

# A Reação de Mitsuda em tatus *Dasybus novemcinctus* utilizando antígeno humano e antígeno derivado de tatus<sup>1</sup>

## *Mitsuda reaction in armadillos *Dasybus novemcinctus* using human and armadillo derived antigens*

Patrícia Sammarco Rosa<sup>2</sup>Andréa de Faria Fernandes Belone<sup>2</sup>Eliane Aparecida Silva<sup>2</sup>

### Resumo

O tatu foi um modelo experimental importante para o estudo da hanseníase, além de ser ainda uma importante fonte para coleta de bacilos. Apesar dos inúmeros relatos de estudos em tatus da espécie *Dasybus novemcinctus*, pouco se sabe sobre a real susceptibilidade desta espécie ao bacilo de Hansen após inoculação experimental com o *M. leprae*. Alguns autores relatam que cerca de 80% dos animais desenvolveriam a doença quando infectados. No Brasil, a inoculação experimental desta espécie resultou em inoculações positivas em apenas dois momentos, tendo até sido levantada a hipótese de estes animais serem mais resistentes à infecção experimental. No presente estudo, utilizou-se a resposta ao antígeno de Mitsuda como um indicador de resposta imune celular de tatus ao *M. leprae*. Para tanto foram utilizados 21 animais testados com antígenos de Mitsuda derivados de humanos ( $4,2 \times 10^9$  bacilos/ml) e antígeno produzido a partir de tatus ( $1,6 \times 10^8$  bacilos/ml). A resposta após 28 dias mostrou que a maior parte dos animais apresentava, no exame histológico, infiltrado constituído por macrófagos com citoplasma vacuolado formando vários agrupamentos, entre-meados por raros linfócitos. Esta resposta imita a hanseníase virchoviana em seres humanos e sugere que os animais seriam susceptíveis a desenvolverem a forma disseminada da doença frente a inoculações bem sucedidas. A baciloscopia nestes animais variou de 3+ a 4+, pela escala de Ridley (1966). Dois

tatus desenvolveram reação granulomatosa de padrão dimorfo com baciloscopia variando de 1+ a 3+.

**Palavras-chave:** reação de Mitsuda; *Dasybus novemcinctus*; antígeno de Mitsuda.

### Introdução

Em 1971, Kircheimer e Storrs<sup>1</sup> demonstraram que o tatu do gênero *Dasybus novemcinctus* era susceptível à infecção pelo *Mycobacterium leprae*. A grande quantidade de *Mycobacterium leprae* recuperada dos animais infectados possibilitou conhecer melhor as características biológicas do bacilo tendo em vista que ele ainda não é cultivado em meios livres de células. Nos Estados Unidos tanto no laboratório da Louisiana como no da Flórida onde trabalhava a Dra. Storrs, a percentagem de animais que adquiriam a doença depois de infectados com o bacilo chegava e ainda chega a mais de 80%<sup>2,3</sup>.

Na América do Sul, contudo, isso não foi observado. Convit<sup>4</sup> na Venezuela admitiu ter tido dificuldades em infectar tatus do gênero *Dasybus novemcinctus*, e os animais em que ele logrou reproduzir a hanseníase foram tatus de tamanho menor, o *Dasybus sabanicola*, que acabaram não se prestando aos seus estudos. Convit<sup>4</sup> chegou a sugerir que os tatus da espécie *D. novemcinctus* sul-americanos fossem mais resistentes à infecção pelo bacilo de Hansen do que os norte-americanos.

No laboratório do Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, no Brasil, entretanto, foi conseguida a reprodução da doença em animais da espécie *D. novemcinctus* em duas ocasiões há alguns anos<sup>5</sup>. Infelizmente a necessidade de extinguir a colônia de tatus que se dispunha na época impediu que pudéssemos tentar a infecção de um número maior desses

<sup>1</sup> Trabalho realizado com apoio financeiro da Fundação Paulista contra a Hanseníase.

✉ Patrícia Sammarco Rosa. Instituto Lauro de Souza Lima, Rodovia Cmte. João Ribeiro de Barros km 225, Caixa Postal 3021, Bauru, SP, Brasil, 17034-971. prosa@ils.br

<sup>2</sup> Pesquisador Científico, Instituto Lauro de Souza Lima.

animais com o *M. leprae*. Com a reinstalação da colônia anos mais tarde, os tatus voltaram a ser estudados no Instituto. Um dos pontos prioritários a serem esclarecidos seria a existência de resistência ou não dos animais sul-americanos do gênero *Dasyus* em reproduzir experimentalmente a hanseníase. A avaliação dos resultados do teste de Mitsuda seria um primeiro passo nesse sentido.

