituem rede de aspecto sincicial, nas proximidades da cavidade do abscesso, tendendo a invadi-la.

Os bacilos são geralmente pouco numerosos e encontrados no interior de leucócitos; nos macrófagos são muito raros e se apresentam granulosos.

6^o-9^o dia: É mais acentuada a predominância de células epitelióides e a disposição nodular dos elementos que constituem o tecido granulomatoso, situado ao redor do micro-abscesso. As lesões neste período atingem o máximo de desenvolvimento histológico, sem contudo formarem lesões tuberculóides típicas. São observadas algumas células gigantes.

Os bacilos são raros e situados no citoplasma de leucócitos coletados no abscesso; os macrófagos muito raramente contêm bacilos.

9^o-12^o dia: As lesões apresentam aspecto histológico semelhante ao descrito anteriormente, havendo, porém, aparecimento de fibrócitos e de algumas fibras colágenas entre os elementos do tecido inflamatório; esse fato marca o início da involução da lesão, em cuja constituição, no entanto, predominam as células epitelióides (fotomicrografia 5). Os bacilos são raros inclusive no micro-abscesso.

12^o-21^o dia: O tecido granulomatoso que circunda o abscesso central contém numerosos fibrócitos e fibras colágenas, que dissociam as células epitelióides e formam pequenos septos fibrosos; há algumas células gigantes, principalmente de tipo corpo estranho. Predominam as células epitelióides, algumas das quais apresentam-se em degeneração (micro-vacuolização, picnose nuclear) e outras em transformação fibrocítica; entre elas são observados elementos com núcleo linfóide.

Os bacilos são muito raros, especialmente no final do período e encontrados apenas no interior de raros leucócitos contidos no abscesso; este geralmente apresenta-se aberto para o exterior.

21^o-27^o dia: Lesão formada por micro-abscesso de reduzidas dimensões, envolvido por tecido granulomatoso com adiantadas alterações involutivas e fibrose (fotomicrografia 7).

Os bacilos são excepcionais até o 249 dia e ausentes após.

27^o-40^o dia: As células epitelióides são pouco numerosas e dissociadas por tecido colágeno; o micro-abscesso tende ao desaparecimento (fotomicrografia 9).

50^o dia: Involução completa da lesão, verificando-se pequena cicatriz fibrosa.

Lote 2 — Cobaios previamente vacinados com BCG e injetados, por via intradérmica, com 0,1 de lepromina, contendo aproximadamente 0,074 mg de "M. leprae".

24-48 horas: Reação inflamatória intensa, de caráter agudo, predominantemente exsudativa (edema e grande afluência leucocitária, predominando os neutrófilos), com tendência à localização (fotomicrografia 2). Os leucócitos apresentam grandes alterações degenerativas que chegam à necrose celular em numerosos elementos. O grande afluxo leucocitário e a necrose celular são responsáveis pela formação do micro-abscesso, que se localiza no centro da lesão, ao redor do qual encontra-se a zona de reação inflamatória a cargo de elementos conjuntivos; esta é constituída por células fixas ativadas e macrófagos fixos (com citoplasma vacuolizado), dispostos em rede de aspecto sincicial. Tanto os leucócitos como os macrófagos possuem grande atividade fagocitária, principalmente em relação ao *M. leprae*.

Os bacilos são numerosos nos pontos em que é maior o afluxo de leucócitos e mais intensa a necrose; geralmente estão situados no interior do citoplasma dos fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos).

3^o-6^o dia: Observa-se maior localização e menor intensidade da reação exsudativa, em relação ao período anterior; os macrófagos são, ao contrário, mais numerosos (fotomicrografia 4) e tendem a se transformarem em células pré-epitelióides (3^o dia de evolução) e posteriormente em células epitelióides (4^o dia de evolução); os elementos citados constituem um tecido inflamatório regularmente denso e pleomorfo, que envolve o abscesso.

Os bacilos são numerosos e intracelulares; encontram-se frequentemente no interior de leucócitos contidos no abscesso, alguns dos quais são fagocitados por macrófagos.

6^o-9^o dia: A continua formação de células epitelióides torna a lesão citologicamente menos pleomorfa. Surgem algumas células gigantes mal constituídas. A lesão assume caráter focal mais proeminente, sobrevivendo estruturas nodulares.

