

ESTUDO DA REAÇÃO DA LEPROMINA NO RATO PRÉVIAMENTE INOCULADO COM *M. LEPRAE-MURIUM* E COM *M. TUBERCULOSIS* (BCG)

W. A. HADLER*

e

L. M. ZITI**

A observação macroscópica da lesão provocada pela lepromina, antes e após a vacinação com o BCG, permitiu a numerosos AA. (5, 7, 1, 17, 21, 20, 22, 23, 3, 19 e 4) concluir que a referida vacinação produz "viragem" da reação da lepromina; a vacinação prévia transformaria reações negativas à lepromina em reações positivas. Histologicamente, porém, não foi demonstrado que a administração de BCG tenha a propriedade de transformar lesões constituídas por células leprosas (que caracterizam as reações tipicamente negativas à lepromina), em lesões formadas predominantemente por células epitelióides (que definem as reações tipicamente positivas à lepromina¹²). A experimentação animal tem mesmo revelado que a vacinação pela forma atenuada do *M. tuberculosis*, não provoca transformação no tipo estrutural da lesão suscitada pela injeção intradérmica de lepromina¹¹⁻¹².

Com a finalidade de estudar, experimentalmente, a ação de micobactérias sobre a reação da lepromina, cogitando especialmente da estrutura histológica da lesão, escolhemos o rato como animal da experimentação, por ter sido verificado que este animal reage sempre negativamente à lepromina. A negatividade da reação, no rato, é macroscópica (25,16,2,10) e histológica¹⁰, constituindo, por isso, animal adequado para as tentativas de positivação da reação da lepromina. Estudos anteriores revelaram, aliás, que a inoculação prévia de micobactérias, no rato, não produz modificação da reação macroscópica provocada pela lepromina^{1,6,2}, ou determina apenas intensificação e maior duração da reação nodular^{25,11}.

(*) Depart. Histologia — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Univ. de S. Paulo.

(**) Secção de Quimioterapia do Inst. Butantan.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, com pêso compreendido entre 190 a 230 g, os quais foram divididos nos seguintes lotes :

Lote 1: Ratos não inoculados prèviamente (contrôles), os quais apenas receberam injeção intradérmica da suspensão de micobactérias mortas pelo calor (120.°C, 1 hora). Engloba os seguintes sub- lotes:

Sub-lote a: 90 ratos injetados com 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*;

Sub-lote b: 20 ratos injetados com 0,1 ml de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. lepraemurium*;

Sub-lote c: 20 ratos injetados com 0,1 ml de suspensão de triturado de lesão da lepra murina, contendo aproximadamente 0,35 mg de *M. lepraemurium*.

Lote 2: Ratos prèviamente inoculados com 1,0 ml de suspensão contendo 5,5 mg de BCG (suspensão em solução de ClNa a 0,85%), por via intraperitoneal; 33 dias após a inoculação do BCG, êstes animais foram injetados, por via intradérmica, com uma suspensão de micobactérias, mortas pelo calor (120.°C, 1 hora), da maneira seguinte:

Sub-lote d: 30 ratos injetados com 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*;

Sub-lote e: 20 ratos injetados com 0,1 ml de suspensão de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. lepraemurium*;

Sub-lote f: 20 ratos injetados com 0,1 ml de suspensão de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 0,35 mg de *M. lepraemurium*.

Lote 3: Ratos inoculados, por via intraperitoneal, com 1,0 ml de suspensão de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 5,0 mg de *M. lepraemurium* (bacilos com vitalidade) ; 40 dias após a inoculação, foram injetados, por via intradérmica, com suspensões de bacilos mortos pelo calor (120.°C, 1 hora), da forma seguinte:

Sub-lote g: 60 ratos injetados com 0,1 ml de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*;

Sub-lote h: 30 ratos injetados com 0,1 ml de suspensão de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. lepraemurium*.

Sub-lote i: 30 ratos injetados com 0,1 ml de suspensão de triturado de lesão de lepra murina, contendo aproximadamente 0,35 mg de *M. lepraemurium*.

Todos os animais dos 3 lotes receberam, na mesma época, a injeção intradérmica de suspensão de bacilos mortos, a qual foi preparada de acordo com o método de HAYASHI¹⁵, ligeiramente modificado. A quantidade aproximada de bacilos, contidos em 1 ml das respectivas suspensões utilizadas, foi determinada por processo anteriormente descrito¹³.

As injeções intradérmicas das suspensões de micobactérias foram efetuadas em dois pontos diferentes de um mesmo animal, tendo um deles sido utilizado para observação macroscópica da reação provocada no local injetado e o outro para o estudo histológico da lesão.

A evolução da reação macro e microscópica, suscitada pelas diferentes suspensões, foi observada diariamente até o 6.º dia, cada 3 dias até o 30.º dia e cada 10 dias até o 120.º dia; mediu-se o diâmetro da lesão e efetuou-se biopsia do local da reação.

O estudo histológico foi executado após fixação em formol a 10% (em solução de C1Na a 0,85%) e inclusão em parafina. Foram feitas as seguintes colorações: HE, Ziehl-Neelsen modificado, Mallory e Gomori para reticulina.

RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Nos gráficos 1 a 6 estão expostos os dados referentes às dimensões e à evolução da lesão papulosa, formada no local injetado com as diferentes suspensões bacilares, nos 3 lotes de ratos.

Ratos não inoculados previamente (contrôles). A lesão que se forma no local inoculado, 24-48 horas após a injeção do triturado de leproma humano (lepromina) ou murino, é pápulo-eritematosa; quando são empregadas suspensões contendo a mesma dose de *M. leprae* ou *M. lepraemurium* (0,074 mg) as lesões possuem diâmetro médio ligeiramente mais elevado para a última micobactéria. O aumento da dose de bacilos, injetada intradérmicamente (0,074 para 0,35 mg de *M. lepraemurium*), produz lesões macroscópicas de maiores dimensões.

A evolução da lesão papulosa suscitada pelas 3 suspensões bacilares utilizadas (0,074 mg de *M. leprae*; 0,074 a 0,35 mg de *M. lepraemurium*), é comparável até o 50.º dia. Após o 50.º dia surgem diferenças; as lesões suscitadas por 0,074 mg de *M. lepraemurium* desaparecem em todos os animais; as provocadas por 0,074 mg de *M. leprae* perduram até o 60.º dia; as produzidas por 0,35 mg de *M. lepraemurium* perduram até o 60.º dia; as produzidas por 0,35 mg de *M. lepraemurium* tendem a aumentar de diâmetro até o 90.º

dia, decrescendo depois, porém sem desaparecerem totalmente até o 120.º dia. Portanto, em ratos não inoculados previamente (contrôles), a lesão macroscópica produzida pelas suspensões injetadas tem mais relação com a dose inoculada que com a espécie de mico-bactéria (gráfico 1).

