MARIA ESTHER SALLES NOGUEIRA

INOCULAÇÃO DE *Mycobacterium leprae* NA BOLSA JUGAL DO HAMSTER

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista *Júlio de Mesquita Filho*, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profª. Drª. Kunie Iabuki Rabello Coelho

Co-orientador: Prof. Dr. Raul Negrão Fleury

Botucatu

1999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE LIVROS/OUTROS MATERIAIS
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO

Nogueira, Maria Esther Salles
Inoculação de *Mycobacterium leprae* na bolsa jugal do hamster / Maria Esther Salles Nogueira. —1999.

Tese (doutoramento) — Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1999.

1. Doenças micobacterianas - Patologia - Estudos experimentais

-CDD 616.96907

Palavras-chave: Hamster; Bolsa jugal;Granuloma, *Mycobacterium leprae*

Dedico este trabalho

Aos meus pais, ,JOSÉ (in memoriam) e ANGELA, meus primeiros mestres, que tudo fizeram pela minha formação moral, afetiva e intelectual.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos,

Pela alegria de tê-los

Agradecimentos

À Prof. Drª. KUNIE IABUKI RABELLO COELHO, minha orientadora, por me transmitir seu valioso conhecimento, pela confiança e carinho em mim depositados.

Ao Prof. Dr. RAUL NEGRÃO FLEURY, co-orientador, que me deixou segura e convicta de sua vivência no campo da patologia da hanseníase, em quem me apoiei.

À Profª. Dra. MARIA SUELI PARREIRA DE ARRUDA, da Faculdade de Ciências, Unesp, Campus de Bauru, que é para mim uma grande amiga e guia na jornada de meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. DILTOR VLADIMIR ARAUJO OPROMOLLA, Diretor da Divisão de Pesquisa, Treinamento e Ensino do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, pela amizade, incentivo e apoio que tem dado à minha carreira.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre me acolheu com carinho e atenção.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia, Paulo Roberto, Maria de Lurdes, Juvenal, Dalva Aparecida, Eduvaldo e Mara, responsáveis pelo preparo das lâminas de histologia, pela competência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Biblioteca Central do Campus de Botucatu-Unesp, que sempre me atenderam com solicitude, em particular a Rosemary pela correção das referências bibliográficas.

Ao Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond, Diretor e Pesquisador Científico do Instituto Lauro de Souza Lima, que possibilitou a qualidade gráfica deste trabalho, disponibilizando-me o acesso ao Centro de Processamento de Dados.

Ao Dr. Somei Ura, Pesquisador Científico IV, um grande amigo, que teve participação decisiva no trabalho, selecionando os pacientes e enviando as amostras para serem processadas.

Às amigas Eliane, Fátima, Suzana, e Elaine que dividem comigo a mesma sala, as alegrias e tristezas do dia a dia profissional.

Aos bolsistas e funcionários do Laboratório de Hanseníase Experimental, Clélia, Márcia, André e Ida que atenderam às minhas solicitações com carinho e competência.

À bibliotecária Iracy Borges Luz e as funcionárias da Biblioteca do Instituto Lauro de Souza Lima, Maria Helena, Luzia Aparecida, Maria Goretti, Lucimara, Maria Helena Silva, Alice Aparecida, pela eficiência e atenção e carinho que sempre demonstraram.

À Telma, Jorge e Maurício do Centro de Processamento de Dados, responsáveis pela editoração gráfica, pela valiosa contribuição.

Agradeço especialmente,

Aos Pacientes, que possibilitaram a elaboração deste trabalho, confiantes na sinceridade e resultados da minha pesquisa científica.

Escuta a provação que te visita,
na estreita cruz do leito que te isola,
e recebe, na dor, a santa esmola
da bondade de Deus, pura e infinita.

Bendita seja a lágrima!... Bendita
a ulceração que punge e desconsola!...
Glorifiquemos a sublime escola
que encontramos na carne enferma e aflita.

Enquanto o corpo chora e desfalece,
usa a meditação, a calma e a prece
no reconforto da alma dolorida...

Sofre, louvando as privações e as chagas
e encontrarás, na sombra em que te esmaga,
a eterna _claridade de outra vida.

Versos aos Enfermos
(Jésus Gonçalves, 1902 -1947*)

*paciente hanseniano internado no Instituto Lauro de Souza Lima em 1933.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS

1 – INTRODUÇÃO..... 01

1.1- Aspectos Gerais..... 01

1.2- Alterações Imunológicas na Hanseníase 07

1.2.1- Alterações da Imunidade Mediada por Células 07

1.2.2- Alterações da Imunidade Humoral..... 10

1.3- Modelos Animais em Hanseníase 12

1.3.1- O Hamster 20

1.3.2- A Bolsa Jugal do Hamster 23

2 - OBJETIVO..... 29

3 - MATERIAL E MÉTODOS..... 30

3.1- Material..... 30

3.1.1- Pacientes 30

3.1.2- Animais 31

3.2- Métodos..... 32

3.2.1- Preparo dos Inóculos NT_1 NT2 e T..... 32

3.2.2- Determinação da Concentração Bacilar 33

3.2.3- Identificação do *Mycobacterium leprae*..... 33

3.2.4- Inoculação em Hamsters para Estudo Morfológico..... 35

3.2.4.1- Grupo Experimental 1..... 36

3.2.4.2- Grupo Experimental 2..... 36

3.2,4.3- Grupo Experimental 3..... 37

3.2.5 Teste de Recuperação Bacilar 37

3.2.5.1- Grupo Experimental 4..... 37

3.3 - Sacrifício e Coleta de Materiais 39
3.4 - Análise Microscópica..... 40
3.4.1- Determinação do Índice Baciloscópico..... 40
3.4.2- Determinação do Índice Morfológico 41
4 - RESULTADOS 42
4.1- Avaliação Macroscópica da Bolsa Jugal e Coxim Plantar ... 42
4.2- Avaliação Microscópica da Bolsa Jugal..... 43
4.2.1- Grupo Experimental 1 43
4.2.2- Grupo Experimental 2 45
4.3- Avaliação Microscópica do Coxim Plantar 47
4.3.1- Grupo Experimental 3 47
4.4- Teste de Recuperação Bacilar (G4) e Camundongo 49
5- DISCUSSÃO..... 70
6 - CONCLUSÕES..... 79
7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
RESUMO..... 95
ABSTRACT..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	antígeno
CPH	complexo principal de histocompatibilidade
HD	hanseníase dimorfa
HDT	hanseníase dimorfa tuberculóide
HDV	hanseníase dimorfa virchoviana
HE	hematoxilina-eosina
HI	hanseníase indeterminada
HT	hanseníase tuberculóide
HV	hanseníase virchoviana
Ia	genes da região Ia do camundongo que codificam Ag de classe II
IB	índice baciloscópico
IFNy	interferon - gama
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IM	índice morfológico
LAM	lipoarabinomanana
LB	linfócito B
LT	linfócito T
LTCD4+	linfócito T auxiliar/indutor
LTCD8+	linfócito T citotóxico/supressor
M.leprae	*Mycobacterium leprae*
NT	não tratado
p.i	pós inoculação
PGL1	glicolipídeo fenólico 1
T	tratado
T_H1	linfócito T helper 1
T_H2	linfócito T helper 2

1. Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

O *Mycobacterium leprae (M. leprae),* agente etiológico da hanseníase, identificado em 1873 por Gerard Henrik Armauer Hansen, é uma bactéria intracelular obrigatória, gram positiva, álcool ácido resistente e corando-se em vermelho pelo método de Ziehl Neelsen. Tem a forma de bastonete, reto ou levemente encurvado com as extremidades arredondadas medindo aproximadamente 1,0 - 8,0 gm de comprimento e 0,3 gm de diâmetro (Draper & Missel, 1977).

Pela microscopia eletrônica, o *M. leprae* nos tecidos humanos, de tatus e de camundongos demonstra características semelhantes as de outras micobactérias. A parede celular tem espessura de 20 nm apresentando uma camada interna eletrondensa e uma externa eletrontransparente, onde estão agrupados componentes lipídicos, particularmente o glicolipídeo fenólico 1 (PGL1) e lipoarabinomanana (LAM) (Brennam & Barrow, 1980; Hunter et al., 1986).

O citoplasma é eletrondenso contendo estruturas comuns as de outros organismos gram positivos tais como: DNA, mesossomos, grânulos de estocagem e membrana plasmática continua sob a parede celular (Rees & Young, 1994).

Essa bactéria, que exibe multiplicação lenta (11 - 13 dias) e baixa patogenicidade, pode ser isolada de tecidos infectados não sendo cultivável em meios artificiais. No homem o *M. leprae* tem predileção especial por tegumento, mucosas e nervos periféricos, podendo acometer fígado, baço, olhos, linfonodos, ossos, articulações e testículos (BRASIL, Ministério da Saúde, 1994).

A importância da hanseníase pode ser avaliada pelos dados obtidos em 1998 que estimam o número total mundial de doentes em 828.803, sendo 105.744 no Brasil (Word Health Organization, 1998). Trata-se de uma doença com baixa mortalidade, mas constitui um grave problema de saúde pública e social, devido às deformidades e incapacidades físicas que levam à discriminação e segregação dos doentes e de seus familiares.

O sistema de classificação adotado no Brasil, foi proposto em Madr i no VI Congresso Internacional de Leprologia (1953). Nesse

sistema há duas formas polares da doença que são clínica e imunologicamente distintas, denominadas hanseníase tuberculóide (HT) e hanseníase virchoviana (HV). Além dessas formas polares estiveis, existem dois grupos intermediários instáveis, denominados hanseníase dimorfa (HD) e hanseníase indeterminada (HI). A evolução da doença para um desses tipos está relacionada à resposta imunológica do indivíduo frente ao *M. leprae.*

Na forma HT a resposta imune celular é eficiente e a reação intradérmica ao antígeno de Mitsuda (Mitsuda,1953) é positiva. Esses pacientes têm poucas lesões cutâneas, bem delimitadas, acastanhadas com bordas discretamente elevadas. O comprometimento do nervo é freqüente, podendo ser a única manifestação clinica do paciente (Brasil, Ministério da Saúde, 1994). No derma, predominam granulomas epitelióides com linfócitos LT (LI) auxiliar/indutor (LTCD4+) e células de Langhans, circundado por halo de LT citotóxico/supressor (LTCD8+) (Modlin et al., 1983). Nos granulomas, os bacilos são raros ou ausentes, e quando presentes são identificados em nervos e áreas de necrose (Job, 1994). A maioria dos pacientes desse tipo tende à cura espontânea.

Na forma HV, a resposta imune celular é deficiente e a reação de Mitsuda é negativa. As manifestações clínicas iniciais são de máculas hipocrômicas que progressivamente se transformam em lesões eritemato-acastanhadas, infiltradas, brilhantes, mal definidas, atingindo grandes extensões do tegumento, formando em algumas Áreas placas e nódulos denominados hansenomas. Há disseminação das lesões para mucosas e vísceras e o comprometimento neural aumenta com a progressão da doença. Histologicamente a epiderme é atrófica e retificada, preservando uma faixa do derma papilar (faixa de Unna). Nas demais camadas do derma, nas fases iniciais, predominam aglomerados de macrófagos com citoplasma abundante, homogêneo, eosinofílico e numerosos bacilos íntegros e fragmentados em seu interior. Nas fases mais avançadas, esses granulomas são constituídos por macrófagos multivacuolados, com numerosos bacilos fragmentados e granulosos (Opromolla & Fleury, 1981). Os LTCD4+ e LTCD8+ são raros e aparecem entremeados aos macrófagos, sem definir o manto linfocitário (Modlin et al,1983). Coleções focais de linfócitos B (LB) estão distribuídas na lesão. Pacientes HV não tratados pioram progressivamente.

O grupo HD, apresenta manifestações intermediárias variáveis entre HT e HV de acordo com o grau de resposta imune ao M. leprae e reação de Mitsuda positiva ou negativa. Clinicamente,

apresentam lesões em placas com o centro aparentemente normal e bordas de limite interno bem definido e externo difuso para a pele circunvizinha. O quadro histológico também apresenta características intermediárias, os granulomas são mais frouxos, extensos e quando localizados junto à superfície não comprometem a epiderme; os linfócitos são escassos e os filetes nervosos menos comprometidos.(Opromolla & Fleury, 1981; BRASIL, Ministério da Saúde, 1994).

Ridley & Jopling (1966), baseados no quadro clínico/histológico determinado pelo estado imune do paciente, propuseram uma subdivisão do grupo HD. Àqueles próximos ao polo tuberculóide, receberam a denominação de dimorfo tuberculóide (HDT) porque apresentam características mais próximas às do polo HT, com granulomas mais compactos e baixo índice baciloscópico (IB). Àqueles próximos ao polo virchoviano, receberam a denominação de dimorfo virchoviano (HDV), apresentando menor resistência, com granulomas mais frouxos, reduzido número de linfócitos e IB mais alto.

O grupo HI, considerado como fase inicial da doença, pode evoluir para uma das formas descritas acima, na dependência da resposta imune do indivíduo ou ausência de terapêutica específica. Caracteriza-se clinicamente por lesões cutâneas hipocrômicas isoladas ou

confluentes. Histologicamente, apresenta infiltrado inflamatório não especifico, constituído por linfócitos e histiócitos onde os bacilos são raros ou ausentes. O infiltrado inflamatório pode apresentar distribuição seletiva ao longo de filetes nervosos podendo penetrar e delaminar o perineuro e endoneuro; quando estas últimas alterações são observadas, mesmo na ausência total de bacilos, a lesão pode ser diagnosticada como compatível com HI. Esses casos podem evoluir, permanecer estacionários ou regredir espontaneamente, se houver evolução, ela será modulada pelo sistema imune do paciente (Opromolla & Fleury, 1981; Ministério da Saúde, 1994).

1.2- Alterações Imunológicas na Hanseníase

1.2.1- Alterações da Imunidade Mediada por Células

Bass et al. (1989) pesquisando LTCD4+ de camundongos conseguiram diferenciar subgrupos dessas células, tendo por base o tipo de secreção de citocinas. Esses subgrupos receberam a denominação de linfócitos T *helper* 1 (T_H1) e linfócitos T *helper* 2 (T_H2). Em 1992, Robinson et al. demonstraram subclasses análogas às células T_H4 e T_H2 murinas, no homem.

Sabe-se hoje que os LTCD4+ na presença de interleucina 12 (IL12) e ausência de interleucina 4 (IL4) diferenciam-se em LTH 1, importantes na ativação da imunidade celular. Essas células secretam basicamente dois tipos de citocinas: IL2 e interferon gama (IFNy). Por outro lado, os LTCD4+ em contato com a IL4 se transformam em LT_H2, envolvidos na ativação da imunidade humoral. Os LT_H2 produzem vários tipos de interleucinas: IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13 (Almeida, 1996).

Na hanseníase, a presença das citocinas tem adquirido grande importância devido à dicotomia imunológica do hospedeiro frente ao *M. leprae*. Os trabalhos têm demonstrado que pacientes com a forma HT apresentam padrão de resposta T_H1 considerada protetora para a hanseníase, enquanto que os pacientes com a forma HV apresentam padrão de resposta T_H2, não protetora (Salgame et al., 1991; Modlin, 1994; Rea, 1995).

A imunidade celular é um mecanismo importante no controle da infecção por *M. leprae*, um microrganismo intracelular obrigatório predominantemente de macrófagos e células de Schwann (Maier, 1987; Hastings, 1994; Ottenhoff, 1994).

Pacientes com HV apresentam resposta imune celular deficiente, específico ao *M. leprae*, mas os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são claros. As investigações sobre o comprometimento das subpopulações de LT na hanseníase, demonstram resultados controversos. Nath & Singh (1980), observaram aumento de LTCD8+ circulantes em pacientes com HT, enquanto, Mehra et al.(1982) observaram resultado semelhante em pacientes HV. Stoner (1982) detectou quantidades normais de LTCD8+ circulantes em pacientes com

Em 1982, Mshana et al. investigando a relação entre LTCD4+ e LTCD8+ no sangue periférico de pacientes com HV, observaram aumento de LTCD8+ e ligeira diminuição de LTCD4+. Resultados semelhantes foram obtidos por Wallach et al. (1982).

A análise de subpopulações de LT realizada por Modlin et al. (1983) demonstrou que em lesões da HT, os LT entremeados no granuloma epitelióide eram CD4+ e o manto circunjacente CD8+. Na forma HV, as células CD4+ e CD8+ estavam entremeadas com histiócitos vacuolados sem definir um manto linfocitário. Para esses autores, a disposição entre LTCD4+ e CD8+ estaria associada à maturação dos monócitos,lise bacilar e, resposta de hipersensibilidade tardia. Por outro lado, a distribuição ao acaso de LTCD4+ e CD8+ poderia impedir a apresentação do antígeno ás células imunocompetentes, como também não estimular a maturação dos monócitos para células epitelióides.

Tem sido sugerido que certos glicolipídeos micobacterianos, entre eles o PGL1 e LAM, desempenhariam papel importante nas alterações da imunidade celular e função efetora dos macrófagos na hanseníase. Em 1987, Kaplan et al. demonstraram que antígenos solúveis do LAM inibiam a resposta de LT do sangue periférico

de pacientes com HV. O mesmo resultado também foi encontrado por Moreno et al. (1988) em relação à proliferação de clones de LTCD4+.Além disso, Krahenbuhl (1995) demonstrou que o LAM obtido tanto do *M. leprae* como do *M. tuberculosis* diminuía a capacidade microbicida de macrófagos humanos e murinos quando ativados pelo IFNy e, suprimia a apresentação de moléculas de classe Ia do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) em macrófagos murinos.

1.2.2- Alterações da Imunidade Humoral

As alterações sorológicas que ocorrem na hanseníase, principalmente na forma HV estão bem documentadas. Distúrbios dos padrões eletroforéticos, com elevação dos níveis de imunoglobulinas (Ig) séricas e aparecimento de auto-anticorpos são achados comuns nesse grupo (Lim & Fusaro, 1967; Bullock & Fasal, 1971; Saha & Mittal, 1971). A presença de auto-anticorpos foi confirmada por vários autores (Bonomo et al., 1967; Masala et al., 1979; Nogueira et al., 1991) que demonstraram reações positivas ao teste cardiolipínico de VDRL, fator anti-núcleo (FAN) e fator reumatóide (FR-látex).

Níveis elevados de Ig não diminuem a alta carga bacilar, o que indica que a imunidade humoral não protege o paciente, servindo apenas como indicador da presença dos antígenos (Ag) do bacilo no organismo infectado. A presença principalmente de IgG está relacionada ao aparecimento de episódios reacionais e alterações neurológicas graves (Lyons et al.,1988)

1.3- Modelos Animais em Hanseníase

Apesar do *M. leprae* ter sido a primeira bactéria patogênica para o homem, identificada, até hoje não é possível o seu cultivo em meios artificiais. Essa propriedade peculiar do agente tem levado inúmeros pesquisadores a procurar animais experimentais que funcionem como fontes de bacilos para utilizações em estudos estruturais e bioquímicos, além da tentativa de entender melhor a patogenia da doença. Varias espécies têm sido utilizadas, porém, os relatos de crescimento e isolamento do bacilo apresentam resultados contraditórios.

Em todos os trabalhos experimentais, o inóculo foi sempre obtido de paciente portador de hanseníase clinicamente diagnosticada, entretanto, esse diagnóstico nem sempre foi correto ao longo da história da hanseníase experimental, o que resultou em dados insatisfatórios. A seguir, pode-se verificar alguns desses resultados com características muito diferentes de autor para autor.

A procura de um animal experimental susceptível ao *M. leprae*, começou em 1879 com os estudos de Hansen, apud BLOM (1973) que pretendia provar cientificamente que a hanseníase era

doença infecciosa e não hereditária, como até então se acreditava. O pesquisador inoculou macacos, coelhos e gatos sem sucesso.

Após essas primeiras tentativas, outros pesquisadores investigaram várias espécies, sendo que o primeiro trabalho experimental depois de Hansen é atribuído a Neisser (1881), apud JOHNSTONE (1987) que inoculou 24 coelhos e 2 cães com material rico em bacilos. Relatou apenas reação local ao redor do sítio de inoculação.

Kobner em 1882, apud JEANSELME (1934) inoculou macacos, via subcutânea em dorso, orelhas e pálpebras. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e, à necropsia demonstraram lesões caseosas em órgãos internos. Também foram inoculados cobaias, ratos, coelhos, pombos, enguias, rãs e peixes, com resultados negativos.

Damsch (1883), apud JOHNSTONE (1987) inseriu tecido hansênico na câmara anterior do olho de dois coelhos e parede abdominal de dois gatos. Relatou que nos coelhos houve uma escassa multiplicação bacilar e nos gatos foram observados numerosos bacilos ao redor do nódulo implantado.

Wesener (1887), apud JOHNSTONE (1987) utilizando a metodologia descrita por Damsch (1883), inoculou tecido hansênico, na câmara anterior de olho e parede abdominal de oito coelhos. Em dois animais, houve desenvolvimento de nódulos em pulmões, fígado, baço, rins, linfonodos. Porém, o autor concluiu que as lesões eram tuberculosas.

Nicolle, em 1906, inoculou macacos (Macacus sinicius) via subcutânea e por escarificação na têmpora, orelhas, mucosa nasal e conjuntiva ocular. O autor relatou o desenvolvimento de nódulos nas orelhas dois meses pós inoculação (p.i). Um dos nódulos foi biopsiado e à microscopia observou-se pequeno número de bacilos. Segundo o autor, a quantidade de bacilos era a única diferença digna de atenção entre a hanseníase humana e a experimental.

Babes & Kalinder (1906), apud JEANSELME (1934) implantaram no tecido celular subcutâneo da face de um macaco, pequenos fragmentos de hansenomas e relataram que 30 dias após, apareceu um nódulo no local. Além disso, foi observado ao longo dos vasos e do trajeto linfático um minúsculo nódulo contendo bacilos. Após três meses da inoculação o animal morreu, e os próprios autores suspeitaram que ele tivesse morrido de tuberculose.

Couret (1911), utilizou como modelos experimentais rãs, girinos, tartarugas, cobras e várias espécies de peixes, todos com resultados negativos.

Shiga (1936), visando aumentar a susceptibilidade de camundongos à doença utilizou animais esplenectomizados, tireoidectomizados e com dieta pobre em vitaminas; embora não tivesse logrado êxito, as técnicas de imunossupressão descritas pelo autor foram aproveitadas por outros pesquisadores abrindo um novo campo de estudos.