Os bacilos são freqüentes nos leucócitos e em raros macrófagos situados no centro da lesão..

9^o-12^o dia: Constitui o período no qual as lesões atingem o máximo de desenvolvimento histológico; o tecido inflamatório que envolve o abscesso é denso e constituído predominantemente por células epitelióides (fotomicrografia 6) ; possui disposição nodular, não tipicamente tuberculóide. Os leucócitos estão situados quase exclusivamente no micro-abscesso. A presença de fibrócitos e de alterações degenerativas em algumas células epitelióides marcam o início da involução da lesão.

Os bacilos são freqüentes; encontram-se em leucócitos contidos no abscesso e raramente em macrófagos situados próximos.

12^o-21^o dia: A involução da lesão apresenta-se mais acentuada, havendo fibrose que dissocia as células epitelióides e produz septos no interior das estruturas nodulares. Entre as células epitelióides há raros neutrófilos e algumas células com núcleo linfóide.

Os bacilos são progressivamente menos numerosos e localizados na Area central da lesão.

21^o-27^o dia: As lesões apresentam-se em involução adiantada (fotomicrografia 8), principalmente no 27^o dia, sendo evidente a fibrose e pouco numerosas as células epitelióides (algumas em degeneração, ou em transformação fibrocítica). O abscesso possui reduzidas dimensões.

Os bacilos são raros no início e excepcionais no final do período.

27^o-40^o dia: Após o 27^o dia a fibrose é progressivamente mais acentuada; tornam-se numerosas as células com núcleo linfóide, ao contrário das células epitelióides (fotomicrografia 10). O micro-abscesso possui reduzidas dimensões. Não são observados bacilos.

No 50^o dia, em alguns casos verifica-se apenas lesão fibrosa cicatricial; porém, na maioria ainda são assinalados pequenos grupos de células epitelióides entre células linfóides e tecido colágeno.

Lote 3 — Cobaios previamente vacinados com BCG e injetados, concomitantemente, por via intradérmica, com 0,165 mg de "M. tuberculosis" e com suspensão contendo aproximadamente 0,17 mg de "M. leprae" (lepromina). — A injeção intradérmica de idêntico peso de M. tuberculosis e de M. leprae, em cobaios prévia-

Dias após inoculação	Lesões provocadas por 0,165 mg de BCG	Lesões provocadas p/ aproximadamente 0,17 mg de <i>M. leprae</i>
1-2 dias	Lesão exsudativa muito intensa e com tendência à localização; necrose e micro-abscesso; intensa solitação de elementos conjuntivos; presença de macrófagos, células pré-epitelióides e epitelióides; numerosos bacilos.	Lesões provocadas por aproximada- lizada; necrose celular e formação de micro-abscesso; menor solitação conjuntiva; presença de macrófagos; numerosos bacilos.
3-6 dias	Micro-abscesso envolvido por tecido inflamatório formado por macrófagos, numerosas células epitelióides e raras células gigantes; estrutura densa; disposição nodular; bacilos pouco numerosos.	Micro-abscesso envolvido por tecido inflamatório constituído por macrófagos e algumas células epitelióides; estrutura densa; numerosos bacilos.
6-90 dias	Lesão nodular com máximo de desenvolvimento histológico; estrutura densa e predomínio de células epitelióides; alguns leucócitos; bacilos raros.	Lesão nodular com numerosas células epitelióides e raras células gigantes; estrutura densa; bacilos numerosos.
9-12 dias	Início das alterações involutivas (fibrócitos e fibras colágenas); células epitelióides dissociadas; bacilos raros.	Lesão nodular com máximo de desenvolvimento histológico; estrutura densa; predomínio de células epitelióides; raros fibrócitos; bacilos numerosos.
12-21 dias	Involução acentuada, com tendência à fibrose; abscesso geralmente drenado para o exterior; bacilos muito raros.	Alterações involutivas progressivamente mais nítidas (fibrócitos, dissociação das células epitelióides); bacilos pouco numerosos.
21-27 dias	Intensa involução; numerosos fibrócitos e fibras colágenas; bacilos excepcionais até o 24º dia e ausentes daí por diante.	Involução acentuada; tendência à fibrose; redução do volume do abscesso; bacilos raros.
27-50 dias	Completa involução; cicatriz fibrosa microscópica no 50º dia.	Cicatrização incompleta mesmo no 50º dia, na grande maioria dos casos; bacilos muito raros até o 30º dia e ausentes após.

