Mem. Inst. Butantan
36: 57-66, 1972.

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA COMPARATIVA DA INTENSIDADE DO FENÔMENO PROLIFERATIVO NA IMUNIDADE CELULAR À TUBERCULOSE EM COBAIOS VACINADOS ORALMENTE E INTRA-DERMICAMENTE PELO BCG.

JESUS CARLOS MACHADO; BRUNO SOERENSEN; JANDYRA PLANET DO AMARAL; EVANI APARECIDA PINTO e NIDIA DE DONOSO.

Seção de Anatomia Patológica e Seção de Bacteriologia do Instituto Butantan

RESUMO — Os autores estudaram a intensidade da reação imunológica celular à tuberculose, comparativamente em dois grupos de cobaias que foram vacinadas pelo BCG por via intra-dérmica e via oral. Após a infecção experimental por via oral destes grupos e mais um controle, os autores estudaram os seguintes órgãos: pulmão, gânglios linfáticos do mediastino, baço e fígado.

A avaliação da intensidade da reação imunológica celular foi feita levando-se em conta as áreas que apresentavam esse tipo de reação, dentro da área total do corte histológico, procedendo-se a elaboração de um gráfico com mensuração planimétrica.

Os autores verificaram que dos órgãos estudados, as reações imunológicas foram mais intensas no pulmão dos 3 grupos e foi sempre observado maior área de reação imunológica celular nos órgãos dos animais previamente vacinados por via intradérmica. Isto sugere ser a via intradérmica de vacinação a mais eficiente no sentido de provocar maior intensidade de reação imunológica celular à tuberculose.

UNITERMOS — Imunopatologia da tuberculose. Vacinação pelo BCG

INTRODUÇÃO

Se não existem dúvidas no que diz respeito à eficácia da vacinação oral pelo BCG, conforme atesta recente avaliação de GERNEZ-RIEUX, GERVOIS e NISTRI (2) ao estudarem a incidência comparativa de dois grupos humanos da cidade de Roubaix (França) — cuja vacinação tinha sido feita por Calmette — onde encontraram 50% menos de casos de tuberculoses ativa nos vacinados do que nos não vacinados, a mesma certeza não subsiste quando desejamos avaliar a proteção ministrada pela vacinação oral em comparação com a intradérmica.

Seria extremamente interessante se pudéssemos avaliar experimentalmente de algum modo, a intensidade da reação provocada pela vacina protetora — BCG no caso — quando administrada por duas vias diferentes, ou seja a intradérmica e a oral. E isso teria significado utilíssimo porque o Brasil é dos poucos países que fazem a prevenção da tuberculose humana pela vacinação

Trabalho realizado com o auxílio do F.E.D.I.B.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

oral pelo BCG. Quando sabemos das extremas dificuldades que existem para critérios seguros da avaliação estatística dessa proteção em grupos humanos selecionados em nosso país, podemos bem compreender da extrema utilidade de tal trabalho experimental.

Em continuação a estudos desenvolvidos nesse sentido por dois autores (B. Soerensen e J. P. Amaral (6)) do presente trabalho, procurou-se neste analisar histologicamente a intensidade das reações proliferativas, ocorridas na imunidade celular contra a tuberculose experimental em cobaios previamente vacinados pelo BCG por via oral e intradérmica.

Estudos quantitativos das reações imunológicas celulares ao bacilo de Koch já foram realizados tanto macro como microscopicamente. Assim, Lorian e Zanon em 1964 (5) para estudar comparativamente as lesões pulmonares na tuberculose experimental, estabeleceram como critério tres graus de comprometimento a saber:

1 — Poucos tubérculos (menos de 10, independente da localização), 2 — Muitos tubérculos (mais de 10, até tubérculos confluentes); 3 — caseificação (pelo menos uma parte caseificada, com volume de uma esfera de 5 mm).

Ionesco e Eskenay, 1970 (3) utilizaram para estudo comparativo das lesões tuberculosas o método planimétrico que consistia na projeção sobre papel milimetrado de cortes histológicos onde se pode calcular a superfície total do órgão e as áreas comprometidas fazendo um levantamento porcentual da superfície comprometida. No nosso trabalho achamos conveniente elaborar uma avaliação microscópica da área com os fenômenos imunológicos presentes em relação com o normal, seguida de gráfico com avaliação planimétrica do mesmo. Analisamos comparativamente os tres grupos estudados ou seja um grupo previamente vacinado por via oral, outro por via intradérmica e finalmente um controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais escolhidos para a experimentação foram cobaias, as quais como é sabido, independentes do sexo, apresentam grande susceptibilidade ao bacilo da tuberculose.