Em 1940, Ota & Sato injetando suspensão bacilar no músculo peitoral de oito galinhas relataram após seis a oito meses, desenvolvimento local de granulomas com bacilos. Experimento semelhante foi repetido por Lobo & Carvalho (1946), inoculando material proveniente de hansenoma no músculo peitoral de galinhas. Os autores descreveram reação local não progressiva de caráter inflamatório, com raros bacilos.

O primeiro trabalho bem documentado de hanseníase experimental em primata não humano foi relatado por Gunders (1958),em um chimpanzé (Pan troglodites). O autor inoculou *M. leprae* na pele,

nervo ulnar, peritôneo e corrente sanguínea. Onze meses p.i, o animal desenvolveu infecção com múltiplos nódulos intracutâneos localizados nas orelhas, antebraços e patas; o animal também apresentou grandes áreas despigmentadas em orelhas e membros. Os nódulos foram biopsiados e eram predominantemente compostos por células epitelióides com bacilos isolados ou em globias em seu interior, semelhante ao grupo HDV.

Baskin et al. (1987) inocularam um macaco Rhesus *(Macaca mulatta)* com $1,5x10^8$ *M. leprae/ml*, obtido de outro macaco infectado naturalmente, por via intravenosa e intracutânea (orelhas, lábios e fronte). Os resultados demonstraram granulomas histiocitários com grande quantidade de bacilos em pele, mucosa nasal, nervo periférico e gânglios linfáticos, semelhantes à forma HV. Segundo os autores essa espécie pode ser utilizada em hanseníase experimental, apresentando a vantagem de ser um animal muito bem estudado em seus aspectos fisiológicos e comercialmente mais barato.

Walsh et al. (1990) inocularam quatro macacos cinomolgus (Macaca fascicularis) com $1,8x10^9$ *M.leprae*/ml de paciente não tratado, via intracutânea e intravenosa. Em três animais, foram observados lesões em orelhas e extremidades, compatíveis com o grupo HDV três meses p.i; no sexto mês as lesões de dois animais regrediram.

O quarto macaco permaneceu assintomático. Para os autores, essa espécie necessitaria ser estudada mais detalhadamente, para determinar a sua utilização em hanseníase experimental.

Gormus et al. (1995) inocularam 31 macacos mangabey *(Cercocebus torquatus atys)* com doses variáveis de 1,8 $x10^7$ a 4,8 $x10^{16}$ *M. leprae/ml,* obtido de macaco infectado naturalmente, via intracutânea (orelhas, nariz, antebraços e região periorbital) e via intravenosa (veia safem). Os resultados demonstraram que 92% dos animais inoculados desenvolveram lesões semelhantes aos tipos HV e HDV. Neuropatias foram observadas em 75% e a regressão expontânea da doença ocorreu em 14% dos animais. Para os autores, o macaco mangabey demonstrou ser altamente susceptível à hanseníase.

Em 1960, Shepard, baseado na hipótese elaborada por Binford (1956), de que o *M. leprae* teria preferência por áreas mais frias do corpo humano, obteve multiplicação localizada do bacilo no coxim plantar de camundongos linhagem BALB/c. Segundo o autor, o crescimento bacilar nessa área era limitado e lento, atingindo o pico ao redor de seis meses. Embora a pata de camundongo não possa ser utilizada como fonte de bacilos porque a sua recuperação não ultrapassa 10^6 bacilos/ml, esse trabalho pioneiro abriu um novo campo de estudos,

permitindo que se evidenciassem várias características do bacilo como a baixa velocidade de multiplicação (10 - 12 dias), tempo de viabilidade fora do organismo (7 - 10 dias quando estocado a 4°C), ausência de subtipos ou cepas, e que a passagem seriada e contínua do bacilo por muitos anos não aumentou e não mudou a sua patogenicidade. Além disso, esse modelo possibilitou estudos sobre a ação de drogas terapêuticas empregadas no tratamento da hanseníase (Pettit & Rees, 1964; Costa et al., 1993; Meyers et al., 1994; Rees & Young,1994).

Outro modelo importante, fol desenvolvido por Kirchheimer & Storrs (1971) que ao injetarem por via intravenosa*, M. leprae* em tatus (Dasypus novemcinctus), cuja temperatura corporal média é de 34°C, obtiveram infecção disseminada, com comprometimento de múltiplos órgãos e grande número de bacilos (10^{10} bacilos/ grama de tecido). As lesões eram semelhantes as verificadas na forma HV. Entretanto, as dificuldades de manutenção dos tatus em cativeiro (Storrs & Greer, 1973; Arruda & Opromolla, 1981) e a baixa porcentagem de animais que desenvolvem a doença em nosso meio (Opromolla et al., 1980), tem limitado o seu uso em estudos experimentais.

Baseado nos estudos sobre a importância da imunidade celular no controle da infecção e a preferência do bacilo por áreas mais

frias do organismo, Rees (1966) inoculou 10^4 a 10^6 M. leprae/ml no coxim plantar e orelhas de camundongos timectomizados e irradiados. Descreveu intensa multiplicação 12 meses p.i (10^7 - 10^{10} bacilos/ml) em orelhas, patas, focinho, fígado, baço e pulmões.

Prabhakaram et al. (1975) não obtiveram infecção sistêmica com a inoculação de *M. leprae* no coxim plantar de camundongos atímicos, até seis meses p.i. Colston & Nilson (1976) repetiram esse estudo, inoculando 10^7 *M. leprae* /ml e observaram os animais por mais de dois anos; ao final desse período verificaram multiplicação bacilar (10^8 - 10^9 bacilos/ml) e disseminação das lesões em testículos, focinho, cauda, fígado e baço.

Atualmente, o camundongo SCID (severe combined immunodeficient) com uma severa deficiência de LT e LB têm sido utilizado em estudos envolvendo a hanseníase. Yogi et al. (1991) inocularam 5,8 x 10^6 *M. leprae* provenientes de camundongo nude, em coxim plantar de camundongos SCID e recuperaram após oito meses 10^9 *M. leprae* coxim Os bacilos em menor quantidade, também foram detectadas em nervos, cauda, escroto, epidídimo, fígado baço e pulmões.

Apesar dos resultados positivos, a utilização desses animais é restrita somente a alguns centros de pesquisa, porque a sua manutenção requer um ambiente controlado e estéril de germes, encarecendo as pesquisas.

1.3.1- O Hamster

Como animal de laboratório têm sido utilizadas três espécies de hamsters: o sírio ou dourado (Mesocricetus auratus) o chinês ou tigrado (Cricetus griseus) e o negro ou europeu (Clicetus cricetus). hamster dourado é o mais utilizado em estudos experimentais e sua introdução nos centros de pesquisa se deu após a captura de duas fêmeas e um macho em Aleppo - Síria, em 1930. São estes três animais Ds progenitores de todos os hamsters dourados empregados atualmente em laboratórios.

A primeira tentativa de infecção do hamster pelo *M. leprae* foi realizada por Adler (1937), que utilizou animais esplenectomizados e obteve lesões viscerais seis semanas após a implantação subcutânea de fragmentos teciduais ricos em bacilos. Entretanto, esses resultados não puderam ser reproduzidos por outros (Dhrarmendra & Lowe, 1940; Oteiza & Blanco, 1948).

Em 1958, Binford utilizando suspensões de bacilos viáveis, inoculou em testículos e orelhas de 50 hamsters, divididos em: grupo 1= 10 irradiados; grupo 2= 10 irradiados e tratados com cortisona; grupo 3= 10 tratados com cortisona; grupo 4= 10 normais e grupo 5= 10 normais inoculados com bacilos mortos que serviram como grupo controle. Houve desenvolvimento de lesões em dois animais do grupo 1 e seis do grupo 4; nos locais de inoculação, foram observados granulomas histiocitários vacuolizados contendo grande número de bacilos. Animais irradiados não apresentaram maior número de bacilos quando comparados ao grupo normal. Animais dos grupos 2 e 3 morreram antes do término do experimento e, os controles do grupo 5 não desenvolveram lesões. Para o autor, apesar das lesões mostrarem semelhança com lesões de HV, seria necessário um estudo mais detalhado com identificação das micobactérias presentes nessas lesões. Assim, amostras dos materiais positivos foram enviadas para Shepard & Kirsh (1961) que familiarizados com os critérios de classificação identificaram uma das amostras como sendo de micobactéria atípica.

Convit et al. (1962) inocularam em orelhas, testículos, coxim plantar e bolsa jugal, 330 hamsters com *M. leprae* provenientes de pacientes HV e HD. Verificaram ao final do décimo mês que 36% daqueles animais inoculados com suspensões de bacilos de pacientes com HD

desenvolveram, nas orelhas, pequenos nódulos de granulomas histiocitários, ricos em bacilos. Por outro lado, apenas 1% dos animais inoculados com bacilos de pacientes HV desenvolveu lesões. Segundo os autores, a baixa porcentagem de positividade no grupo inoculado com bacilos de pacientes HV, era devido à total adaptação do *M. leprae* ao metabolismo intracelular humano. Ao contrário, os bacilos provenientes das lesões HD não estariam tão bem adaptados devido as oscilações da resposta imune do paciente, originando, portanto, cepas resistentes capazes de sobreviver e multiplicar-se em tecido animal. Os resultados das inoculações realizadas na bolsa jugal e coxim plantar não foram relatados.

Waters & Niven em 1966, acompanharam por período de 5 a 22 meses, 53 hamsters inoculados nas orelhas e testículos com suspensões de *M. leprae*. Relataram presença de bacilos no interior de várias células em 69% dos animais inoculados nas orelhas e 4% nos testículos. Reinoculando nos mesmos locais outros 18 hamsters com material positivo dos testículos, verificaram 18 meses p.i, resultados semelhantes aos obtidos na primeira inoculação, sem que a quantidade bacilar excedesse 10^6 bacilos/ml. Os autores concluíram que o tipo de infecção obtido na orelha de hamster era semelhante ao descrito por Shepard (1960) no coxim plantar.

Arruda et al. (1995a) inocularam na bolsa jugal de 34 hamsters $5x10^6$ M. *leprae/ml* e verificaram, entre 30 a 150 dias p.1, formação de granulomas macrofágicos não epitelióides com grande número de bacilos, semelhantes aos da HV.humana. No mesmo trabalho, os autores inocularam 18 hamsters via coxim plantar e ao comparar as lesões dos dois locais de inoculação observaram que nesse último grupo houve formação de granulomas epitelióides focais com células gigantes, linfócitos e raros bacilos. Segundo os autores, esses dados indicam a necessidade de estudos mais detalhados sobre o uso da bolsa jugal como local de escolha em estudos que envolvam a participação da resposta imune, na formação da lesão hansênica.

1.3.2- A Bolsa Jugal do Hamster

As bolsas jugais do hamster são invaginações bilaterais que têm aberturas na cavidade bucal e se estendem, dorso-caudalmente, sob a pele dos ombros. No animal adulto quando expandida cada uma delas mede 4,0 cm - 5,0 cm de comprimento, aproximadamente 1,0 cm de largura e 0,4 mm de espessura. E revestida por epitélio plano estratificado corneificado, composto por camada basal de células cubóides, camada espinhosa com um a três níveis de células, camada

granulosa composta por um a dois níveis de células achatadas e extrato córneo homogêneo e densamente corado pela hematoxilina-eosina (HE) (White & Gohari, 1981). Esse epitélio é sustentado por tecido conjuntivo denso, sob o qual repousa tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. O tecido conjuntivo frouxo, une a parede externa da bolsa às estruturas adjacentes, permitindo que ela seja facilmente evertida em animais anestesiados, facilitando a sua utilização em estudos experimentais (Barker & Billingham, 1977; Hardy et al., 1986).

A bolsa jugal é considerada um local imunologicamente privilegiado e tem sido utilizada para transplantes de células e tecidos normais e malignos, porque tolera aloenxertos ali implantados por longo tempo, ao redor de quatro meses. Essa tolerância aos enxertos é explicada pela combinação da escassez ou ausência de drenagem linfática na porção distal e presença da barreira de tecido conjuntivo. As atividades específicas dos linfócitos tais como reconhecimento antigênico e interação com outras células do sistema imune ocorrem nos órgãos linfóides secundários; a ausência de drenagem linfática no segmento distal resultaria em bloqueio do ramo aferente da resposta imune, consequentemente, não ocorreria o início dessa resposta, resultando assim, na tolerância imunológica.

A inexistência ou escassez da drenagem linfática no terço distal da bolsa foi motivo de discussões entre vários pesquisadores e os resultados apresentados foram contraditórios. Shepro et al. (1964) relataram que o bacteriófago T_4 e *Escherichia coli* marcados com timidina triciada escaparam da bolsa rapidamente. Anticorpos fago-específicos foram detectados na corrente sangüínea 24 horas p.i, embora em pequenas quantidades. Para os autores quanto menor e menos flogístico o Ag, menor é a capacidade de retenção no tecido e, quando escapam da bolsa ficam distribuídos aleatoriamente, em meio ao tecido conjuntivo bucal, ao invés de serem drenados diretamente para o linfonodo regional. Resultados semelhantes foram obtidos por Barker & Billingham (1971).

De acordo com Handler & Shepro (1968) apesar da bolsa não possuir vasos linfáticos e não existir linfonodos regionais específicos, o linfonodo cervical superior abaixo do músculo esternocleidomastoídeo seria primariamente estimulado pelo Ag procedente desse local. Os autores chamam atenção para o nódulo cervical superior contralateral que também é afetado pela estimulação antigênica, mas em menor grau.

Do mesmo modo, Arruda et al. (1995b) inocularam tinta nanquim na porção proximal da bolsa jugal de dez hamsters; outros dez na porção distal e oito no lábio superior direito. Os linfonodos cervicais

dos animais inoculados no lábio exibiram macrófagos com partículas do corante, após seis horas. Os linfonodos cervicais dos animais inoculados nas porções proximal ou distal da bolsa mostraram-se inalterados, sem vestígios de partículas de tinta, até o final da experimentação, em 72 horas. Para os autores, esses resultados confirmaram os relatos de Sinhorini et al.,1994 e a hipótese da ausência de drenagem linfática na bolsa jugal do hamster

As células de Langerhans têm sido identificadas como as principais células apresentadoras de Ag na indução da hipersensibilidade tardia, desde que Silberberg (1973) identificou-as em contato íntimo com linfócitos na dermatite de contato.

Para esclarecer melhor a hipótese supracitada, Bergstresser et al. (1980) realizaram um interessante trabalho avaliando a distribuição das células de Langerhans na superfície cutânea de roedores, entre eles o hamster. Os locais avaliados foram o dorso, orelha, coxim plantar e bolsa jugal. Os resultados demonstram médias de 1300, 1100, 620 e 130 células/mm2 respectivamente. Como pode ser observado, a densidade de células de Langerhans na bolsa jugal foi cinco a dez vezes menor quando comparada aos outros locais. Para os pesquisadores, a diminuição das células de Langerhans, poderia produzir um

processamento e apresentação antigênica ineficiente. Portanto, locais imunologicamente privilegiados poderiam ser resultado de três fatores que atuariam sinergicamente: 1) ausência de drenagem linfática que bloquearia a apresentação do Ag aos linfonodos regionais; 2) deficiência de células de Langerhans que permitiria a passagem do Ag através do epitélio, sem uma apresentação imunológica efetiva e 3) acesso direto do Ag à rede vascular, onde a quantidade sistêmica do Ag resultaria em inibição e supressão da resposta imune, em vez de resposta efetiva.

Nos últimos anos, a bolsa jugal do hamster vêm sendo utilizada em estudos sobre a participação do sistema imune no desenvolvimento e evolução das infecções causadas por micobactérias e fungos.

Sinhorini et al. (1994), inocularam 5,0x106 BCG/0,05ml (Bacilo de Calmette-Guérin) na bolsa jugal do hamster, observaram inicialmente, um infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos. Após sete dias, os granulomas eram discretos, compostos por agregados de células epitelióides, sem a presença do manto circunjacente. A inoculação no coxim plantar demonstrou lesões mais intensas, com grande número de células epitelióides e presença do manto celular.

Roxo et al. (1994), inocularam BCG e M.tuberculosis $H_{37}Rv$, uma cepa virulenta, na bolsa jugal do hamster. A inoculação do BCG produziu granulomas epitelióides com ausência de halo mononuclear ao redor do granuloma. As lesões produzidas pela cepa H37Rv foram semelhantes àquelas induzidas pelo BCG, mas com características mais agressivas ao longo do período estudado. A inoculação do coxim plantar, resultou na formação de granulomas epitelióides e halo de células mononucleares circundando a lesão. Porém, a cepa virulenta $H_{37}Rv$ mostrou um caráter progressivo, enquanto o BCG assumiu um caráter de resolução. Segundo os autores não se observaram diferenças significativas entre as lesões, produzidas pelas duas cepas inoculadas.

Independente dos mecanismos propostos para explicar a tolerância imunológica da bolsa, é fato confirmado que aloenxertos implantados em órgãos ou tecidos sem drenagem linfática não são rejeitados. Essa característica aliada à facilidade de manipulação da bolsa, tem levado os pesquisadores a utilizá-la como local de implante para tumores humanos. O *status* de local imunologicamente privilegiado da bolsa, tem ainda tomado essa estrutura, um local ideal para estudos sobre o papel do sistema imune na formação dos granulomas.

2. Objetivo

2 - **OBJETIVO**

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a utilização da bolsa jugal do hamster como local de inoculação do *M. leprae,* por meio de:

1. Caracterização histológica da evolução das lesões induzidas por inoculação de *M. leprae* no segmento distal da bolsa jugal;

2. Comparação das lesões induzidas com inóculos preparados a partir de pacientes não tratados e em tratamento;

3. Comparação da evolução das lesões da bolsa jugal (local desprovido de drenagem linfática) com as do coxim plantar (local rico em drenagem linfática);

4. Avaliação da possibilidade de multiplicação bacilar nas lesões da bolsa jugal.

3. Material e Métodos

3 — MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Material

3.1.1- Pacientes

Os inóculos foram preparados a partir de lesões de três pacientes com HV e baciloscopia positiva, selecionados pelo corpo clínico do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, SP.

A classificação da forma clínica foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo Congresso Internacional de Madri, 1953. Os pacientes selecionados deram sua autorização para participar do estudo e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética Médica sob nº 29/97CEM.

Um dos pacientes identificado como **NT_1**(não tratado-1), masculino, branco, com 23 anos de idade era portador de HV ativa em progressão e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **NT_1**, antes do início do tratamento. O IB foi de 6+ e o índice morfológico (IM) 1%.

Um outro paciente identificado como **NT_2** (não tratado-2), masculino, branco, com 65 anos de idade era portador de HV ativa em progressão e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **NT_2**, antes do início do tratamento. O IB foi de 5+ e o IM 0,5%.

O terceiro paciente, identificado como **T** (tratado), masculino, branco, com 20 anos de idade era portador de HV em regressão, sob quimioterapia com Ofloxacim e Rifampicina, há cerca de 30 dias, e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **T.** 0 IB foi de 6+ e o IM 0,5%.

3.1.2- Animais

Foram utilizados 80 hamsters *(Mesocricetus auratus),* machos com aproximadamente dois meses e peso corpóreo entre 90 - 120 gramas. Durante o período de experimentação foram mantidos em temperatura ambiente, alojados em caixas plásticas apropriadas, recebendo ração comercial e água à vontade.

3.2- Métodos

3.2.1- Preparo dos Inóculos **NT_1 NT_2** e **T**

Os inóculos **NT_1 e NT_2** de dois pacientes não tratados e o inóculo **T** de um paciente em tratamento foram preparados a partir dos tecidos obtidos dos seus hansenomas, por biópsia com *punch* de 5,0 mm de diâmetro. Esse material foi processado segundo técnica proposta pela World Health Organization (WHO, 1987) com pequenas modificações, como segue, resumidamente: após retirada da epiderme, o tecido dérmico foi recortado com tesoura e homogeneizado em 1,0 ml de solução salina estéril a 0,85% (SSE) em triturador de tecido tipo Potter-Elverjhem e em seguida, foi filtrado em gaze de *nylon* obtendo-se a suspensão de bacilos. A seguir foi determinada a concentração bacilar e o material foi dividido em duas alíquotas, das quais uma foi utilizada para determinar a identificação do *M. leprae* e a outra, para inoculação dos animais dos grupos experimentais, o que ocorreu imediatamente após o preparo dos inóculos.

3.2.2- Determinação da Concentração Bacilar

Foi usada a metodologia proposta por Shepard (1960). Assim, *em* lâmina de vidro com três círculos de 1,0 cm de diâmetro foram espalhados 20 Al da suspensão de bacilos em cada círculo; o material foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos e corado pela técnica de Ziehl- Neelsen. A seguir calculou-se a concentração dos *M. leprae* existentes na amostra, contando o número de bacilos em 20 campos microscópicos para cada círculo; para tanto examinou-se em zig-zag, toda a área de cada um dos círculos impressos na. lâmina. O número total de bacilos dos três círculos foi somado dividido pela somatória dos campos microscópicos (60) e multiplicado pelo fator do microscópio 415754. O fator 415754 correspondeu à relação da área do círculo/área da abertura da objetiva.

3.2.3- Identificação do *Mycobacterium leprae*

Para identificação do *M. leprae* foram utilizadas técnicas de cultivo e de inoculação em coxim plantar de camundongos para afastar qualquer possibilidade de contaminação do inóculo com outras micobactérias. Esses procedimentos são utilizados rotineiramente para

identificação de *M. leprae,* cuja característica principal é o não crescimento *in vitro,* e a multiplicação limitada no coxim plantar após seis meses p.i.

Para o cultivo foi utilizada uma alíquota de cada tipo do inóculo NT_1, NT_2 e T, semeada em meio Lowenstein Jensen a 30^{O} C e 37^{O} C; uma outra alíquota foi semeada em meio de Middlebrook 7H11 a 37^{O} C (David et al., 1994) efetuada em dois tempos, da seguinte forma: o primeiro tempo é de descontaminação parcial de bactérias; em tubo de ensaio de vidro, adicionaram-se 0,5 ml de hidróxido de sódio a 4% com vermelho fenol como indicador e 0,5 ml da amostra. Após vigorosa agitação incubou-se em estufa a 37^{O} C por 15 minutos. A seguir, a amostra foi centrifugada a 3000 r.p.m. por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. 0 sedimento foi totalmente descontaminado gotejando-se ácido clorídrico a 4% até a viragem de cor para o amarelo e, em seguida foi neutralizado gotejando-se uma solução de sulfato de alumínio e potássio. a 0,4% com vermelho fenol como indicador, até .a viragem da cor para o rosa; esse procedimento visou equilibrar o pH da amostra com o do meio de cultura. No segundo tempo, o material foi semeado no meio Middlebrook 7H11 a 37^{O} C e observado semanalmente por seis a oito semanas. O resultado dos cultivos após esse período foi negativo.