Quadro 4 — Estudo comparado das lesões microscópicas provocadas por 0,165 mg de BCG e aproximadamente 0,17 mg de *M. leprae*, em cobaias previamente vacinados pelo BCG.

mente vacinados pelo BCG, feita em um mesmo animal, permite melhor comparação da estrutura da lesão, atenuando a causa de erro dependente das variações individuais. Deve-se, porém, lembrar que a suspensão de BCG contém apenas o *M. tuberculosis*, enquanto que a lepromina encerra outros elementos dos lepromas triturados, os quais são passíveis de provocar reação quando introduzidos nos tecidos; o material injetado é portanto heterogêneo, constituindo causa de erro justificada pela grande dificuldade de separação do *M. leprae*, contido em suspensões de lepromas triturados ²,

No entanto, a fase tardia da reação dos tecidos e o comportamento dos bacilos em face dessa reação, parecem pouco influenciados pela heterogeneidade das suspensões; por essa razão tais pontos serão especialmente focalizados.

As diferenças histológicas verificadas nas lesões induzidas em um mesmo animal, por igual pêso de *M. tuberculosis* e do *M. leprae*, estão resumidas no quadro 4 e dizem respeito à intensidade e ao ritmo evolutivo da reação. O tipo de reação inflamatória é idêntico para as duas micobactérias e caracterizado pelos mesmos elementos histológicos, dotados de igual capacidade funcional.

As lesões provocadas pelo BCG são sempre mais intensas e possuem ritmo evolutivo mais acelerado, comparadas com as suscitadas por igual dose de *M. leprae*.

O método histológico permite verificar que desde o início é maior a solitação dos elementos conjuntivos nas lesões produzidas pelo *M. tuberculosis*, sendo mais precoce o aparecimento de macrófagos, células pré-epitelióides e epitelióides; as lesões atingem o máximo de desenvolvimento histológico mais cedo que as provocadas pela lepromina. As alterações involutivas sobrevêm mais precocemente nas lesões induzidas pelo BCG, havendo completa cicatrização no 50º dia que sucede a inoculação. Ao contrário, nos cobaios injetados com lepromina, as lesões geralmente não estão completamente involuídas no 50º dia.

Além disso, o número de bacilos diminui mais rapidamente nas lesões provocadas pelo *M. tuberculosis*, as quais tornam-se histologicamente abacilares após o 240 dia de evolução; o *M. leprae*, porém, é encontrado inclusive em lesões com 30 dias de evolução, quando a lepromina injetada contém aproximadamente 0,17 mg de *M. leprae* em 0,1 ml.

Com referência às duas doses de *M. leprae* utilizadas (aproximadamente 0,074 mg e 0,17 mg) verifica-se relação direta entre elas e a intensidade da reação suscitada. Porém, o ritmo evolutivo da lesão é idêntico, não havendo diferenças demonstráveis pelo método empregado. Os bacilos aparentemente permanecem maior tempo nas lesões provocadas por doses mais elevadas, fato este que provavelmente reflete apenas a imprecisão do método histológico, nesse particular.

DISCUSSÃO

Em cobaios previamente vacinados pelo BCG a reação macroscópica, provocada pela injeção intradérmica de suspensões de *M. tuberculosis* e de *M. leprae*, apresenta-se diferente no que diz respeito à intensidade e à evolução. A diferença de intensidade possui relação, ao menos parcial, com a dos de bacilos injetada; como não foram utilizadas quantidades iguais das duas micobactérias (0,165 mg de *M. tuberculosis* e aproximadamente 0,075 mg de *M. leprae*), no estudo da reação macroscópica, a análise comparada da intensidade está prejudicada.

O decurso evolutivo do nódulo dérmico sofre menor interferência do fator dose e por isso, deve ser comentado.

