

EVOLUÇÃO DAS LESÕES INDUZIDAS POR MICOBACTÉRIAS BCG E POR H₃₇Rv EM HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)*

Eliana ROXO¹
Idércio Luiz SINHORINI²
Mário MARIANO³

RESUMO - Foram investigados experimentalmente alguns aspectos da patogenia da tuberculose através da inoculação de uma cepa de micobactéria de virulência atenuada - BCG e outra cepa altamente virulenta - *M.tuberculosis* H₃₇Rv no tecido sub-epitelial do coxim plantar e no tecido sub-epitelial do terço distal da bolsa cervical de hamster, um sítio desprovido de drenagem linfática.

A inoculação desses agentes determinou diferentes perfis de evolução das lesões, sendo que as lesões produzidas pelo BCG na pata apresentaram uma tendência de declínio do tamanho após 21 dias e as lesões produzidas pelo H₃₇Rv mostraram uma evolução progressiva. O mesmo perfil foi observado nas lesões induzidas na bolsa cervical por ambos os agentes. Contudo, diferentemente do BCG, o H₃₇Rv disseminou-se para os órgãos internos, causando extensas lesões. A inoculação de BCG ou H₃₇Rv na pata provocou um aumento de 21 e 68 vezes, respectivamente, o peso do linfonodo satélite em relação ao controle, evidenciando a disseminação do bacilo por via linfática. Todavia, quando essas amostras foram inoculadas na bolsa, não determinaram significativas mudanças de peso do linfonodo cervical, mas evidenciou-se a disseminação do bacilo virulento por via sanguínea, pelas lesões produzidas no baço e pulmão.

Palavras-chave: hamster, *M.bovis* BCG, *M.tuberculosis*.

1. INTRODUÇÃO

Diversos autores afirmam que a severidade da tuberculose é determinada pela susceptibilidade do hospedeiro associada à virulência do bacilo^{2,4,8,13,14}.

O grupo de microrganismos representado pelas micobactérias tem como característica fundamental uma parede celular complexa, constituída por 60% de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos e por peptídeos^{2,11,14} sendo alguns desses antígenos micobacterianos comuns a várias espécies do gênero. Esses fatores constituintes da parede

podem estar ligados à capacidade de sobrevivência da micobactéria dentro das células do hospedeiro e sua patogenicidade^{11,14}.

A lesão granulomatosa se forma independente de imunidade sistêmica, contudo linfócitos sensibilizados são capazes de modificar o volume da lesão^{9,12} e a cronicidade da doença parece estar ligada à capacidade de sobrevivência do microrganismo no interior do macrófago do hospedeiro².

É de consenso geral que cepas atenuadas podem produzir reação proliferativa,

* Parte de tese de mestrado em Patologia Experimental e Comparada na Fac. Med. Vet. Zoot. - Univ. São Paulo

¹ Pesquisadora Científica, Chefe da Seção de Patologia Clínica - Instituto Biológico - Cx. P. 7119 - Sao Paulo (01064-970)

² Prof. Dr. - Depto. Patologia da Fac. Med. Vet. Zoot. - Univ. São Paulo

³ Prof. Titular - Depto. Imunopatologia - Inst. Biociências - Univ. São Paulo.

que tendem a resolução e que cepas virulentas produzem extensas lesões progressivas. Contudo, há controvérsias de que as lesões sejam determinadas por produtos do metabolismo do bacilo ou enzimas autolíticas, pela hipersensibilidade tardia desenvolvida durante a multiplicação do bacilo no organismo hospedeiro ou pela combinação de ambos fatores^{1,2,4,7,13}.

O hamster proporciona um sítio imunologicamente privilegiado em sua bolsa cervical, cujo tecido sub-epitelial do terço distal é desprovido de drenagem linfática, permitindo o estudo da evolução da lesão na ausência de imunidade, sem a utilização de métodos drásticos

3.12

MEDAWAR¹⁰ em seus experimentos com enxertos de pele em sítios imunologicamente privilegiados, como câmara anterior do olho e cérebro, verificou que o sistema de drenagem linfática é necessário para a criação de um estado de imunidade específica, embora não seja necessário para revelar uma resposta imune.

O golden-hamster (*Mesocricetus auratus*) é relativamente susceptível ao bacilo bovino e humano, bem como a outras micobactérias⁶. A inoculação desse animal com altas doses de BCG causa doença progressiva e fatal, mas nem todas as cepas são igualmente ativas⁵. Tem sido largamente empregado na avaliação de virulência de cepas de BCG utilizadas para produção de vacinas⁵.