Para identificação da micobactéria através da inoculação em coxim plantar, foram usados cinco camundongos BALB/c inoculados com 1,0 x 10^4 *M.* leprae/0,03m1; após seis meses os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico e o tecido obtido do coxim plantar foi processado conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. A concentração de bacilos no grupo **NT_1** foi de 7,47 x 10^4 *M. leprae/* ml e no grupo **T** foi de 6,45 x 10^4 *M. Ieprae/*ml.

3.2.4- Inoculação em Hamsters para Estudo Morfológico

Para a realização do estudo das lesões os hamsters foram divididos em três grupos experimentais denominados G1, G2, e G3 com 30, 30 e 12 animais respectivamente (Tabela 1).

Os animais dos grupos G1 e G2 foram inoculados no segmento distal da bolsa jugal com inóculos NT_1 e **T** respectivamente e os do grupo G3 foram inoculados no coxim plantar com o inóculo **NT1.** Para inoculação na bolsa jugal, os animais foram anestesiados com solução Tiopental sódico (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda), diluída a 20 mg/ml, na dose de 40mg/kg de peso corpóreo, por via intraperitoneal. A seguir, foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e, o acesso à porção distal foi obtido pela eversão da bolsa jugal direita,

com auxílio de uma pinça. Logo após a inoculação, a bolsa foi recolocada na posição inicial e, os animais foram devidamente identificados e assistidos até que se recuperassem da anestesia. Depois foram observados até o final dos períodos experimentais.

3.2.4.1 Grupo Experimental 1 (G1)

Trinta hamsters receberam inóculo **NT_1** com 0,1 ml da suspensão de 6,0 x 10^8 *M. leprae/ml* no tecido subepitelial do segmento distal da bolsa jugal direita. Lotes de cinco animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Bolsas jugais de todos os hamsters foram processadas para microscopia óptica.

3.2.4.2 Grupo Experimental 2 (G2)

Trinta hamsters receberam inóculo **T** com 0,1 ml da suspensão de 6,0 X 10^8 *M. leprae/* ml no tecido subepitelial da porção distal da bolsa jugal direita. Lotes de cinco animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. As bolsas jugais de todos os hamsters foram processadas para microscopia óptica.

3.2.4.3 Grupo Experimental (G3)

Doze hamsters receberam inóculo **NT_1** com 0,1 ml da suspensão de 6,0 x 10^8 *M. leprae/* ml, no coxim plantar da pata posterior esquerda. Lotes de dois animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. O coxim plantar coletado foi processado para microscopia óptica.

3.2.5- Teste de Recuperação Bacilar

3.2.5.1 Grupo Experimental 4 (G4) e Camundongos

Oito hamsters receberam inóculo **NT_2 com 0,1** ml da suspensão de 3,4x10^9 *M. leprae/ml* no tecido subepitelial do segmento distal da bolsa jugal direita. Lotes de dois animais foram sacrificados aos 7,14,21 e 28 dias p.i e as lesões de inoculação das bolsas jugais foram processadas como em 3.2.1 e 3.2.2 para a obtenção da suspensão de bacilos.

Essas suspensões foram utilizadas para reinoculação no coxim plantar de cinco camundongos BALB/c na dose $1,0x10^4$ *M, leprae/*0,03 ml por lote de hamster.

Esses camundongos foram todos sacrificados seis meses p.i e as lesões dos tecidos dos coxins plantares inoculados foram processados também como em 3.2.1 e 3.2.2 para testes de recuperação bacilar.

Tabela 1 - Distribuição dos animais inoculados com *M. leprae* segundo o grupo experimental, via de inoculação, tipo do inóculo, número de animais /lote e destino dos fragmentos teciduais.

Grupos	Via	Inóculo	N.º/Lote	M.O	TRb
G1 (n=30)	BJ	NT_1	5	5	-
G2 (n=30)	BJ	T	5	5	-
G3 (n=12)	CP	NT_1	2	2	-
G4 (n=8)	BJ	NT_2	2	-	8

BJ= bolsa jugal

CP= coxim plantar

n.º/lote= número de animais sacrificados/ lote

MO= número de animais destinados à microscopia óptica/lote

TRb= teste de recuperação bacilar

3.3- Sacrifício e Coleta de Materiais

Os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram sacrificados por inalação com éter etílico comercial, em jarra de anaerobiose, através de plano anestésico profundo levando à depressão do sistema nervoso central.

Constatada a morte do animal, a bolsa jugal foi evertida e a lesão de inoculação do segmento distal coletada e fixada em formalina a 10%, exceto o grupo G4 já descrito em 3.2.5.

A pata posterior esquerda dos animais (G3), foi seccionada ao nível das articulações, separando-se o tecido do coxim plantar *que* foi fixado em formalina a 10%.

3.4- Análise Microscópica

Secções histológicas com espessura aproximada de 4µm, foram coradas pela HE e Faraco-Fite (1938). As lâminas analisadas foram documentadas no fotomicroscópio Olympus Vanox AHB53 .

3.4.1- Determinação do Índice Baciloscópico

A análise histológica incluiu a determinação do IB, que representou a média estimativa da população bacteriana da amostra. Nesse estudo, a avaliação foi realizada de acordo com a escala logarítmica proposta por Ridley & Nilson (1967). 0 número de bacilos presentes foi determinado conforme quadro abaixo.

Quadro 1: Escala para Avaliação do Índice Baciloscópico.

IB= 0 (não há bacilos em 100 campos examinados)
IB= 1+ (1-10 bacilos em cada 100 campos examinados)
IB= 2+ (1-10 bacilos em cada 10 campos examinados)
IB= 3+ (1-10 bacilos em cada campo examinado)
IB= 4+ (10-100 bacilos em cada campo examinado)
IB= 5+ (100-1000 bacilos em cada campo examinado)
IB= 6+ (mais, de 1000 bacilos em cada campo examinado)

3.4.2- Determinação do Índice Morfológico

A análise histológica também incluiu a determinação do IM, conforme metodologia descrita por Leiker & McDougall (1987). O IM representou o percentual de bacilos intensa e uniformemente corados e morfologicamente íntegros em relação ao total de bacilos examinados, presentes nos cortes histológicos. Aqueles íntegros foram denominados de sólidos e considerados viáveis. Os demais bacilos, que evidenciaram falhas na coloração, representadas por zonas transversais descoradas mesmo apresentando a maior parte do seu organismo bem corada, foram denominados fragmentados e considerados não viáveis. Os bacilos fragmentados que evidenciavam muitas zonas transversais descoradas foram denominados granulosos e, também considerados não viáveis.

4. RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1. Avaliação Macroscópica da Bolsa Algal e Coxim Plantar

A partir das 20 horas p.i, na maioria dos animais inoculados na bolsa jugal, a lesão do local de inoculação era evidente e se apresentava como nódulo milimétrico bem delimitado, de coloração esbranquiçada e consistência discretamente aumentada. No grupo G1 aos 21 dias p.i não foi possível visualizar a lesão.

A lesão de inoculação do coxim plantar foi sempre de difícil visualização macroscópica; assim, todo o tecido do coxim plantar foi coletado e o seu centro considerado o local de inoculação.

4.2- Avaliação Microscópica da Bolsa Jugal

4.2.1- Grupo Experimental 1 (G1)

Os cortes histológicos do local de inoculação dos animais sacrificados 20 horas p.i demonstravam denso acúmulo de macrófagos e neutrófilos sendo a área central predominantemente neutrofílica; muitos neutrófilos nessa área apresentavam-se fragmentados (Fig.1 a,b). Circundando essa lesão observava-se edema, congestão e exsudato neutrofílico ao lado de alguns eosinófilos, mastócitos e monócitos dispersos, sem limites precisos. Lâminas coradas pela técnica de Faraco-Fite demonstravam áreas com bacilos bem corados, sugestivos de bacilos íntegros, mas no conjunto predominavam bacilos granulosos. O IB foi de 4+ (Fig. 1c) segundo classificação proposta por Ridley & Nilson (1967).

Após 48 horas, as lesões eram semelhantes às de 20 horas, porém, os acúmulos de macrófagos e neutrófilos apresentavam delimitação mais precisa e disposição mais compacta. A area central apresentava neutrófilos mais fragmentados (Fig. 2 a,b). O IB foi de 4+,

com bacilos predominantemente granulosos e raros bacilos íntegros no interior de macrófagos e de alguns neutrófilos (Fig. 2c).

A lesão no 7° dia era mais discreta, delimitada, representada por granuloma macrofágico com raros neutrófilos. Os macrófagos apresentavam citoplasma microvacuolizado semelhantes às células de Virchow. A periferia da lesão apresentava-se, sem congestão ou outras células inflamatórias exceto raros neutrófilos e mastócitos (Fig. 3a). Notava-se ainda presença de algumas células gigantes multinucleadas do tipo Langhans (Fig.3b). 0 IB foi de 5+ de bacilos granulosos (Fig. 3c).

Aos 14 dias, observou-se redução na extensão do granuloma, mas de morfologia semelhante ao do 7° dia (Fig. 4 a,b). O IB não se alterou apresentando 5+ de bacilos granulosos no interior de macrófagos (Fig. 4c).

Aos 28 dias, a lesão não se alterou, exibindo granuloma macrofágico composto por células com citoplasma abundante, vacuolado e núcleo vesiculoso ao lado de alguns macrófagos pouco vacuolados (Fig. 5a,b). 0 IB foi de 6+ de bacilos granulosos (Fig. 5c).

4.2.2- Grupo Experimental 2 (G2)

A lesão de inoculação com 20 horas, era representada por um amplo processo supurativo central, circundado por macrófagos formando um anel. Circundando essa lesão havia moderado edema e congestão com exsudato de neutrófilos, alguns eosinófilos, mastócitos e células monocitárias (Fig. 6a,b). Pelo Faraco-Fite o IB foi de 3+ de bacilos granulosos, alguns no espaço intercelular (Fig. 6c).

Com 48 horas, o abscesso era semelhante à lesão de 20 horas, porém, mais circunscrito, com redução do edema, congestão e exsudação de células no tecido circunjacente. Alguns macrófagos apresentavam citoplasma abundante e pequenos vacuolos (Fig. 7a,b).O IB foi de 4+ e os bacilos localizados no interior de neutrófilos e macrófagos eram todos granulosos (Fig. 7c).

Aos 7 dias, a lesão era bem delimitada e constituída por granuloma macrofagico com uma pequena area central necrótica composta por neutrófilos fragmentados. Circundando esse granuloma, havia ainda um infiltrado inflamatório composto por monócitos, alguns neutrófilos, eosinófilos e mastócitos de distribuição difusa (Fig. 8 a,b). Os

bacilos granulosos fagocitados pelos macrófagos com IB de 5+ estavam mdistribuídos uniformemente (Fig. 8c).

Aos 14 dias, o granuloma tomou-se mais circunscrito, constituído por macrófagos multivacuolados com citoplasma abundante. No centro da lesão, observaram-se alguns neutrófilos e eosinófilos, sem formação de processo supurativo (Fig. 9 a,b). O IB foi 5+ de bacilos granulosos (Fig. 9c).

Aos 21 dias, o granuloma era semelhante ao de 14 dias, porém, bem delimitado e sem neutrófilos (Fig. 10 a,b). 0 IB foi de 5+ de bacilos granulosos no interior dessas células com numerosas globias (Fig. 10c). Nas circunjacências da lesão principal, havia alguns macrófagos com numerosos bacilos granulosos.

Aos 28 dias, a lesão permanecia inalterada (Fig.11 a,b), com IB de 6+ de bacilos granulosos no interior de células macrofágicas formando globias (Fig.11c).

43- Avaliação Microscópica do Coxim Plantar

4.3.1- Grupo Experimental 3 (G3)

A análise histológica do coxim plantar em hamsters sacrificados com 20 horas, demonstrou lesão central representada por acúmulo de fibrina, neutrófilos e alguns macrófagos. Na periferia a lesão exibia edema, congestão, exsudato difuso de neutrófilos, monócitos, mastócitos e alguns eosinófilos cuja intensidade diminuía progressivamente com a distância da lesão central (Fig. 12 a,b). Os cortes corados pelo Faraco-Fite exibiam IB de 3+ de bacilos granulosos e alguns sólidos, isolados ou formando globias, localizados no interior de macrófagos e no espaço intercelular (Fig. 12c).

Com 48 horas, houve aumento do número de macrófagos e redução acentuada do número de neutrófilos no centro da lesão. Na periferia o infiltrado de células inflamatórias era de composição semelhante ao verificado às 20 horas porém muito mais discreto (Fig. 13 a,b). O IB permaneceu inalterado de 3+ de bacilos granulosos e alguns sólidos, no interior de macrófagos e neutrófilos (Fig. 13c).

Aos 7 dias, a lesão era composta por células epitelióides em meio às quais observavam-se neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, além de algumas células gigantes multinucleadas (Fig. 14 a,b). Esse conjunto era circundado por exsudato celular semelhante ao de 48 horas. Pelo Faraco-Fite, observou-se IB de 4+ de bacilos granulosos no interior de macrófagos (Fig. 14c).

Aos 14 dias, a lesão era delimitada e, formada por granuloma epitelióide contendo células gigantes e linfócitos (Fig. 15 a,b). Havia ainda remanescentes de infiltrado inflamatório na periferia da lesão central com predomínio de células mononucleares. O IB permaneceu inalterado com 4+ de bacilos granulosos (Fig. 15c).

Aos 21 dias, observou-se diminuição do granuloma epitelióide, tornando-se mais compacto com células gigantes e linfócitos (Fig. 16 a,b). O IB foi de 2+ de bacilos granulosos (Fig. 16c).

Aos 28 dias, a lesão se tornou muito reduzida, composta por acúmulo de células epitelióides com citoplasma finamente vesiculoso, linfócitos e algumas células gigantes (Fig. 17 a,b). 0 IB foi 2+, com bacilos granulosos (Fig. 17 c).

4.4- Teste de Recuperação Bacilar (G4) e Camundongo

Os coxins plantares de camundongos inoculados com *M. leprae* isolados das bolsas jugais de hamsters do grupo G4 demonstraram resultados positivos aos 7 e 14 dias p.i com recuperação de $6,4x10^3$ e $1,3x10^4$ *M.leprae/*ml respectivamente. A recuperação resultou negativa aos 21 e 28 dias p.i.

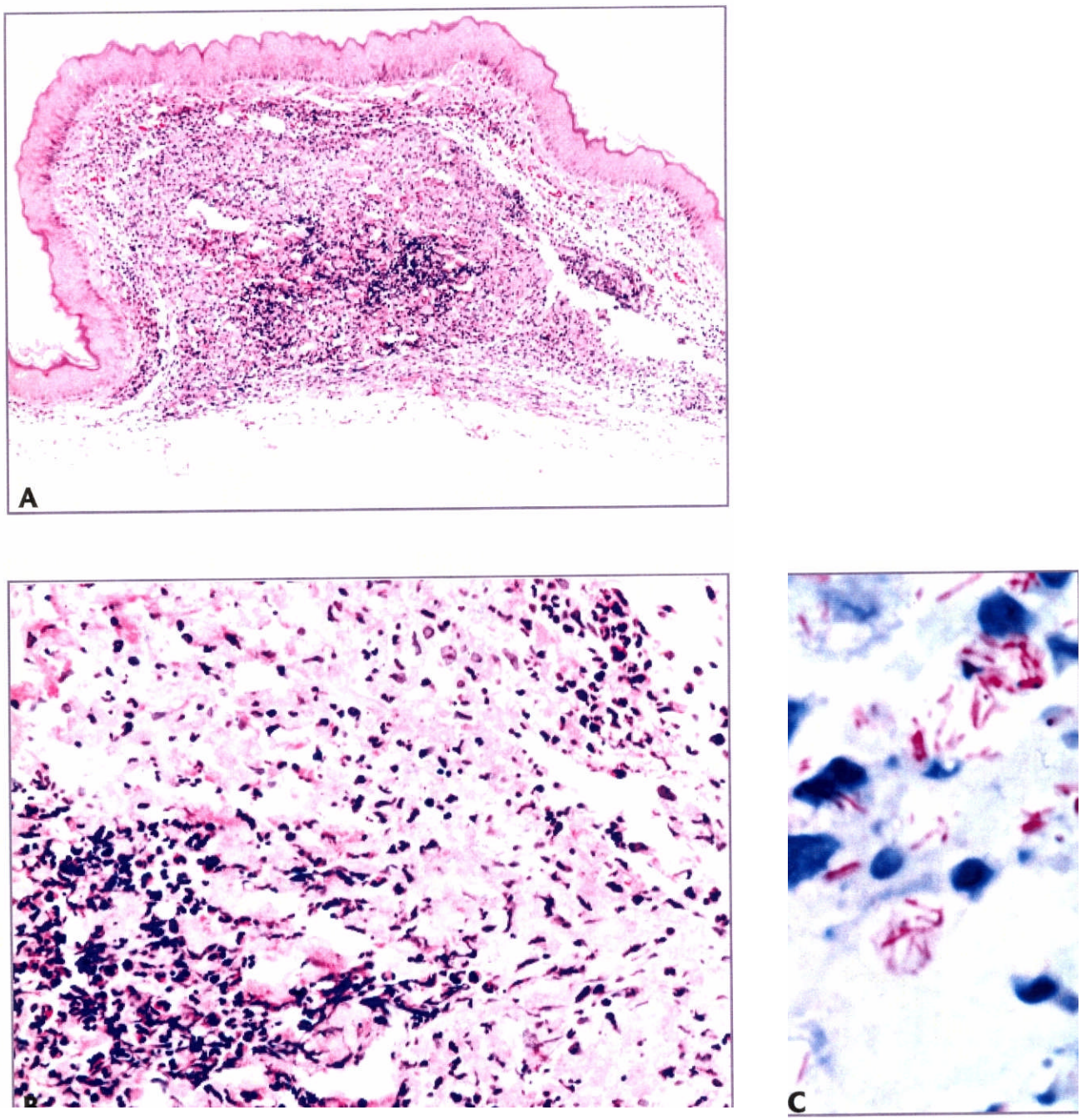


FIGURA 1. G1 - Bolsa Jugal - 20 h - p.i

A) Lesão exsudativa formando um denso acúmulo celular delimitado, fazendo protuberância na superfície epitelial. O foco central é circundado por uma área com edema, congestão e células inflamatórias distribuidas mais difusamente.
(HE - 40 X)

B) O centro da lesão é composto predominantemente de neutrófilos íntegros e fragmentados.
(HE - 200 X)

C) Bacilos granulosos e alguns sólidos.
IB: 4+ (Faraco - Fite - 1000 X)

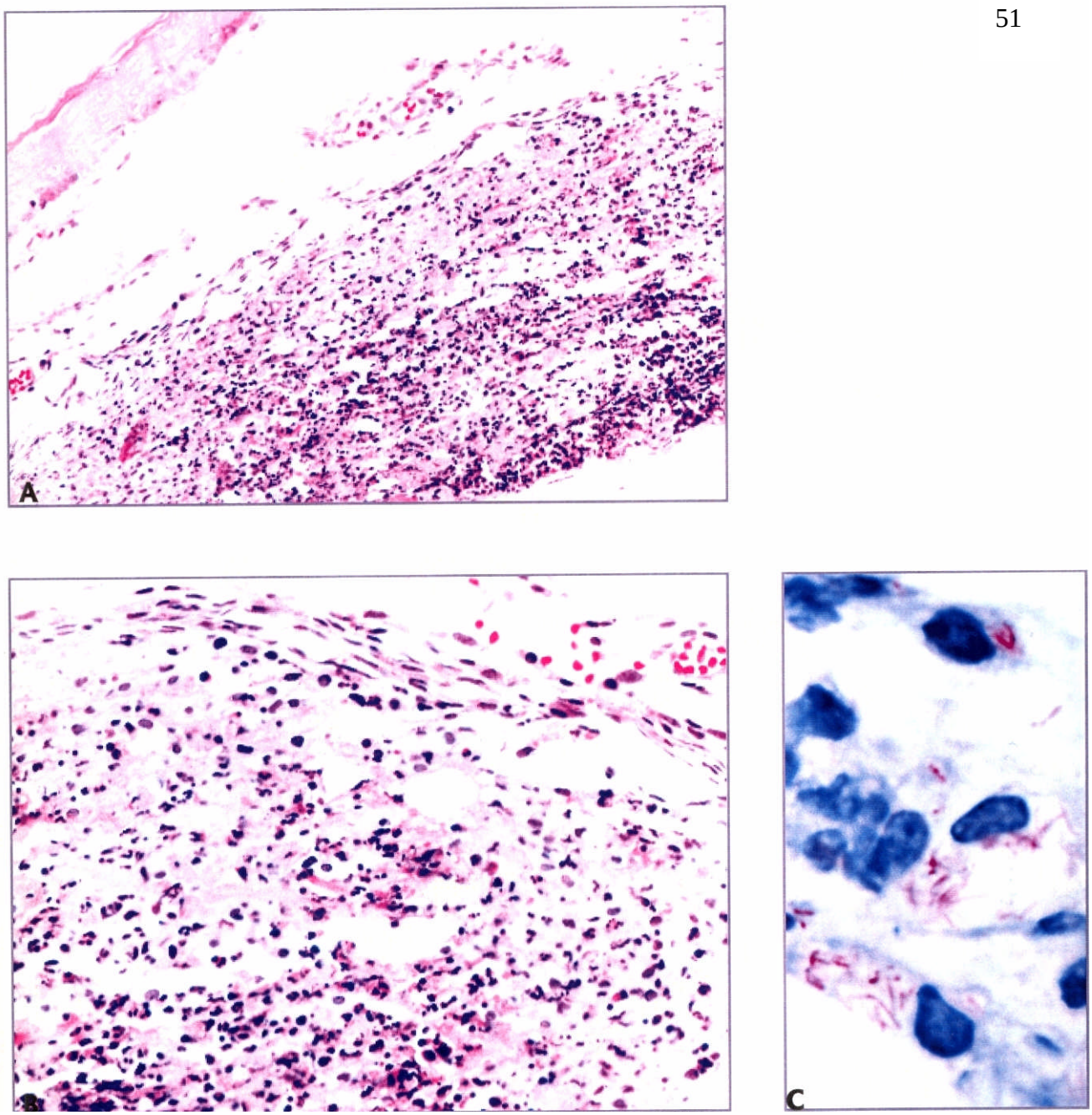


FIGURA 2. G1. - Bolsa Jugal - 48 h - p.i

A) Lesão nodular, bem delimitada, composta de macrófagos e neutrófilos.
(HE - 100 X)