Foram utilizados 132 animais com aproximadamente 1 ano de idade, inoculados com 2 mg de bacilos virulentos da tuberculose da linhagem H37Rv. A inoculação foi feita por via traqueal por ser a via normal de contágio. Desta amostra, 51 animais foram vacinados com 100 mg de BCG por via oral, outros 53 animais foram vacinados com 0,1 mg de BCG por via intradérmica, sendo que em todos os lotes a inoculação dos bacilos virulentos foi feita 45 dias após a vacinação. As 28 cobaias restantes foram utilizadas como grupo controle.

Dos animais que morreram e dos sacrificados foram retirados os órgãos: pulmão, coração, baço, fígado, rim, supra-renal e os gânglios linfáticos do mediastino. O material foi fixado em formol a 10% e posteriormente foram feitos cortes histológicos sendo usado como rotina a coloração pela hematoxilina e eosina (H. E.).

Nos cortes histológicos, em número aproximado de 1.800 foram analisadas a presença e intensidade da reação imunológica celular no conjunto e isoladamente (infiltrado de células epitelióides e linfocitárias; tubérculos completos e incompletos, necrose de caseificação, calcificação e fibrose). A avaliação da intensidade foi feita pelo levantamento da área alterada em relação com a área normal.

A intensidade de reação imunológica celular foi classificar com sinais positivos (+) que variavam de um (+) a quatro (++++). O sinal um (+) foto 1 correspondia a uma reação imunológica celular que ocupava 25% ou menos da área total do corte histológico; o sinal dois (++) foto 2 correspondia a uma variação de 26% a 50%; sinal 3 (+++) foto 3 correspondia de 51% a 75% e o sinal quatro (++++) foto 4 correspondia a 76% ou mais da área.

Com os resultados desta classificação foram elaboradas tabelas e gráficos levando-se em conta a área reacional.

Baseado no fato de serem os órgãos; pulmão, gânglios linfáticos do mediastino, baço e fígado mais habitualmente comprometidos pelo bacilo da tuberculose, foi a ele dedicada maior atenção neste trabalho.

Nos gráficos, por meio de planímetro, foram medidas as áreas de reação imunológica celular relacionadas com os 2 tipos de vacinação e controle, nos 4 órgãos acima referidos, e os valores dessas áreas estão expressos em um gráfico de barras.

RESULTADOS

Os gráficos elaborados apresentam comparativamente os valores das áreas com a reação imunológica celular presente, relacionando os animais vacinados por via oral, via intradérmica e controle. Verificamos uma área de reação sempre maior para os animais vacinados por via intradérmica, sendo que esta diferença varia segundo o órgão considerado.

Na fig. 1 onde são apresentadas as curvas referentes as áreas de reação imunológica celular no baço para os tres grupos de animais, verificamos que a curva correspondente ao grupo de animais vacinados por via intradérmica é aproximadamente 115% (2,15 vezes) maior que para os vacinados por via oral (fig. 5). Entre os do grupo controle e os vacinados por via oral não foi verificada diferença significativa (fig. 5).

Em relação ao pulmão, analizando os dados da fig. 2, observamos também uma maior área de reação imunológica celular para os animais vacinados por via intradérmica, sendo esta área cerca de 27% (1,27 vezes) maior que a verificada para o grupo da via oral. A área relativa ao grupo da via oral é 2O% (1,2 vezes) maior que a do grupo controle (fig. 5).

O mediastino (fig. 3) apresentou resultados semelhantes, sendo que a área da reação imunológica celular dos vacinados intradermicamente é 13% (1,13

vezes) maior que para os vacinados oralmente, e este último tem área 45% (1,45 vezes) maior que a dos animais do grupo controle (fig. 5).

No fígado (fig. 4), onde a intensidade da reação imunológica celular se apresentou diminuida, em relação aos três órgãos já mencionados, novamente foi observada ser a área de resposta referente aos animais vacinados por via intradérmica maior, cerca de 12% (1,12 vezes), que a apresentada pelos vacinados por via oral. O grupo dos animais vacinados oralmente apresentou uma área de resposta 33% (1,33 vezes) maior que a do grupo controle (fig. 5).