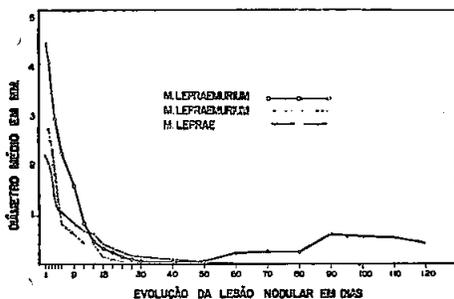


Gráfico 1: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica da *M. lepras* (aproximadamente 0,074 mg), ou de *M. lepraemurium* (aproximadamente 0,074 e 0,35 mg) em ratos não injetados com micobactérias (contrôles). Diâmetros médios da lesão cutânea.

O desaparecimento da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de 0,074 mg de *M. leprae* ou *M. lepraemurium* (que se verifica no 60.º e no 50.º dia respectivamente), não corresponde ao desaparecimento da lesão histológica; esta perdura maior tempo. Por êste motivo em períodos sucessivos podem ser observados, no local injetado, pequenos nódulos visíveis macroscôpicamente. Assim, no 120.º dia 3 ratos inoculados com *M. leprae* e 4 injetados com *M. lepraemurium* apresentaram lesão papulosa com menos de 1,0 mm de diâmetro, a qual, histologicamente, era constituiria por células leprosas contendo bacilos aar.

Ratos previamente vacinados com BCG. A injeção intradérmica de *M. leprae* ou *M. lepraemurium*, contendo a mesma dose de bacilos (0,074 mg), produz lesões cuja intensidade e evolução são bastante semelhantes até o 40.º dia. Daí por diante, enquanto as lesões provocadas pelo *M. leprae* permanecem estacionárias, as suscitadas pelo *M. lepraemurium* apresentam aumento progressivo do diâmetro médio até o 80.º dia, decrescendo depois até o 120.º dia. As lesões provocadas pela injeção de 0,35 mg de *M. lepraemurium* são desde o início mais intensas, mas a evolução apresenta grande paralelismo com a das lesões suscitadas por 0,074 mg do mesmo bacilo, inclusive no que se refere à curva ascendente após o 40.º dia de evolução (gráfico 2).

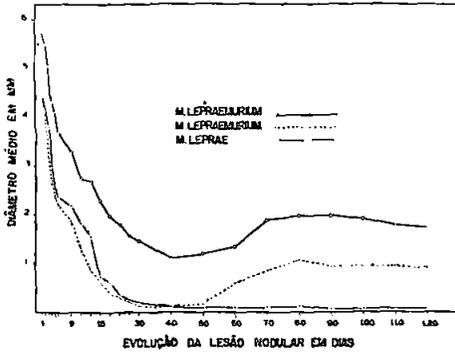


Gráfico 2: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de *M. leprae* (aproximadamente 0,074 mg), ou de *M. lepraemurium* (aproximadamente 0,074 mg e 0,35 mg), em ratos previamente vacinados com 5,5 mg de BCG. Diâmetros médios da lesão cutânea.

Ratos previamente inoculados com *M. lepraemurium*. A lesão cutânea suscitada pela injeção intradérmica de 0,35 mg de *M. lepraemurium* é inicialmente mais intensa que a provocada por 0,074 mg de *M. leprae* ou de *M. lepraemurium*.

Inicialmente, as lesões provocadas pela mesma dose (0,074 mg) de bacilos possuem maior diâmetro médio quando é injetado o *M. leprae* (comparado com o *M. lepraemurium*). Porém, após o 6.º dia de evolução as lesões provocadas pelo *M. lepraemurium* tornam-se

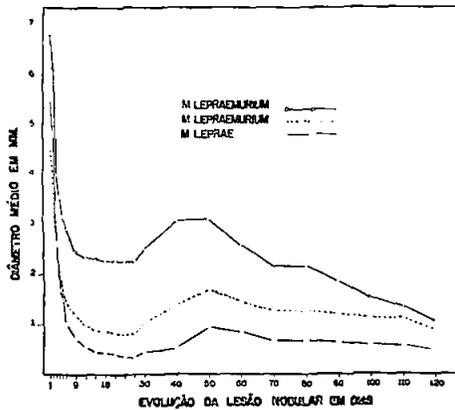


Gráfico 3: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de *M. leprae* (aproximadamente 0,074 mg), ou de *M. lepraemurium* (aproximadamente 0,074 mg e 0,35 mg), em ratos com lepra murina. Diâmetros médios da lesão cutânea.

mais intensas sendo, no entanto, as curvas paralelas. A curva de evolução da lesão provocada por 0,35 mg de *M. lepraemurium* é também paralela às anteriores (mas, deslocada para cima), até o 80.º dia; daí por diante apresenta-se descendente, de modo que no 120.º dia o diâmetro médio é comparável ao da lesão provocada por 0,074 mg do mesmo bacilo (gráfico 3).

Estudo comparado da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de M. leprae ou M. lepraemurium em ratos não inoculados (contrôles) e previamente injetados com BCG ou com M. lepraemurium.

A observação comparada da reação suscitada pela injeção intradérmica de lepromina contendo 0,074 mg de *M. leprae*, em ratos não inoculados e previamente injetados com BCG ou com *M. lepraemurium* (gráfico 4), revela:

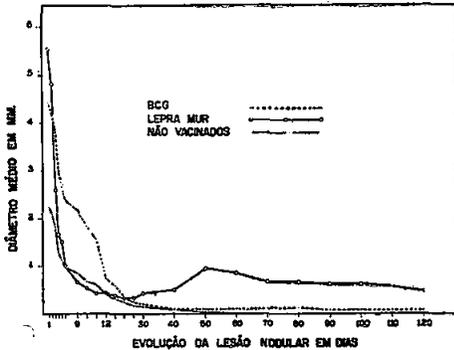


Gráfico 4: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de *M. leprae* (aproximadamente 0,074 mg) em ratos não inoculados (contrôles), previamente vacinados com BCG, ou inoculados com *M. lepraemurium*. Diâmetros médios da lesão cutânea.

a) a lesão papulosa inicial apresenta maiores dimensões nos animais vacinados com BCG e principalmente nos inoculados com *M. lepraemurium*, comparados com os ratos não inoculados;

b) nos animais vacinados com BCG, a partir do 18.º dia, a curva evolutiva da reação é paralela à dos animais não vacinados, sendo, porém, ligeiramente mais elevados os valores do diâmetro médio; nos ratos com lepra murina a curva torna-se ascendente do 24.º dia até o 50.º dia, sendo descendente depois;

c) a lesão papulosa local torna-se imperceptível, macroscopicamente, após o 60.º dia, nos ratos não inoculados previamente, enquanto que nos vacinados com BCG e principalmente nos com lepra murina as lesões persistem até o 120.º dia; nestes últimos as lesões

atingem dimensões visivelmente maiores que nos vacinados com BCG.