B) Detalhe da lesão demonstrando macrófagos com citoplasma eosinofílico e amplo, ao lado de neutrófilos fragmentados.
(HE - 200 X)

C) Bacilos granulosos e alguns íntegros. IB:
4 + (Faraco - Fite - 1000 X)

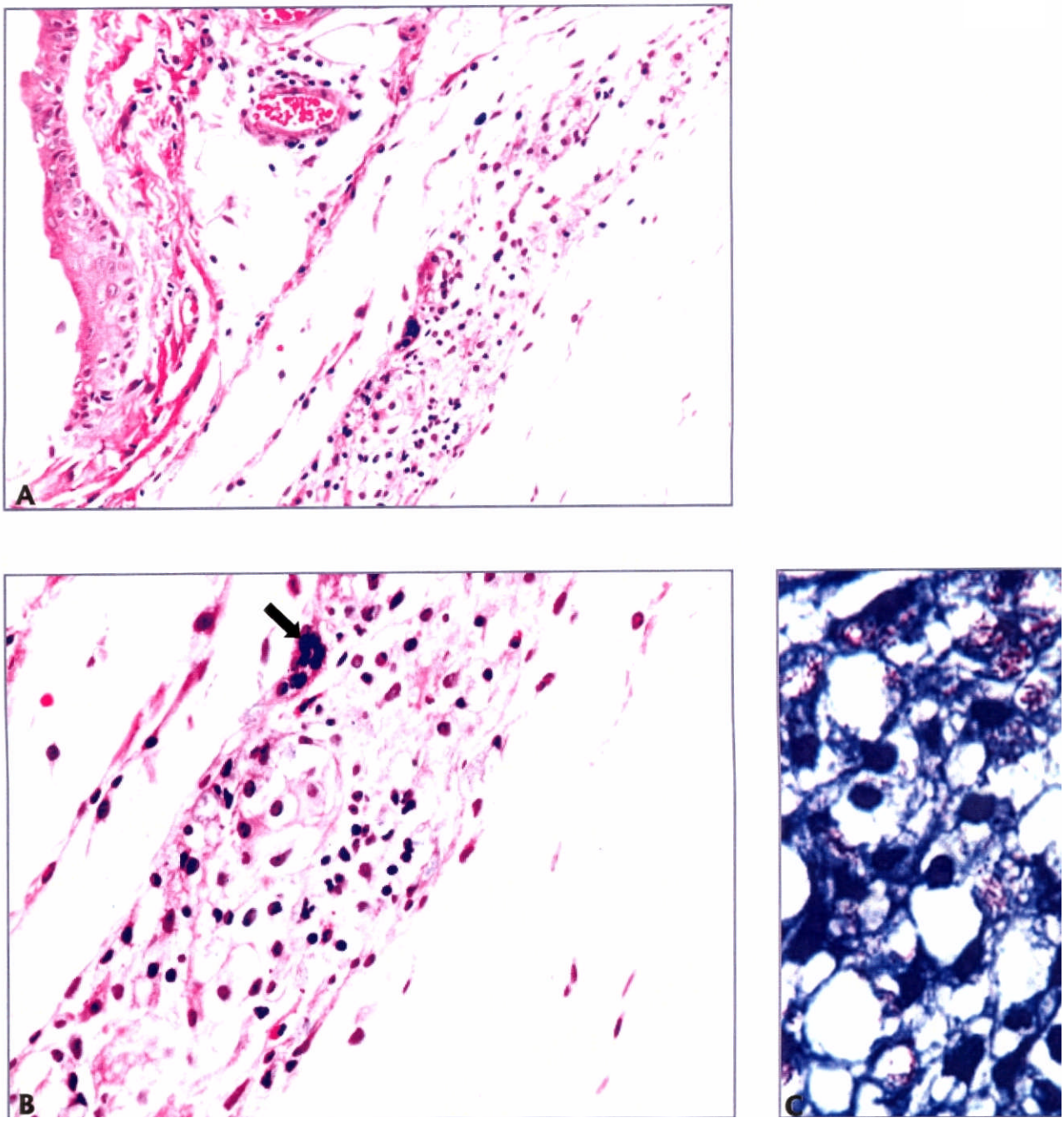


FIGURA 3. G1. - Bolsa Jugal - 7 dias - p.i

A) Pequeno granuloma macrofágico com raros neutrófilos.
(HE - 100 X)

B) Detalhe demonstrando macrófagos com citoplasma multivacuolado, semelhantes às células de Virchow. Observa-se também uma célula gigante multinucleada (seta) e alguns linfócitos
(HE - 200 X)

C) Bacilos granulosos.
IB: 5 + (Faraco - Fite - 1000 X)

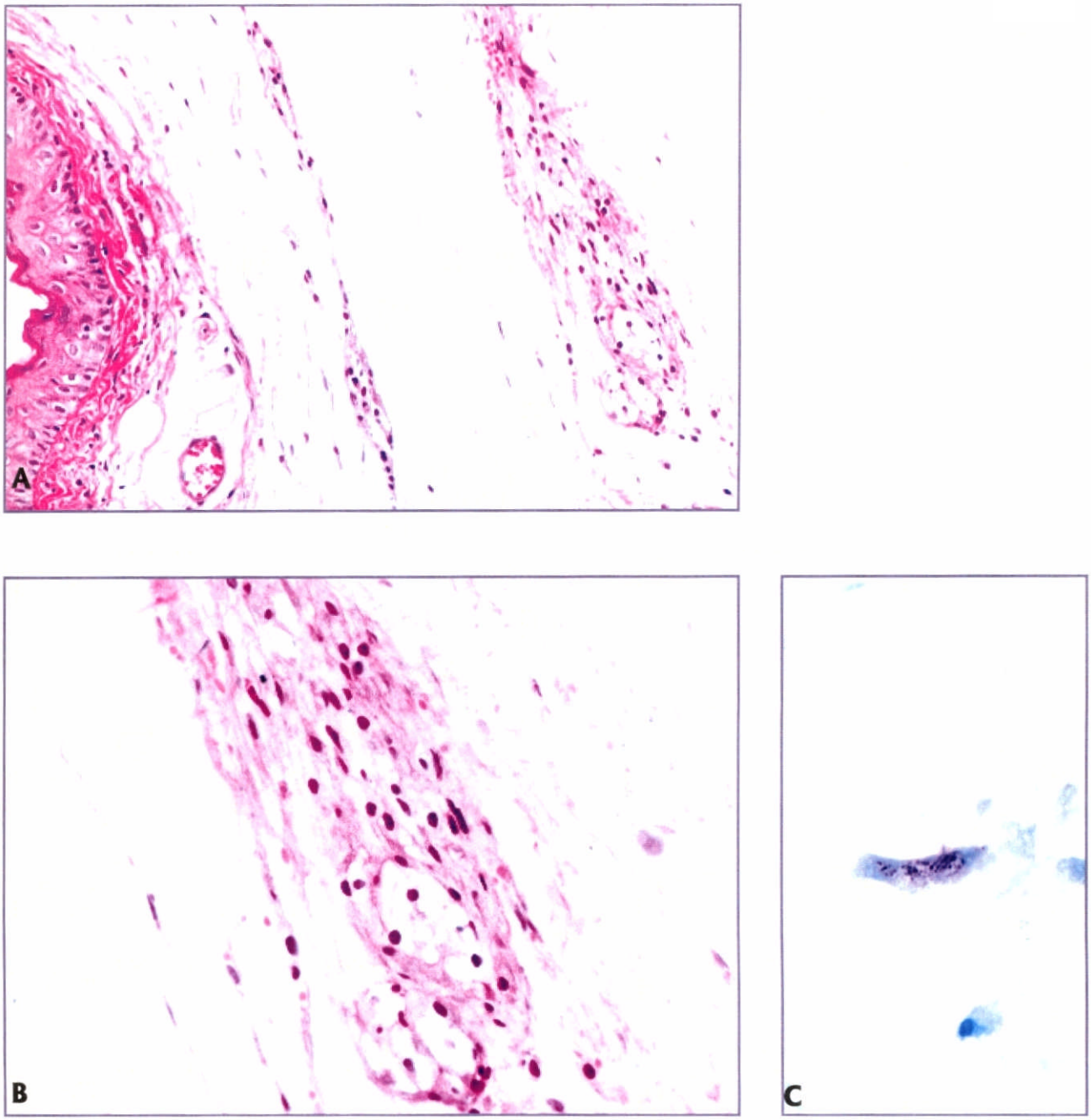
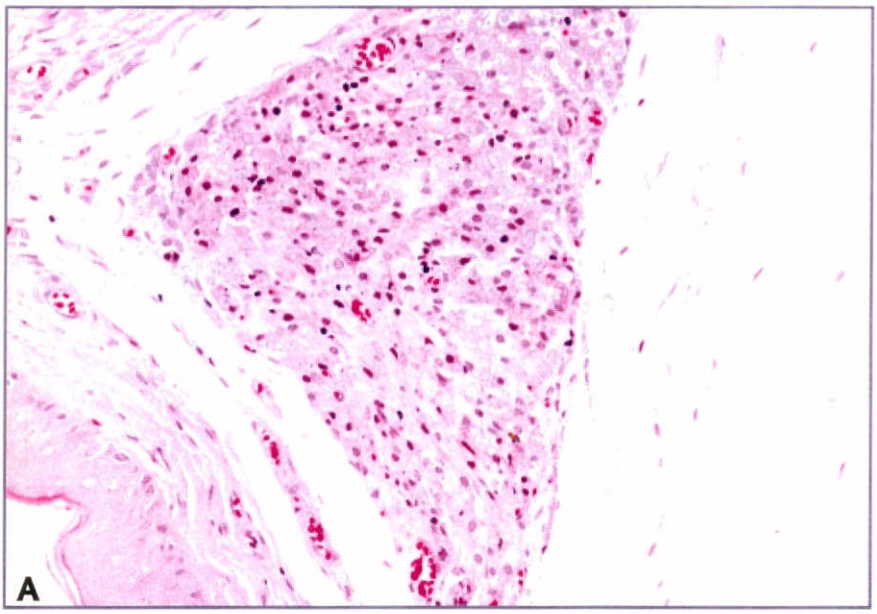


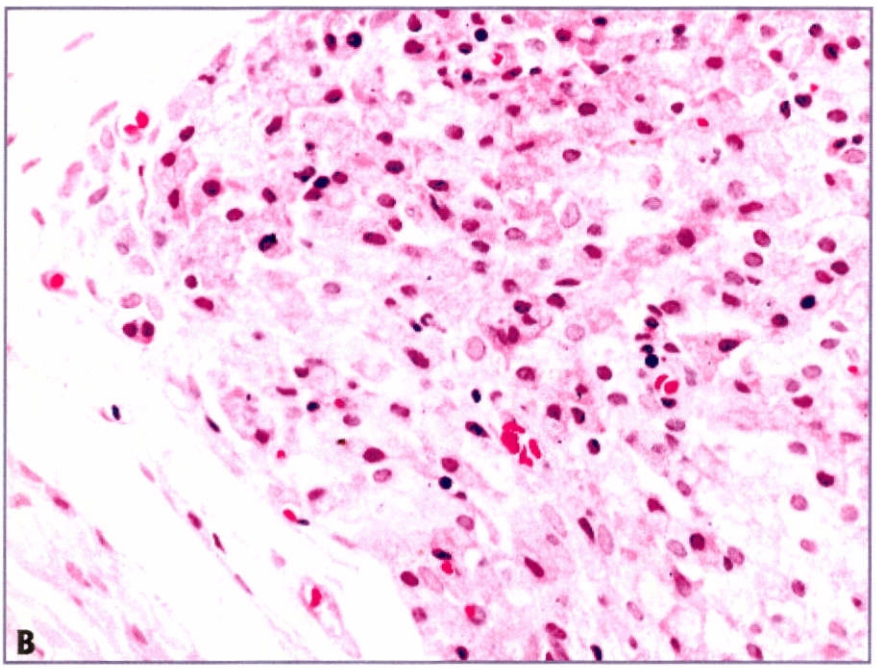
FIGURA 4. G1. - Bolsa Jugal - 14 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico pequeno e bem delimitado.
(HE - 100 X)

B) Detalhe demonstrando macrófagos multivacuolados.
(HE - 200 X)

C) Bacilos granulosos.
IB: 5+ (Faraco - Fite - 1000 X)





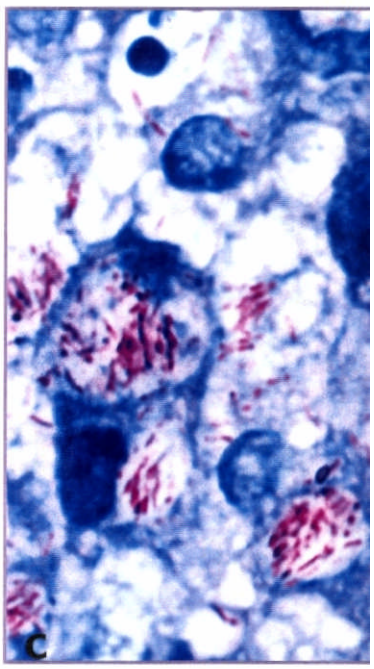
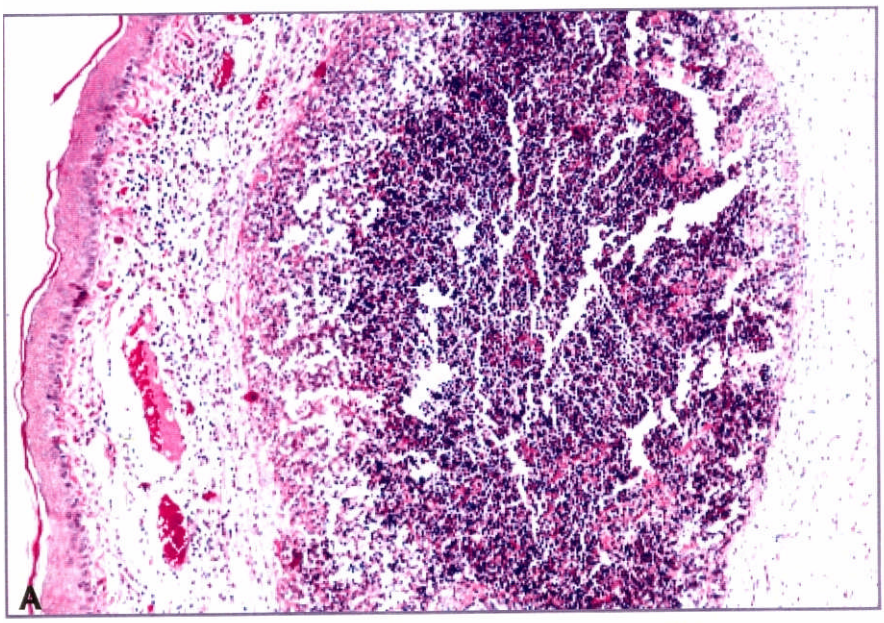


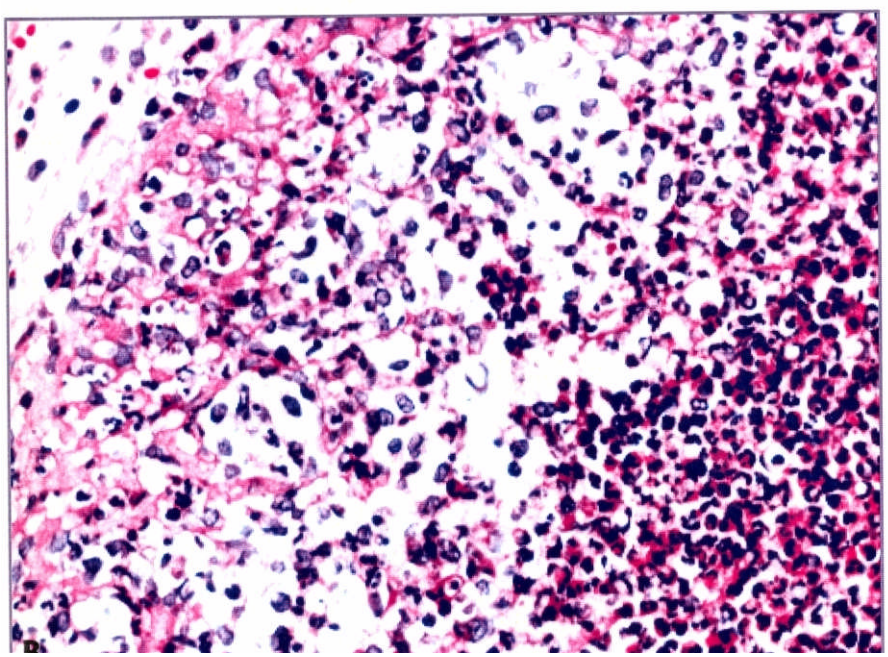
FIGURA 5. G1.- Bolsa Jugal - 28 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico bem delimitado.
(HE - 100 X)

B) Detalhe demonstrando macrófagos com citoplasma amplo e alguns linfócitos
(HE - 200 X)

C) Grande número de bacilos granulosos no interior de macrófagos.
IB: 6+ (Faraco - Fite - 1000 X)





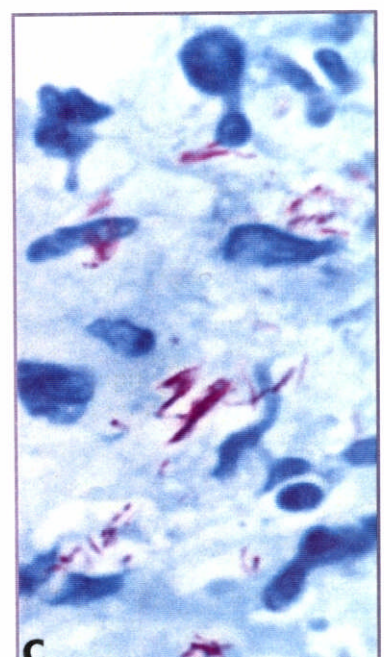
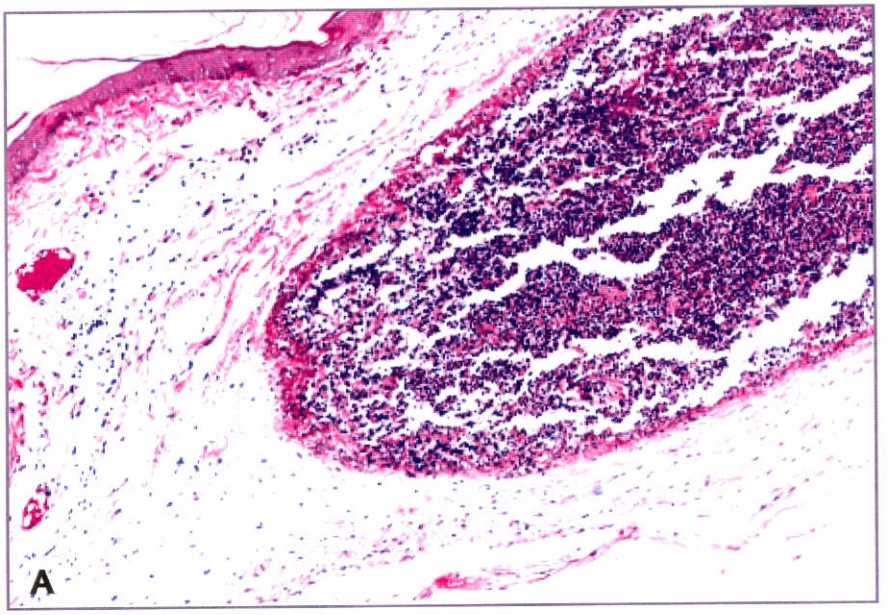


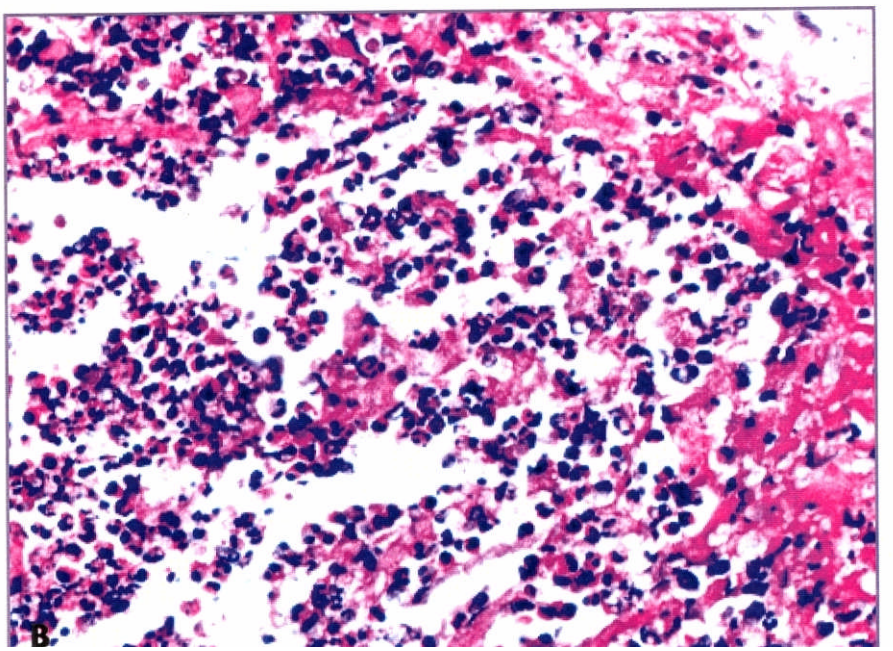
FIGURA 6. G2. - Bolsa Jugal - 20 h - p.i

A) Lesão exsudativa representada por processo supurativo central, circundado por macrófagos em meio a edema com moderada congestão.
(HE - 40 X)

B) Detalhe da lesão demonstrando área central predominantemente neutrofílica, circundado por macógrafos (HE - 200 X)

C) Bacilos granulosos.
IB = 3+ (Faraco - Fite - 1000 X).