Com a finalidade de se obter subsídios para um melhor esclarecimento da patogenia da tuberculose, foram realizados experimentos que consistiram na inoculação de uma cepa de micobactéria de virulência atenuada - BCG e outra cepa altamente virulenta - *M.tuberculosis* amostra H₃₇Rv no tecido sub-epitelial do coxim plantar e no tecido sub-epitelial no terço distal da bolsa cervical de hamster, contribuindo assim para a avaliação da participação da virulência do agente, da participação das vias sangüínea e linfática na disseminação do agente e da imunidade sistêmica e local no desenvolvimento da lesão tuberculosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animals: Foram utilizados 18 golden-hamsters

(*Mesocricetus auratus*) outbred, machos adultos, com peso corpóreo entre 80 e 120 gramas.

2. Inóculo:

a) Onco BCG Oral (cepa Moreaux, Rio de Janeiro), contendo 100 mg por ml, com aproximadamente 10⁷ germes viáveis por ml, produzido pelo Instituto Butantã, São Paulo.

b) *Mycobacterium tuberculosis* cepa H₃₇Rv, oriunda do Centro Panamericano de Zoonoses, Argentina. Foi preparada uma suspensão nos moldes do Onco BCG oral utilizado, contendo 100 mg de bacilos por ml de meio de Souton, separando-se os grumos por agitação em Vortex, em frascos tipo penicilina com tampa de rosca, contendo aproximadamente 3 g de pérolas de vidro de 3 e de 4 mm de diâmetro. Nos testes de viabilidade foram encontrados aproximadamente 10⁻⁷ bacilos viáveis por ml.

3. Anestésico: Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico p.a., em jarras de anaerobiose, para aplicação dos inóculos e para o sacrifício desses.

4. Sítios de Inoculação: Os inóculos foram aplicados na dose de 0,1 ml com seringa de insulina descartável, no coxim plantar ou na bolsa cervical.

5. Avaliação macro e microscópica: Os animais foram sacrificados em intervalos variados conforme o experimento. Realizada a necropsia, foram então colhidos linfonodos poplíteo e/ou cervical, pesados e fixados em solução de formol a 10%. As patas e bolsas cervicais inoculadas foram colhidas e conservadas em solução de formol a 10%.

As lesões produzidas na pata e na bolsa cervical foram medidas com paquímetro digital Mitutoyo^R de alta precisão.

Os materiais colhidos foram incluídos em parafina para realização de cortes de 5 µm de espessura, corados pelo método de hematoxilina-eosina (H.E.).

3. RESULTADOS

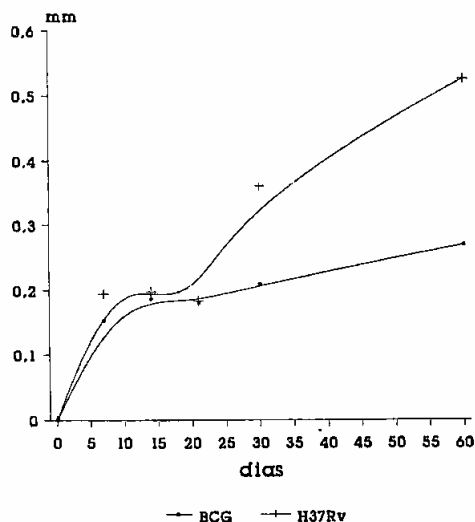
1. Evolução das lesões induzidas por BCG e

por H₃₇Rv na pata e na bolsa cervical do hamster

As lesões induzidas na pata por BCG tiveram um caráter proliferativo, até aproximadamente 21 dias, tendendo a

após esse período. Já as lesões induzidas por H₃₇Rv tiveram evolução marcadamente progressiva durante todo o período de observação

FIG. 1 - Evolução do granuloma em hamsters inoculados no coxim plantar direito com BCG ou H₃₇Rv.



do experimento, como se observa na Fig. 1.

Aos sete dias da inoculação de BCG na pata microscopicamente observou-se a presença da lesão granulomatosa com predomínio de células mononucleares, presença de grandes quantidades de células polimorfonucleares, halo compacto de pequenas células mononucleares na periferia da lesão e a presença do componente necrótico. A partir de 14 dias da inoculação do BCG, observou-se halo de células mononucleares mais acentuado na periferia da lesão, ausência do componente necrótico e predomínio das células macrofágicas de citoplasma amplo e núcleo com cromatina frouxa.

