

Inoculação de *Mycobacterium leprae* na bolsa júbalo do hamster¹

Maria Esther Salles Nogueira²

Kunie Iabuki Rabello Coelho³

Raul Negrão Fleury⁴

Maria Sueli Parreira de Arrudas⁵

RESUMO

A utilização da bolsa jugal do hamster, foi avaliada pela inoculação de $6,0 \times 10^8$ M. leprae/ml no tecido subepitelial de 60 animais, empregando como grupo controle, 12 hamsters inoculados no coxim plantar. Os animais foram sacrificados em 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias pi. A evolução da lesão de inoculação foi analisada pelo exame histológico em cortes corados pela hema-toxilina-eosina e Faraco-Fite. A avaliação da viabilidade bacilar na bolsa jugal do hamster foi realizada 7, 14, 21, e 28 dias pi pelo teste de recuperação bacilar em camundongos. Os resultados nos permitiram concluir que a resposta inflamatória ao M. leprae na bolsa jugal evoluiu para formação de granulomas macro-fágicos semelhantes aos da Hanseníase virchoviana humana porém, o teste de recuperação bacilar sugeriu que não houve multiplicação dos bacilos. As lesões do coxim plantar evo-

luíram para granulomas epitelióides semelhantes aos da Hanseníase dimorfa.

Descritores: Hamster. Bolsa Jugal. Granuloma. *Mycobacterium leprae*.

INTRODUÇÃO

A pesar do M. leprae ter sido a primeira bactéria identificada como patogênica para o homem em 1873¹⁹, 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.

Os estudos da Hanseníase em animais de experimentação até a década de 1960, foram sempre insatisfatórios porque em mui-

1. Parte de tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP;
2. Pesquisadora Científica IV, Setor de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima, caixa postal 62, CEP 1700-970, imunologia@iisl.br, Bauru - SP, Brasil;
3. Professora Doutora, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Unesp - Botucatu- SP;
4. Professor Doutor, Setor de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru - SP;
5. Professora Doutora, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Unesp - Bauru- SP.

tos 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.

Em 1960, Shepard²⁷ demonstrou crescimento local e limitado de *M. leprae* no coxim plantar de camundongos, cuja temperatura média de 27°-31°C é mais baixa que a temperatura corporal (37°C). Embora a pata de camundongo não possa ser utilizada como fonte de bacilos porque a sua recuperação não ultrapassa 106M. leprae/ml, esse trabalho pioneiro abriu um novo campo de estudos, permitindo que se evidenciassem várias características do bacilo.

A partir desse trabalho pioneiro, os pesquisadores também passaram a manipular drasticamente o sistema imune de camundongos^{7,13,22} e ratos¹⁴ para conseguir uma disseminação efetiva do *M. leprae*. Atualmente, estão sendo utilizados camundongos congenitamente atímicos - (*nude mouse*) e camundongos SCID, que apresentam uma severa deficiência de linfócitos T e linfócitos B¹⁴.

Outro modelo importante, foi desenvolvido por Kirchheimer & Storrs em 1971²¹ quando obtiveram infecções disseminadas em tatus (*Dasyurus novemcinctus*), cuja temperatura média corporal é de 34°C.

A inoculação do *M. leprae* em macacos de várias espécies^{5,17,32} tem demonstrado que esses animais apresentam espectro clínico semelhante ao da hanseníase humana. Apresentam inclusive, neuropatias e episódios reacionais.

Apesar do sucesso conseguido, 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 imuno-

logicamente 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^{2,25,29} e fungos^{1,26}. As bolsas jugais do hamster são invaginações bilaterais que têm abertura na cavidade bucal e se estendem, dorso-caudalmente, sob a pele dos ombros. É revestida por epitélio plano estratificado e 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^{4,20,31}.

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^{3,18} e diminuição das células de Langerhans⁶.