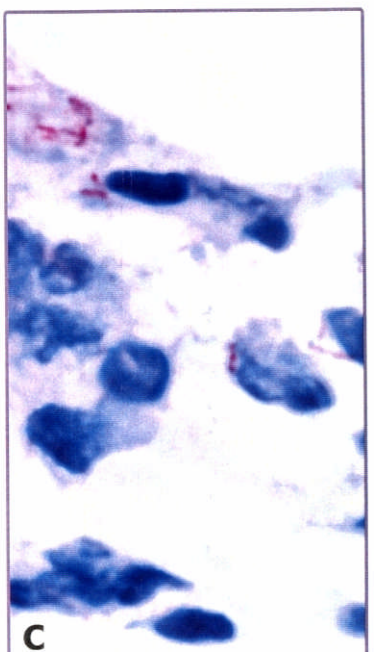
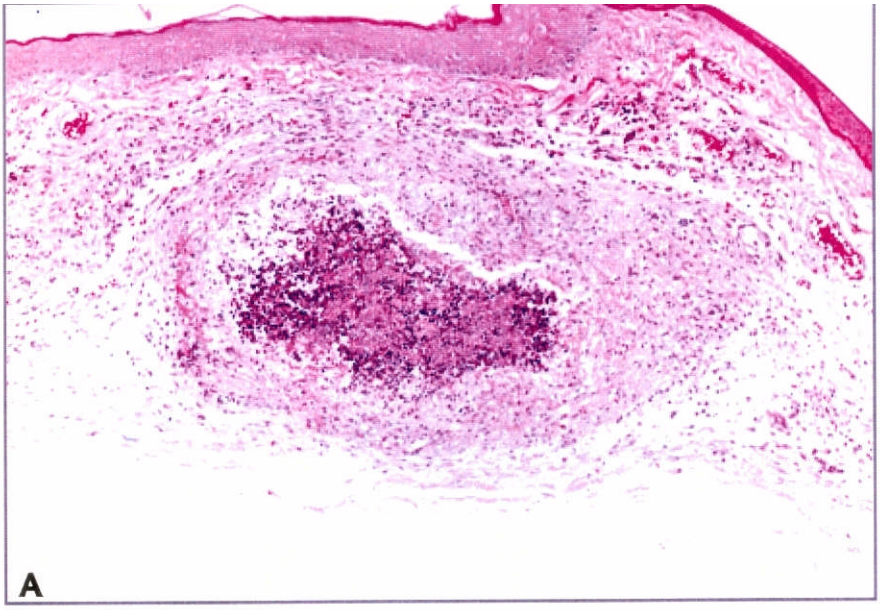


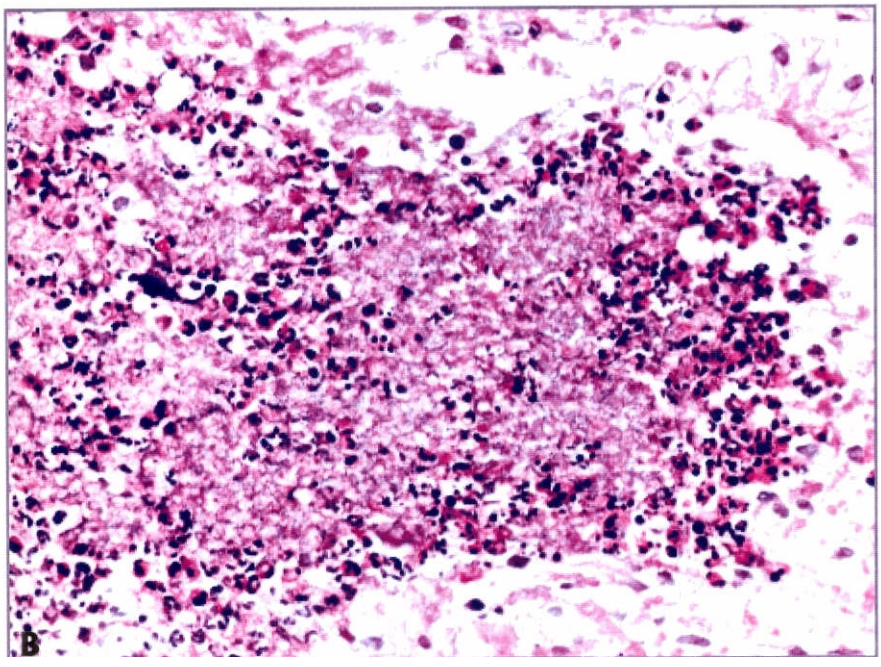
FIGURA 7. G2. - Bolsa Jugal - 48 h - pi

A) Lesão exsudativa com área central predominantemente neutrofílica em meio a edema, congestão e exsudação de células no tecido circunjacente.
(HE - 40 X).

B) Detalhe da lesão demonstrando neutrófilos fragmentados na parte central, circundado por alguns macrófagos.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 4+ (Faraco - Fite - 1000 X).





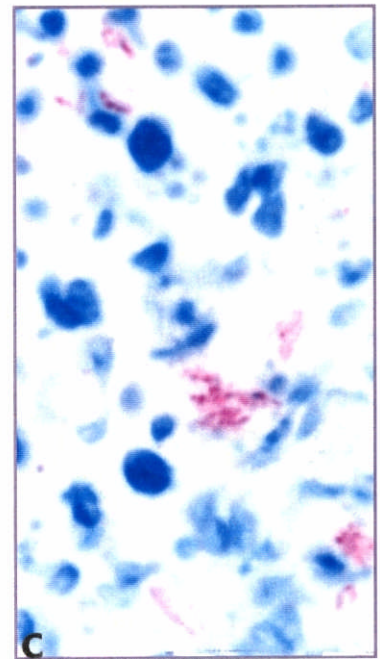
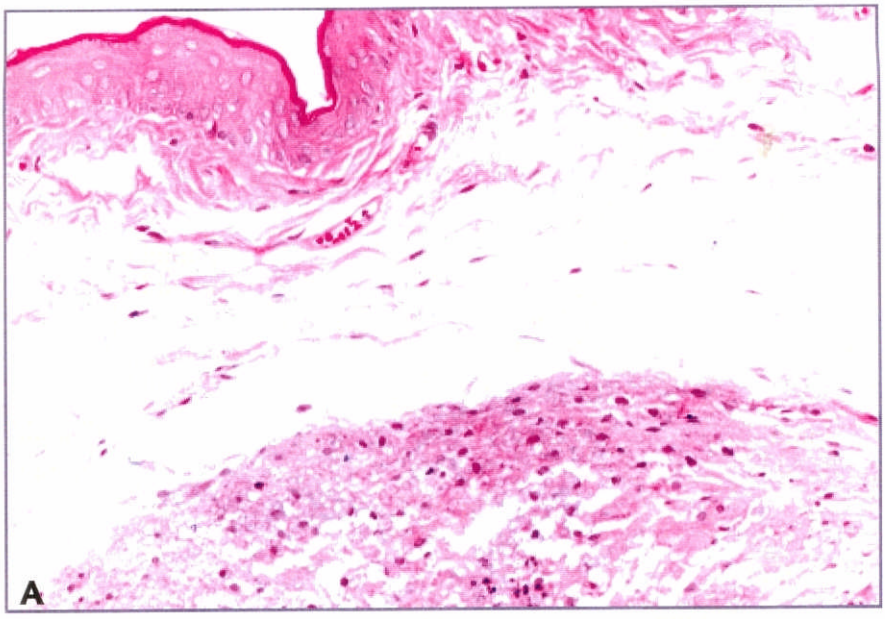


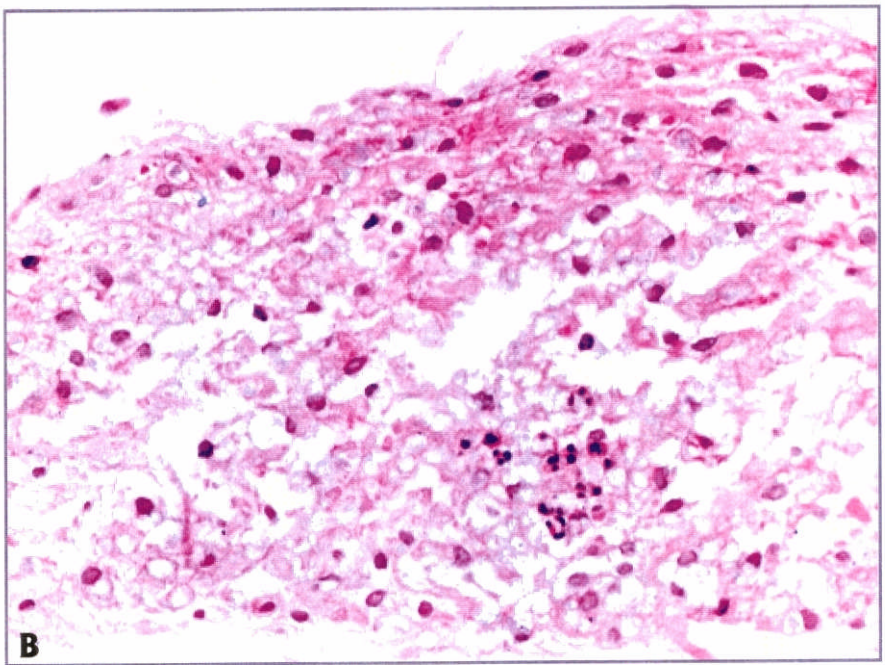
FIGURA £3 G2 - Bolsa Jugal - 7 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico com área central supurativa.
(HE - 40 X).

B) Detalhe da lesão mostrando área central supurativa.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 5+ (Faraco - Fite - 1000 X).





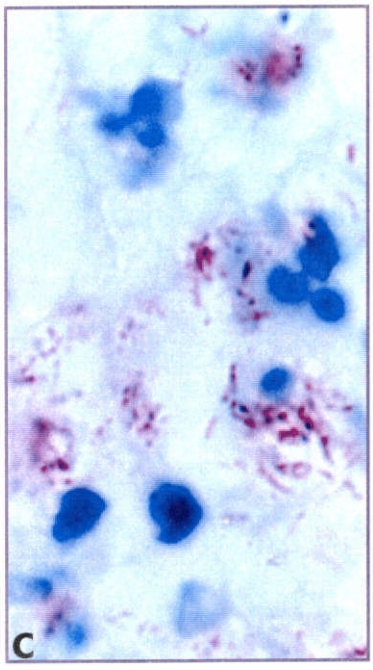
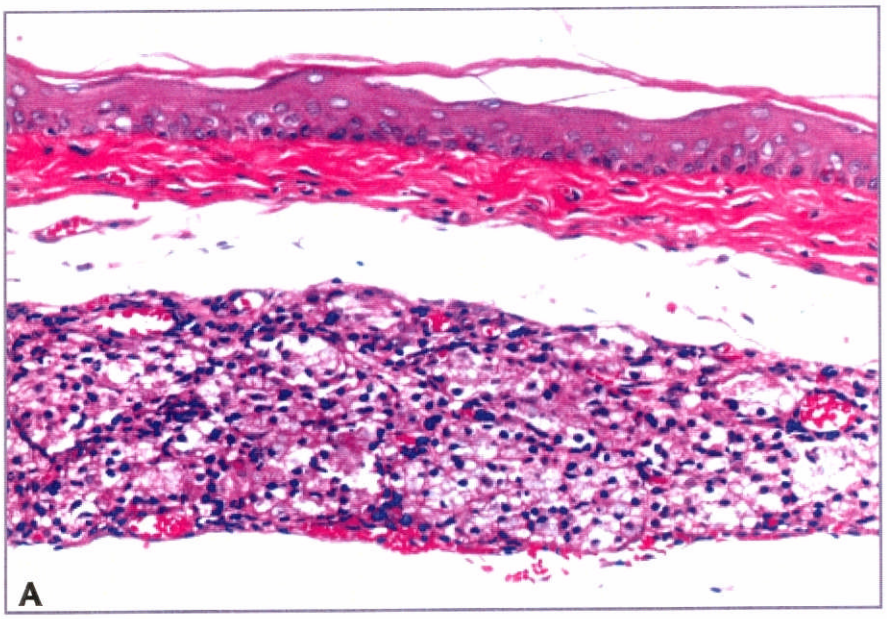


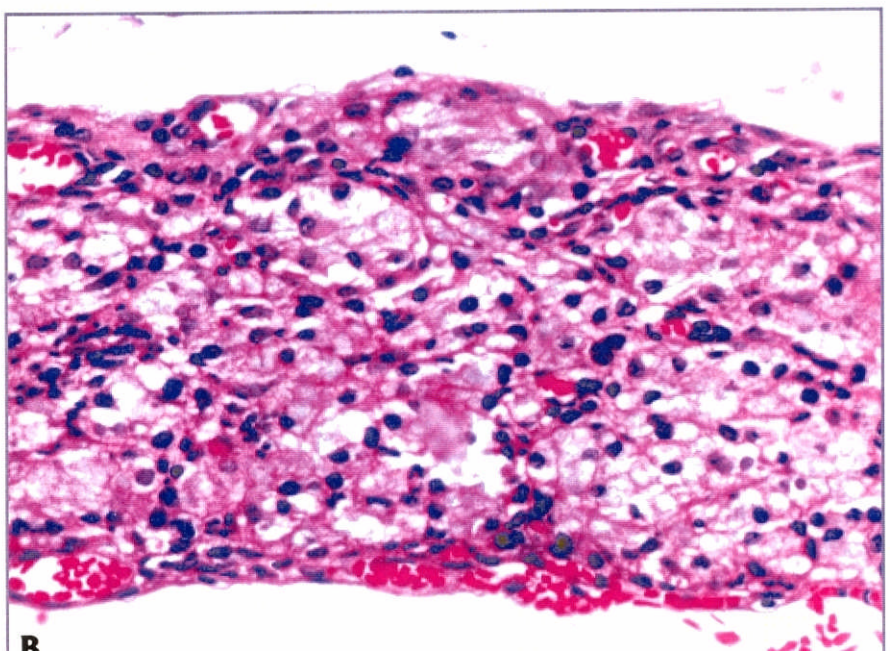
FIGURA 9. G2. - Bolsa Jugal - 14 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico com raros neutrófilos.
(HE - 100 X).

B) Detalhe da lesão demonstrando macrófagos multivacuolados com citoplasma abundante e raros neutrófilos fragmentados no centro.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 5+ (Faraco - Fite - 1000 X).





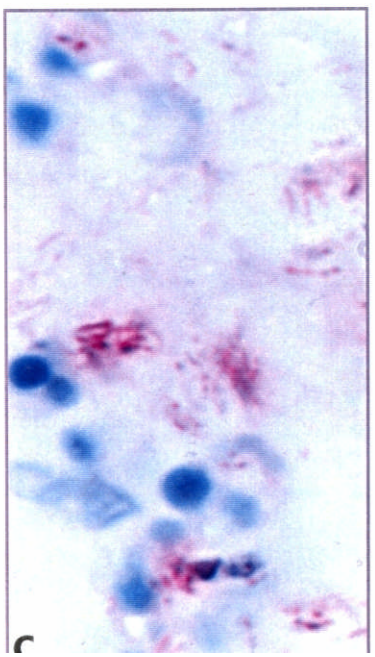


FIGURA 10. G2. - Bolsa Jugal - 21 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico bem delimitado desprovido de neutrófilos.
(HE - 100 X).

B) Detalhe demonstrando congestão e macrófagos com citoplasma abundante.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 5+ (Faraco - Fite - 1000 X).

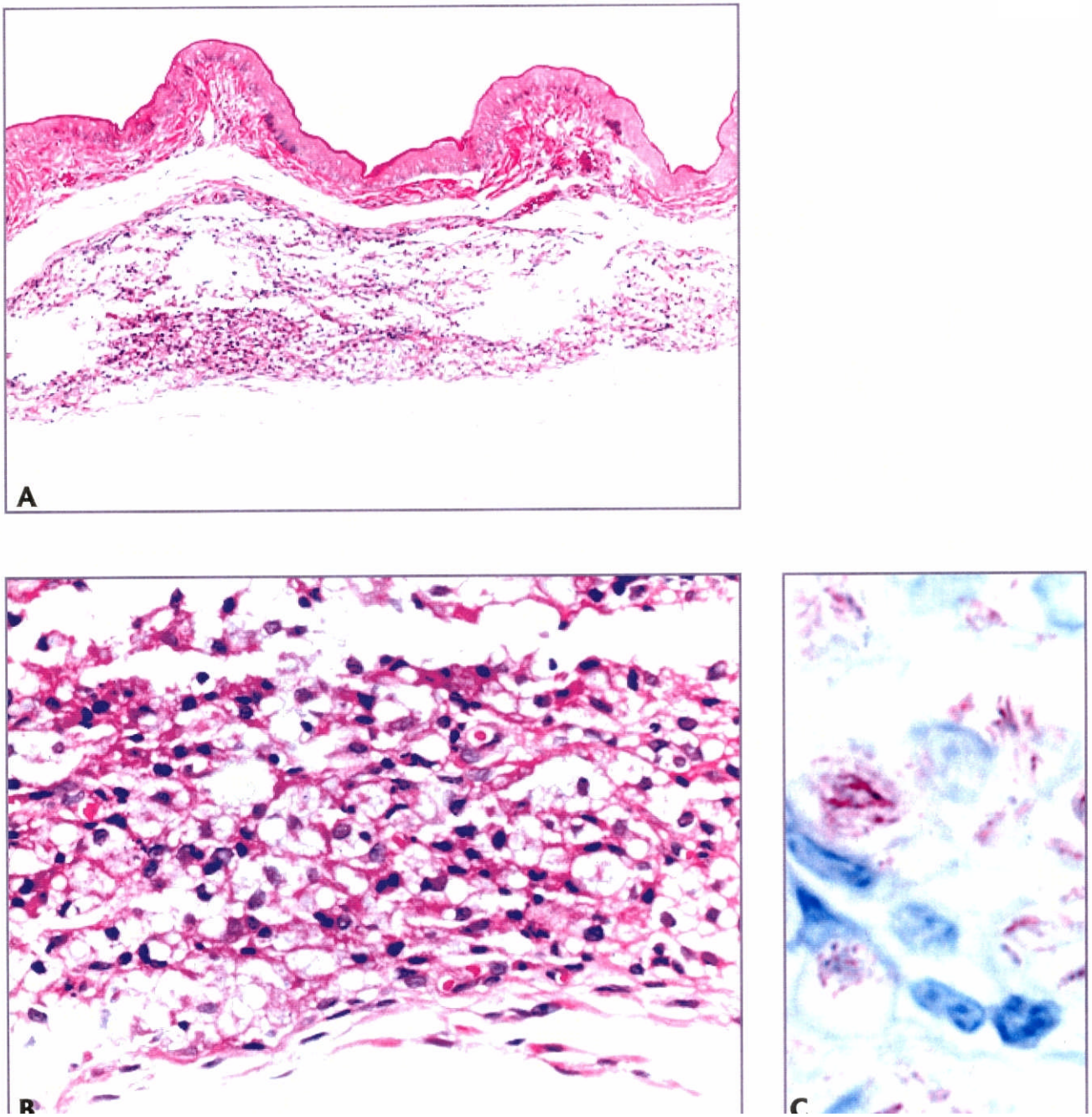


FIGURA 11. G2 - Bolsa Jugal - 28 dias - p.i

A) Granuloma macrofágico.
(HE - 40 X).

B) Detalhe mostrando macrófagos multivacuolados.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB = 6+ (Faraco - Fite - 1000 X).

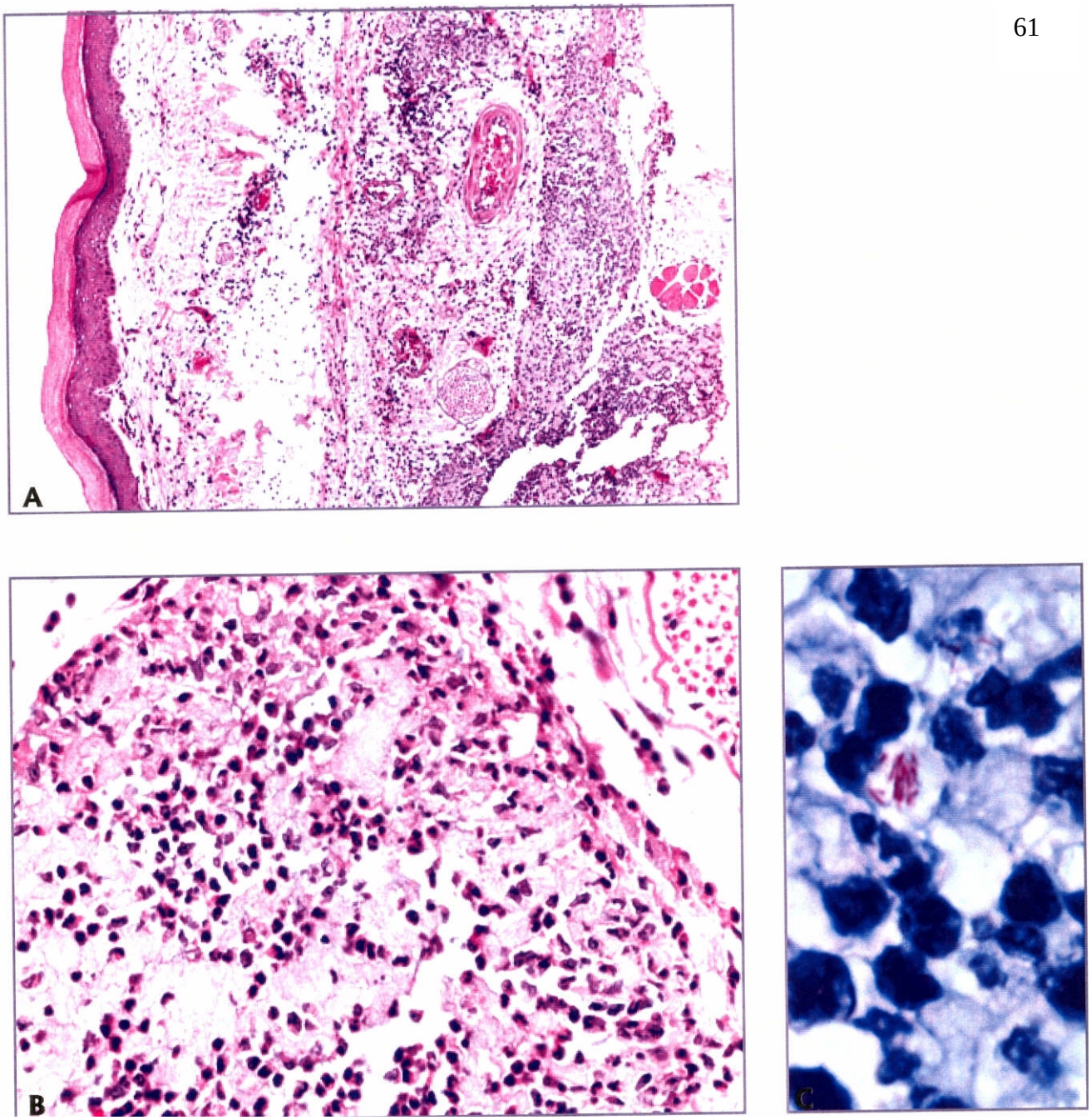
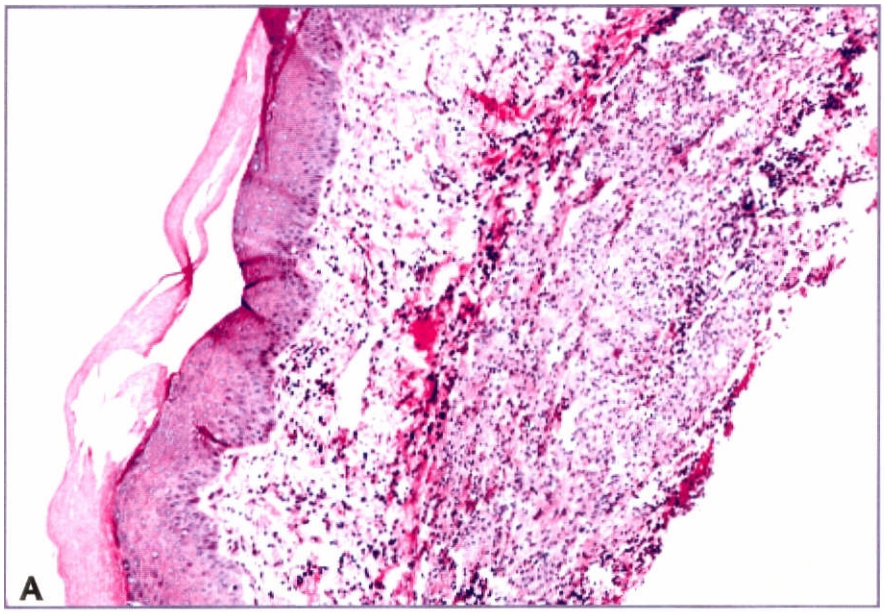