A involução da reação provocada pelo BCG é mais rápida, comparada com a lesão suscitada pela lepromina; o diâmetro médio do nódulo, na primeira eventualidade, decresce precocemente para tornar-se igual a zero no 30° dia que sucede à inoculação (ver gráfico). Na reação da lepromina (apesar da menor dose de bacilos) o diâmetro média diminui mais lentamente; a lesão macroscópica somente desaparece no 40° dia.

As diferenças assinaladas devem ser encaradas sob ressalva, devido à heterogeneidade das suspensões empregadas.

O estudo microscópico evidencia que o tipo de reação histológica é idêntico para as duas micobactérias, quando injetadas nas condições referidas, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. As lesões possuem uma fase aguda inicial, de caráter exsudativo, seguida da fase crônica, granulomatosa. As células que tomam parte nas duas fases são idênticas morfológica e funcionalmente e dispõem-se em estrutura de mesmo tipo. Há apenas maior intensidade das reações produzidas pelo BCG, comparadas com as induzidas pela mesma dose de *M. leprae*; em ambas, porém, a fase exsudativa é caracterizada por grande afluxo leucocitário e alterações degenerativas, inclusive necróticas, condicionando a formação do micro-abscesso verificado nas duas eventualidades, localizado na área central da lesão. A presença do micro-abscesso, nas lesões provocadas pelas duas micobactérias, facilita a comparação, uma vez que proporciona homogeneidade no material de estudo.

Tanto o *M. tuberculosis* como o *M. leprae* são lisados no interior do macrófago do cobaio, o qual posteriormente transforma-se na célula epitelióide; sob o estímulo das substâncias libertadas pelos bacilos lisados¹; estes fatos estão relacionados com a identidade da estrutura histológica verificada na fase crônica das lesões provocadas pelas duas micobactérias.

A evolução da reação inflamatória (isto é, a dinâmica do processo) apresenta, no entanto, algumas diferenças quantitativas; as lesões produzidas pelo BCG possuem decurso mais rápido, tornam-se mais cedo livres de bacilos e envolvem e desaparecem com maior brevidade.

O método histológico sugere relação entre o desaparecimento dos bacilos (destruição bacilar) e o ritmo evolutivo da lesão. Nas lesões suscitadas pelo BCG é mais precoce tanto a presença de células epitelióides (verificada no 1°-2° dia) como seu predomínio nas lesões (verificado no 6°-9° dia de evolução). Estes fatos permitem supor que a lise do *M. tuberculosis*, desempenhada pelo macrófago, se processa com maior rapidez, comparada com a destruição do *M. leprae*. Na lesão provocada pela lepromina, as células epitelióides são observadas a partir do 3° dia e predominam após o 9° dia de evolução, o que indica maior duração da "fase de macrófago"² e indiretamente sugere que a lise dos bacilos é mais lenta. O estudo bacterioscópico confirma os fatos assinalados, uma vez que as lesões provocadas pelo BCG são abacilares após o 24° dia, ao contrário das lesões suscitadas pela lepromina que apresentam micobactérias até o 30° dia de evolução.

Paralelamente, a fase de degradação e eliminação dos produtos oriundos da destruição bacilar, ou "fase de células epitelióides" ², é também mais perene nas lesões provocadas pela lepromina, comparadas com as suscitadas pelo BCG; daí advém maior precocidade involutiva das lesões produzidas pelo *M. tuberculosis*, as quais se apresentam completamente cicatrizadas 50 dias após a inoculação (ao contrário, as lesões suscitadas pelo *M. leprae* persistem além do 50º dia).

Os fatos assinalados sugerem que no cobaio previamente vacinado pelo BCG, do mesmo modo que no cobaio normal ², a resistência que o *M. leprae* opõe à lise, por parte do macrófago, é maior que a oposta pelo *M. tuberculosis* (de modo semelhante ao que ocorre em relação aos fagócitos de larvas de insetos ⁶⁴).

O desigual comportamento das duas micobactérias, em face da ação lítica dos macrófagos do cobaio, não constitui propriedade dependente de sua vitalidade, uma vez que foram empregados bacilos mortos pelo calor; também não possui relação com a resistência adquirida específica, pois é observada tanto no cobaio previamente vacinado pelo BCG, como no animal normal. Possivelmente relaciona-se com a estrutura, a composição química e com propriedades físico-químicas da célula bacteriana (das quais depende a atividade das enzimas dos macrófagos, uma vez que constituem o substrato sobre o qual a enzima atua), sendo independente de suas propriedades antigênicas.