Com o propósito de avaliar a bolsa jugal do hamster como local alternativo para inoculação e proliferação do *M. leprae*, caracterizamos histologicamente a evolução das lesões induzidas pela inoculação do bacilo no segmento distal da bolsa jugal; comparamos as lesões induzidas com inóculos de pacientes não tratados e em tratamento; comparamos a evolução das lesões da bolsa jugal (local desprovido de drenagem linfática) com as do coxim plantar (local rico em drenagem linfática) e avaliamos a possibilidade de multiplicação bacilar nas lesões da bolsa jugal.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Pacientes: foram utilizados hansenomas de dois pacientes com hanseníase virchoviana, não tratados que deram origem aos inóculos NT1 e NT2; e um terceiro hansenoma de paciente com hanseníase virchoviana, na vigência de tratamento, que deu origem ao inóculo T. Os pacientes selecionados deram sua autorização para participar do estudo e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética Médica sob nº 29/97CEM.

2. Animais: 80 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, com dois meses de idade e peso corpóreo entre 90 - 120 gramas foram divididos em quatro grupos experimentais denominados G1, G2, G3 e G4 (Tabela 1). Os animais dos grupos G1 e G3 receberam inóculos NT1, do grupo G2 inóculo T e do grupo G4 receberam inóculo NT2.

3. Inóculos: os inóculos foram preparados a partir de hansenomas biopsiados com punch de 5,0 mm de diâmetro e processados segundo técnica proposta pela World Health Organization (WHO, 1987)³³ com pequenas modificações. A seguir foi determinada a concentração bacilar conforme metodologia proposta por Shepard (1960)²⁷ e o material dividido em duas aliquotas, das quais uma foi utilizada para a identificação do *M. leprae* e a outra, para inoculação dos grupos experimentais, o que ocorreu imediatamente após o preparo dos inóculos.

4. Identificação do *M. leprae*: para afastar qualquer possibilidade de contaminação com outras micobactérias foram utilizadas técnicas de cultivo em meio Lowenstein Jensen¹¹ a 30°C e 37°C e meio de Middlebrook 7H1¹¹ a 37°C como também, inoculação em coxim plantar de camundongos²⁷.

5. Grupos experimentais: 30 hamsters do grupo G1 e 30 do grupo G2 foram inoculados com 0,1 ml da suspensão de 6,0x10⁸ M. leprae no segmento distal da bolsa jugal direita.

Lotes de cinco animais/grupo foram sacrificados, às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias. No grupo G3, 12 hamsters receberam 0,1 ml da suspensão de 6,0x10⁸ M. leprae, no coxim plantar da pata posterior esquerda. Lotes de dois animais/grupo foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias pi. Bolsas jugais e coxins plantares de todos os hamsters foram fixados em formalina 10%, corados pela hematoxilina-eosina e Faraco¹² Fite¹⁵. As lâminas foram analisadas pela microscopia óptica e documentadas no foto- microscópio Olympus Vanox AHB53. O grupo G4, era formado por oito hamsters que receberam 0,1 ml da suspensão de 3,4x10⁹ M. leprae/ml no tecido subepitelial da bolsa jugal. Lotes de dois animais foram sacrificados aos 7, 14, 21 e 28 dias pi e as lesões das bolsas foram processadas para a obtenção da suspensão de bacilos. Essas suspensões foram utilizadas para reinoculação no coxim plantar de cinco camundongos BALB/c na dose 1,0x10⁴ M. leprae/ 0,03 ml por lote de hamster. Os camundongos foram todos sacrificados seis meses pi e as lesões dos tecidos dos coxins plantares inoculados foram processados para testes de recuperação bacilar.

RESULTADOS

Avaliação Histológica da Lesão de Inoculação

Grupo Experimental 1: A inoculação de *M. leprae* na bolsa jugal do hamster resultou, às 20 horas em denso acúmulo de macrófagos e neutrófilos sendo a área central predominantemente neutrofílica; muitos neutrófilos nessa área apresentavam-se fragmentados. 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 granulados. O IB foi de 4+ segundo classificação proposta por Ridley &