O motivo desta apresentação é referir os resultados obtidos após aplicação do antígeno de Mitsuda, tanto de origem humana como de origem animal, em tatus do gênero *D. novemcinctus* capturados na região de Bauru.

## Material e Métodos

Para observar os resultados do teste de Mitsuda foram utilizados 21 tatus da espécie *D. novemcinctus*, machos e fêmeas, adultos, pesando de 3,5 a 5 kg. Nenhum animal havia sido inoculado anteriormente com o *M. leprae*.

O abdômen dos animais foi lavado cuidadosamente com água e sabão, seguido da aplicação de algodão com álcool 70°.

Foram utilizadas duas preparações do antígeno, uma de origem humana (H) e outra de origem animal (A). O antígeno A continha  $1,6 \times 10^8$  bacilos/ml e o antígeno H  $4,2 \times 10^9$  bacilos/ml. Os animais foram inoculados intradermicamente na região abdominal direita e esquerda respectivamente com 0,1 ml do antígeno A e do antígeno H. O local da inoculação, onde foi observada uma elevação após a introdução do antígeno, foi marcado com um pontilhado feito através de tinta nanquim. Os antígenos foram bem homogeneizados antes de cada inoculação para assegurar uma suspensão uniforme de bacilos.

Após 21 dias o local da inoculação foi examinado para a verificação da presença de lesões macroscópicas (pápulas ou nódulos) e biopsiado com "punch" de 4 mm. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada 10%. Nos locais sem lesões visíveis ou palpáveis a biópsia foi feita dentro da área delimitada pelos pontos tatuados com a tinta nanquim.

O material da biópsia foi incluído em parafina e corado pela hematoxilina e eosina, e pelo método do Faraco-Fite para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes. O índice bacilos-cópico variou de 0+ a 6+, de acordo com a escala de Ridley<sup>6</sup>. O tamanho dos infiltrados foi descrito de acordo com a descrição de Job et al.<sup>7</sup> (1982), infiltrados pequenos ocupavam até 20% da área do corte observado, infiltrados de tamanho médio ocupavam cerca de 50% da área e infiltrados grandes ocupavam mais de 50% da área do corte.

## Resultados

Na tabela 1 estão relacionados o tipo e o tamanho dos infiltrados encontrados como resultado das inoculações com os dois tipos de antígenos e a quantidade de bacilos presentes.

Em nossos 21 tatus somente em um animal foi percebida uma induração (>5mm) no local da inoculação após 21 dias. Nos demais não havia nenhuma lesão visível ou palpável e a biópsia teve que se orientar somente pela marcação com a tinta nanquim.

Na maior parte dos animais examinados, os cortes corados pela HE e Faraco-Fite, tanto os provenientes das inoculações feitas com antígeno A como com o H, mostraram o mesmo tipo de infiltrado com alguma diferença quantitativa no tamanho dos infiltrados e na quantidade de bacilos observada.

Em sua maioria os infiltrados eram médios, com poucos ou muitos focos perivascularares e neurais, no derma superficial e/ou profundo (Figura 1). Os infiltrados eram constituídos por células mononucleares, com predomínio de macrófagos com citoplasma abundante, vacuolado, núcleo vesiculoso ou denso. Em alguns casos se notava um número reduzido dessas células, em geral em torno de vasos e em outros havia um número moderado desses macrófagos formando vários agrupamentos que tomavam até 20 a 30% dos cortes, entremeados por raros linfócitos (Figura 2). Chamava a atenção a presença de mastócitos que em alguns cortes eram bastante numerosos e melhor visíveis com a coloração pelo Faraco-Fite. Os índices bacilos-cópicos variaram de 3+ a 4+ nesses animais e a quantidade de bacilos era proporcional ao número de células (Figura 3). Às vezes foram encontradas células mononucleares isoladas penetrando o colágeno e contendo bacilos. Os animais com este padrão de resposta corresponderiam aos com reação tipo virchoviana ao antígeno de Mitsuda.

Em dois tatus (ILSL32 e ILSL33) observou-se extenso infiltrado histiocitário, difuso, ocupando o derma superficial e profundo (Figura 4). Esses infiltrados eram constituídos por macrófagos vacuolados, com citoplasma abundante, núcleo central, denso ou vesiculoso. Em algumas áreas foram detectadas células epitelióides, raras células gigantes e linfócitos (Figura 5). Estas células justapostas abrangiam mais que 50% da derme. No animal ILSL33 foram observados focos de necrose. Os índices bacilos-cópicos variaram de 1+ a 3+ nesses animais (Figura 4). O quadro descrito caracteriza uma resposta dimorfa.