Observando-se os valores das áreas de reação imunológica celular, nos tres grupos de animais, concomitantemente apresentados para os 4 órgãos na fig. 5, podemos verificar que sempre ocorreu uma maior área dessa reação imunológica celular para os animais vacinados por via intradérmica em relação aos vacinados oralmente e o grupo controle.

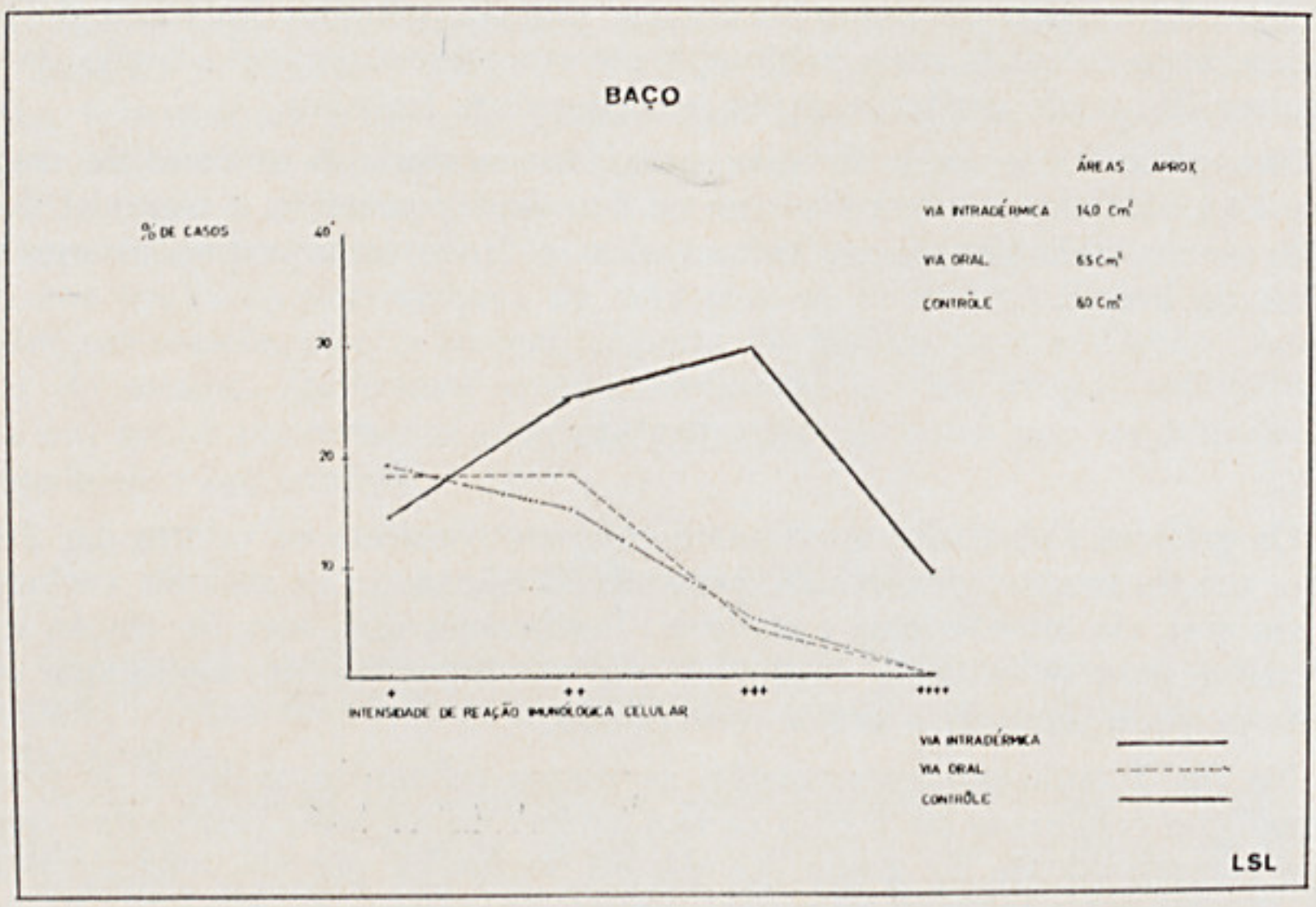

Fig. 1. Avaliação planimétrica da intensidade da reação imunológica celular no baço.