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

Grupos	Via	Inóculo	Dose	Nº/lote	MO	TRb
G1 (n=30)	BJ	NT1	6,0X10 ⁸	5	5	-
G2 (n=30)	BJ	T	6,0X10 ⁸	5	5	-
G3 (n=12)	CP	NT ₁	6,0X10 ⁸	2	2	-
G4 (n=8)	BJ	NT ₂	3,4X10 ⁹	2	-	8

LEGENDA

BJ= bolsa jugal

CP= coxim plantar

MO= número de animais destinados à microscopia óptica/lote

nº/lote= número de animais sacrificados/ lote

NT= não tratado

T= tratado

TRb= teste de recuperação bacilar

Hilson (1967)²⁴. Após 48 horas, as lesões eram semelhantes, porém, os acúmulos de macrófagos e neutrófilos apresentavam delimitação mais precisa e disposição mais compacta (Fig.1a). O IB foi de 4+, com bacilos predominantemente granuloso e raros bacilos íntegros (Figura 1 b). Aos 7 dias a lesão era mais discreta, delimitada, representada por granulomas macrofágicos com raros neutrófilos. Os macrófagos apresentavam citoplasma microvacuolizado semelhantes às células de Virchow. Notava-se ainda presença de algumas células gigantes multinucleadas do tipo Langhans. O IB foi de 5+ de bacilos granuloso. Nos animais sacrificados aos 14 dias, observou-se redução na extensão do granuloma, mas de morfologia semelhante ao do 7º dia. O IB foi de 5+ de bacilos granuloso. Aos 21 dias não foi possível visualizar a lesão. Com 28 dias, a lesão não se alterou, exibindo granuloma macrofágico composto por células com citoplasma abundante, vacuolado e núcleo

vesiculososo (Fig. 2a). O IB foi de 6+ de bacilos granuloso (Fig. 2b).

Grupo Experimental 2: A lesão de inoculação com 20 horas, era representada por um amplo processo supurativo central, circundado por macrófagos formando um anel. Na periferia da lesão havia moderado edema e congestão com exsudato de neutrófilos, alguns eosinófilos, mastócitos e células mononucleares. Pelo Faraco-Fite o IB foi de 3+ de bacilos granuloso. 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. O IB foi de 4+ e os bacilos localizados no interior de neutrófilos e macrófagos eram todos granuloso. Aos 7 dias, a lesão era constituída por granuloma macrofágico com uma pequena área 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. O IB foi de 5+ de bacilos granulosos. Aos 14 dias, o granuloma tornou-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. O IB foi 5+ de bacilos granulosos. Aos 21 dias, o granuloma era semelhante, porém, bem delimitado e sem neutrófilos. O IB foi de 5+ de bacilos granulosos. Aos 28 dias, a lesão permanecia inalterada, com IB de 6+ de bacilos granulosos no interior de células macrófagicas formando globias.

Grupo Experimental 3: A análise histológica do coxim plantar em hamsters sacrificados às 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. O IB foi de 3+ de bacilos granulosos e alguns sólidos, isolados ou formando globias, localizados no interior de macrófagos e no espaço intercelular. 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. 3a). O IB permaneceu inalterado de 3+ de bacilos granulosos e alguns sólidos, no interior de macrófagos e neutrófilos (Fig. 3b). 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. O IB foi de 4+ de bacilos granulosos no interior de macrófagos. Aos 14 dias, a lesão era delimitada e, formada por granuloma epitelióide contendo células gigantes e linfócitos. 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. Aos 21 dias, observou-se diminuição do granuloma epitelióide, tornando-se mais compacto com células gigantes e linfócitos. O IB foi de 2+ de bacilos granulosos. Aos 28 dias, a lesão se tornou muito reduzida, composta por acúmulo de células epitelióides com citoplasma finamente vesiculoso, linfócitos e algumas células gigantes (Figura 4a). O IB foi 2+, com bacilos granulosos (Figura 4b).

Grupo Experimental 4: O coxim plantar de camundongos inoculados com *M. leprae* isolados das bolsas jugais de hamsters do grupo G4 demonstraram aos 7 e 14 dias pi recuperação de $6,4 \times 10^3$ e 13×10^3 *M. leprae*/ml respectivamente. A recuperação resultou negativa aos 21 e 28 dias pi.