**Tabela 1.** Característica da reação observada em tatus após teste intradérmico com diferentes preparações do antígeno de Mitsuda.

Identificação do animal	Antígeno de Mitsuda humano (H)			Antígeno de Mitsuda de tatu (A)		
	Tamanho infiltrado*	Conteúdo celular**	IB***	Tamanho infiltrado*	Conteúdo celular**	IB***
ISSL27	Pequeno	M	-	Médio	M	2+/3+
ISSL29	Médio	M	4+	Médio	M	4+
ISSL30	Médio	M,L	4+	Médio	M,	4+
ISSL31	Médio	M	4+	Médio	M	3+
ISSL32	Extenso	M,L, E	3+	Extenso	M,L,E,CG	3+
ISSL33	Médio	M,L, E	2+	Extenso	M,L,E,CG	1+/2+
ISSL34	Médio	M	3+	Médio	M,L	3+
ISSL35	Pequeno	M	2+	Pequeno	M	2+
ISSL36	Médio	M	4+	Pequeno	M	-
ISSL37	Médio	M	4+	Médio	M	4+
ISSL38	Médio	M	4+	Médio	M	3+
ISSL39	Médio	M	4+	Pequeno	M	1+
ISSL40	Médio	M,L	4+	Médio	M,L	3+
ISSL41	Pequeno	M	4+	Pequeno	M	3+
ISSL42	Pequeno	M	3+	Pequeno	M	3+
ISSL43	Médio	M,L	4+	Médio	M,L	4+
MAN1	Médio	M,L	4+	Pequeno	M	-
MAN4	Médio	M,L	4+	Médio	M,L,N	4+
MAN5	Médio	M,L	2+/3+	Pequeno	M	1+
MAN6	Médio	M,	4+	Médio	M	4+
MAN8	Médio	M,	4+	Médio	M	4+

M= macrófagos, L= linfócitos, E= células epitelióides, CG= células gigantes, N=neutrófilos, IB=índice baciloscópio.

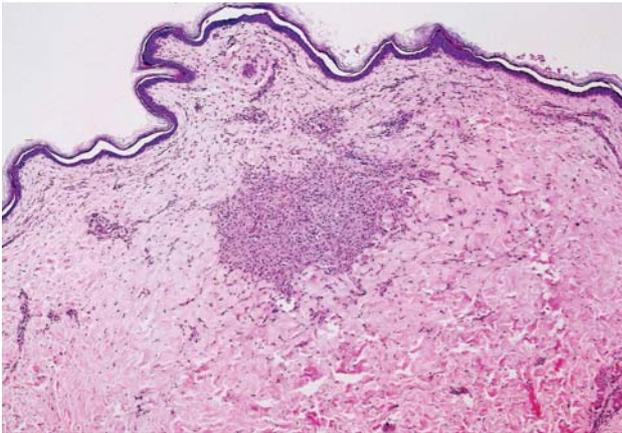


Figura 1. Reação de Mitsuda em tatus. Padrão virchoviano. Foco granulomatoso de pequena extensão no derma médio. HE. Aumento original 40x.

Figure 1. Mitsuda reaction in armadillos. Lepromatous pattern. Small granulomatous foci in the median dermis. HE. Original magnification 40x.

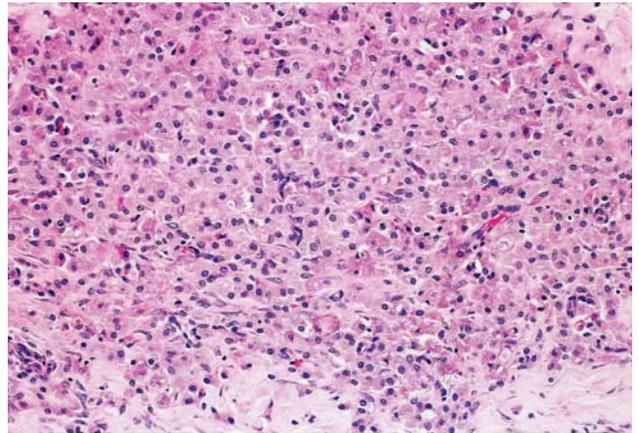


Figura 2. Detalhe da figura anterior. Granuloma constituído por macrófagos não epitelióides. Raríssimos linfócitos. HE. Aumento original 80x.

