

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 µm de comprimento e 0,3 µm 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 eletrtransparente, onde estão agrupados componentes lipídicos, particularmente o glicolípido 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 (World 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 Madri 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 clínica 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 específico, 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_H1 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 (IFN γ). 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 às 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 IFN γ 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, peritônio 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 $1,5 \times 10^8$ *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 $1,8 \times 10^9$ *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 $1,8 \times 10^7$ a $4,8 \times 10^{16}$ *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 espontânea 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, foi 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 $5,8 \times 10^6$ *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 (*Cricetus cricetus*). O 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 os 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 (Dharmendra & 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 5×10^6 *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, conseqüentemente, 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 T₄ e *Escherichia coli* marcados com timidina triciada escaparam da bolsa rapidamente. Anticorpos fago-específicos foram detectados na corrente sanguínea 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 $5,0 \times 10^6$ 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* H₃₇Rv, 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 àsquelas 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 H₃₇Rv 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.