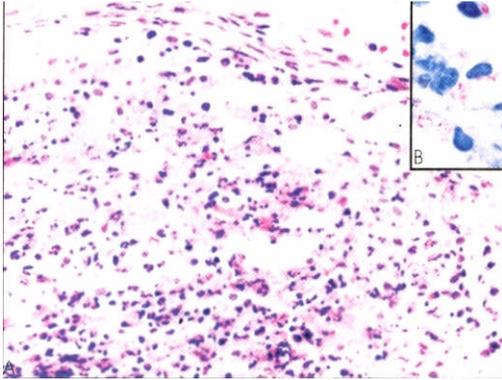


Figura 1 a) Grupo G1. Fotomicrografia do granuloma induzido pela inoculação de *M. leprae* na bolsa jugal do hamster 46 horas pi. Notar lesão nodular, bem delimitada, composta por macrófagos com citoplasma eosinofílico e amplo, ao lado de neutrófilos fragmentados (HE. 200X). **1 b)** bacilos gramulosos e alguns íntegros IB: 4+ (Faraco-Fite 1000X).

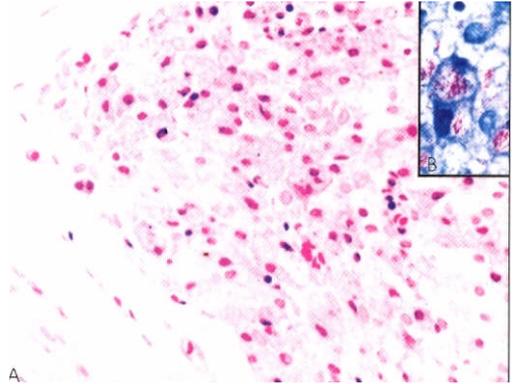


Figura 2a) Grupo G1 . Fotomicrografia do granuloma induzido pela inoculação de *M. leprae* na bolsa jugal do hamster 28 dias pi. Notar macrófagos com citoplasma abundante, vacuolado e núcleo vesiculoso.(HE. 200X). **2b)** bacilos gramulosos. IB: 6+ (Faraco-Fite 1000X).

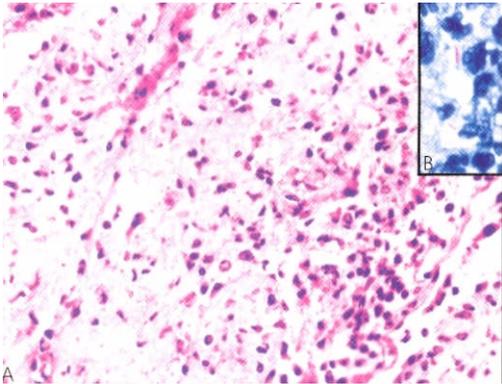


Figura 3a) Grupo G3. Fotomicrografia do granuloma induzido pela inoculação de *M. leprae* no coxim plantar do hamster 48 horas pi. Detalhe demonstrando o centro da lesão com macrófagos e neutrófilos fragmentados (HE. 200X). **3b)** bacilos gramulosos. IB: 3+ (Faraco-Fite 1000X).

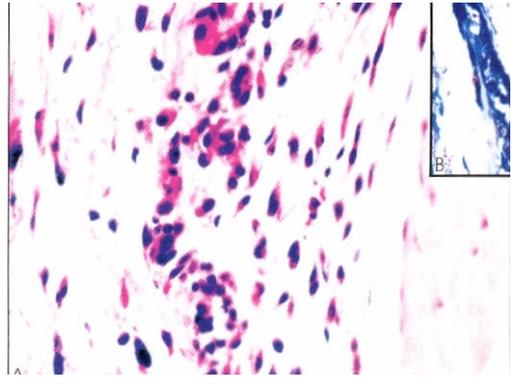


Figura 4a) Grupo G3. Fotomicrografia do granuloma induzido pela inoculação de *M. leprae* no coxim plantar do hamster 28 dias pi. Detalhe demonstrando acumulo de células epitelióides com citoplasma finamente vesiculoso, linfócitos e algumas células gigantes multinucleadas (HE. 200X). **4b)** bacilos gramulosos. IB: 2+ (Faraco-Fite 1000X).