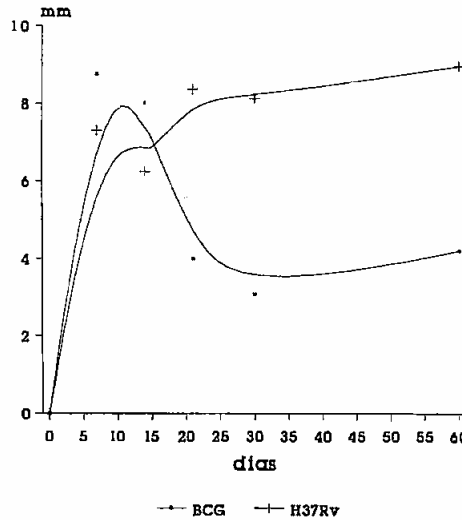
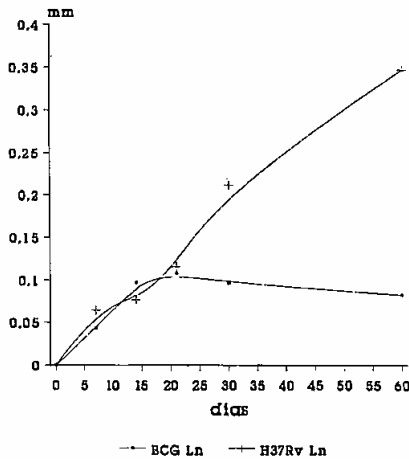
A inoculação com H₃₇Rv na pata produziu lesão granulomatosa, que aos 7 dias apresentava microscopicamente pequena participação de células polimorfonucleares, discreto componente necrótico, presença de células mononucleares na periferia da lesão e células mononucleares de citoplasma amplo e cromatina frouxa no centro.

A lesão na bolsa cervical do hamster induzida por BCG mostrou acentuado aumento de tamanho até aproximadamente o 14^o dia da

inoculação, tendendo a resolução após esse período, como se observa na Fig. 2. As lesões induzidas por H₃₇Rv na bolsa cervical apresentaram aspecto proliferativo e mais uniforme, aumentando em diâmetro no decorrer do tempo de inoculação, como se observa na Fig. 2. Aos 60 dias da inoculação, as lesões por H₃₇Rv foram intensas, apresentando necrose e fistulação, ocorrendo a generalização do processo com lesões granulomatosas no pulmão e esplenomegalia.

Na bolsa cervical, a inoculação de BCG produziu a formação de lesão onde o aspecto microscópico, demonstrou o predomínio de células macrofágicas de citoplasma amplo com núcleo de cromatina frouxa, ausência de halo de células mononucleares na periferia da lesão e presença de poucas células polimorfonucleares a partir do 7^o dia. Aos 60 dias, observou-se a presença de lesão residual em alguns animais, contendo células macrofágicas de citoplasma amplo e núcleo de cromatina frouxa.

A lesão induzida por H₃₇Rv na bolsa cervical foi semelhante àquela induzida por BCG

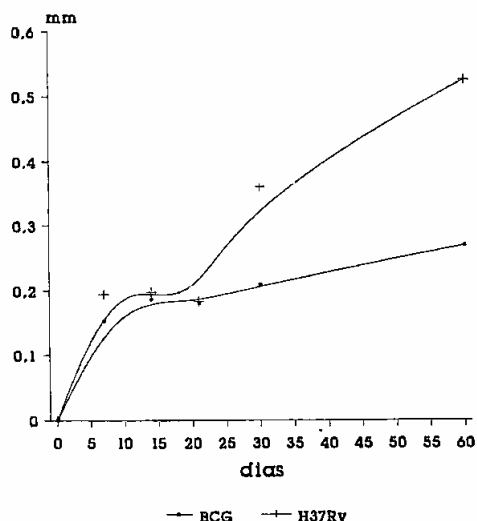
FIG. 2 - Evolução do granuloma em hamsters inoculados na bolsa cervical com BCG ou H₃₇Rv.FIG. 3 - Variação de peso de linfonodo poplíteo de hamster inoculados com BCG ou H₃₇Rv no coxim plantar.

aos 7 dias, tomando aspecto mais agressivo ao longo do tempo. Observou-se microscopicamente a presença de grande número de células polimorfonucleares, com predomínio de células mononucleares durante os primeiros estágios de evolução da lesão, apresentando a partir do 30º dia da inoculação numerosos vasos sanguíneos e pequenos focos de necrose.