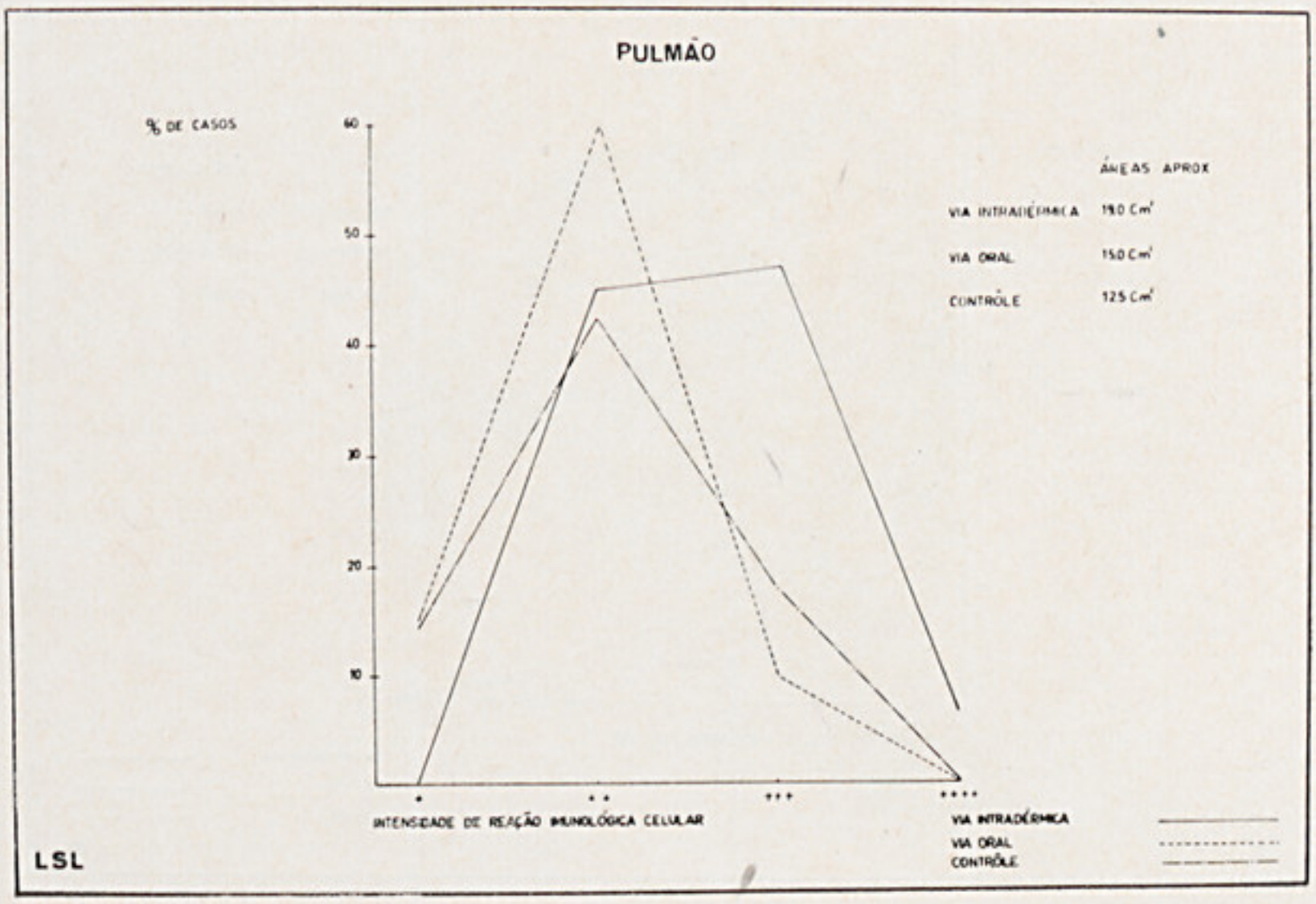

Fig. 2. Avaliação planimétrica da intensidade da reação imunológica celular no pulmão.