Comparando a reação suscitada pela injeção intradérmica de aproximadamente 0,074 mg de *M. lepraemurium*, em animais não inoculados previamente (contrôles) e em ratos vacinados com BCG ou injetados com *M. lepraemurium* (gráfico 5), verifica-se:

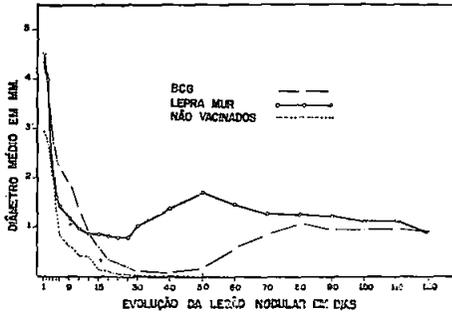


Gráfico 5: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica de *M. lepraemurium* (aproximadamente 0,074 mg) em ratos não inoculados (contrôles), previamente vacinados com BCG, ou inoculados com *M. lepraemurium*. Diâmetros médios da lesão cutânea.

a) a lesão papulosa inicial é mais intensa nos ratos vacinados com BCG ou nos portadores da lepra murina, em relação aos não inoculados previamente (contrôles) ;

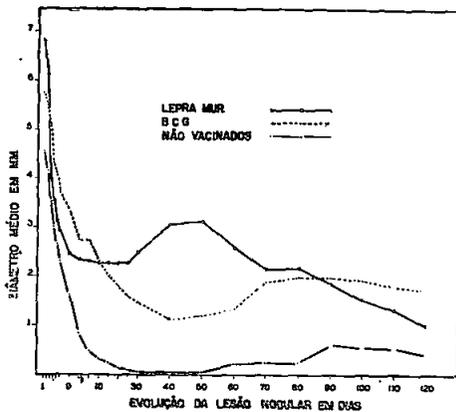


Gráfico 6: Evolução da reação macroscópica provocada pela injeção intradérmica da *M. lepraemurium* (aproximadamente 0,35 mg) em ratos não inoculados (contrôles), previamente vacinados com BCG, ou inoculados com *M. lepraemurium*. Diâmetros médios da lesão cutânea.

b) a curva evolutiva da lesão nos ratos contrôles é progressivamente descendente até o 50 ° dia; nos animais vacinados com BCG a referida curva é descendente até o 50 ° dia, sendo depois ascendente até o 80.º; nos animais com lepra murina é descendente até o 27.º dia e depois ascendente até o 50.º dia.

O estudo comparado da reação produzida pela injeção intradérmica de 0,35 mg de *M. lepraemurium* nos ratos não inoculados previamente (contrôles), nos vacinados com BCG e nos com lepra murina (gráfico 6), mostra:

a) a reação inicial é mais forte nos vacinados com BCG e nos com lepra murina, em comparação com os não vacinados (contrôles) ;

b) a curva evolutiva da lesão é progressivamente descendente até o 50.º dia e depois ascendente até o 90.º dia, nos ratos contrôles;

c) nos ratos vacinados com BCG a curva evolutiva é descendente até o 40.º dia e depois ascendente até o 90.º dia;

d) a curva evolutiva da lesão nos ratos com lepra murina é descendente até o 27.º dia e depois ascendente até o 50.º dia;

e) no 120.º dia a lesão dos animais vacinados com BCG possui maiores dimensões que a dos ratos com lepra murina e principalmente que a dos contrôles normais.

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Tanto nos ratos não inoculados (contrôles) como nos previamente injetados com BCG ou com *M. lepraemurium*, a injeção intradérmica de suspensão de *M. leprae* (lepromina) ou de *M. lepraemurium*, mortos pelo calor, provoca sempre lesões de tipo idêntico, independente da espécie de micobactéria e da dose injetada. Por esse motivo, não será estudado separadamente o quadro histológico da reação da lepromina nas eventualidades citadas; serão apenas expostas as diferenças decorrentes da espécie, das doses utilizadas e da inoculação prévia de micobactérias.

As lesões microscópicas iniciais são, em todos os casos, exsudativas, contendo numerosos neutrófilos. No decurso da fase exsudativa células conjuntivas são "ativadas" e se transformam em macrófagos fixos, com citoplasma vacuolizado e dispostos em rede de aspeto sincicial. No interior do citoplasma dos macrófagos são observados bacilos aar, cujo número aumenta com o progredir da evolução da lesão. A medida que cresce o número de micobactérias no interior dos macrófagos, verificam-se modificações morfológicas progressivas que culminam com a formação da célula leprosa do rato. As células leprosas aumentam numericamente na lesão

e assumem disposição nodular. Nos nódulos assim formados podem ser observadas algumas células gigantes.

Após o 18.º dia de evolução surgem aspectos regressivos nas lesões; a regressão, porém, é lenta, de forma que no 120.º dia há ainda pequenas lesões nodulares, formadas por células leprosas contendo bacilos alterados morfológicamente.

Ratos não inoculados previamente (contrôles). O quadro histológico é idêntico ao descrito em trabalho anterior¹⁰; há, porém, variações de intensidades relacionadas com a dose de mico-bactéria injetada por via intradérmica; as lesões são mais intensas quando se injetam 0,35 mg de bacilos comparadas com 0,074 mg; a reação provocada pela mesma dose de bacilos (0,074 mg) possui a mesma intensidade independentemente da espécie da micobactéria usada (*M. leprae* e *M. lepraemurium*).

Relacionado com as citadas diferenças de intensidade está o constante aparecimento de abscesso, no centro da lesão suscitada pela injeção intradérmica de 0,35 mg de *M. lepraemurium* (verificado em 50% dos animais) ; êste fato não ocorre na grande maioria dos ratos injetados com 0,074 mg de *M. leprae* ou de *M. lepraemurium* (apenas em 5% dêstes ratos há formação de abscesso).

Nos períodos subsequentes da evolução da lesão (após o 18.º dia) observa-se que, em 50% dos casos, nas lesões provocadas por 0,35 mg de *M. lepraemurium* sobrevêm fibrose; há formação de septos fibrosos e, as vêzes, de cápsula fibrosa descontínua que tende a envolver a lesão; êste fato não ocorre nas lesões dos ratos injetados com 0,074 mg de *M. leprae* ou de *M. lepraemurium*. Após o 60.º dia, apenas nos ratos injetados com 0,35 mg de *M. leprae* podem ser observadas pequenas áreas de necrose, na zona central da lesão (foto 9) ; a necrose aparece em 50% dos casos. A tendência à fibrose e à necrose, verificada nos ratos injetados com 0,35 mg de *M. lepraemurium*, estão relacionadas com a maior intensidade da lesão nestes animais.

Ratos previamente inoculados com BCG ou com M. lepraemurium.

A lesão inicial (24 — 48 h. após inoculação), provocada pela injeção intradérmica de suspensão de *M. leprae* ou *M. lepraemurium*, caracteriza-se pela presença de micro-abscesso central, o qual se apresenta em 95% dos casos. Na cavidade do abscesso há numerosos neutrófilos e macrófagos, contendo grande número de bacilos fagocitados e apresentando grandes alterações degenerativas, inclusive necrose. Circunda o abscesso uma zona inflamatória na qual predominam células conjuntivas ativadas, havendo, no entanto, numerosos macrófagos e neutrófilos; os bacilos são relativamente raros nesta zona.