2. Fenômenos dependentes de vasos linfáticos e sanguíneos

O linfonodo poplíteo do membro que recebeu inoculação de BCG no tecido sub-epitelial do coxim-plantar, aumentou em até 21 vezes entre 21 e 30 dias, tendendo à diminuição após esse período. Já com H₃₇Rv, o peso do linfonodo poplíteo aumentou significativamente durante todo o período observado, em até 68 vezes, como se verifica na Fig. 3.

Os linfonodos cervicais não apresentaram variação significativa de peso, tanto no lote que recebeu inoculação de BCG na bolsa

FIG. 4 - Variação de peso de baço de hamsters inoculados com BCG ou H³⁷Rv na bolsa cervical.

cervical, quanto o que recebeu H₃₇Rv nesse mesmo sítio. Contudo, houve um acentuado aumento de volume do baço dos animais, 60 dias após terem sido inoculados com H₃₇Rv na bolsa cervical, como se observa na Fig. 4.

3. DISCUSSÃO

Como afirmam YOUMANS¹⁴ e SINHORINI¹², a lesão granulomatosa se desenvolve na presença e na ausência de imunidade sistêmica, não apresentando no presente experimento diferenças muito acentuadas microscopicamente entre as cepas BCG e H₃₇Rv, quando inoculadas na pata ou mesmo na bolsa cervical do hamster.

A lesão induzida na pata aumentou gradativamente, tanto por BCG quanto por H₃₇Rv. Contudo, após 30 dias da inoculação, a lesão por BCG assumiu características de resolução, enquanto que a lesão por H₃₇Rv mostrou um caráter marcadamente progressivo, com generalização do processo. Essas observações se assemelham aos experimentos de ALSAADI e SMITH¹, que verificaram em cobaias que a cepa H₃₇Ra (*M.tuberculosis* avirulento) se desenvolve no pulmão numa fase inicial de aumento logarítmico, seguida de uma fase estacionária e uma fase de declínio. STEENKEN et al¹³ também

afirmam que uma variante virulenta causa doença progressiva, enquanto que uma variante avirulenta causa uma infecção "preguiçosa" e em resolução.

Caráter semelhante de lesão regressiva com cepa atenuada e de lesão progressiva com cepa virulenta foi observado na bolsa cervical do hamster, sugerindo que a virulência do agente desempenha papel preponderante no desenvolvimento da lesão, mesmo num sítio de privilégio imunológico, desprovido de drenagem linfática.

Histologicamente, na bolsa cervical do hamster a inoculação de BCG produziu uma lesão granulomatosa, que apresentava na fase estacionária de evolução uma uniformidade celular, composta predominantemente por células de aspecto epitelióide. Quanto à lesão produzida por H₃₇Rv, essa apresentou o mesmo aspecto anterior, mas com características evolutivas, apresentando necrose e hiperemia mais acentuadas que nas lesões pelo bacilo menos virulento.

A vascularização da lesão aumentou a partir do 30º dia da inoculação na periferia da lesão e aumentou a quantidade de fibroblastos circunscrevendo esta, quando localizada na pata. Na bolsa cervical do hamster, a lesão se assemelhava a um acúmulo de macrófagos e a vascularização acentuou-se a partir do 30º dia da

inoculação, distribuindo-se desordenadamente pela lesão, sendo ligeiramente mais acentuadas nas lesões induzidas por H₃₇Rv.

O linfonodo poplíteo satélite à pata inoculada aumentou de peso até a fase estacionária de evolução da lesão induzida no coxim plantar por BCG em até 21 vezes o peso original, porém não diminuiu aos 30 ou 60 dias da inoculação, como na fase de regressão da lesão. Nos animais inoculados com H₃₇Rv na pata, o linfonodo aumentou gradativamente, atingindo 68 vezes o peso em relação ao controle não inoculado, evidenciando o caráter mais agressivo dessa cepa.

A variação acentuada de peso do linfonodo satélite à lesão tuberculosa, salienta a participação da drenagem linfática na disseminação do agente.

A inoculação de BCG, como de H37Rv na bolsa cervical do hamster não provocou aumento significativo do peso dos linfonodos cervicais, contudo a lesão provocada pelo bacilo virulento se disseminou tardiamente, causando lesões principalmente no pulmão e baço, sugerindo assim a participação da disseminação por via hemática das lesões tuberculosas na bolsa, provenientes da inoculação de cepas virulentas e com longos períodos de evolução.