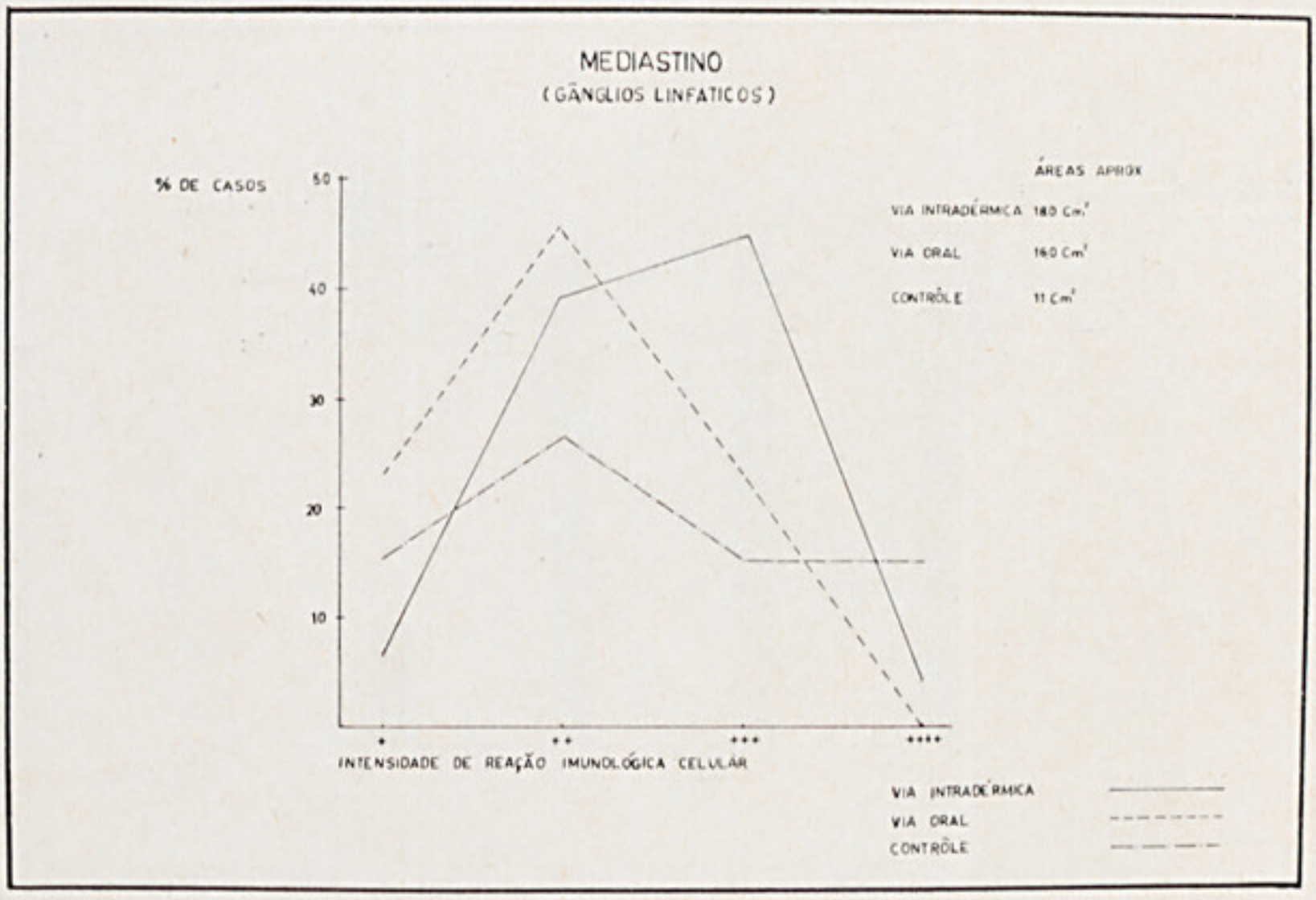

Fig. 3. Avaliação planimétrica da intensidade da reação imunológica celular nos gânglios linfáticos do mediastino.