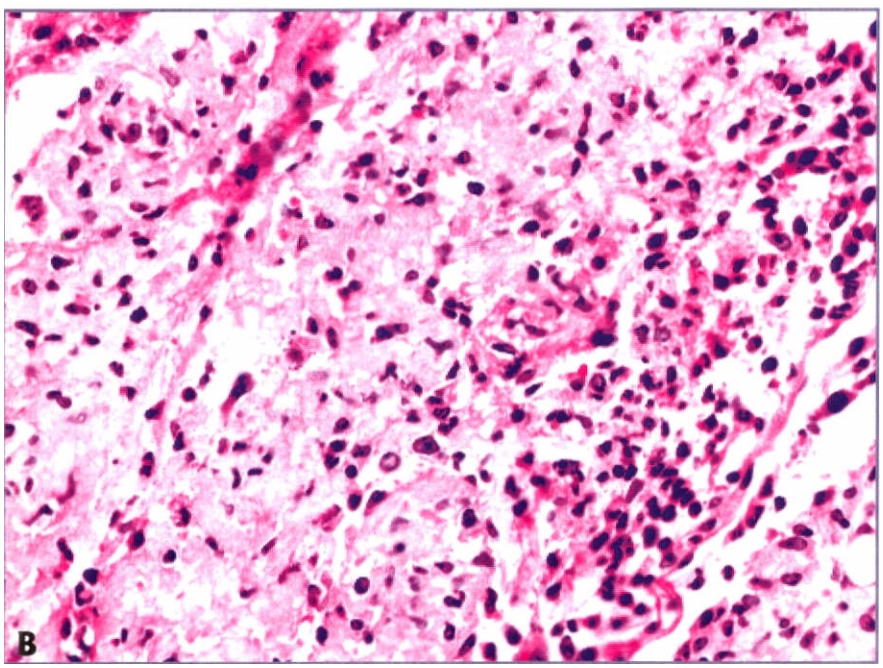
FIGURA 12. G3- Coxim Plantar - 20 h - p.i

A) Lesão exsudativa com edema e congestão circundando aglomerados de fibrina e neutrófilos. (HE - 40 X).

B) Detalhe demonstrando um aglomerado exsudativo de neutrófilos. (HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos e alguns íntegros.
IB: 3+ (Faraco - Fite - 1000 X).





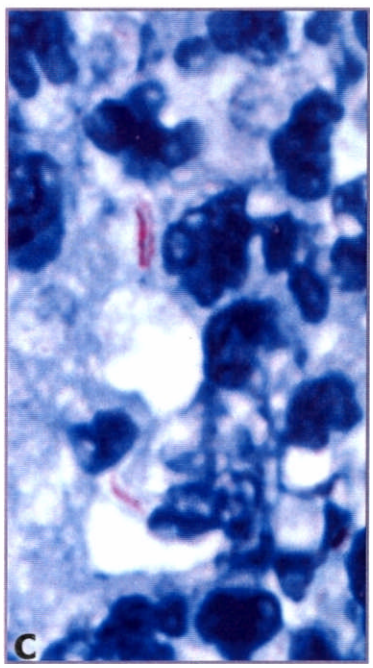


FIGURA 13. G3 - Coxim Plantar - 48 h - p.i

A) Acúmulo de macrófagos e redução acentuada de neutrófilos em meio a congestão e edema. (HE - 100 X).

B) Detalhe demonstrando o centro da lesão com macrófagos e neutrófilos fragmentados. (HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos e alguns íntegros.
IB: 3+ (Faraco - Fite - 1000 X).

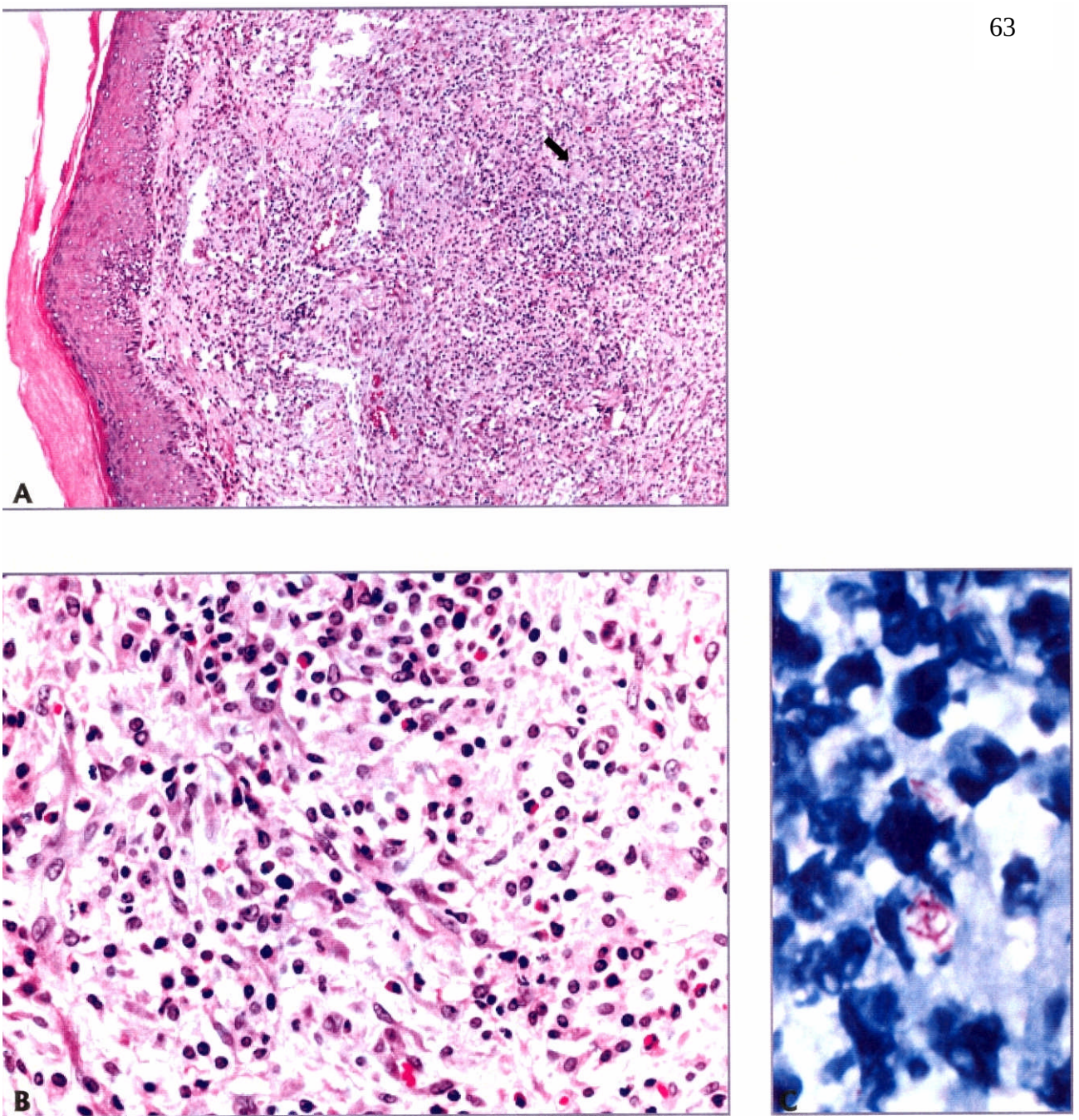
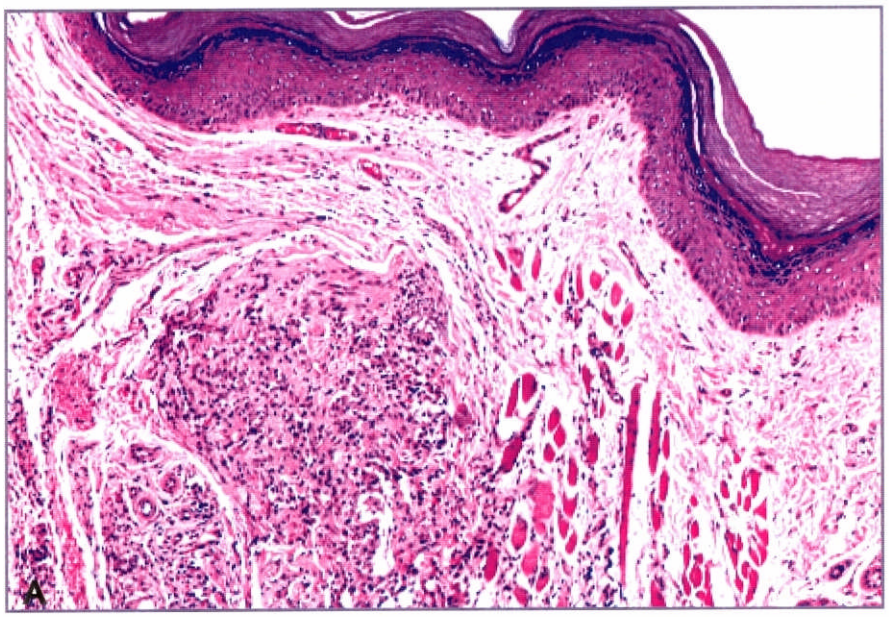


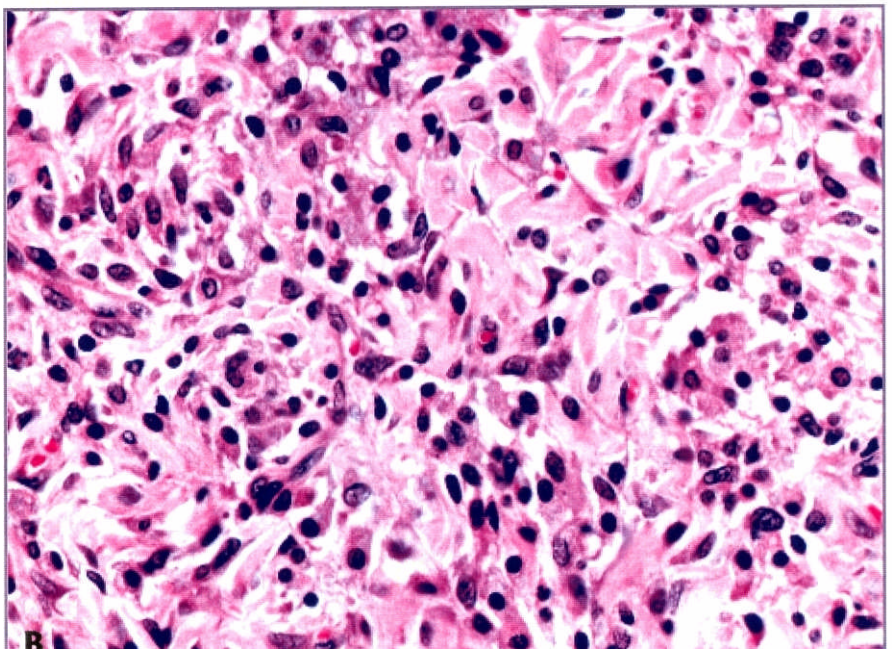
FIGURA 14. G3 - Coxim Plantar - 7 dias - p,i

A) Granuloma epitelióide com uma célula gigante multinucleada (seta), permeado por neutrófilos, linfócitos e eosinófilos.
(HE - 100 X).

B) Detalhe.
(HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 4+ (Faraco - Fite - 1000 X).





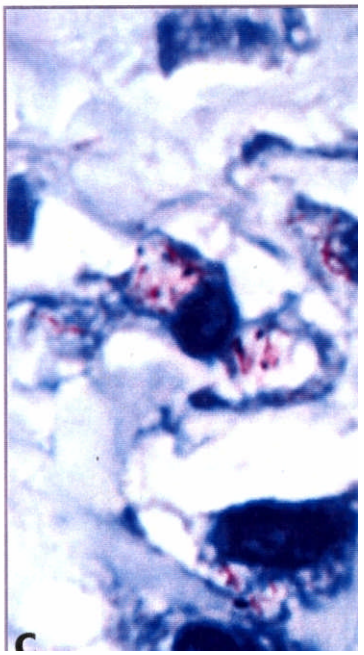
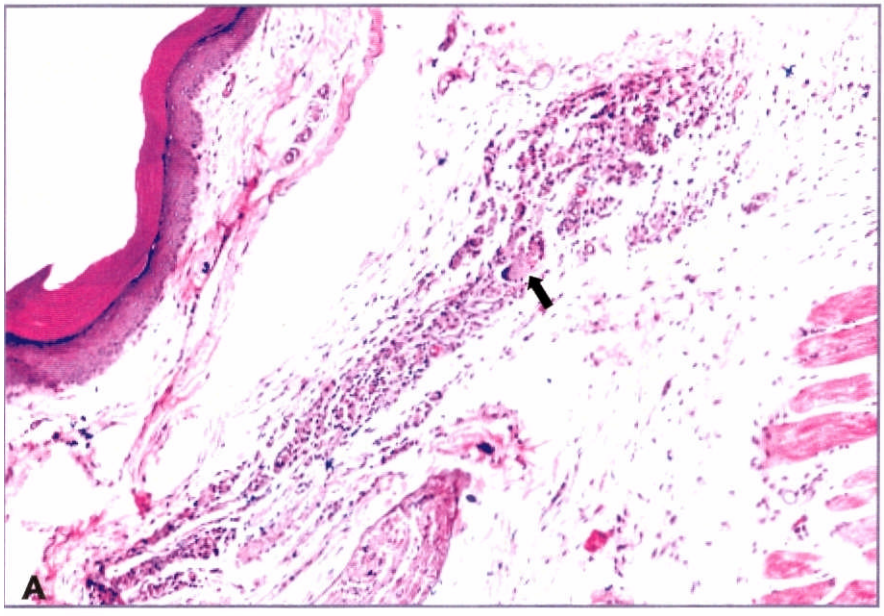


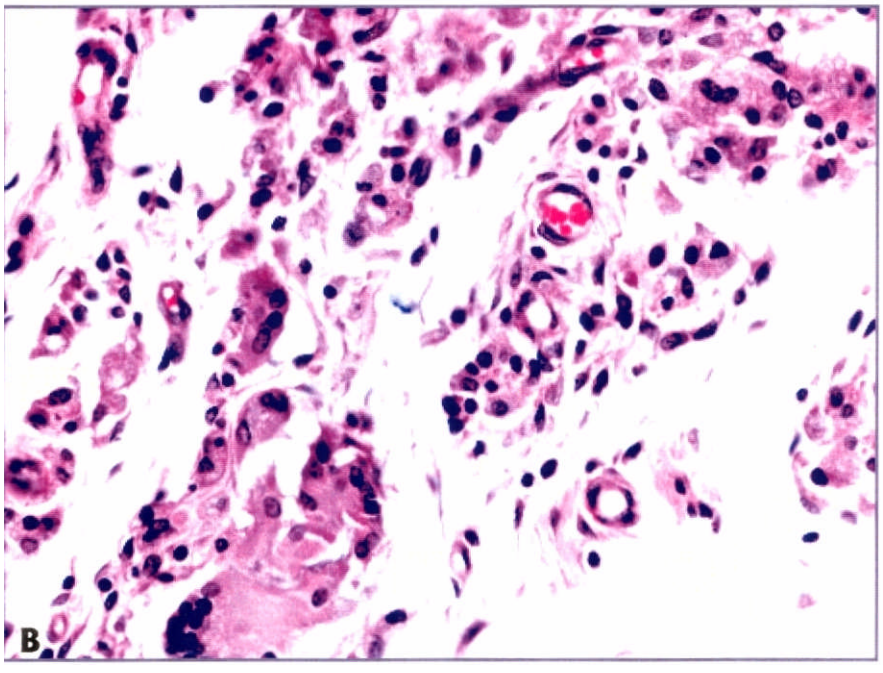
FIGURA 15. G3 - Coxim Plantar - 14 dias - p.i

A) Granuloma epitelióide delimitado, contendo linfócitos e células gigantes.
(HE - 100 X).

B) Detalhe demonstrando as células epitelióides e linfócitos.
(HE 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 4+ (Faraco - Fite - 1000 X).





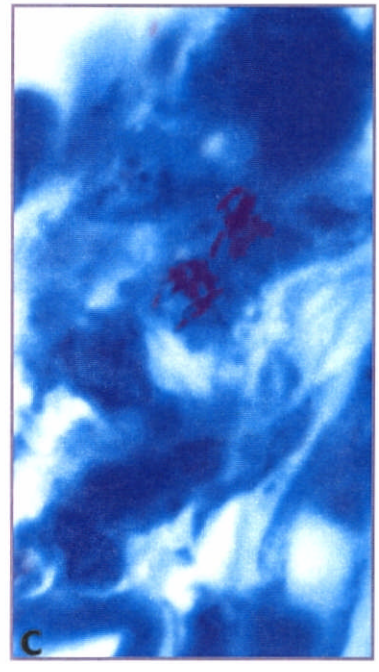
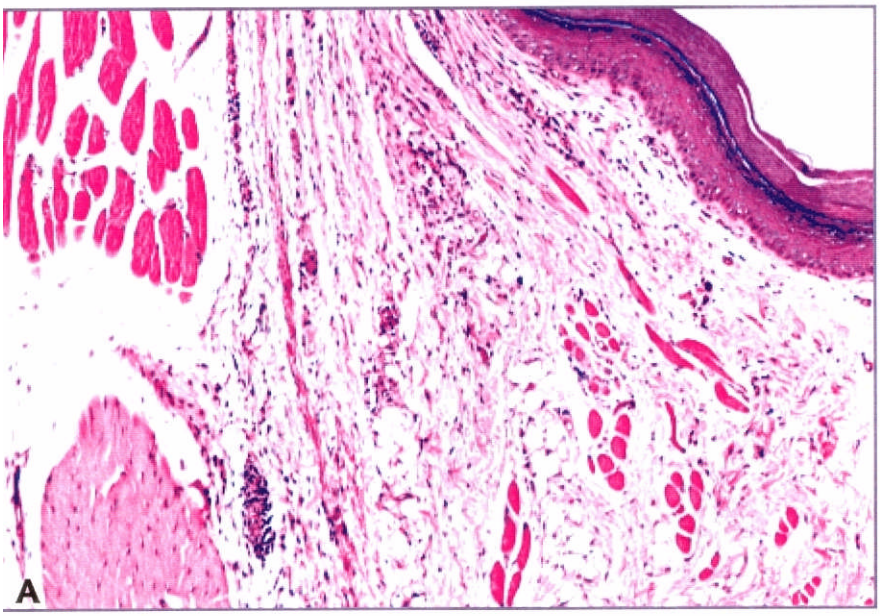


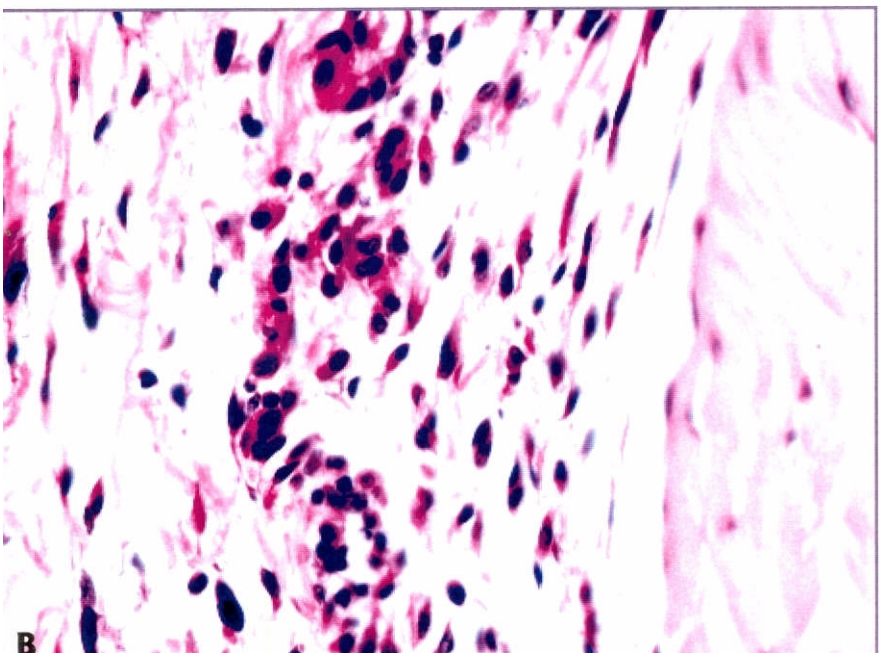
FIGURA 16. G3 - Coxim Plantar - 21 dias - p.i

A) Granuloma epitelióide pequeno com células gigantes multinucleadas (seta) e linfócitos, (HE - 40 X).

B) Detalhe da lesão demonstrando a célula gigante. (HE - 200 X).

C) Bacilos granulosos.
IB: 2+ (Faraco - Fite - 1000 X).





