

Hanseníase experimental murina: inoculação do *Mycobacterium leprae* via intranasal¹

*Murine experimental Hansen's disease: intranasal inoculation of the *Mycobacterium leprae**

Fátima Regina VILANI-MORENO²

Maria Sueli Parreira de ARRUDA³

Maria Esther Salles NOGUEIRA²

Ida Maria Foschiani Dias BAPTISTA⁴

RESUMO

Considerando as vias aéreas superiores como a mais provável porta de entrada do *M. leprae* no organismo, no presente estudo avaliou-se o comportamento do bacilo inoculado experimentalmente via intranasal. Assim, camundongos Suíços foram inoculados por instilação nasal com *M. leprae* e sacrificados em diferentes períodos de tempo. Em cada sacrifício os pulmões foram removidos e submetidos ao lavado broncoalveolar (LBA) e análise histopatológica. O LBA foi avaliado quanto ao número de bacilos recuperados e número total e diferencial de células inflamatórias; foi ainda semeado em meios de cultivo Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H9 e 7H11. No LBA foram encontrados bacilos até o 6º mês de inoculação; não houve crescimento de micobactérias nas culturas. O número total de células, linfócitos e neutrófilos do LBA obtido de camundongos infectados foi maior que o do grupo controle até o 6º mês da experimentação. A

análise histopatológica revelou pequenos infiltrados celulares distribuídos pelo parênquima pulmonar e ao redor de vasos até o 6º mês de sacrifício; não foram observadas lesões de disseminação. Os resultados obtidos revelam que a inoculação de *M. leprae*, via intranasal, em camundongos Suíços, não levou ao desenvolvimento da doença nem a multiplicação dos bacilos; assim estudos adicionais envolvendo outras linhagens de camundongos poderão ser úteis para determinar a importância da via intranasal na infecção hansênica.

Descritores: Hanseníase. Camundongo. Via intranasal. Lavado broncoalveolar.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo álcool-ácido resistente não cultivável em meios artificiais¹⁰.

A porta de entrada deste microrganismo não se encontra totalmente esclarecida. É consenso geral entre os hansenologistas que a transmissão se dá através do contato íntimo e prolongado entre pacientes multibacilíferos não tratados e indivíduos não infectados¹⁶. Como o bacilo é detectado em grande quantidade na boca e nariz de pacientes altamente bacilíferos, alguns pesquisadores têm sugerido as vias aéreas superiores como importante porta de entrada do *M. leprae*^{5,11}.

Estudos experimentais realizados com a finalidade de esclarecer esse aspecto, são raros. Ress & McDougall¹⁷, trabalhando com camundongos timentomizados e

¹ Projeto financiado pela Fundação Paulista Contra a Hanseníase (Proc. nº 003/97)

² Pesquisadora Científica, Equipe Técnica de Imunologia, Instituto "Lauro de Souza Lima", Bauru-SP.

³ Professora Doutora, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP/Bauru-SP.

⁴ Bióloga, Equipe Técnica de Microbiologia, Instituto "Lauro de Souza Lima", Bauru-SP

²⁴ Endereço para correspondência: Fátima Regina Vilani-Moreno, Equipe Técnica de Imunologia, Instituto "Lauro de Souza Lima", Rod. Comandante João Ribeiro de Barros, Km 225/226, CP 62, CEP 17001-970, Bauru-SP, Brasil. Fax: 014-2304747, Tel. 014-2302244. E-mail: Imunologia@iisl.br

infectados com *M. leprae* através de aerosol, recuperaram bacilos álcool-ácido resistentes 14 meses após a inoculação, em macerados de orelha, coxim plantar, focinho e pulmões dos animais infectados. Chehl et al.⁴, contudo, utilizando camundongos atímicos inoculados com o bacilo através da narina, pulmões, boca, estômago e pele, obtiveram infecção generalizada somente em camundongos inoculados via nasal; segundo os autores, não foram encontrados bacilos álcool-ácido resistentes nos pulmões desses animais. Mais recentemente, McDermott-Lancaster & McDougall¹⁴, empregando camundongos atímicos, obtiveram resultados semelhantes aos descritos por Ress & McDougall¹⁷ em animais timectomizados.