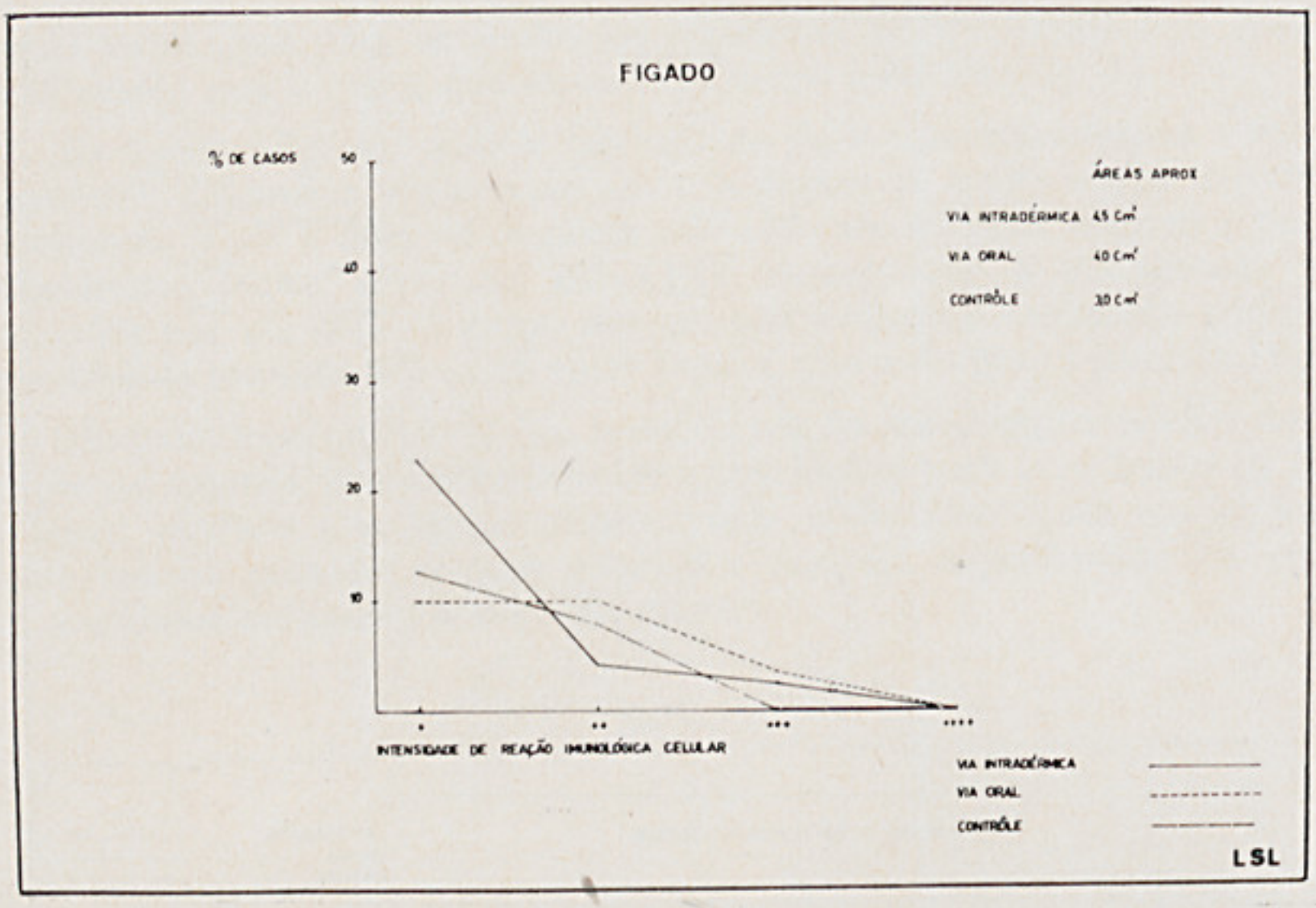

Fig. 4. Avaliação planimétrica da intensidade da reação imunológica celular no fígado.