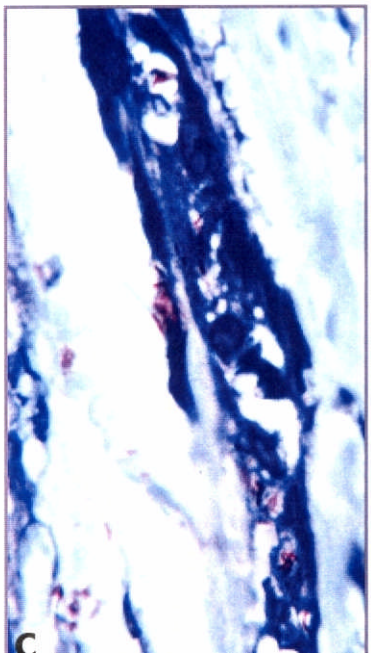


FIGURA 17. G3 - Coxim Plantar - 28 dias - p.i

A) Pequeno granuloma epitelióide, frouxo, com linfócitos e células gigantes multinucleadas.
(HE - 100 X).

B) Detalhe.
(HE -, 200 X),

C) Bacilos granulosos.
IB: 2+ (Faraco - Fite - 1000 X).

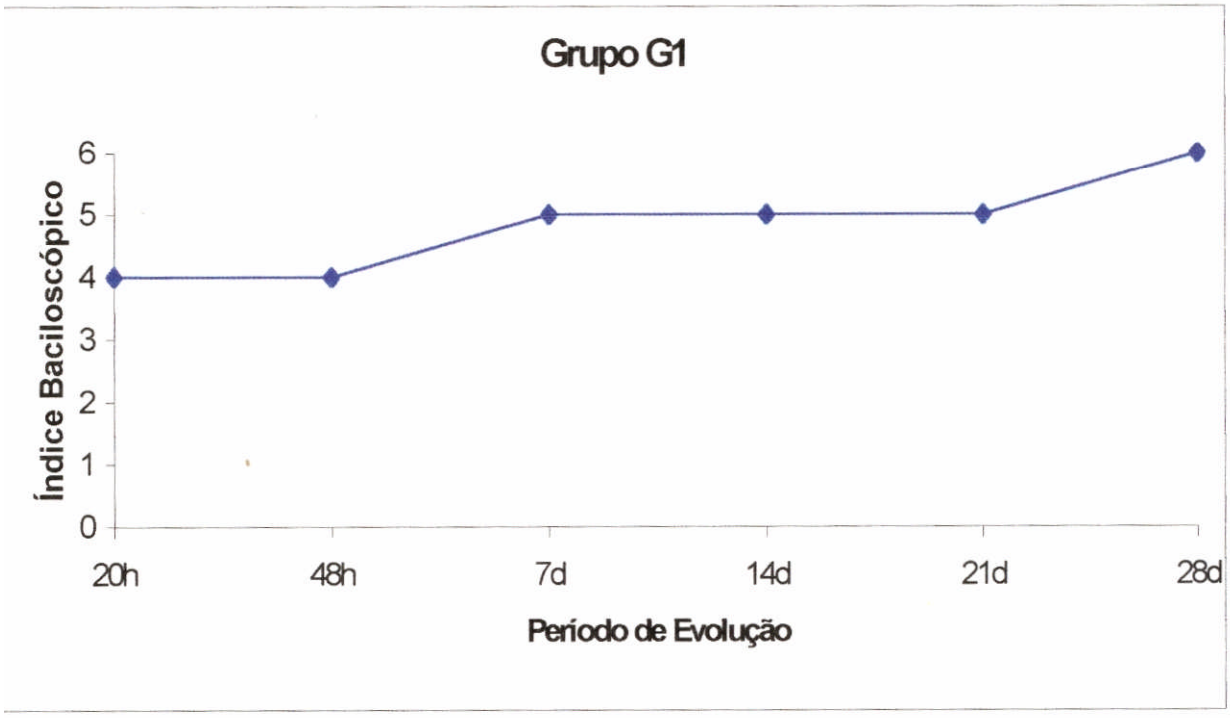


Figura 18. Correlação entre IB e tempo de evolução da inoculação do *M. leprae* na bolsa jugal do hamster - grupo G1.

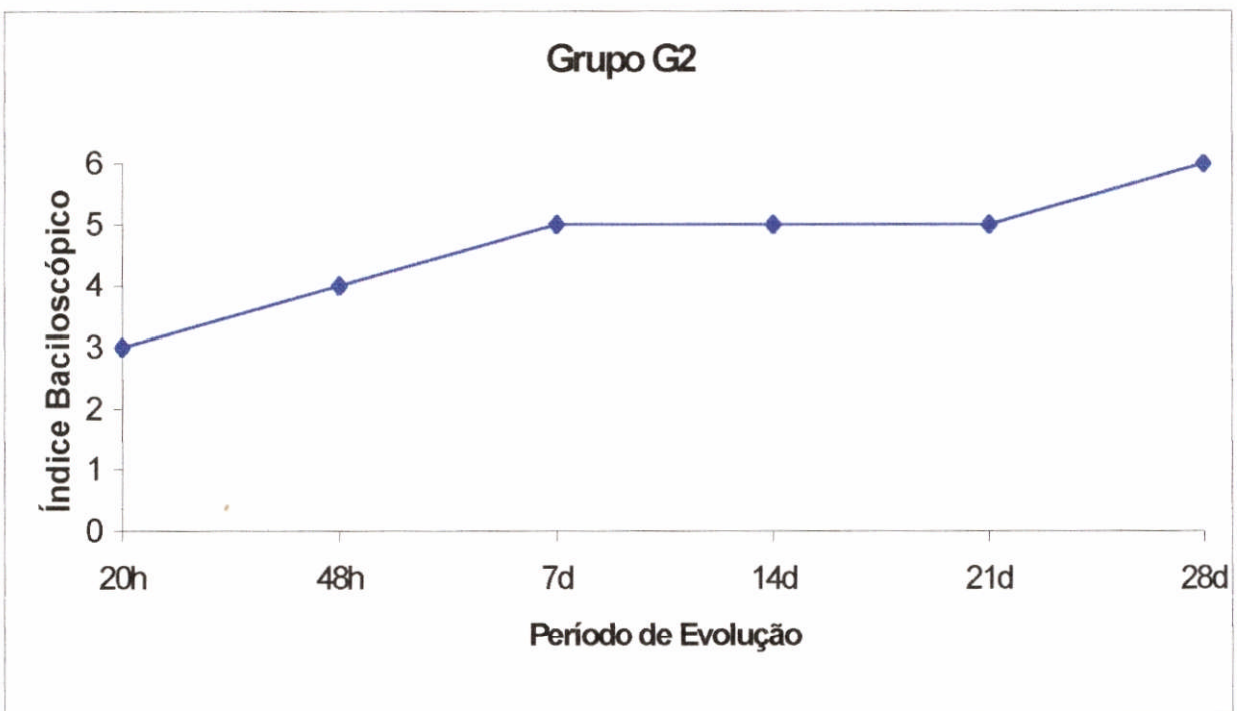


Figura 19. Correlação entre IB e tempo de evolução da inoculação do *M. leprae* na bolsa jugal do hamster - grupo G2.

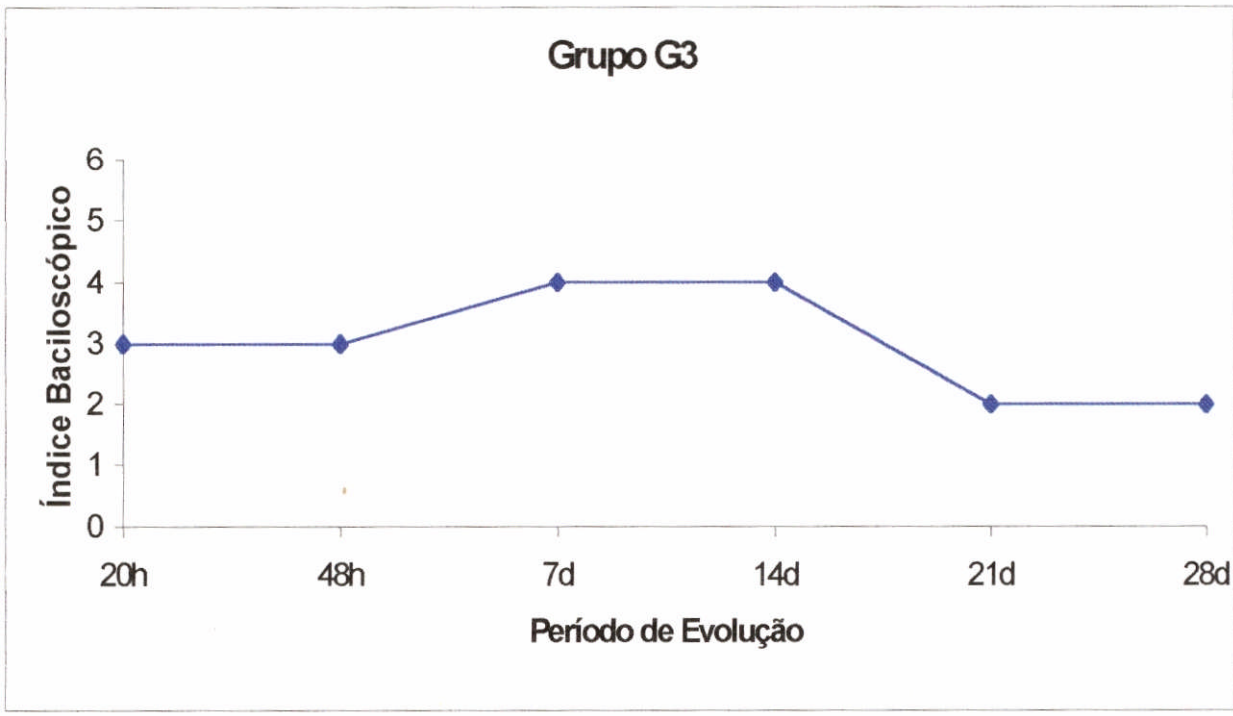


Figura 20. Correlação entre IB e tempo de evolução da inoculação do *M. leprae* no coxim plantar do hamster - grupo G3.

5. Discussão

5 - DISCUSSÃO

Os estudos da hanseníase em animais de experimentação até a década de 19601 foram sempre insatisfatórios porque em muitos experimentos utilizando o mesmo animal e a mesma técnica, os resultados eram variáveis de autor para autor. 0 desconhecimento das características biológicas do *M. leprae* tal como, crescimento lento, associado ás variantes experimentais, como dose do inóculo e contaminação do material por outras micobactérias, têm sido apontados como responsáveis por essa grande variação dos resultados.

As observações clínicas de Binford (1956) de que pacientes com HV apresentavam lesões preferencialmente localizadas em áreas mais frias do organismo como extremidades, nariz, orelhas e supercílios, deram o primeiro passo para o grande avanço no conhecimento da hanseníase na década de 1960.

Foi baseado nessa observação que Shepard (1960) inoculou uma baixa dose de *M. leprae* (10^4) no coxim plantar de camundongos e obteve multiplicação bacilar entre seis e oito meses p.i, não ultrapassando 106 bacilos/ml. Esse modelo é atualmente utilizado em

camundongos das linhagens BALB/c, CFW e DBA, para estudos sobre ação de drogas terapêuticas.

Baseado na hipótese de Binford (1956) e no modelo experimental de Shepard (1960), Rees (1966) inoculou *M. leprae* na pata e orelhas de camundongos timectomizados e irradiados e obteve disseminação para tegumento, vísceras e nervos, demonstrando a importância do sistema imune celular na hanseníase. A partir desse trabalho pioneiro, os pesquisadores passaram a manipular drasticamente o sistema imune de camundongos (Fieldsteel & Mac Intosh, 1971; Binford et al., 1972) e ratos (Fieldsteel et al.,1981) para conseguir uma disseminação efetiva do *M. leprae.* Atualmente, estio sendo utilizados camundongos congenitamente atímicos (Colston & Hilson, 1976; Chehl et al.,1985) e os camundongos SCID, que apresentam uma severa deficiência de LT e LB (Yogi et al., 1991).

A grande contribuição dos modelos experimentais em animais imunodeprimidos, foi proporcionar a recuperação de número suficiente de bacilos para pesquisas nas áreas da microbiologia e biologia molecular. Além disso, os dados obtidos reforçaram o papel da resposta imune celular do hospedeiro na modulação da infecção e da doença. Em camundongos normais a inoculação do *M. leprae* resulta na formação de

granulomas frouxos, com macrófagos, linfócitos e algumas células epitelióides assumindo o padrão da HD humana, enquanto nos imunodeficientes (timectomizados, irradiados, *nude,* SCID) as lesões assumem o padrão da HV. Porém, o uso de animais imunodeprimidos é limitado pelo seu alto custo decorrente da necessidade de manutenção em ambiente especial, livre de contaminações.

Em 1971, Kirchheimer & Storrs descobriram um novo animal experimental, o tatu, que apresenta temperatura corporal mais baixa do que os demais mamíferos até então utilizados; inoculando *M. leprae* nesses animais obtiveram disseminação e recuperação de grande número de bacilos. Entretanto, esse animal silvestre se adapta mal ao cativeiro o que dificulta a sua utilização em maior escala (Storrs & Greer, 1973; Arruda & Opromolla, 1981). Em nosso meio a baixa porcentagem *de* animais que desenvolvem a doença também tem limitado o seu uso em hanseníase experimental (Opromolla et al., 1980).

A inoculação do *M. leprae* em macacos de várias espécies tem demonstrado que esses animais apresentam espectro clínico semelhante ao da hanseníase humana. Apresentam inclusive, neuropatias e episódios reacionais de eritema nodoso hansênico (Wolf et al., 1985; Baskin et al. ,1987; Walsh et al., 1990; Gormus et al., 1995). Esses

animais têm sido utilizados principalmente, em estudos sobre a patogênese e o dano neurológico causado pela doença. Além disso, como são animais filogeneticamente próximos do homem e apresentam uma vida média de 20 anos, são modelos apropriados para as pesquisas de vacinas e estudos epidemiológicos. Porém, como existe o risco de extinção e o custo é elevado, esses animais estão sendo cada vez menos utilizados em hanseníase experimental.

Assim, ainda se procura um modelo experimental alternativo, de fácil reprodução e de custo baixo, para se obter lesões e multiplicação bacilar. Inoculação em um local anatômico imunologicamente privilegiado, de um animal susceptível, sem necessidade de manipulação do seu sistema imune é um modelo que tem sido muito útil para experimentação em neoplasias e algumas doenças infecciosas. Um desses locais é a bolsa jugal do hamster que vem sendo utilizada em estudos que avaliam a participação da resposta imune no desenvolvimento e evolução de infecções causadas por bactérias e fungos (Sampaio & Dias, 1970; Sinhorini et al., 1994; Roxo et al, 1994; Arruda et al., 1994; Arruda et al., 1995a). Entretanto, são muito escassos os dados de literatura sobre a inoculação do *M. leprae* nessa bolsa jugal. Convit et al., (1962) mencionaram inoculação semelhante, mas não relataram os seus resultados. Arruda et al., (1995a), foram os primeiros a utilizar a

bolsa jugal em hanseníase experimental com resultados positivos, onde sugeriram a possibilidade de multiplicação bacilar.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de ampliar e detalhar os estudos iniciados por Arruda et al. (1995a). Foram utilizados inóculos de três fontes diferentes: dois de pacientes com HV, não tratados que deram origem aos inóculos NT_1 e NT_2; o terceiro foi de paciente com HV, na vigência de tratamento por cerca de um mês, que deu origem ao inóculo T. Bolsas jugais dos animais dos grupos G1 e G2 foram inoculadas respectivamente com inóculos NT_1 e T com o objetivo de comparar resultados.

Os inóculos foram sempre utilizados brutos o que incluiu M. leprae e tecido inflamatório homogeneizado do paciente doador; esse procedimento baseou-se nos grupos pilotos que demonstraram que bacilos purificados não produziam lesões. Com 20 horas de evolução ambos os grupos apresentaram uma inflamação aguda exsudativa representada por edema, congestão, deposição de flbrina e neutrófilos, sendo as lesões do grupo G2 mais intensas que as do G1.

Em outras doenças infecciosas granulomatosas observadas em material humano ou em animais experimentais, a primeira

resposta inflamatória é sempre exsudativa e inespecífica; essa fase tem duração curta podendo ser muito fugaz.

Após a fase inicial aguda, o infiltrado era bem delimitado, composto principalmente por macrófagos com citoplasma abundante, multivacuolado, assemelhando-se as células de Virchow; os neutrófilos e linfócitos eram progressivamente mais escassos até o sétimo dia no grupo G1 e até o 140 dia no grupo G2. A partir desse período até o final do experimento a composição do granuloma foi semelhante nos dois grupos. Era constituído basicamente por células macrofágicas multivacuoladas, com grande número de bacilos granulosos em seu interior.

À semelhança dos resultados descritos em animais imunocomprometidos (Rees,1966; Gaugas et al.,1971; Su et al., 1973; Yogy, 1991), no testículo de hamster (Binford, 1958; Convit et al., 1962), e no tatu (Kirchheimer & Storrs,1971), na bolsa jugal do hamster a resposta ao *M. leprae*, se caracterizou por granulomas macrofágicos, sem transformação em células epitelióides, assemelhando-se ao padrão histológico do pólo da HV humana.

Com relação ao IB, os resultados demonstraram aumento gradativo de bacilos ao longo do experimento com índices de 4+, 5+ e 6+ para o grupo G1 (Fig. 18) e 3+, 4+, 5+ e 6+ para o grupo G2 (Fig. 19), o que revela aumento aproximado de mil vezes o número inicial de bacilos em 28 dias, dado discrepante com a velocidade de multiplicação do M. leprae. No coxim plantar de camundongo, Shepard (1960) verificou aumento de cerca de cem vezes em período de seis a oito meses, usando a técnica de recuperação bacilar. Como o IB é baseado na relação entre o número de bacilos íntegros, fragmentados ou granulosos e a área da lesão, esse aparente aumento poderia corresponder em grande parte, A concentração do microrganismo decorrente de reabsorção do edema intersticial do foco inflamatório, além de processo degenerativo e fragmentação e não da multiplicação bacilar. A análise histológica pelo Faraco-Fite demonstrou bacilos íntegros até 48 horas para o grupo G1 e ausentes para o G2 desde o início.

A partir desses resultados foi criado o grupo G4 para a avaliação da viabilidade bacilar nas lesões dos grupos G1 e G2 onde houve aumento do IB. Assim, inoculou-se NT_2 em bolsa jugal de hamster e o material colhido desse local foi reinoculado no coxim plantar de camundongos como teste de recuperação bacilar. Os resultados desse teste suportaram a hipótese de concentração local de bacilos, tendo sido

positivo até o 14º dia p.i e depois negativos; possivelmente os bacilos aí inoculados foram parcial e gradativamente removidos pela circulação linfática local.

A formação do granuloma macrofágico, semelhante ao padrão observado na HV humana, provavelmente se relaciona à ausência de drenagem linfática, e conseqüente ausência do ramo aferente da resposta imune, gerando tolerância imune local (Barker & Billingham, 1971). Além desse fato, sabe-se que para o *clearence* de bacilos das lesões a drenagem linfática tem papel importante no homem. Assim, a ausência dessa drenagem não permitiria a mobilização dos bacilos do local de inoculação resultando em acúmulos de *M. leprae*, no interior dos macrófagos; os bacilos em grande quantidade, induziriam alterações citoplasmáticas semelhantes àquelas do polo HV humano.

Considerando as diferenças estruturais entre a bolsa jugal e o coxim plantar quanto à drenagem linfática, constituiu-se o terceiro grupo (G3) que representa o grupo controle inoculado com bacilos do paciente NT1, uma vez que Ags de patógenos inoculados no coxim plantar, atingem o linfonodo poplíteo (Sinhorini et ai, 1994; Roxo et al., 1994) pela sua via linfática aferente. Nesse grupo, os animais sacrificados com

20 horas p.i demonstraram lesões inflamatórias exsudativas semelhantes aos outros dois grupos na bolsa jugal.

A fase exsudativa rápida e progressivamente foi sendo substituída por macrófagos às 48 horas e granulomas epitelióides a partir do sétimo dia. Associaram-se a esse tipo de lesão, algumas células gigantes multinucleadas de tipo Langhans e linfócitos e a partir do 21º dia o processo inflamatório diminuiu progressivamente. O IB que inicialmente foi igual ao do grupo G2 progrediu para 4+ paralelamente 6 redução de congestão e edema das lesões, mas nunca atingiu os níveis dos dois primeiros grupos e a partir do 21º dia houve redução para 2+; esses dados indicam que provavelmente não houve multiplicação bacilar e também não houve clearence total no período estudado (Fig. 20).

No coxim plantar do hamster, embora o granuloma exibisse características epitelióides, assemelhava-se mais ao padrão histológico encontrado no grupo da HD do homem. Nossos resultados estão de acordo com os relatados por Rees et al.,1969 e Shepard et al., 1983.

6. Conclusões

6- CONCLUSÕES

A resposta inflamatória inicial à inoculação de macerado de hansenoma na bolsa jugal do hamster foi sempre exsudativa e inespecífica, mais intensa e de maior duração quando o inóculo era de paciente em tratamento do que de paciente não tratado.

Após a regressão da fase exsudativa, em ambos os tipos de inóculos usados, houve formação de granulomas macrofágicos semelhantes à HV humana que corresponde ao pólo com deficiência de resposta imune celular e reação de Mitsuda negativa.

As lesões do coxim plantar também iniciaram com fase exsudativa de curta duração e evoluíram para granulomas epitelióides semelhantes à forma HD que no homem apresenta as possibilidades evolutivas para uma das duas formas HDV ou HDT.

As lesões das bolsas jugais que receberam inóculos de pacientes tratado ou não tratado demonstraram aumento do IB de cerca de mil vezes em 28 dias, dado incompatível com as características biológicas do *M. leprae,* fato interpretado como decorrente de

concentração local por reabsorção do edema e da congestão e pela ausência de mobilização do bacilo por drenagem linfática.

No coxim plantar houve aumento inicial, seguido de queda do IB sendo a primeira fase interpretada como efeito da concentração como na bolsa jugal, enquanto a segunda fase estaria relacionada com mobilização dos bacilos pela drenagem linfática.

O teste de recuperação dos bacilos em coxim plantar de camundongos foi positivo para os inóculos obtidos de hamsters 7 e 14 dias p.i, tornando-se negativo para inóculos de hamsters de 21 e 28 dias p. i.

A bolsa jugal do hamster se comporta como o pólo anérgico da hanseníase humana permitindo o desenvolvimento de granulomas macrofágicos mas não oferece condições para a manutenção de viabilidade e de multiplicação do *M. leprae,* mesmo com utilização de altas doses do inóculo.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - Referências Bibliográficas*

ADLER, S. Inoculation of human leprosy into Syrian hamster. *Lancet. v.2,* p.714-5, 1937.