Figure 2. Detail of previous figure. Granuloma constituted by non-epithelioid macrophages. Scarce lymphocytes. HE. Original magnification 80x.

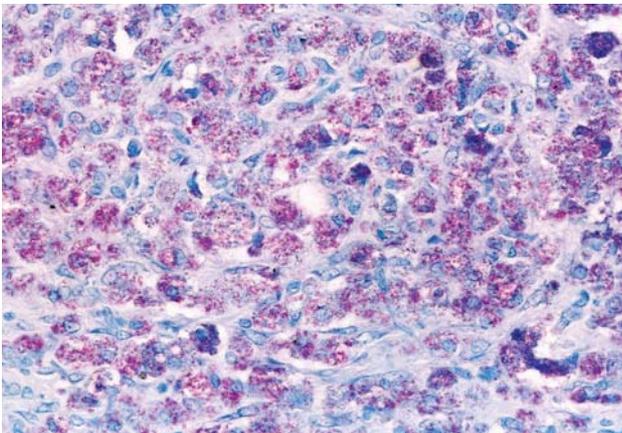


Figura 3. Reação de Mitsuda em tatus. Padrão virchoviano. Macrófagos abarrotados de BAAR. Faraco-Fite. Aumento original 160x.

Figure 3. Mitsuda reaction in armadillos. Lepromatous pattern. Macrophages filled with BAAR. Faraco-Fite. Original magnification 160x.

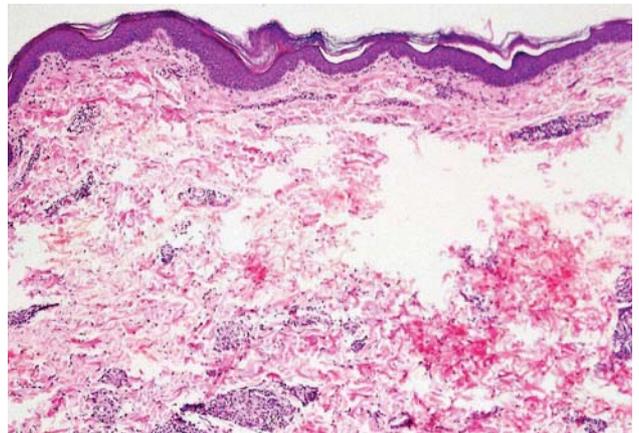


Figura 4. Reação de Mitsuda em tatus. Padrão dimorfo. Granulomas de pequena extensão, múltiplos. HE. Aumento original 40x.

Figure 4. Mitsuda reaction in armadillos. Borderline pattern. Small, multiple granulomas. HE. Original magnification 40x.

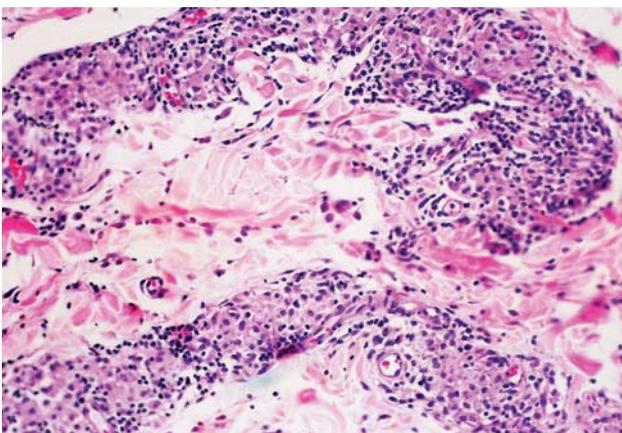


Figura 5. Detalhe da figura anterior. Granulomas com padrão dimorfo, células epitelióides em arranjo tuberculóide frouxo, contornados e penetrados por linfócitos. HE. Aumento original 80x.

Figure 5. Detail of previous figure. Borderline pattern granuloma, epithelioid cells in loose tuberculoid arrangement, surrounded and penetrated by lymphocytes. HE. Original magnification 80x.