A lesão é, em síntese, inflamatória, aguda e intensa, chegando a provocar necrose dos elementos mais centrais, a qual concorre para a formação da cavidade do micro-abscesso.

Com o progredir da evolução da lesão a reação exsudativa inicial diminui de intensidade (3.º — 4.º dia) e na zona que envolve o abscesso, passam a ser mais numerosos os macrófagos, os quais apresentam bacilos no citoplasma ; após o 6.º dia são observadas células leprosas nesta zona da lesão ,as quais tendem a formar nódulos bem delimitados (8.º — 9.º dia) . As células leprosas são bem vacuolizadas, especialmente nas zonas mais ricas em bacilos, nas quais são verificadas alterações necróticas de algumas células (9.º dia). Na periferia da lesão surgem, precocemente (9.º dia), fibrócitos e fibras colágenas (fotos 2 e 4).

Tanto a tendência à fibrose como à necrose aumentam progressivamente a partir do 12.º dia; as áreas de necrose tornam-se relativamente extensas ; entre as formações nodulares de células leprosas surgem delgados septos colágenos; a lesão é progressivamente envolvida por tecido fibroso.

A involução se acentua lentamente, observando-se progressivamente maiores áreas de necrose e fibrose. No 120.º dia de evolução, apesar de serem grandes a fibrose e a necrose, ainda são observados pequenos grupos de células leprosas vacuolizadas, (fotos 6, 8 e 10) contendo bacilos alterados morfológicamente.

As lesões descritas são idênticas nas ratos injetados com 0,074 mg de *M. leprae*, ou de *M. lepraemurium*; nos ratos injetados com 0,35 mg de *M. lepraemurium* elas são, porém, mais extensas e intensas.

São também verificadas diferenças histológicas entre os ratos previamente vacinados com BCG e os inoculados com *M. lepraemurium*. As lesões histológicas, provocadas pela injeção intradérmica de mesma dose de bacilos, são mais intensas e possuem maior tendência à fibrose e à necrose, nos ratos inoculados com *M. lepraemurium* que nos vacinados com BCG; estas diferenças são, no entanto, pouco evidentes e difícil de serem avaliadas individualmente.

Estudo comparado das lesões histológicas provocadas pela injeção intradérmica de mico bactérias em ratos não inoculados (contrôles) e previamente vacinados pelo BCG ou injetados com M. lepraemurium.

Tanto a vacinação prévia pelo BCG como inoculação de *M. lepraemurium* intensificam a reação histológica provocada pela lepromina, no rato; as lesões, nos animais previamente injetados com essas micobactérias, são desde o início mais intensas e extensas (fotos 1 e 2) e apresentam microabscesso na porção central; o microabscesso raramente é verificado nos ratos controles não inocula-

Dias após inoculação	Ratos não inoculados previamente (contrôles)	Ratos previamente vacinados com BCG ou inoculados com <i>M. lepraemurium</i>
1 - 2 dias	Lesão inflamatória aguda, pouco intensa, difusa; não há microabscesso (quando são injetados 0,074 mg de bacilos) em 95% dos animais.	Lesão inflamatória aguda, intensa, localizada; formação de microabscesso na grande maioria dos casos (95%) mesmo quando são injetados 0,074 mg de bacilos.
3 - 6 dias	Numerosos macrófagos que fagocitam micobactérias; as primeiras células leprosas são observadas no 6.º dia.	Abscesso central envolvido por zona de macrófagos, contendo bacilos fagocitados; as primeiras células leprosas são observadas no 6.º dia.
6 - 9 dias	As células leprosas são pouco vacuolizadas e se dispõem em nódulos bem delimitados. Bacilos numerosos e íntegros.	As células leprosas são bem vacuolizadas e se dispõem em nódulos bem delimitados; algumas células leprosas necrosadas; fibras colágenas na periferia da lesão. Bacilos numerosos e íntegros.
9 - 12 dias	Formações nodulares constituídas por células leprosas; ausência de fibrose e de necrose. Bacilos + + + +, 10-15% alterados morfológicamente.	Formações nodulares separadas entre si por fibrócitos, algumas fibras colágenas e células com núcleo linfóide. Vacuolização e necrose das células leprosas. Bacilos + + + +, 10-15% alterados morfológicamente.
12 - 18 dias	Ausência de fibrose e de necrose; nódulos de células leprosas, bem delimitados. Bacilos + + + +, 10-20% alterados morfológicamente.	Presença de septos fibrosos e esboço de cápsula conjuntiva na maioria dos casos. Necrose da zona central dos nódulos de células leprosas. Bacilos + + + +, 10-20% alterados morfológicamente.
18 - 24 dias	Vacuolização das células leprosas e involução das lesões; halo linfóide descontínuo; presença de fibrose apenas nos ratos injetados com 0,35 mg de <i>M. lepraemurium</i> . Bacilos + + + +, 30% alterados morfológicamente.	Áreas de necrose no centro da lesão; involução com tendência à fibrose que envolve e septa a lesão. Bacilos + + + +, 30% alterados morfológicamente.
24 - 30 dias	Progridem as alterações involutivas; fibrose apenas nos ratos injetados com 0,35 mg de <i>M. lepraemurium</i> ; halo linfóide envolve descontinuamente a lesão. Bacilos + + + +, 40% alterados.	Progride a involução da lesão com tendência à fibrose e à necrose. Halo linfóide envolve a lesão. Bacilos + + + +, 40% alterados.
30 - 60 dias	Involução da lesão sem fibrose e necrose (exceção dos ratos injetados com 0,35 mg de <i>M. lepraemurium</i>). Bacilos + + + +, 60% alterados.	Aumentam a fibrose e a necrose. Bacilos + + + +, 60% alterados morfológicamente.
60 - 120 dias	Lesões nodulares formadas por células leprosas, em graus diversos de involução; pequena tendência à fibrose. Halo linfóide descontínuo e inconstante. Presença de necrose em 50% dos ratos injetados com 0,35 mg de <i>M. lepraemurium</i> . Bacilos + a + + + + 60-100% alterados morfológicamente.	As lesões constam de necrose central envolvida por cápsula colágena, contendo entretanto grupos de células leprosas. Tendência à cicatrização fibrosa, sem no entanto, ser completa. Bacilos + a + + + +, 60-100% alterados morfológicamente.

dos, quando injetados com aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae* ou *M. lepraemurium*.

Além da maior intensidade, as lesões verificadas nos ratos previamente inoculados com BCG ou *M. lepraemurium* apresentam freqüentemente áreas de necrose (fotos 4, 6, 8 e 10) ; ao contrário, nos ratos não inoculados (contrôles), a presença de necrose constitui eventualidade semente verificada em 50% dos animais injetados com 0,35 mg de *M. leprae*. Além da maior intensidade e da presença de necrose, as lesões provocadas pela lepromina nos animais previamente inoculados envolvem apresentando fibrose, cujas fibras colágenas separam as lesões e as envolvem (fotos 8 e 10).