Considerando que os poucos experimentos envolvendo as vias aéreas superiores têm mostrado resultados divergentes, no presente estudo avaliou-se o comportamento do *M. leprae* inoculado por instilação nasal em camundongos, através da análise morfológica e baciloscóptica dos pulmões e eventuais lesões de disseminação, determinação do número de bacilos e quantificação do número total e diferencial das células inflamatórias recuperadas pelo lavado broncoalveolar (LBA).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram utilizados 73 camundongos da linhagem Swiss, com 8-10 semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto “Lauro de Souza Lima”, Bauru-São Paulo.

Inóculo: foi utilizada suspensão de *M. leprae* preparada a partir de hansenomas obtidos de paciente altamente bacilífero e virgem de tratamento específico para hanseníase. Os hansenomas foram processados em solução salina de Hank's e a concentração bacilar ajustada para 4×10^8 bacilos/ml, segundo técnica proposta por Shepard²⁰.

Para identificação do *M. leprae*, amostras da suspensão foram semeadas em meios de cultivo Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H9 e 7H11, e mantidas às temperaturas de 30 e 37°C, por 2 meses. Do mesmo modo, 30µl da suspensão foram inoculadas no coxim plantar de camundongos Suíços²⁰. Foram considerados como critérios para a identificação positiva do *M. leprae*²⁶ a ausência de bacilos álcool-ácido resistentes nesses meios de cultivo e crescimento bacilar segundo curva descrita por Shepard²⁰, no coxim plantar dos camundongos inoculados.

Inoculação: 53 animais foram anestesiados com tiopental sódico, via intraperitoneal, na dose de 30 mg/kg de peso corpóreo e inoculados via intranasal com 2×10^7

bacilos, em 50µl.

Sacrifício: os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico após 24, 48 e 72 h; 7, 15 e 30 dias e aos 2, 4, 6, 10 e 11 meses pós-inoculação. Em cada sacrifício os pulmões foram coletados e submetidos ao LBA. Foram ainda coletados coração, fígado, rins e baço.

LBA: após a remoção dos pulmões, a traquéia foi canulada e 1,0ml de solução salina estéril (SSE) foi instilada e aspirada dos pulmões com o auxílio de seringa. Este procedimento foi repetido por 6 a 7 vezes. A suspensão celular foi centrifugada e o botão de células ressuspenso em 1,0ml de SSE. Amostras do LBA foram semeadas em meios de cultivo Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H9 e 7H11, de modo a confirmar a ausência de outras micobactérias, que não o *M. leprae*, na suspensão.

Avaliação do LBA: o LBA foi avaliado quanto:

1. Número total de células inflamatórias: foi determinado adicionando-se 10µl de solução cristal violeta 0,5% em ácido acético glacial 30% a 90µl da suspensão celular. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e os resultados expressos em número absoluto de células.
2. Contagem diferencial das células inflamatórias: amostras do LBA foram citocentrifugadas e coradas por Wright. O percentual de macrófagos, linfócitos e neutrófilos foi determinado contando-se 200 células com objetiva de 100x.
3. Quantificação do número de bacilos no LBA: amostras do LBA foram fixadas em lâminas e coradas por Ziehl-Neelsen. Os bacilos foram quantificados conforme descrito por Shepard²⁰.

Avaliação histológica: Os órgãos foram fixados em formalina 10% por 24 h, recortados e submetidos aos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina-eosina e Faraco-Fite^{6,7}. As lesões foram avaliadas quanto à extensão, padrão do infiltrado inflamatório e presença de bacilos.

A extensão das lesões foi determinada em escala de 1 a 4+ (cruzes), sendo 1+ comprometimento inferior a 25% do corte histológico; 2+ comprometimento menor que 50% do corte histológico; 3+ comprometimento entre 50% - 75% do corte histológico; 4+ comprometimento superior a 75% do corte histológico²⁵. O padrão do infiltrado inflamatório foi avaliado quanto à predominância de células linfomononucleares ou polimorfonucleares e a quantificação bacilar segundo o proposto por Ridley & Hilsen¹⁸.