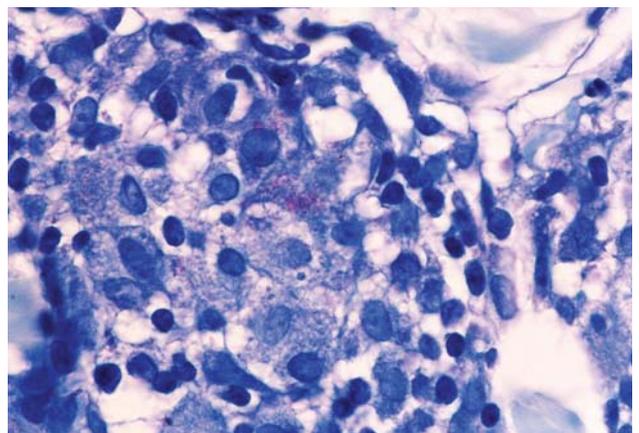


Figure 6. Reação de Mitsuda em tatus. Padrão dimorfo. Bacilos granulosos no interior de macrófagos epitelióides. Faraco-Fite. Aumento original 400x.

Figure 6. Mitsuda reaction in armadillos. Borderline pattern. Granular bacilli inside epithelioid macrophages. Faraco-Fite. Original magnification 400x.

## Discussão

Job *et al.*<sup>7</sup> (1982) foram os primeiros a estudar a resposta dos tatus ao teste de Mitsuda. Em um primeiro experimento utilizaram 14 animais e inocularam lepromina preparada com material humano contendo uma suspensão de  $3,8 \times 10^7$  *M. leprae* em 0,2 ml.

Em seres humanos vários autores descrevem a reação de Mitsuda como um indicador de capacidade de resposta imune celular. As reações Mitsuda positivas ocorreriam em indivíduos com boa capacidade de resposta, portanto mais resistentes à infecção, ou com tendência a desenvolver a forma tuberculóide da hanseníase. As reações Mitsuda negativas ocorreriam em indivíduos com baixa capacidade de resposta ou com deficiência específica, e quando infectados desenvolveriam formas de menor resistência (grupo dimorfo e tipo virchoviano)<sup>8</sup>.

Job *et al.*<sup>7</sup> observaram em tatus três diferentes tipos de resposta ao antígeno de Mitsuda:

- 1) uma reação à lepromina, lepromatosa, onde a o infiltrado inflamatório era pequeno e ocupava cerca de 20% da área do corte. As células que compunham esse infiltrado eram macrófagos com núcleos ovais ou redondos e citoplasma abundante com vacuolização acentuada dando lugar a um aspecto espumoso. Raros linfócitos estavam presentes e a coloração pelo Faracofite mostrava numerosos bacilos no interior das células macrófágicas. Dos 14 tatus, 11 apresentaram esse aspecto histológico.
- 2) Outro tipo de resposta foi observada somente em um tatu, e considerada uma reação dimorfa. Nesse caso havia grande quantidade de macrófagos com núcleos redondos ou ovais e citoplasma vacuolado tomando 50% do corte, contendo bacilos em grande quantidade. Havia áreas em que os linfócitos se concentravam em maior número, nas quais a quantidade de bacilos era menor.
- 3) O terceiro tipo correspondia a uma reação tuberculóide que foi observada em dois animais. Havia células epitelióides, células gigantes e linfócitos disseminados, tomando 30% dos cortes. Nesses casos somente raros bacilos foram encontrados. Dos 11 tatus com reações tipo virchoviana à lepromina, 10 desenvolveram a hanseníase disseminada dentro de 13 a 66 meses. Já os animais com reação tuberculóide não desenvolveram a doença. Diante desses resultados, os autores sugerem que usando o teste lepromínico seria possível diferenciar os tatus susceptíveis dos resistentes.

Em um estudo posterior, Job *et al.*<sup>9</sup> (1987) mostraram que os quadros histopatológicos da reação de Mitsuda em tatus poderiam variar de tuberculóide, dimorfo tuberculóide, dimorfo lepromatoso e virchoviano. Dos 102 tatus testados com antígeno A contendo  $1,6 \times 10^8$  *M. leprae*/ml, nove apresentaram reação de Mitsuda positiva sendo que cinco destes animais apresentaram induração visível. Job *et al.* consideram que similarmente ao que ocorre em seres humanos, o quadro histológico da reação de Mitsuda espelha o aspecto histopatológico da doença, sugerindo que os animais poderiam desenvolver até uma forma tuberculóide da hanseníase.

Não encontramos nenhuma reação tuberculóide bem definida nos cortes examinados. Temos dessa maneira dois casos que poderíamos chamar de resposta com padrão dimorfo e os demais padrão virchoviano. O quadro caracterizando uma resposta dimorfa sugere que esses animais provavelmente não desenvolveriam a forma disseminada da doença quando inoculados, caracterizando animais mais resistentes. Os animais com padrão virchoviano de resposta corresponderiam a animais susceptíveis à infecção pelo *M. leprae*.