Os elementos citados (intensidade, extensão, necrose e fibrose) diferenciam as lesões dos ratos previamente inoculados em relação aos não inoculados.

As células leprosas das lesões dos ratos previamente inoculados são geralmente mais vacuolizadas (foto 4), que as das lesões dos ratos controles não inoculados (foto 3) ; a referida vacuolização precede à necrose celular, o que permite supor tratar-se de alteração citológica de caráter degenerativo.

Apesar das diferenças assinaladas, não são observadas modificações na citogênese e no ritmo evolutivo das lesões provocadas pela lepromina, nos animais previamente inoculados e nos controles não inoculados. A formação de macrófagos e de células leprosas e, as alterações involutivas das lesões, são verificadas na mesma época nos dois grupos de animais, o que revela ser comparável o ritmo evolutivo das lesões, em todos os períodos de sua evolução; inclusive 60-90 dias após a injeção da suspensão de bacilos, quando as lesões apresentam nítida involução, o aspeto é comparável nos dois grupos. No grupo previamente inoculado, porém, a presença de fibrose pode simular aspetos involutivos mais adiantados.

O número de bacilos por célula leprosa é ligeiramente maior nos ratos não inoculados previamente, em relação aos vacinados com BCG, ou aos inoculados com *M. lepraemurium*; êste fato pode ser interpretado como dependente do maior número de células leprosas presentes nas lesões dos ratos previamente inoculados (relacionado com a maior extensão da lesão), o que diminui a relação bacilos: células leprosas.

DISCUSSÃO

A inoculação prévia de BCG ou de *M. lepraemurium* produz, no rato, modificações da reatividade dos tecidos em face da injeção intradérmica de suspensões de micobactérias.

Nestas circunstâncias, a lesão nodular, que se forma no local injetado com a suspensão de bacilos, possui maiores dimensões. Aliás, fôra já assinalado que a injeção de lepromina, em ratos prèviamente inoculados com *M. lepraemurium*, provoca nódulos maiores, que se desenvolvem mais ràpidamente e permanecem maior tempo, comparado com animais normais²⁵ ; êste fato foi infirmado por TANIMURA²⁴.

A intensificação da reação macroscópica suscitada pela lepromina é observada tanto nos animais vacinados com ECG como nos inoculados com *M. lepraemurium*; nestes últimos as reações atingem maiores dimensões, provàvelmente por se tratar de animais portadores de moléstia evolutiva (lepra. murina). Verifica-se, além disso, que os nódulos (especialmente os tardios) provocados pela injeção intradérmica de *M. lepraemurium*, nos animais prèviamente vacinados com BCG, são maiores que os produzidos pela mesma dose de *M. leprae*; êste fato parece revelar que o BCG desenvolve, no rato, maior sensibilidade em relação ao *M. lepraemurium* que ao *M. leprae*. Fato idêntico é observado nos animais prèviamente inoculados com *M. lepraemurium*. Concorda com a interpretação citada, a verificação de que, em cobaios, a inoculação de *M. lepraemurium* desenvolve maior sensibilidade à tuberculina, comparada com a desenvolvida pela mesma dose de *M. leprae*¹³.

Além de maiores dimensões, o nódulo macroscópico provocado pela injeção intradérmica de 0,074 mg de *M. leprae* ou *M. lepraemurium*, em ratos prèviamente inoculados, possui decurso diferente, persistindo maior tempo e evoluindo em duas fases: a) fase inicial, que se caracteriza pela diminuição progressiva da lesão, cuja intensidade máxima é verificada 24 horas após .a injeção; esta fase vai até o 30.º — 40.º dia; b) fase final, que apresenta ascensão dimensional até o 50.º — 80.º dia, seguida de decréscimo lento. Nos ratos não inocula dos prèviamente (contrôles), a segunda fase é observada apenas quando se injetam 0,35 mg de *M. lepraemurium*, sendo, porém, mais tardia. O aparecimento da segunda fase da reação coincide com a presença de alterações morfológicas que atingem grande proporção dos bacilos da lesão, conforme se verifica histològicamente ; a destruição dos bacilos nas lesões parece libertar substâncias endobacilares, responsáveis pela fase final da reação. Esta fase é evidente nos animais prèviamente sensibilizados, possuindo relação com o grau de sensibilização (é mais precoce nos ratos com lepra murina).

O estudo histològico das lesões também revela que a inoculação prèvia de BCG ou de *M. lepraemurium*, intensifica a reação provocada pelas suspensões de micobactérias. A lesão, nestas circunstâncias, possui maiores dimensões e apresenta micro-abscesso central; além disso, há alterações cito-tóxicas pronunciadas, tradu-

zidas pela vacuolização e necrose da célula leprosa, responsáveis pelas áreas de necrose. As alterações necróticas são diretamente proporcionais ao número e às alterações dos bacilos nas lesões, permitindo supor que a libertação de produtos endobacilares seja responsável pela necrose dos tecidos previamente sensibilizados. Histologicamente, além disso, a lesão provocada pela lepromina, em ratos previamente inoculados, tem maior tendência à localização e involui com fibrose.

A constituição histológica da lesão suscitada pela lepromina, ou por suspensão de *M. lepraemurium*, em ratos previamente inoculados com micobactérias, no entanto, é do mesmo tipo que a verificada em ratos não inoculados (contrôles). Em ambos, a lesão caracteriza-se pela presença da célula leprosa do rato, que se origina a partir do macrófago e contém bacilos em seu citoplasma. Nas duas eventualidades, o macrófago não possui aptidão de lizar o *M. leprae* ou o *M. lepraemurium*, os quais são armazenados na célula leprosa; a desintegração das micobactérias (que se traduz pelas alterações morfológicas e pela redução numérica dos bacilos) produz-se tardiamente e sem participação evidente das células da lesão. A involução da lesão (com exceção da fibrose) também é idêntica nos dois grupos, verificando-se alterações regressivas iguais às observadas nas lesões de lepra murina sob tratamento⁹. Além disso, a inoculação prévia de micobactérias (BCG ou *M. lepraemurium*) não altera o ritmo evolutivo da lesão, apesar de desenvolver sensibilidade.

A sensibilização desenvolvida, no rato, pela inoculação prévia de BCG ou de *M. lepraemurium*, é de muito menor grau que a verificada em cobaias vacinados com BCG¹². Talvez não seja mesmo possível estabelecer comparação, nesse particular, entre estas duas espécies de animais, uma vez que no rato não há possibilidade de produzir-se verdadeiro fenômeno de Koch¹⁷. No cobaio, a hipersensibilidade desenvolvida pela vacinação prévia com BCG sobrevem em concomitância com evolução acelerada da lesão suscitada pela lepromina¹², fato êsse que não ocorre no rato.

