

5. Discussão

5 - DISCUSSÃO

Os estudos da hanseníase em animais de experimentação até a década de 1960 foram sempre insatisfatórios porque em muitos experimentos utilizando o mesmo animal e a mesma técnica, os resultados eram variáveis de autor para autor. O desconhecimento das características biológicas do *M. leprae* tal como, crescimento lento, associado às 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, estão 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; Senhorini 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 NT₁ e NT₂; 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 NT₁ 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 produzem lesões. Com 20 horas de evolução ambos os grupos apresentaram uma inflamação aguda exsudativa representada por edema, congestão, deposição de fibrina 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 NT₂ 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 14^o 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 *clearance* 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 àsquelas 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 al., 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 a 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 clearance 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.