Grupo controle: pulmões de 20 camundongos sadios (tempo 0) foram submetidos ao LBA e histologia. O LBA foi avaliado quanto à presença de micobactérias,

através da coloração por Ziehl-Neelsen e semeadura em meios de cultivo Lowenstein-Jensen e Midedlebrook 7H9 e 7H11, e quanto à contagem do número total e diferencial das células inflamatórias. Os cortes histológicos, corados pela hematoxilina-eosina, foram avaliados quanto à presença de eventuais reações inflamatórias.

RESULTADOS

Identificação do *M. leprae*: não houve crescimento de micobactérias nos meios Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H9 e 7H11 semeados com a suspensão utilizada na inoculação experimental e com os LBA recuperados dos animais inoculados e sadios. A curva de crescimento bacilar no coxim plantar de camundongos foi característica do *M. leprae*²⁰.

Avaliação do LBA:

1. Número total de células inflamatórias: o número de células recuperadas pelo LBA de camundongos inoculados com *M. leprae* foi maior que do grupo controle até os 6 meses pós-inoculação. A partir dos 10 meses os valores caíram e se mantiveram inferiores aos do grupo controle até o final da experimentação (Tabela 1).
2. Contagem diferencial das células inflamatórias: nos animais controle a contagem diferencial revelou predominância de macrófagos, seguido de linfócitos e neutrófilos. Nos animais inoculados, embora os macrófagos fossem sempre encontrados em maior número, verificou-se aumento do percentual de linfócitos e neutrófilos até o 6º mês do experimento. Aos 10 e 11 meses os percentuais encontrados foram semelhantes aos do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade de bacilos, número total e diferencial de células inflamatórias presentes no LBA de camundongos Suíços sadios e inoculados intranasalmente com *M. leprae*. Valores expressos como média de 20 animais (tempo 0) e 4 animais inoculados/grupo.

Tempo de sacrifício	Nº de bacilos (x 10 ⁵)	Nº total de células (x 10 ⁵)	Tipo de células inflamatórias* (%)		
			M	L	PMN
0	Neg.	2,6	91	8	1
24 h	10,0	5,0	65	19	16
48 h	6,0	4,8	83	12	5
72 h	6,0	5,5	76	15	9
7 dias	2,0	4,9	81	13	6
15 dias	0,3	3,5	82	12	6
30 dias	0,6	3,0	83	12	5
2 meses	0,7	2,9	79	15	6
4 meses	0,5	3,1	81	14	5
6 meses	0,9	3,0	77	17	6
10 meses	Neg	2,2	87	10	3
11 meses	Neg	2,0	88	10	2

* M= macrófago, L= linfócito, PMN= neutrófilo.

3. Quantificação de bacilos: os dados obtidos quanto à presença de bacilos estão sumarizados na Tabela 1. Em 64% dos animais inoculados foram recuperados bacilos pelo LBA. Como pode ser observado, o número de bacilos foi elevado até as 72 horas pós-inoculação. Embora a partir do 7º dia os valores tenham diminuído, foram detectados bacilos até o 6º mês do experimento (Figura 1).

Avaliação histológica: a análise do quadro histológico revelou que, até o 6º mês da experimentação, 60% dos animais apresentaram pequenos infiltrados celulares que comprometiam menos de 25% do corte histológico (padrão 1+) e encontravam-se distribuídos pelo parênquima pulmonar e ao redor de vasos (Figura 2). Em 52% dos animais foram observados bacilos intracelulares, padrão 1+. Não foram encontradas lesões de disseminação em nenhum animal inoculado, durante o período de estudo.

•Os achados do LBA e histopatológicos revelaram correlação positiva entre percentual de linfócitos e neutrófilos do LBA e presença dessas células nos tecidos.

À avaliação histológica, pulmões de camundongos sadios (grupo controle) não exibiam qualquer lesão ou infiltrado inflamatório.

DISCUSSÃO

Admitindo-se a via respiratória como porta de entrada onde o bacilo proliferaria para depois disseminar-se por via linfohematogênica, a evolução posterior da doença iria depender da intensidade da proliferação bacilar nesta primeira localização, da capacidade de filtro do sistema mononuclear fagocitário e da reatividade dos tecidos onde os bacilos iriam posteriormente se abrigar³.