Portanto, verifica-se que a inoculação prévia de BCG ou de *M. lepraemurium* apesar de provocar, no rato, alterações de reação da lepromina, não modifica o tipo fundamental de estrutura histológica da lesão. A inoculação prévia de micobactérias apenas determina alterações da reação da lepromina, relacionadas com o desenvolvimento de hipersensibilidade (cruzada ou não), sem modificar o tipo de estrutura histológica; a lesão microscópica corresponde a da reação histologicamente negativa à lepromina, tanto nos ratos não inoculados (contrôles) como nos inoculados. A ausência de transformação da estrutura histológica da lesão, indica que o macrófago do rato não adquire capacidade de

lizar os bacilos contidos nas suspensões injetadas intradêrmicamente, após prévia inoculação de micobactérias. Em outras palavras, a inoculação prévia de BCG ou de *M. lepraemurium*, no rato não produz "viragem" da reação da lepromina, uma vez que não é capaz de dotar o macrófago do rato, da faculdade de destruir o *M. leprae* ou o *M. lepraemurium*.

Estes fatos concordam com a verificação de que a vacinação prévia com BCG não altera o decurso evolutivo da moléstia produzida pela inoculação intraperitoneal de pequena dose de *M. lepraemurium* ¹⁴.

SUMMARY

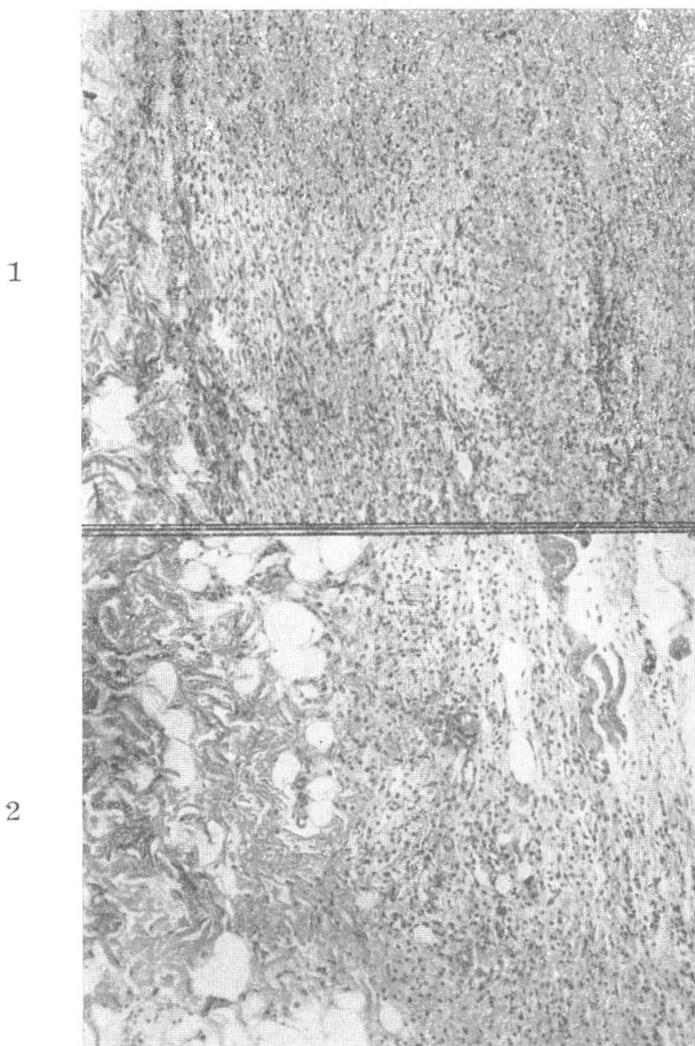
The influence of previous inoculation of mycobacteria on the results of lepromin reactions is studied in rats. This animal, when normal, always shows a macroscopically and histologically negative lepromin reaction.

A comparative study was made between normal, adult rats (controls) and rats, previously injected by the intra-peritoneal route with about 5 mg of *M. lepraemurium* or 5,5 mg of *M. tuberculosis* (BCG strain). Afterwards the animals were injected intracutaneously with suspensions of *M. leprae* or *M. lepraemurium*, containing about 0,074 or 0,35 mg of bacilli and were observed for 120 days.

The macroscopic and histologic study of the cutaneous lesions during the course of their evolution shows, that the previous inoculation of BCG or *M. lepraemurium* changes the rat's tissular reactivity against intracutaneously injected suspensions of mycobacteria. In that case we can note that: a) the macroscopic lesion is larger, it remains longer and shows two peaks during its evolution (initial and final peak) b) the histological lesions are intense and show necrotic areas, abscesses and fibrosis.

It was noted however, that the citology of the lesions is the same in the controls and in the previously inoculated rats. In both groups of animals the lesions are constituted by ratleprosy cells, which show to be storing the bacilli without lysing them. The bacillar alterations in both groups appear slowly and apparently without active participation of the leprosy cells. The histologic evolution is also not modified and the regressive pictures have identical aspects and are at the same rate (in contrast to the behavior of the guinea-pig) in controls and previously inoculated rats.

The previous inoculation of BCG or *M. Lepraemurium* produces in the rat some degree of hypersensitivity to lepromin, without modifying the histological structure of the lepromin lesion. The structure is always that of a negative reaction, as well as in the inoculated, as in the control-rats, which means absence of sensitizing effect, produced by previous inoculation of these mycobacteria on the lepromin reaction in the rat.

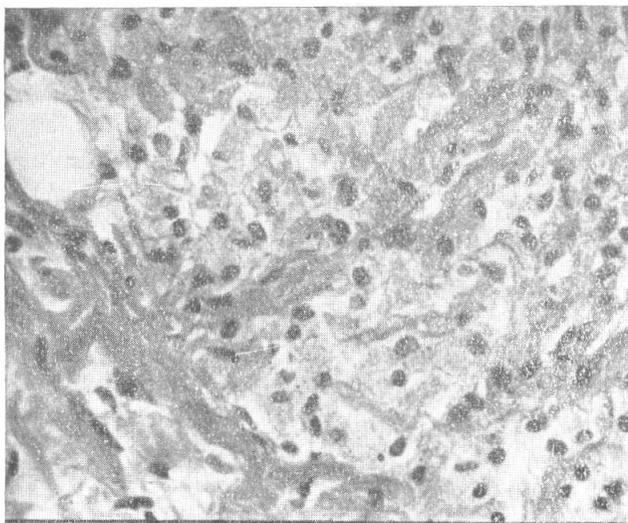


Fotomicrografias 1 e 2 — Lesões observadas 9 dias após a injeção intradérmica de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*. H. E.; 180x.