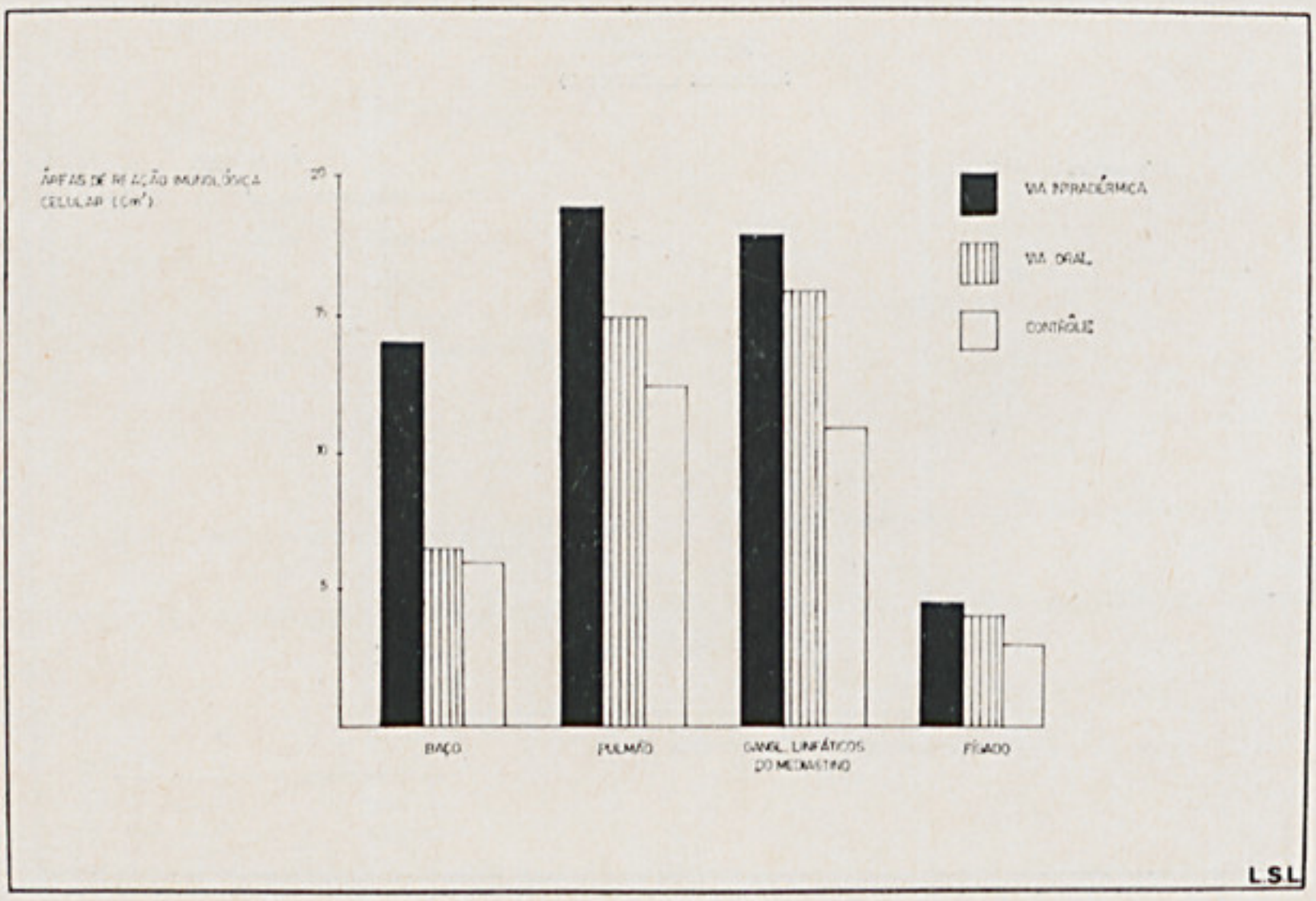

Fig. 5. Gráfico comparativo das áreas da resposta imunológica celular.

Foto 1: Pulmão — corte histológico — HE.
† A reação imunológica celular ocupa menos que 25% da área parenquimatosa

Foto 2: Pulmão — Corte histológico — H.E.
†† A reação imunológica celular ocupa entre 26 a 50% da área parenquimatosa.

Foto 3: Pulmão — Corte histológico — H.E.
†‡† A reação imunológica celular ocupa entre 51 a 75% da área parenquimatosa.

Foto 4: Pulmão — Corte histológico — H.E.
†‡†‡ A reação imunológica celular ocupa mais de 76% da área parenquimatosa.