Partindo dessas considerações, no presente estudo investigou-se a reatividade no tecido pulmonar de camundongos, frente ao *M. leprae*, através da análise do LBA, das lesões de inoculação e eventuais lesões de disseminação.

Experimentalmente, o LBA tem sido utilizado no estudo de diversas patologias pulmonares, sendo as mais freqüentes as de etiologia fúngica^{1,13,19,21} e viral^{2,12,15,23}. Na hanseníase, contudo, os poucos trabalhos experimentais não abordam o LBA.

Neste estudo verificou-se que em camundongos inoculados com *M. leprae* o número total de células recuperadas pelo LBA foi maior que o do grupo controle até o 6º mês. Aos 10 e 11 meses, períodos em que não detectou-se bacilos nos pulmões, os valores foram semelhantes aos dos animais controles.

Com relação à contagem diferencial das células, verificou-se que o LBA de animais sadios, à semelhança do observado por outros autores^{1,8,9,22}, exibiu sempre

predominância de macrófagos, seguido de linfócitos e neutrófilos. Também nos animais infectados com *M. leprae*, os macrófagos foram sempre as células predominantes, embora o percentual de linfócitos e neutrófilos estivesse elevado na maioria dos tempos de sacrifício da experimentação. Esses resultados são semelhantes aos observados por Vilani-Moreno et al.²⁵ quando da avaliação do LBA de camundongos Suíços inoculados com *Paracoccidioides (P.) brasiliensis*, via endovenosa.

Correlacionando os achados do LBA com possíveis alterações histológicas, verificou-se que 60% dos pulmões dos animais inoculados com *M. leprae* apresentavam pequenos infiltrados celulares compostos por macrófagos alveolares, linfócitos e neutrófilos. Em 64% dos animais foram observados bacilos no LBA detectados pela coloração Ziehl-Neelsen.

Do mesmo modo, houve uma correlação positiva entre percentual de linfócitos e neutrófilos do LBA e presença dessas células nos tecidos. Resultados semelhantes foram observados por Baughman et al.¹ utilizando modelo murino de histoplasmose pulmonar, por Vaux-Peretz et al.²⁴ em camundongos infectados com vírus sincicial e por Vilani-Moreno et al.²⁵ em camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Assim, os resultados obtidos neste estudo, associados com os presentes na literatura, demonstram que a população celular recuperada pelo LBA reflete o infiltrado celular presente nos pulmões.

Com relação à presença de bacilos nas lesões, verificou-se que do início até o 6º mês da experimentação, os animais apresentavam bacilos localizados no citoplasma macrofágico. Na hanseníase humana, em situações de intensa atividade da doença também pode-se encontrar bacilos em macrófagos nos alvéolos e septos pulmonares, ou ainda, em pequenos conglomerados de macrófagos presentes nos septos alveolares¹⁰. De modo geral, no entanto, não se observa comprometimento pulmonar na hanseníase humana.

No que diz respeito à quantidade de bacilos recuperados pelo LBA, chama a atenção a variação do número obtido em um mesmo intervalo de tempo (dados não mostrados). Considerando que McDermott-Lancaster & McDougall¹⁴ obtiveram resultados semelhantes em camundongos desnudos inoculados com *M. leprae* via traqueal, é possível que os camundongos Suíços também exibissem alterações individuais na velocidade de seus macrófagos em promover o clearance bacilar.

Cabe ainda considerar que embora os bacilos estivessem presentes nos pulmões até o 6º mês da experimentação, eles não foram capazes de provocar infecção generalizada. Na hanseníase humana, tem sido sugerido que os bacilos após multiplicarem-se nos locais

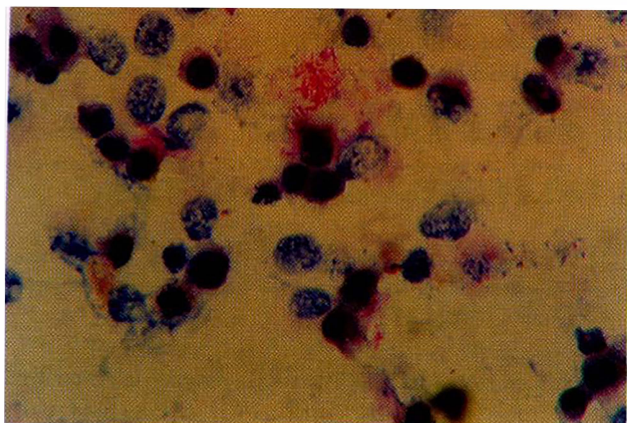


Fig. 1: LBA de camundongo Suíço com 1 mês pós-inoculação. Presença de macrófagos, linfócitos e bacilos álcool-ácido resistentes. Coloração por Ziehl-Neelsen, 1000x.