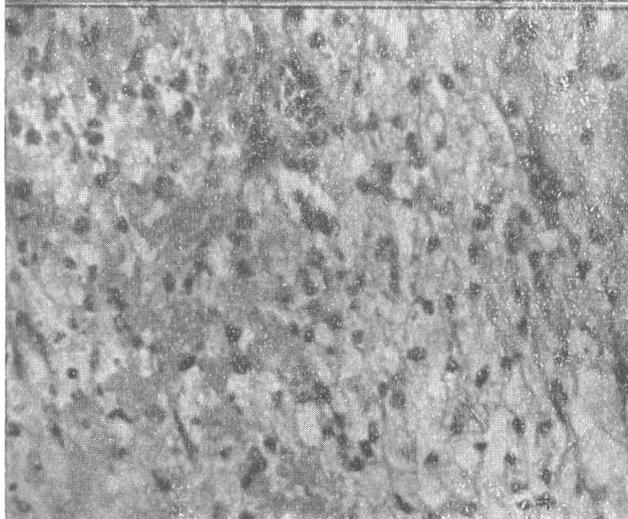
1 — Rato não inoculado previamente (contrôle) ; ausência de necrose e fibrose.

2 — Rato previamente inoculado com BCG; lesão mais intensa; presença de área de necrose; tendência à fibrose.

3



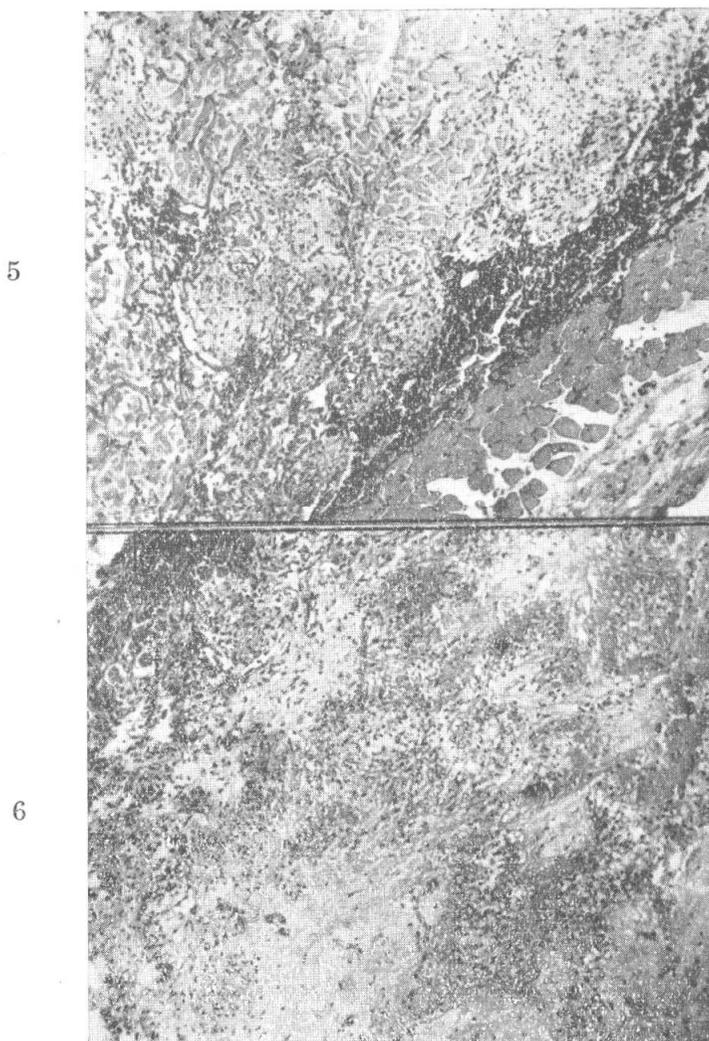
4



Fotomicrografias 3 e 4 — Aspéto da célula leprosa do rato em lesões observadas 9 dias após a injeção intradérmica de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*. H. E. 480x.

3 — Rato não inoculado prèviamente (contrôle); célula leprosa pouco vacuolizada; ausência de necrose.

4 — Rato prèviamente inoculado com BCG; célula leprosa bem vacuolizada; área de necrose.

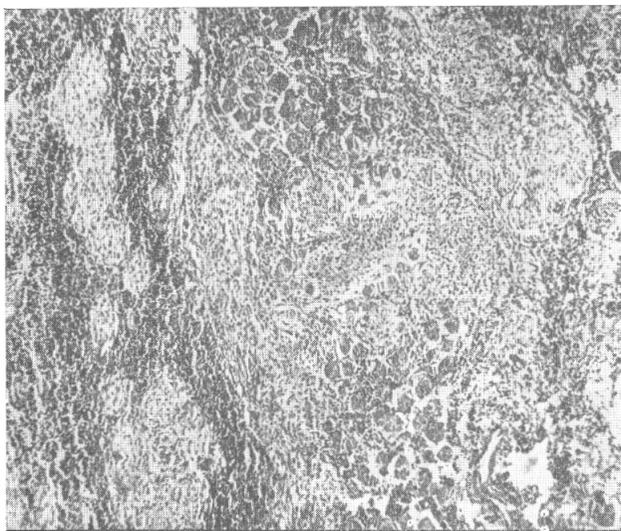


Fotomicrografias 5 e 6 — Lesões verificadas 120 dias após a injeção intradérmica de lepromina contendo aproximadamente 0,074 mg de *M leprae*. H. E. 180x.

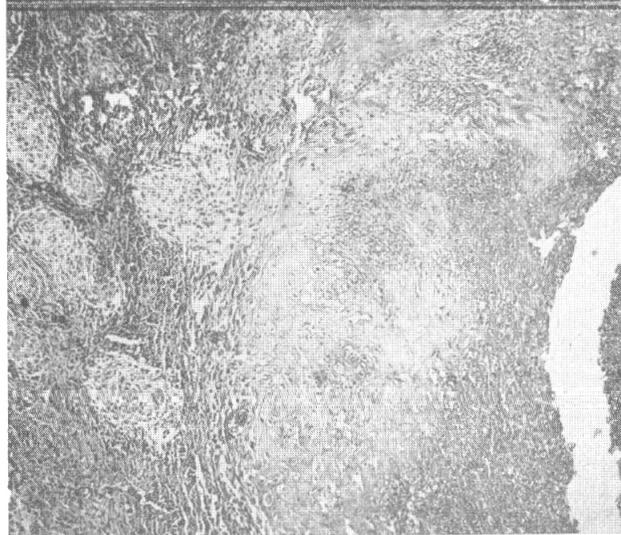
5 — Rato não inoculado previamente (contrôle); lesão em involução; ausência de necrose; pequena tendência à fibrose.

6 — Rato previamente inoculado com BCG; lesão em involução; áreas de necrose e fibrose.