DISCUSSÃO

As vacinações por via oral de BCG em grupos humanos protegem significativamente as populações vacinadas, conforme relatam os trabalhos de GERNEZ-RIEUX, GERVOIS e NISTRI (2). Experimentalmente, pelos trabalhos de IZUMI e COSTELLO (4) em camundongos suiços albinos, observou-se que diferentes vias de administração (intraperitoneal, intravenosa e aerosol) de BCG também tem ação protetora. No entanto, a intensidade dessa proteção varia segundo Costello e Izumi (1). Assim da mesma forma admitimos que as reações imunológicas celulares possam ser diferentes em intensidade segundo a via de administração do BCG seja oral ou intradérmica, mantidas constantes as demais variáveis, como sejam a quantidade de bacilos do BCG e os bacilos virulentos posteriormente introduzidos nos animais de experimentação.

No presente trabalho notamos que dos órgãos estudados pela ordem, o pulmão, gânglios linfáticos do mediastino, baço e fígado foram os que apresentaram reações imunológicas celulares mais intensas. Como a reação imunológica celular depende da presença de bacilos, a sua maior intensidade, decorre da maior presença numérica dos mesmos nesses órgãos, conforme assinalam Izumi e Costello. Nos nossos casos como vemos pela figura (5), realmente as reações imunológicas foram mais intensas no pulmão, como seria de esperar, nos três grupos estudados. Dentre eles a maior intensidade foi no grupo vacinado intra-dermicamente. Da mesma forma a reação imunológica celular foi mais intensa no grupo dos vacinados intra-dermicamente nos gânglios linfáticos do mediastino, baço e fígado.

CONCLUSÃO

Pelos nossos resultados, cremos poder afirmar que a reação imunológica celular protetora contra o Bacilo da Tuberculose avaliado histologicamente é mais intensa, nas cobaias, quando a vacinação pelo BCG é realizada pela via intra-dérmica.

SUMMARY — The authors study the intensity of the cellular immunological reaction to tuberculosis in two groups of guinea pigs, one group having been vaccinated with BCG intradermally, the other orally. After the experimental infection by the oral route, and in the control group, the authors studied the following organs: lungs, mediastinal lymph nodes, spleen and liver.

The evaluation of the intensity of the cellular immunological reaction was accomplished taking into consideration the areas that exhibit this type of reaction with the total area of the histological section and proceeding to plot this graphically.

The authors verified that, in the organs studied, the immunological reactions were more intense in the lungs of the three groups and it was always observed that the greatest area of cellular immunological reaction occurred in the organs of those animals previously vaccinated intradermally. This suggests the intradermal route of vaccination is the more efficient in the sense of provoking the more intense cellular immunological reaction to tuberculosis.

UNITERMS — Immunopathology of tuberculosis. BCG vacination.

MACHADO, J. C., SOERENSEN, B., AMARAL, J. P., PINTO, E. A. e DONOSO, N. — Avaliação histopatológica comparativa da intensidade do fenômeno proliferativo na imunidade celular à tuberculose em cobaios vacinados oralmente e intradermicamente pelo BCG. *Mem. Inst. Butantan, 36*: 57-66, 1972.

BIBLIOGRAFIA

1. COSTELLO, R. and IZUMI, T. — Measurement of resistance to experimental tuberculosis in albino mice. *J. Exp. Med.* **133** (2): 362 — 375, 1971.

2. GERNEZ-RIEUX, CH., M. GERVOIS ET R. NISTRI — Résultats éloignés des premières vaccinations anti-tuberculeuses (BCG) d'Albert Calmette effectuées a Roubaix, de 1925 a 1934. *Ann. de l'Inst. Pasteur de Lile*: 10: 89196, 1958/59.

3. IONESCO, J. et ESKENASY, A.; Influence des voies d'administration du vaccin BCG sur la dynamique de l'inflammation tuberculeuses expérimentale. *Rev. d'Immun.* **34**: (1-2) 1-10 1970.

4. IZUMI, T. and R. COSTELLO: Temporal development of resistance to pulmonary tuberculosis in Swiss albino mice. *J. Exp. Med.* **133** (2): 376-388 (1971).

5. LORIAN, V. and U. ZANON — Pulmonary tuberculosis in Guines Pigs by transtracheal inoculation. *Acta tuberculoses et Pneumologica Scandinavioa* **44**: 76-82, 1964.

6. SOERENSEN, B., e PLANET DO AMARAL, J. — Estudo comparativo de necrópsias em cobaios tuberculosos e cobaios tuberculosos previamente vacinados com B.C.G. por via oral. *"O Hospital"*, **65** (2) 287-292 (1964).

Recebido para publicação em : 15/10/72
Aceito para publicação em: 23/10/72