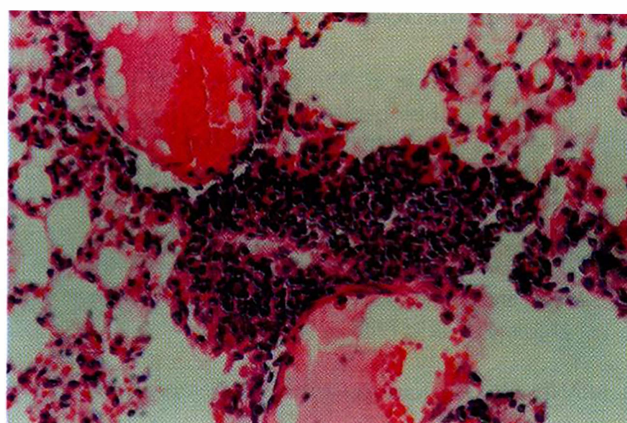


Fig. 2: Histologia do pulmão de camundongo Suíço, com 1 mês pós-inoculação. Pequeno infiltrado inflamatório próximo a vaso e bronquíolo. Coloração HE, 400x.

de inoculação sejam englobados pelos macrófagos e carregados para outros locais, onde numa fase mais tardia da infecção se multiplicariam e causariam doença¹⁶. Experimentalmente, contudo, e utilizando as vias aéreas superiores como porta de entrada, não se conseguiu dados que comprovassem essa hipótese. Do mesmo modo que o observado por McDermott-Lancaster & McDougall¹⁴ em camundongos desnudos, os animais utilizados neste trabalho não apresentaram lesões de disseminação ou bacilos detectáveis pelo Faraco-Fite no coração, fígado, baço e rins. Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que a inoculação de *M. leprae*, via intranasal, em camundongos Suíços, não levou ao desenvolvimento da doença nem a multiplicação dos bacilos, assim estudos adicionais envolvendo outras linhagens de camundongos poderão ser úteis para determinar a importância da via intranasal na evolução da infecção hansênica.

SUMMARY

*Considering the upper airways the most likely infective route for the *M. leprae*, the present study evaluated the behavior of the bacilli experimentally inoculated via intranasal. Thus, Swiss mice were inoculated*

*with *M. leprae* by nasal instillation and then sacrificed in different periods of time. Lungs were removed and submitted to bronchoalveolar lavage (BAL) and histopathological exam in each sacrifice. The number of bacilli recovered and the total and differential number of inflammatory cells were evaluated in the BAL. The BAL was also cultured in Lowenstein-Jensen and Middlebrook 7H9 and 7H11 media. Bacilli were found in the BAL until the 6th month after inoculation. Cultures for mycobacteria were all negative. The total number of cells, lymphocytes and neutrophils in the BAL of infected mice was higher than in the control group until the 6th month of experimentation. The histopathological analysis showed small cellular infiltrates distributed throughout the pulmonary parenchyma and around vessels, up to the 6th month of sacrifice. Lesions of dissemination were not found. The results obtained revealed that inoculation of *M. leprae* via intranasal in Swiss mice did not result in development of disease and neither in multiplication of the bacilli. Therefore, additional studies involving other strains of mice would be useful to determine the importance of the intranasal via in leprosy infection.*