DISCUSSÃO

São muito escassos os dados de literatura sobre a inoculação do *M. leprae* na bolsa jugal do hamster. Convit et al., (1962)¹⁰ mencionaram inoculação semelhante, mas não relataram os seus resultados. Arruda et al., (1995a)², foram os primeiros a utilizar a bolsa jugal em hanseníase experimental com resultados positivos, onde sugeriram a possibilidade de multiplicação bacilar.

Histologicamente, as bolsas jugais inoculadas com *M. leprae*, apresentavam inicialmente em ambos os grupos uma inflamação aguda exsudativa, sendo as lesões do grupo G2 mais intensas que as do G1.

Após a fase aguda, o infiltrado era bem delimitado, composto principalmente por macrófagos com citoplasma abundante, multivacuolado, assemelhando-se às células de Virchow; os neutrófilos e linfócitos eram progressivamente mais escassos até o sétimo dia no grupo G1 e até o 14º 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 granuloso em seu interior.

À semelhança dos resultados descritos em animais imunocomprometidos^{16,22,30,34} no testículo de hamster¹⁰ e no tatu²¹, 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 da hanseníase virchoviana humana.

Com relação ao IB, os resultados demonstraram aumento gradativo de bacilos ao longo do experimento com índices de até 6+ para os grupos G1 e G2, 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)²⁷ 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 granuloso e a área da lesão, esse aparente aumento poderia corresponder em grande parte, à 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. Assim, inoculou-se *M. leprae* 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 recuperados até o 14º dia pi e depois negativos; possivelmente os bacilos aí inoculados foram parcial e gradativamente removidos pela circulação linfática local.

A formação do granuloma macrofágico na bolsa jugal, semelhante ao padrão observado na hanseníase virchoviana humana, provavelmente se relaciona à ausência de drenagem linfática, e conseqüente ausência do ramo aferente da resposta imune, gerando tolerância imune local. 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 àquelas do polo virchoviano 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 antígenos de patógenos inoculados no coxim plantar, atingem o linfonodo poplí-

teo^{25,29} pela sua via linfática aferente. Nesse grupo, os animais sacrificados com 20 horas pi 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 Iesão, 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 à 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.

No coxim plantar do hamster, embora o granuloma exibisse características epitelióides, assemelhava-se mais ao padrão histológico encontrado no grupo dimorfo da hanseníase humana. Nossos resultados estão de acordo com os relatados por Rees et al., 1969²³ e Shepard et al., 1983²⁸.

CONCLUSÃO

A bolsa jugal do hamster se comporta como o pólo anérgico da hanseníase humana permitindo o desenvolvimento de granulomas macrófágicos mas não oferece condições para

a manutenção de viabilidade e de multiplicação do *M. leprae*, mesmo com utilização de altas doses do inóculo.

SUMMARY

The use of the hamster cheek pouch in experimental leprosy was evaluated through the inoculation of 6.0×10^8 *M. leprae*/ml in its subepithelial 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 hematoxylineosin 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) after the exsudative phase, the lesions evolved into macrophagic granuloma formation similar to the lepromatous leprosy in humans; b) 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; c) the lesion in the foot pad evolved into epithelioid granulomas similar to the borderline leprosy; d) the *M. leprae* recovery test from the foot pad of mice suggests that there was no multiplication of the bacilli.