E' provável que os lípidos, que tomam parte na constituição das duas micobactérias, sejam os principais responsáveis pela resistência oposta à lise ².

A comparação do ritmo evolutivo das lesões histológicas induzidas em cobaios normais, pelo *M. tuberculosis* e pelo *M. leprae* ², com os resultados obtidos em cobaios previamente vacinados pelo BCG, revela, direta e indiretamente, que a vacinação prévia acentua a atividade lítica do macrófago, em relação às duas micobactérias. A inoculação do bacilo atenuado não sómente intensifica a reação macroscópica como acelera o ritmo evolutivo da lesão histológica ³; esse fato ocorre de modo idêntico para os dois e depende do desenvolvimento de hipersensibilidade (cruzada no caso do *M. leprae*) ⁴ e de provável resistência adquirida; esta última parece responsável pela formação acelerada da lesão tuberculóide.

SUMMARY

The lesions suscitated by intracutaneous injections of *M. tuberculosis* and *M. leprosy* suspensions, in BCG vaccinated guinea pigs, are cytologically alike; the cells of the inflammatory tissue are morphologically and physiologically identicals and constitute lesions of a same type, with a central abscess surrounded by the tuberculoid inflammatory tissue. This cytological and histological identity makes easy the comparative study of the lesions by these two mycobacteria in vaccinated guinea pigs. In opposition in normal guinea pigs the same comparison is diffculted

by the presence of the abscess observed only in the animals injected with *M. tuberculosis*.

Ninety eight normal guinea pigs were inoculated with 33.0 mg of BCG, by peritoneal or intramuscular route. Forty days after 58 guinea pigs were injected intracutaneously with 0,05 ml of a *M. tuberculosis* (BCG) suspension, containing 0.165 mg of bacilli; 22 guinea pigs were injected by this same via with 0,1 ml of lepromin containing nearly 0.074 mg of *M. leprae*; the other 20 guinea pigs were injected by this same route with 0.165 mg of BCG on a side and with 0,1 ml of lepromin containing 0.170 mg of *M. leprae* on the other side.

The macroscopic and the microscopic lesions suscitated by the intracutaneous injection of these two mycobacteria were observed during 50 days.

The macroscopic examination shows: a) the reaction provoked by 0.165 mg of BCG is stronger but disappears at the 30th day after inoculation; b) the reaction suscitated by approximately 0.074 mg of *M. leprae* is weaker but vanishes only 40 days after inoculation.

The histological study of the lesions shows: a) the injection of 0.165 mg of BCG induces stronger reactions which have shorter evolutive course, with complete cicatrization of the 50th day; b) the injection of nearly 0.170 mg of *M. leprae* produces weaker lesions which have longer evolutive course, without complete cicatrization at the 50th day after inoculation.

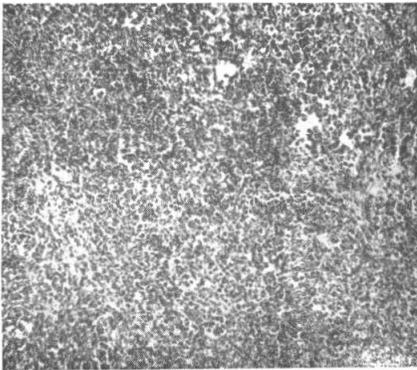
The evolutive speed of the lesion (which depends of the cytological transformation of the macrophage and epithelioid cell) probably is a consequence of the success of bacterial lysis by the guinea pig macrophage; thus the more rapid evolution of the lesion means more easy lysis of the bacilli.

The *M. tuberculosis* appears to be more easily lyzed than *M. leprae*; this is observed by the more rapid cytological transformation, by the shorter time required for the disappearance of the lesion and because the lesions become later without histologically demonstrable bacilli.