Uniterms: Leprosy. Mice. Intranasal via. Bronchoalveolar lavage.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUGHMAN, R.P. et al. The pathogenesis of experimental pulmonary histoplasmosis. Correlative studies of histopathology, bronchoalveolar lavage, and respiratory function. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.134, p.771-776, 1986.
2. BILYK, N. et al. Functional studies on macrophage populations in the airways and the lung wall of SPF mice in the steady-state and during respiratory virus infection. *Immunology*, v.65, p.417-425, 1988.
3. BRAND, P.W. Temperature variation and leprosy deformity. *Int. J. Leprosy.*, v.27, p.1-7, 1959.
4. CHEHL, S. et al. Transmission of leprosy in nude mice. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v.34, p. 1161-1166, 1985.
5. DAVEY, T.F., REES, R.J.W. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Leprosy Rev.*, v.45, p.121-134, 1974.
6. FARACO, J. Bacilos de Hansen e cortes de parafina: Método complementar para pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. *Rev. bras. Leprol.*, v.6, p.177-180, 1938.
7. FITE, G.L. Staining of acid-fast bacilli in parafin sections. *Am. J. Pathol.*, v.14, p.491-507, 1938.
8. FREUDENBERG, N. et al. Function and "homing" of the lung macrophages. I. Evidence of functional heterogeneity of mobile cells of the murine lung parenchyma in the bronchoalveolar lavage (BAL). *Virchows Arch. B Cell Pathol.* v.64, p.191-197, 1993.
9. HALEY, P.J. et al. Comparative morphology and morphometry of alveolar macrophages from six species. *Am. J. Anat.*, v.191, p.401-407, 1991.
10. HASTINGS, R. C. *Leprosy*. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 470p.
11. HUBSCHER, S. et al. Discharge of *Mycobacterium leprae* from the mouth in lepromatous leprosy patients. *Leprosy Rev.*, v.50, p.45-50, 1979.
12. KIMPEN, J.L.L., OGRA, P.L. T cell redistribution kinetics after secondary infection of BALB/c mice with respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.*, v.91, p.78-82, 1993.
13. LEVITZ, S.M., DIBENEDETTO, D.J. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.*, v.142, p.659-65, 1989.
14. McDERMOTT-LANCASTER, R.D., McDOUGALL, A.C. Mode of transmission and histology of *M. leprae* infection in nude mice. *Int. J. Exp. Path.*, v.71, p.689-700, 1990.
15. OPENSHAW, P.J.M. Flow cytometric analysis of pulmonary lymphocytes from mice infected with respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.*, v.75, p.324-8, 1989.
16. PALLEN, M.J., McDERMOTT, R.D. How might *Mycobacterium leprae* enter the body? *Leprosy Rev.*, v.57, p.289-297, 1986.
17. REES, R.J.W., McDOUGALL, A.C. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *Int. J. Leprosy*, v.44, p.63-68, 1976.
18. RIDLEY, D.S., HILSON, G.R.F. A logarithmic index of bacilli in biopsies. I. Method. *Int. J. Leprosy*, v.35, p.184-186, 1967.
19. SAWYER, R.T. Experimental pulmonary candidiasis. *Mycopathologia*, v.109, p.99-109, 1990.
20. SHEPARD, C.C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. *J. Exp. Med.*, v.112, p.445-454, 1960.
21. SUGAR, A.M., PICARD, M. Macrophage and oxidant-mediated inhibition of the ability of live *Blastomyces dermatitidis* conidia to transform to the pathogenic yeast phase; implications for the pathogenesis of dimorphic fungal infections. *J. Infect. Dis.*, v.163, p.371-5, 1991.
22. TAKIZAWA, H. et al. Experimental hyper-sensitivity pneumonitis in the mouse: histologic and immunologic features and their modulation with cyclosporin A. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.81, p.391-400, 1988.
23. VAUX-PERETZ, F., MEIGNIER, B. Comparison of lung histopathology and bronchoalveolar lavage cytology in mice and cotton rats infected with respiratory syncytial virus. *Vaccine*, v.8, p.543-8-1990.
24. VAUX-PERETZ, F. et al. Comparison of the ability of formalin-inactivated respiratory syncytial virus, immunopurified F, G and N proteins and cell lysate to enhance pulmonary changes in BALB/c mice. *Vaccine*, v.10, p.113-118, 1992.
25. VILANI-MORENO, F.R. et al. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia*, v.141, p.79-91, 1998.
26. WHO - World Health Organization- *Laboratory Techniques for Leprosy* (WHO/CSS/LEP/86.4), 1987, p.107-118.