7



8

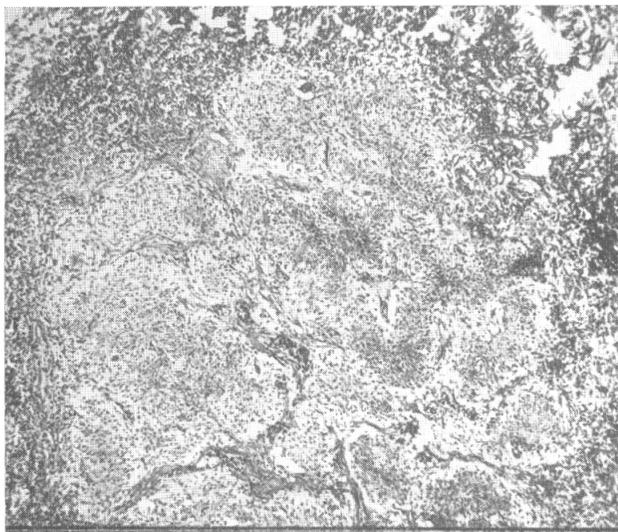


Fotomicrografias 7 e 8 — Lesões verificadas 120 dias após a injeção intradérmica de suspensão contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*. H. E., 60x.

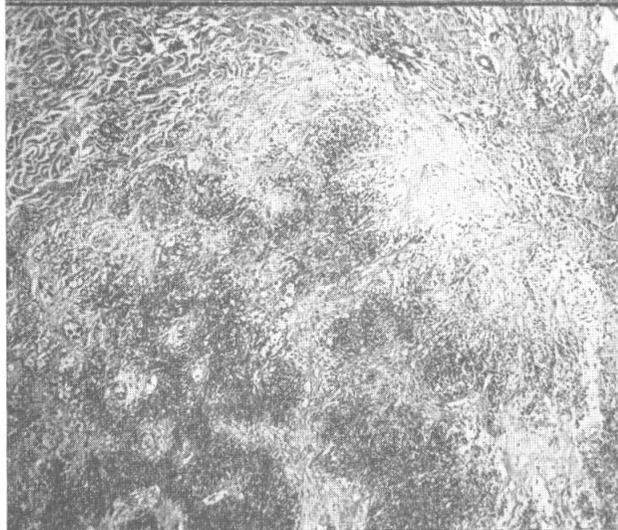
7 — Rato não inoculado previamente (contrôle) ; lesão em involução; ausência de necrose; pequena fibrose.

8 — Rato previamente inoculado com *M. lepraemurium*; lesão em involução; necrose e fibrose intensas.

9



10



Fotomicrografias 9 e 10 — Lesões verificadas 120 dias após a injeção intradérmica de suspensão contendo aproximadamente 0,35 mg de *M. lepraemurium*. H. E. 60x.

9 - Rato não inoculado previamente (contrôle); lesão em involução pequena fibrose e pequenas áreas de necrose.

10 — Rato previamente inoculado com BCG; lesão em involução; grandes áreas de necrose e intensa fibrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — AZULAY, R. D. — A ação do BCG sobre a reação lepromínica. Arq. Serv. Nac. Lepra 6: 81, 1948.
- 2 — BARMAN, J. M. — Ensayo de inoculación de bacilos de Hansen a ratas blancas. Rev. Med. Rosario 35: 101, 1945.
- 3 — CHAUSSINAND, R. — Concerning the study the of prophylatic action of BCG vaccination against leprosy. Editorial. Internat. J. Leprosy 21: 75, 1953.
- 4 — DHARMENDRA, MAZUMDER, S. & MUKERJEE, N. — The possible rôle of BCG vaccination in prophylaxis against leprosy. Leprosy India 25: 163, 1953.
- 5 — FERNANDEZ, J. M. M. — Estudio comparativo de la reacción de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas. Rev. Argent. Dermatosif. 23: 425, 1939.
- 6 — FIELDING, J. W. — The lepromin test in laboratory animals. M. J. Australia 1: 439, 1944.
- 7 — FLOCH, H. — Sur l'épidémiologie de la lèpre en Guyane Française. Arq. Serv. Nac. Lepra 4: 71, 1946.
- 8 — FLOCH, H. & CAMAIN, R. — Reaction de Mitsuda; immunité anti-lépreuse et vaccination par le BCG. Arch. Inst. Pasteur Guyane Franç. N.º 172, 1948.
- 9 — HADLER, W. A. — Estudo histológico das lesões de lepra murina em involução. Rev. Brasil. Leprol. 19: 75, 1951.
- 10 — HADLER, W. A. — Comportamento do cobaio e do rato, normais, injetados com "lepromina" por via intradérmica. Rev. Brasil. Leprol. 21: 165, 1953.
- 11 — HADLER, W. A. — Influência do BCG sobre a reação da lepromina no rato. VI Reunião Anual da Soc. Brasil. Prog. Ciência, — São Paulo, Novembro 1954.
- 12 — HADLER, W. A. — Influência da inoculação prévia de BCG sobre os resultados da reação da lepromina, em cobaios. Tese de Doutorado. Fac. Med. de Ribeirão Preto, 1955.
- 13 — 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.
- 14 — HADLER, W. A. & ZITI, L. M. — Efeito da vacinação pelo BCG sobre a evolução da lepra murina; observação em ratos inoculados por via intraperitoneal com pequena dose de *M. lepraemurium*. Rev. Brasil. Leprol. 22: 124, 1954.
- 15 — HAYASHI, F. — Mitsuda's skin reaction in leprosy. Internat. J. Leprosy 1: 31, 1933.
- 16 — LYON, M. — Le rat ne réagit pas à la léproline de Mitsuda. Bull. Soc. Path. Exoth. 32: 134, 1939.
- 17 — MARCHOUX, E. & CHORINE, V. — Le phénomène de Koch ne se produit pas chez le rat par réinoculation du bacille de Stefansky. Bull. Soc. Path. Exot. 31: 8,09, 1938.
- 18 — MONTESTRUC, E. & BLACHER, R. — La vaccination au BCG dans la prophylaxie de la lèpre. Rev. Colon. Méd. Chir. 22: 358, 1950.
- 19 — OLMOS CASTRO, N. — La calmetización en la profilaxis antileprosa. Rev. Argent. Leprol. 1: 2, 1953.

- 20 — ROSEMBERG, J. — Estado atual da vacinação BCG oral. *Rev. Brasil. Tuberc.* 19: 699, 1951.
- 21 — ROSEMBERG, J., SOUZA CAMPOS, N. & AUN, J. N. — Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. I-Ação positivante do BCG sobre a lepromino-reação. *Rev. Brasil. Leprol.* 18: 3, 1950.
- 22 — SILVA, C. — Vacinação BCG na lepra. *O Hospital* 42: 931, 1952.
- 23 — SOUZA CAMPOS, N. — A reversibilidade da leprominoreação pelo BCG. Seu valor profilático. Estudo do "Educandário S. Teresinha". III Conf. Panamer. Lepra, Buenos Aires, 1951.
- 24 — TANIMURA, Y. — Experimental study on immunology of murine leprosy. II On skin reaction of murine leprosy. *La Lepro*, 21: 108, 1952.
- 25 — WATANABE, Y. — Experimental studies on animals concerning leprosy. IV Allergy and inoculation of lepra materials. *Kitasats Arch. Exp. Med.* 12: 355, 1953.