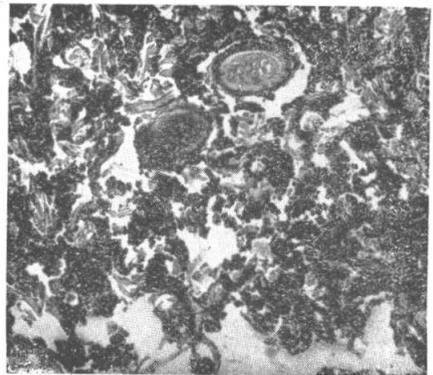
We can suppose than in BCG vaccinated guinea pigs, as well as in normal ones, the lysis of *M. leprae* by the macrophage is more difficult than that of *M. tuberculosis*. The different behavior of these two mycobacteria probably depends on their structure, chemical composition and physico-chemical properties; perhaps the lipids have a great influence in these differences.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — Hadler, W. A. — Comportamento do cobaio e do rato normais, injetados com "lepromina" por via intradérmica. Rev. Brasil. Leprol., 21:165, 1953.
- 2 — Hadler, W. A. — Estudo comparado das lesões provocadas pela injeção intradérmica de suspensões de *M. leprae* e *M. tuberculosis*, em cobaios normais. Rev. Brasil. Leprol., 21:315, 1953.
- 3 — Hadler, W. A. — Trabalho em publicação.
- 4 — Hadler, W. A. & Ziti, L. M. — Estudo da sensibilidade tuberculínica em cobaios normais inoculados experimentalmente com *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis*. Rev. Brasil. Leprol., 21:341, 1953.
- 5 — Havashi, F. — Mitsuda's skin reaction in leprosy. Internat. J. Leprosy, 1:31, 1953.
- 6 — Metalnikov, S. — L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles, *Galleria mellonella*. Monograf. Inst. Pasteur, Masson et Cie., Paris, 1927.
- 7 — Metalnikov, S. & Toumanoff, F. — La lèpre chez les insectes. Compt. Rend. Soc. Biol., 89:935, 1923.



Fotomicrografia 1 - H.E.; 200x. Injeção de 0,1 ml de suspensão contendo 0,165 mg de BCG, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Lesão com 24 horas de evolução. Notar a extensão, a intensidade da lesão e o grande número de células conjuntivas fixas.



Fotomicrografia 2 — H.E.; 900x. Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,170 mg de *M. leprae*, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Lesão com 24 horas de evolução. Comparando com a fotomicrografia anterior verifica-se que a lesão é menos extensa e possui menor número de elementos conjuntivos proliferados.

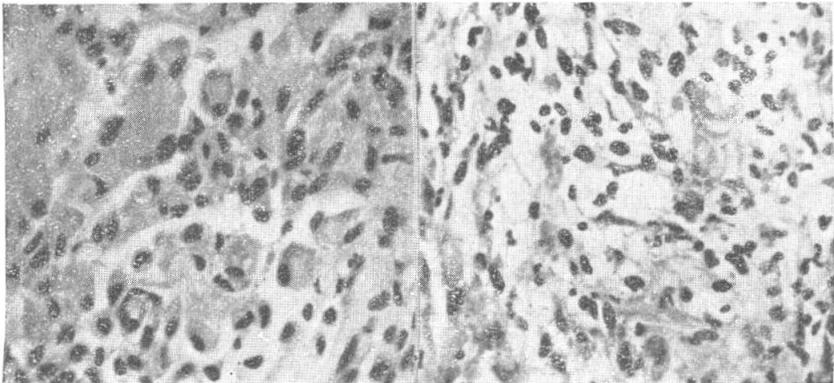


Fig. 3

Fig. 4

Fotomicrografias 3 e 4 — H.E.; 400x. Reação inflamatória que envolve o abscesso central, em lesões com 72 horas de evolução.

- 3 - Injeção de 0,1 ml de suspensão contendo 0,165 mg de BCG, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG; presença de células epitelióides.
- 4 — Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,170 mg de *M. leprae*, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG; numerosos macrófagos vacuolizados; ausência de célula:.. epitelióides.