Uniterms: Hamster. Cheek pouch. Granuloma. *Mycobacterium leprae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. ARRUDA, M.S.P., FLEURY, R.N., NOGUEIRA, M.E.S. Inoculation of *Mycobacterium leprae* into the cheek pouch. *Leprosy Review*, v.66, p.181-2, 1995a.
3. 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, p.109-13, 1995b
4. BARKER, E., BILLIGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.*, v.25, p.1-54, 1977,
5. 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. Leprosy*, v.55, p. 109-15, 1987.
6. BERGSTRESSER, P.R., FLETCHER, C.R., STREILEIN, J.W. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J. Invest. Dermatol.*, v.74, p.77-80, 1980.
7. 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. Leprosy*, v.40, p.99-100, 1972.
8. CHEHL, S., JOB, C.K., HASTINGS, R.C. Transmission of leprosy in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.34, p.1161, 1985
9. COLSTON, M.J., HILSON, G.R.F. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*, v.262, p.399-401, 1976.
10. CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., IMAEDA, T. Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. I. Clinical, bacteriologic, and histopathologic study. *Int. J. Leprosy*, v.30, p.239-53, 1962.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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. Leprosy*, v. 49, p.317-23, 1981.
15. FITE, G.L. Staining of acid-fast bacilli in paraffin sections. *Am. J. Pathol.*, v. 14, p.491-507, 1938.
16. GAUGAS, J.M., REES, R.J.W., WEDDELL, A.G.M. Reversal effect of thymus grafts on lepromatous leprosy in thymectomized- irradiated mice. *Int. J. Leprosy*, v.39, p. 388-95, 1971.
17. GORMUS, B.J., XU, K., BASKIN, G.B., MARTIN, L.N., BOHM, R.P., BLANCHARD, J.L., MACK, PA, 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. *Leprosy Review*. v.66, p.96-104, 1995.
18. 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.

19. HANSEN, G.H.A. Üdersogelser angaend spedalskshendens arsager. *Norsk. Laegevil.*, v.4, p.1-88, 1873.
20. HARDY, M.H., VRABLIC, O.E., COVANT, H.A., KANDARKAR, S.V. The development of the Syrian hamster cheek pouch. *Anat. Rec.*, v.214, p.273-82, 1986
21. KIRCHHEIMER, W.F., STORRS, E.E. Attempts to stablish the armadillo (*Dasybus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I. report of lepromatous leprosy in experimentally infect armadillo. *Int. J. Leprosy*, v. 39, p.693-702, 1971.
22. REES, R.J.W. Enhanced susceptibility of thymectomized and irradiated to infection with *Mycobacterium leprae*. *Nature*, v.211, p.657-8, 1966
23. 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.
24. RIDLEY, D.S., HILSON, G.R.F. A logarithmic index of bacilli in biopsies. I. Method . *Int. J. Leprosy*, v.35, p.184-6, 1967.
25. ROXO, E., SINHORINI, I.L., MARIANO, M. Evolução das lesões induzidas por micobactérias BCG e por H37 RV em hamster (*Mesocricetus auratus*). *Hans. Int.*, v.19, p.19-25, 1994
26. 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.
27. 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. 445-54, 1960.
28. SHEPARD, C.C., VAN-LANDINGHAM, R.M., WALKER, L.L., YES, Z. Comparison of the immunogenicity vaccines prepared from viable *M. bovis*, heat-killed *M. leprae*, and a mixture of the two for normal and *M. leprae*-tolerant mice. *Infect Immun.*, v. 40, p.1096, 1983.
29. 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.
30. SU, D.W.P., YANG, H.Y., SKINSNES, O.K. The effect of neonatal thymectomy on *Mycobacterium leprae* infection in mice. *Int. J. Leprosy*, v.41, p.81-92, 1973.
31. WHITE, F.H., GOHARI, K. The ultrastrutural morphology of hamster cheek pouch epithelium. *Arch. Oral Biol.*, v.26, p.563-69, 1981.
32. WOLF, R.H., GORMUS, B.J., MARTIN, L.N. Experimental leprosy in the three species of monkeys. *Science*. v. 227, p. 529-31, 1985.
33. WORLD HEALTH ORGANIZATION *Laboratory Techniques for Leprosy*. Geneva: WHO\CDS\LEP\ 86.4: 1987. p.134.
34. YOGI, Y., NAKAMURA, K., IONOUYE, T. Susceptibility of severe C ombined immunodeficient (SCID) mice to *Mycobacterium leprae*: multiplication of *M. leprae* inoculated into both hind feet at an early stage. *Int. J. Leprosy*, v. 59, p. 722-3, 1991.