ALMEIDA, A.M. *Concentração sérica de citocinas no espectro das formas clínicas da hanseníase.* Ribeirão Preto, 1996. 86p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ARRUDA, M.S.P., COELHO, K.I., MONTENEGRO, M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in Syrian hamster inoculated in the cheek pouch. *Mycopathologia ,* v.128, p.67-73, 1994.

ARRUDA, M.S.P., FLEURY, R.N., NOGUEIRA, M.E.S. Inoculation of *Mycobacterium leprae* into the cheek pouch. *Lepr. Rev.,* v.66, p.181-2, 1995a.

---

*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP.
Normas pare publicações da UNESP. São Paulo: Editora UNESP, 1994.
v.2: Referências bibliográficas.

NATIONAL UBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed medicus. Washington, 1993. 219p.

ARRUDA, M.S.P., MOI, A.L.M., CLARO, S.G., NOGUEIRA, M.E.S. Drenagem linfática no tecido conjuntivo da bolsa jugal do hamster. *Salusvita,* v.14, p109-13, 1995b.

ARRUDA, 0.S., OPROMOLLA, D.V.A. Manutenção de tatus em cativeiro *(Mamalia,Edentata). Bioterios,* v.1, p.57-62, 1981.

BARKER, F., BILLINGHAM, R.E. The lymphatic status of hamster cheek pouch tissue in relation to its properties as a graft sites. *J. Exp. Med,* v.133, p.620 -39, 1971.

BARKER, F., BILLINGHAM, R.E. Immunologicaly privileged sites. *Adv. Immunot,* v.25, p.1-54, 1977.

BASKIN, G.B., BOBBY,J.G., MARTIN,L.N., WOLF, R.H., MURPHEY-CORB, M., WALSH, G.P., BINFORD, C.H., MEYERS, W.M., MALATY, R. Experimental leprosy in rhesus monkey: necropsy findings. *Int. J. Lepr.,* v.55, p. 109-15, 1987.

BASS, H., MOSSMANN, T., STROBER, S. Evidence for mouse TH1 and TH2 like helper LT cell *in vivo.* Selective reduction of TH1 like helper LT cells after total lymphoid irradiation. *J. Exp. Med,* v.170, p.1495-511, 1989.

BERGSTRESSER, P.R., FLETCHER, C.R., STREILEIN, J.W. Surface densities of Largerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J. Invest. Dermatol,* v.74, p.77-80, 1980.

BINFORD, C.H. Comprehensive program for the inoculation of human leprosy in laboratory animals. *Public Health Rep., v* 71, p.995-6, 1956.

BINFORD, C.H. Histiocytic granulomatous mycobacterial lesions produced in the golden hamster *(C. auratus)* inoculated with human leprosy. *Int. J. Lepr.,* v.26, p.318-24, 1958.

BINFORD, C.H., WALSH, G.P., THEOCHUNG, T.L. Transmission of *Mycobacterium leprae* in immunosuppressed mice. Use of bone marrow shielding in preventing death from irradiation. *Int. J. Lepr.,* v.40, p.99-100, 1972.

BLOM, K. Armauer Hanse n and human leprosy transmission. Medical ethics and legal rights. *Int. J. Lepr,,* v.41, p.199-207, 1973.

BONOMO, L., BABIERI, G., DAMMACO, F. Autoimmune reactions and macroglobulins in leprosy. *Dermatol. Int.,* v.6, p.214-5, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Guia de Controle da Hanseníase.* Brasilia: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1994.

BRENNAN, P. J, BARROW, W. W. Evidences for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae. Int. J. Lepr,,* v.48, p.382-7, 1980.

BULLOCK, W.E.J.R., FASAL, P. Studies of immune mechanism in leprosy. The role of cellular and humoral factors in impairment of the *in vitro* immune response. J. *Immunol,* v.106, p.888-99, 1971.

CHEHL, S., JOB, C.K., HASTINGS, R.C. Transmission of leprosy in nude mice. *Am. J. Trop. Med.Hyg.,* v.34, p.1161, 1985.

COLSTON, M.J., NILSON, G.R.F. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature,* v.262, p.399-401, 1976.

CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 6, Madrid, 1953. *Memória...* Madrid: Associacion International de la Lepra,1953. 1344p.

CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., IMAEDA, T. Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. I. Clinical, bacteriologic, and histopathologic study. *Int. 1, Lep,* v.30, p.239-53, 1962.

COSTA, H.C., OPROMOLLA, D.V.A., VIRMOND, M., BEIGUELMAN, B. Influence of the rapid acetylator phenotype on the emergence of DDS resistant *Mycobacterium leprae. Braz. J. Genet.,* v.16, p.1029-34, 1993.

COURET; M. The behavior of *Bacillus leprae* in cold blooded animals. *J. Exp. Med.,* v.8, p.576-88, 1911.

DAVID, H., BRUM, L., PRIETO, E. *Manual de micobacteriologia em saúde pública:* Princípios e Métodos. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994. p.50-6.

DHARMENDRA, R., LOWE, J. Attempts at transmission of human leprosy to Syrian hamsters. *Indian J. Med. Res.,* v.28, p.61-9, 1940.

DRAPER, P., MISSELL, D. Determination of the mass of the *Mycobacterium leprae* by electron microscopy. *J, Gen. Microbiol, v.* 101, p.207-9, 1977.

FARACO, J. Bacillos de Hansen e cortes de parafina; methodo complementar para pesquisa de bacillos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. *Rev. Bras. Leprol,* v.6, p.177-80, 1938.

FIELDSTEEL, A.H., MC INTOSH, A.M. Effect of neonatal thymectomy and antithymocytic serum on susceptibility of rats to *Mycobacterium leprae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v.* 138, p. 8-13, 1971.

FIELDSTEEL, A.H., SATO, N., COLSTON, M.J. Relationship between T-cell population in neonatally thymectomized Lewis rats and susceptibility to infection with *Mycobacterium leprae. Int. J. Lepr., v.* 49, p.317-23, 1981.

FITE, G.L. Staining of acid-fast bacilli in paraffin sections. *Am. J. Pathol,* v. 14, p.491-507, 1938.

GAUGAS, J.M., REES, R.J.W., WEDDELL, A.G.M. Reversal effect of thymus grafts on lepromatous leprosy in thymectomised- irradiated mice. *Int. J. Lepr.,* v.39, p. 388-95, 1971.

GORMUS, B.J., XU, K., BASKIN, G.B., MARTIN, L.N., BOHM, R.P., BLANCHARD, J.L., MACK, P.A, RATTERREE, M.S., McCLURE, H.M., MEYERS, W.M., WALSH, G.P. Experimental leprosy in monkeys. I.

sooty mangabey monkey: transmission, susceptibility, clinical and pathological findings. *Lepr. Rev.,* v.66, p.96-104, 1995.

GUNDERS, A.E. Progressive experimental infection with *Mycobacterium leprae* in a chimpanzee. *J. Trop. Med. Hyg., v.* 611 p. 228-30, 1958.

HANDLER, A.H., SHEPRO, D. Cheek pouch technology: Uses and applications. In: HOFFMAN, R.A, ROBINSON, F.P, MAGALHÃES, H. *The golden hamsters. its biology and uses in medical research.* Iowa City: Iowa State University Press, 1968. p.104-201.

HANSEN, G.H.A. Üdersogelser angaend spedalskhendens arsager. *Norsk. Laegevil,* v.4, p.1-88, 1873.

HARDY, M.H., VRABLIC, 0.E., COVANT, H.A., KANDARKAR, S.V. The development of the Syrian hamster cheek pouch. *Mat. Rec.,* v.214, p.273-82,1986

HASTINGS, R.C. *Leprosy.* Zed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 470p.

HUNTER, S.W., GAYLORD, H., BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the phosphorylated antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.,* v.261, p. 1234-51, 1986.

JEANSELME, E. *La Lépre.* Paris: G.Doin & C^{ie}, 1934, p.142.

JOB, C.K. Pathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy.* Zed. Edinburgh: Churchill Uvingstone, 1994. p. 193-224.

JOHNSTONE, P.A. The search for animal models of leprosy. *Int. J. Lepr.,* v.55, p.536-47, 1987.

KAPLAN, G., GHANDI, R.R., WEINSTEIN, D.E., LEVIS, W.R., PATARROYO, M.E., BRENNAN, P.J., COHN, Z.A. *Mycobacterium leprae* antigen-induced cell suppression of the cell proliferation in vitro. *J. Immund, v.* 138, p.3028-34, 1987.

KIRCHHEIMER, W.F., STOFRRS, E.E. Attemps to stablish the armadillo *(Dasypus novemcinctus)* as a model for the study of leprosy. I. report of lepromatous leprosy in experimentally infect armadillo. *Int. J. Lepr., v.* 39, p.693-702, 1971.

KRAHENBUHL, J.L. Role of mycobacterial constituents in regulation of macrophage effector function. In: ROTH, J. L.. BOLIN, C.A, BROGDEN, K.A 2. ed. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens.* Washington (D.C): A.S.M. Press. 1995. p.97-114.

LEIKER, DL., MC DOUGALL, A.C. *Guia Técnico. Baciloscopia da Hanseníase.* 2.ed. Wurzburg: German Leprosy Relief Association, 1987. p.32.

LIM, S.D., FUSARO, R.M. Leprosy. I. IgA and IgM immunoproteins in leprosy sera. *Int. J. Lepr.,* v.35, p.355-60, 1967.

LOBO. V.X., CARVALHO, B. Results of the inoculation of emulsion of human lepromatous in chickens and pigeons. *Lepr. India,* v.18, p.22-3, 1946.

LYONS, N.F., SHANNON, E.J., ELLIS, B.P.B., NAAFS, B. Association of the IgG and IgM antibodies to phenolic glycolipid-1 antigen of *Mycobacterium /eprae* with disease parameters in multibacillary leprosy patients. *Lepr. Rev., v.* 59, p. 45-52, 1988.

MAIER, M. The relation between allergy and immunity in leprosy. *Int. J. Lepr.,* v.55, p.116-39, 1987.

MASALA, C, AMENDOLEA, M.A., NUTI, M., RICCARDUCCI, R., TARABINI, C.G.L. Autoantibodies in leprosy. *Int. J. Lepr.,* v.47, p.171-5, 1979.

MEHRA, V., TAWAR, G.P., BHUTANI, L.K. Actived suppressor T cell in leprosy. *J. Immunol.,* v.29, p.1946-5, 1982.

MEYERS, W.M., GORMUS, B.F., WALSH, G.P. Experimental leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy.* 2.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p.385.

MITSUDA, K. On the value of skin reaction to a suspension of leprous nodules. *Int. J. Lepr.,* v.21, p.347-58, 1953.

MODLIN, R.L. T_H1 - TH2 Paradigm: Insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol.,* v.102, p.828-32, 1994.

MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., MEYER, P.R., REA, T.H. In situ demonstration of lymphocytes subsets in granulomatous inflammation: leprosy rhinoscleroma and sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.,* v.51, p.430-8, 1983.

MORENO, C., MEHLERT, A., LAMB, J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysacharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Chi?. Exp. Immunol.,* v.74, v.206-10, 1988.

MSHANA, R.N., HAREGEWOIN, A., HARBOE, M., BELEHU, A . Thymus dependent lymphocytes in leprosy. I. T lymphocytes subpopulation defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Lepr.,* v 501 p.291-6, 1982.

NATH, I., SINGH, R. The suppressive effect of *M. leprae* on the *in vitro* proliferative response of lymphocytes from patients with leprosy. *CIA Exp. Immunol.,* v.41, p. 406-14, 1980.

NICOLE, C. Reproduction expérimentale de la lépre chez les singes inférieurs. *Arch. Inst. Pasteur Tunis,* v.1, p.45-7, 1906.

NOGUEIRA, M.ES., ARRUDA, 0.S., VILANI, F.R., ARRUDA, M.S.P. Estudo de auto-anticorpos na hanseníase virchoviana. *Salusvita, v.* 101 p. 19- 28, 1991.

OPROMOLLA, D.V.A., FLEURY, R.N. Classificação e Reação na hanseníase. In: *Noções de Hansenologia.* Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 1981. p. 101-7.

OPROMOLLA, D.V.A., ARRUDA, 0.S., FLEURY, R.N. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae. Hansen& Int., v.* 5, p.28-36, 1980.

OTA, M., SATO, S. Inoculation experiments of human and rat lepra in the hen. *Int. J. Lepr., v.* 8, p.81-5, 1940.

OTEIZA, A., BLANCO, F.L. Intentos de transmision experimental de la lepra humana al hamsters sirio *(Crisetus auratus)* In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LA LEPRA, 5, Cuba, 1948. *Memórias..* Cuba: Associacion International de la Lepra, 1948. p.526.

OTTENHOFF, T.H.M. Immunology of leprosy. *Trop. Geogr. Med.,* v.46, p. 72-84, 1994.

PETTIT, J. H. S., RESS, R. J. W. Sulphone resistance in leprosy. An experimental an clinical study. *Lancet,* v.26, p.673, 1964.

PRABHAKARAN, K., HARRIS, E.B., KIRCHHEIMER, W.F. Hairless mice, human leprosy and thymus derived lymphocytes. *Experientia, v.* 31, p. 784, 1975.

REA, T.H. Immune responses in leprosy, cytokines and news archetypes for dermatology. *Clin. Exp. Dermatol,* v.20, p.89-97, 1995.

REES, R.J.W. Enhanced susceptibility of thymectomized and irradiated to infection with *Mycobacterium /eprae. Nature,* v.211, p.657-8, 1966

REES, R.J.W., YOUNG, D.B. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy* 2º ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994, p.48-53.

REES, R.J.W., WEDDELL, A.G.M., PALMER, E., PEARSON, J.M.H. Human leprosy in normal mice. *Br. Med. J.,* v.3, p.216-7, 1969.

RIDLEY, D.S., JOPLING W.H. Classification of leprosy according to immunity - a five group system. *Int, J. Lepr.,* v.34, p.255-73, 1966. RIDLEY, D.S., NILSON, G.R.F. A logarithmic index of bacilli in biopsies. I. Method. *Int. 1 Lepr.,* v.35, p.184-6, 1967.

ROBINSON, D.S, HAMID, Q., YING, S, TSICOPOULOS, Al BARKANS, J., BENTLEY, M., CORRIGAN, C., DURHAM, S.R., KAY, B. Predominant T_H2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl J. Med.,* v.326, p.298-304, 1992.

ROXO, E., SINHORINI, I.L., MARIANO, M. Evolução das lesões induzidas por micobactérias BCG e por H37 RV em hamster *(Mesocricetus auratus). Hansenol Int.,* v.19, p.19-25, 1994.

SAHA, K., MITTAL, M.M. A study of cell mediated immunity in leprosy: changing trends in immunological spectrum of the disease. *Clin. Exp. Immunol, v.* 8, p.901-9, 1971.

SALGAME, P., ABRAMS, J.S, CLAYBERGER, C., GOLDSTEIN, H., CONVIT,J., MODLIN, R.M., BLOOM, B.R. Differing cytokine profiles of functional of human CD4 and CD8 T cells clones. *Science,* v.254, p.279, 1991.

SAMPAIO, M.M., DIAS, L.B. Experimental infection of Jorge Lobo's disease in the cheek pouch of the golden hamster. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,* v.12, p.115-20, 1970.

SHEPARD, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into the foot pads of mice. *J. Exp. Med., v.* 112, p. 1960.

SHEPARD, C.C., KIRSH, D. The serologic anatomy of mycobacteria. In: LEONARD WOOD MEMORIAL JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SYMPOSIUM ON RESEARCH IN LEPROSY, Baltimore, *1961.Resumos...* p. 8-10.

SHEPARD, C.C., VAN-LANDINGHAM, R.M., WALKER, L.L., YES, Z. Comparison of the immunogenecity vaccines prepared from viable *M ,bovis,* heat-killed *M. leprae,* and a mixture of the two for normal and *M.l*eprae-tolerant mice. *Infect Immun., v.* 40, p.1096, 1983.

SHEPRO, D., COHEN, P.S., KULA, N. The incompetence of the hamster cheek pouch membrane as a mechanical barrier to the movement of tritiated *E coil* B3 and tritiated T4 bacteriophage. *J, Immunol,* v.9, p.725-31, 1964.

SHIGA, K. Intracerebral infection with lepra bacillus. *Kitasato Arch. Exp. Med.,* v.13, p.1-8, 1936.

SILBERBERG, I. Apposition of mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. *Acta Derm. Venereol.,* v.53, p.1-12, 1973.

SINHORINI, I.L., MERUSSE, J.L.B., MARIANO, M. Role of lymphatic drainage on the development of Calmette-Guerin Bacillus - induced

granulomas in the hamster. *Int. Arch. Allergy Immunol.,* v.103, p.166-74, 1994.

STONER, G.L. Studies on the defect in cell mediated immunity in lepromatous leprosy using HLA-D identical siblings. *Scand. J. Immunol,* v.15, p. 33-48, 1982.

STORRS, E.E., GREER, W.E. Maintenance and husbandry of armadillo colonies. *Lab. Anim. Sci.,* v.23, p.823-9,1973.

SU, D.W.P., YANG, H.Y., SKINSNES, O.K. The effect of neonatal thymectomy on *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Int. J. Lepr,,* v.41, p.81-92, 1973.

WALLACH, D., COTTENOT, F., BACH, M.A. Imbalances in cell subpopulations in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.,* v.50, p.282-90, 1982.

WALSH, G.P., DelaCRUZ, E.C., ABALOS, R.M., FAJARDO, T.T., GUIDO, L.S., CELLONA, R.V., MEYERS, W.M., GORBUS, B.J., RESUELLER, R., LANGE, F.W. Leprosy studies in Philippine cynomolgus monkeys *(Macaca fasicularis):* preliminary results. *Int. J. Lepr,,* v.58, p.193, 1990.

WATERS, M.F.R., NIVEN, J.S.F. Experimental infection of the ear and footpad of the golden hamster with *Mycobacterium leprae. Br. J, Exp. Pathol,* v.47, p.86-92, 1966.

WHITE, F.H., GOHARI, K. The ultrastrutural morphology of hamster cheek pouch epithelium. *Arch. Oral Biol.,* v.26, p.563-69, 1981.

WOLF, R.H., GORMUS, B.J., MARTIN, L.N. Experimental leprosy In the three species of monkeys. *Science. v.* 227, p. 529-31, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *Laboratory Techniques for Leprosy.* Geneva: WHO\CDS\LEP\ 86.4: 1987. p.134.

WORD HEALTH ORGANIZATION *Action programme for the elimination of Leprosy.* Geneva: WHO/LEP/98.2: 1998. p.8.

YOGI, Y., NAKAMURA, K., IONOUYE, T. Susceptibility of severe combined immunodeficient (SCID) mice to *Mycobacterium leprae:* multiplication of *M. leprae* inoculated into both hind feet at an early stage. *Int. J,lepr., v.* 59, p. 722-3, 1991.

RESUMO

NOGUEIRA, M.E.S. Inoculação de Mycobacterium Ieprae na bolsa jugal do hamster. Botucatu, 1999. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

A utilização da bolsa jugal do hamster na hanseníase experimental, foi avaliada por meio da inoculação de $6,0x10^8$ *M. leprae*/ml no seu tecido subepitelial em 60 animais, empregando como grupo controle, 12 hamsters inoculados no coxim plantar. Os animais foram sacrificados 20 e 48 horas e 7,14,21 e 28 dias p.i. A evolução da lesão de inoculação foi analisada pelo exame histológico em cortes corados pela hematoxilinaeosina e Faraco-Fite. A avaliação da viabilidade bacilar na bolsa jugal do hamster foi realizada 7, 14, 21, e 28 dias p.i. pelo teste de recuperação dos bacilos em camundongos. Os resultados nos permitiram concluir que: a) a resposta inflamatória inicial ao *M. leprae* na bolsa jugal foi exsudativa e inespecífica, com duração curta; b) após a fase exsudativa as lesões evoluíram com formação de granulomas macrofágicos semelhantes aos da hanseníase virchoviana humana; c) houve grande aumento do índice baciloscópico, incoerente com as características biológicas do *M. leprae*; fato interpretado como decorrente da concentração local pela reabsorção do edema e congestão; d) as lesões do coxim plantar iniciaram com fase

exsudativa de curta duração e evoluíram para granulomas epitelióides semelhantes aos da hanseníase dimorfa; e) o aumento inicial do índice baciloscópico no coxim plantar até 14 dias p.i pode ser interpretado como decorrente de concentração local de bacilos pela reabsorção do edema e congestão; a queda após esse período teria sido decorrente de mobilização dos bacilos pela drenagem linfática; f) o teste de recuperação do bacilo no coxim plantar de camundongos sugere que não houve multiplicação bacilar; g) as doses dos inóculos foram muito altas e mesmo assim, houve tendência das lesões de ambos os locais de inoculação à regressão.

Palavras-chave: Hamster; Bolsa Jugal; Granuloma; *Mycobacterium leprae.*

Abstract

NOGUEIRA, M.E.S. Inoculation of *Mycobacterium leprae* in the cheek pouch of hamster's. Botucatu, 1999. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

The use of the hamster cheek pouch in experimental leprosy was evaluated through the inoculation of 6.0x108 *M. leprae/ml* in its subepitelial tissue in 60 animals. A control group of 12 hamsters was inoculated in the foot pad. The animals were sacrificed 20 and 48 hours, 7,14,21 and 28 days after inoculation. Histological sections stained with hematoxylin-eosin and Faraco-Fite were used to evaluate the evolution of the lesions. The evaluation of the bacilli viability in cheek pouch was done by bacilli recovery test using mice inoculated in the foot pad and sacrificed six months after inoculation. The results led us to the following conclusions: a) acute inflammatory phase to *M. leprae* in the cheeck pouch was a short term non-specific and exsudative response; b) after the exsudative phase, the lesions evolved into macrophagic granuloma formation similar to the lepromatous leprosy in humans; c) there was a remarkable increase of the bacteriologic index, as opposed to the biological characteristics of *M. leprae* a fact that was interpreted as a local concentration after reabsorption of edema and congestion; d) the lesion in the foot pad initiated with a short term exsudative phase and evoluted into epithelioid granulomas similar to the borderline leprosy; e)

the initial increase of the bacteriologic index in the foot pad until 14 days after inoculation can be interpreted as a consequence of the local concentration due to reabsorption of edema and congestion. The decrease of the bacteriologic index after this period could be a result of the lymphatic drainage of the bacilli; f) the *M. leprae* recovery test from the foot pad of mice suggests that there was no multiplication of the bacilli; g) in spite of the high dosages inoculated, there was a tendency to the regression of lesions at both inoculated sites.

Keywords: Hamster; Cheek pouch; Granuloma; Mycobacterium leprae.