Quanto aos tipos de lepromina utilizados, A e H, os resultados obtidos mostraram algumas diferenças. Um estudo anterior realizado também em tatus demonstrou não haver diferenças significativas na resposta a antígenos derivados de tatus ou derivados de camundongos nude (*nu/nu*), tanto no padrão denominado pelos autores de tuberculóide, como no padrão virchoviano de resposta<sup>10</sup>. As variações de índice bacilos cópico e extensão do infiltrado parecem estar relacionadas mais à uniformidade do inóculo do que à resposta imune celular dos animais, já que o padrão celular, mesmo onde não havia bacilos, foi idêntico.

Assim como Convit<sup>4</sup>, os pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima obedeceram às normas técnicas preconizadas por Kircheimer e Storrs<sup>1</sup> na inoculação dos tatus. É possível que exista uma forma de resistência natural dos tatus sul-americanos ao *M. leprae*, que seria independente da resistência frente ao antígeno de Mitsuda. Este teste demonstra qual a reação que o indivíduo desenvolveria diante de uma infecção bem sucedida, mas outros fatores podem estar envolvidos na resistência natural à instalação de infecção, da mesma forma do que ocorre em seres humanos.

## Abstract

The armadillo has been an important experimental model for leprosy, besides it is still an important resource for bacilli. Despite the innumerous studies about armadillos of the Genus *Dasypos*, little is known about the real susceptibility of this species to the Hansen's bacillus after experimental infection with *M. leprae*. Many authors have reported that 80% of the inoculated animal

will develop the disease. In Brazil, positive inoculation of this species was obtained only twice, being raised the hypothesis that these animals are more resistant to experimental infection. In the present study the response to the Mitsuda antigen was used as an indicative of cellular immune response to *M. leprae* in armadillos. Twenty one animals were tested with two Mitsuda antigen preparations, human derived ( $4,2 \times 10^9$  bacilli/ml) and armadillo derived ( $1,6 \times 10^8$  bacilli/ml) antigens. Response after 28 days of intradermal testing showed that most of the animals presented an infiltrate composed by grouped macrophages with vacuolated cytoplasm and rare lymphocytes. This response resembles lepromatous leprosy in humans and suggests that these animals would be susceptible to development of disseminated leprosy when successfully inoculated. Bacilloscopy in these animals varied from 3+ to 4+ according to Ridley's scale (1966). Two animals developed a granulomatous reaction with borderline pattern and bacilloscopy varying from 1+ to 3+.

**Key-words:** Mitsuda reaction; *Dasybus novemcinctus*; Mitsuda antigen.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Richard W. Truman do GWL Hansen's Disease Center, na Louisiana State University, USA, por prover o antígeno derivado de tatus e a Dra. Maria Esther Sales Nogueira por prover o antígeno derivado de seres humanos.

## Referências

- 1 Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasybus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. *Int J Lepr* 1971;39:692-701.
- 2 Meyers WM. Experimental Leprosy. In: HASTINGS RC, editor. *Leprosy*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Churchill-Livingstone; 1994. p. 385-408.
- 3 Job CK. Nine-banded armadillo and leprosy research. *Indian J Pathol Microbiol* 2003; 46:541-50.
- 4 Convit J, Aranzazu N, Pinardi ME. Leprosy in the armadillos. Clinical and pathological aspects. In: *The armadillo as an experimental model in biomedical research*. Washington (DC): Pan american health organization 1978;366:41-8.
- 5 Opromolla DVA, Arruda OS, Fleury RN. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. *Hansen int* 1980;5:28-36.
- 6 Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity - a five - group system. *Int J Lepr* 1966; 34:255-73.
- 7 Job CK, Kirchheimer WF, Sanchez RM. Tissue response to Lepromin, an Index of susceptibility of the armadillo to *M. leprae* Infection - a preliminary report. *Int J Lepr* 1982;50:177-82.
- 8 Beiguelman B. A reação de mitsuda oitenta anos depois. *Hansen int* 1999;24:144-61.
- 9 Job CK, Sanchez RM, Hunt R, Hastings RC. Prevalence and significance of positive mitsuda reaction in the nine-banded armadillo (*Dasybus novemcinctus*). *Int J Lepr* 1987; 55: 685-8.
- 10 Job CK, Truman RW. Comparative study of mitsuda reaction to nude mouse and armadillo lepromin preparations using nine-banded armadillos. *Int J Lepr* 2000; 68:18-22.