A disseminação do agente (H37Rv) se fez principalmente por via linfática, evidenciada pelo aumento significativo do linfonodo poplíteo que drenava a região da pata inoculada, mas

também por via sanguínea, uma vez que na bolsa cervical, onde estavam ausentes os vasos linfáticos, abundavam vasos sanguíneos nas lesões.

4. CONCLUSOES

Significativas diferenças macroscópicas foram observadas durante a evolução das lesões, comparativamente entre BCG e H₃₇Rv, tanto na pata quanto na bolsa cervical de hamster.

Não obstante as diferenças macroscópicas, microscopicamente não se observou diferenças marcantes entre as lesões produzidas por BCG e H₃₇Rv, notadamente quando inoculados no tecido sub-epitelial do coxim plantar do hamster.

Apesar da alta susceptibilidade do hamster a diferentes amostras de micobactérias, a virulência da amostra determinou o perfil de evolução das lesões.

A disseminação por via linfática do agente, evidenciada através do aumento de peso do linfonodo satélite, demonstrou-se verdadeira para as inoculações na pata.

Quando a inoculação ocorreu no tecido sub-epitelial do terço distal da bolsa cervical do hamster, embora a disseminação da amostra virulenta tenha sido evidenciada nos órgãos internos, não houve aumento de volume de linfonodo satélite, sugerindo a disseminação por via sanguínea.

SUMMARY - *Some aspects of the pathogeny of tuberculosis was experimentally investigated by inoculating either an attenuated mycobacteria strain - BCG or a virulent strain - M.tuberculosis H₃₇Rv into the foot pad or the cheek pouch of hamster. The inoculation of these agents determined different patterns of lesion. The BCG-induced lesions in the foot pad had a tendency to decrease in size. On the other hand, the lesions by H₃₇Rv showed a progressive evolution. The same pattern of evolution was observed with the lesions induced in the cheek pouch. However, the H₃₇Rv disseminated to internal organs and the BCG did not.*

Key-words: hamster, *M.bovis* BCG, *M.tuberculosis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALSAADI, A; SMITH, D. The fate of virulent and attenuated mycobacteria in guinea pigs infected by the respiratory route. ***Am.Rev.Resp.Dis.***, **107**:1041-1046,1973.
2. BARKER, C.F.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. ***Advances in Immunology***, **25**: 1-54, 1977.
3. BARKSDALE, L.; KIM, L.S. Mycobacterium. ***Bacteriological Reviews***, 41(1): 217-372, 1977.
5. BUENO, P. Estudos sobre a causa da necrose no processo tuberculoso. ***Rev.Bras.Tub.***, **31(149)**: 835-842, 1953.
7. BUNCH-CHRISTENSEN, K.; LADEFOGED, A.; GUID, J. The virulence of some strains of BCG for golden hamster. ***Bull. Org. Mond. Santé***, **43**: 65-70, 1970.
8. DENNIS, E.W.; GOBLE, F.C.; BERBERIAN, D.A.; FRELIH, E.J. Experimental tuberculosis of the syrian hamster (*Cricetus auratus*). ***Annals N.Y. Academy of Sciences***, **52(1)**: 646-661, 1949.
9. LURIE, M.B.; DANNENBERG, A.M. Jr. Macrophage function in infectious disease with inbred rabbits. ***Bacteriological Reviews***, **29(4)**: 466-476, 1965.
10. LURIE, M.B.; ZAPPASODI, P.; TICKNER, C. On the nature of genetic resistance to tuberculosis in the light of the host-parasite relationships in natively resistant and susceptible rabbits. ***Am. Rev. Resp. Dis.***, **2(3)**: 297-323, 1955.
9. MARIANO, M. The experimental granuloma. (dados não publicados).
10. MEDAWAR, P.B. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. ***Brit. J. exp. Path. London***, **29**: 58-69, 1948.
11. RATLEDGE, G.; STANFORD, J. ***The biology of mycobacteria***, ed. 2, Acad. Press. London, 1982. 1(2): 544.
12. SINHORINI, I.L. ***Formação do granuloma induzido pelo BCG no hamster. Influência do "PPD" na evolução das lesões***. São Paulo, 1983. p. (Tese de Doutorado/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP).
13. STEENKEN, W. Jr.; OATWAY, W.H. Jr.; PETROFF, S.A. Biological studies of the tubercle bacillus. II. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H). ***J.Exp.Med.***, **60(2)**: 515-540, 1934.
14. YOUNG, G.P. ***Tuberculosis***. 1 ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 1979, 511p.