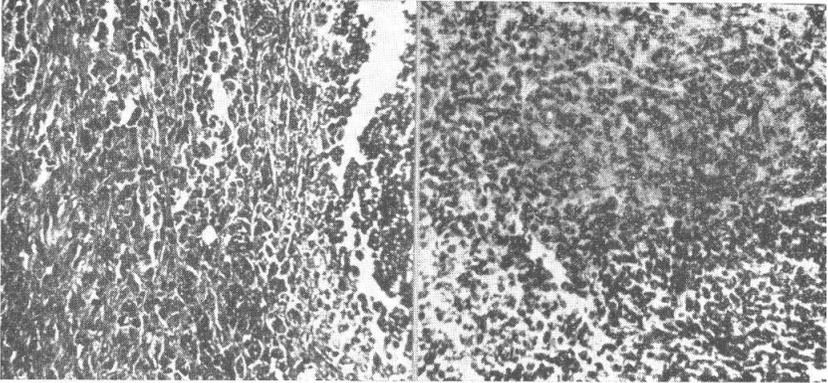
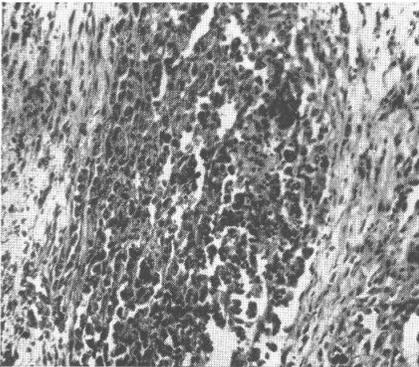


Fig. 5

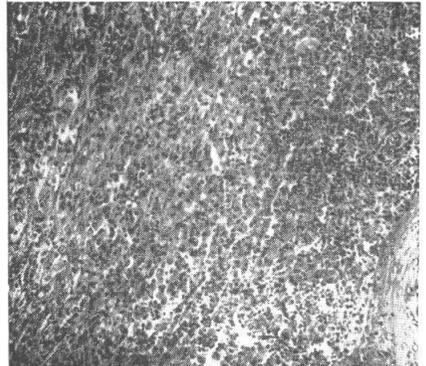
Fig. 6

Fotomicrografias 5 e 6 H.E.; 200x. Reação inflamatória que envolve o microabscesso central em lesões com 12 dias de evolução.

- 5 — Injeção de 0,1 ml de suspensão contendo 0,165 mg de BCG, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. São numerosos os fibrócitos; lesão em involução.
- 6 — Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,170 mg de *M. leprae*, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Pequeno número de fibrócitos.



Fotomicrografia 7 — H.E.; 200x. Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo 0,165 mg de BCG, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Lesão com 24 dias. Acentuada fibrose e alterações degenerativas em células epitelioides; involução acentuada.



Fotomicrografia 8 — H.E.; 200x. Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente, 170 mg de *M. leprae*, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados com BCG. Lesão com 24 dias. Comparar com a fotomicrografia anterior; involução bem menos avançada.

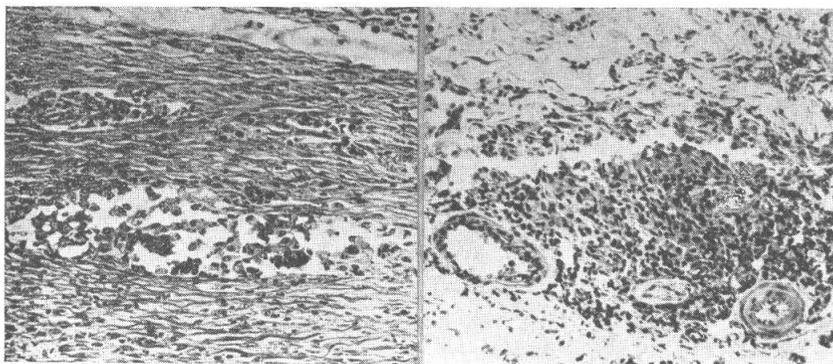


Fig. 9

Fig. 10

Fotomicrografias 9 e 10 — H.E.; 200x. Aspecto da reação inflamatória que envolve o abscesso em lesões com 30 dias de evolução.

- 9 — Injeção de 0,1 ml de suspensão de BCG contendo 0,165 mg de bacilos, por via intradérmica, em cobaias previamente vacinados pelo BCG. Lesão em franca involução; intensa fibrose e grandes alterações degenerativas das células epitelióides.
- 10 — Injeção de 0,1 ml de lepromina contendo 0,170 mg de *M. leprae*, por via intradérmica, em cobaios previamente vacinados pelo BCG. Lesão em involução menos acentuada que a da fotomicrografia anterior; presença de células epitelióides bem conservadas.