

INOCULACION DEL MYCOBACTERIUM LEPRAE EN ANIMALES EN CONDICIONES DIETETICAS ESPECIALES (*)

por KARL E. MASON

Departamento de Anatomía de la Universidad de Rochester
Escuela de Medicina y Odontología - Estados Unidos de Norte América

Este trabajo representa una continuación de los estudios presentados en la Conferencia de Lepra de Carville, del 7 al 10 de noviembre de 1960, cuyos relatos han sido publicados en "The Star" (volumen 20, página 19 a 21, año 1961), por el Hospital del Servicio de Salud Pública de Carville, Louisiana. En esa época nosotros pudimos referir los resultados de un período de solamente ocho meses de post-inoculación, después de la introducción de medio a un tercio de millón de bacilos de Hansen, en testículos de ratas, marmotas doradas de Siria (Hamster) y gatos alimentados con una dieta deficiente en vitamina E y con un contenido del 15 %, 6 % y 15 % de aceite de hígado de bacalao, respectivamente; representando esto una parte de nuestro esfuerzo para explotar las diferentes especies de animales de laboratorio en su susceptibilidad al *M. leprae*.

Resumiendo brevemente estos estudios, diremos que ambos testículos de todos los animales experimentales fueron inoculados (febrero 24 de 1960), con 0,05 cc. de una suspensión de bacilos de Hansen, derivados de un leproma fresco enviado en hielo seco, el día anterior desde el Hospital del Servicio de Salud Pública de Carville a través de la gentileza del doctor Jorge Fite. La suspensión de los bacilos "vivos" fue administrada a 16 ratas, 13 marmotas doradas de Siria y 5 gatos y también inoculada en 6 testículos controles (recién extraídos de marmotas doradas de Siria), los cuales fueron homogeneizados y extendidos en portaobjetos para realizar el recuento bacilar de acuerdo al método de Hilson y Elek (4). Este último procedimiento, empleado a través de todos estos estudios, indicó que cada testículo recibió entre medio y dos tercios de millón de bacilos. La suspensión "viva" se centrifugó, lavó con suero fisiológico, para extraer las proteínas extrañas y se resuspendió hasta completar el volumen original, antes de calentarlo a 100°C, por una hora. Este mismo volumen (0,05 cc.) de esta suspensión "muerta" fue inoculado en los testículos de 12 ratas y 10 marmotas doradas de Siria mantenidas en el mismo régimen dietético y en 6 testículos controles, recientemente extraídos de ratas y marmotas doradas de Siria.

A pesar de las precauciones tomadas, hubo considerable coagulación de la suspensión. Los recuentos hechos en los testículos controles indicaron que las dosis inoculadas contenían considerablemente menos cantidad de bacilos que los de las suspensiones "vivas". Esta última suspensión, sembrada en medio de Lowestein-Jensen, no dio lugar a crecimiento de bacilos ácido-resistentes.

(*) Conferencia pronunciada el 18 de agosto de 1961 en el Instituto Nacional de Microbiología.

De 4 a 8 meses después de la inoculación con la suspensión de bacilos "muertos", extendidos por impresión de los testículos de las marmotas doradas de Siria, fueron pronunciadamente negativos en cuanto a contenido bacilar; los testículos de las ratas fueron negativos, con excepción de algunos casos en los que se recobraron de 50.000 a 200.000 bacilos. En el caso de animales que recibieron el inóculo "vivo" los extendidos por impresión de los testículos de los gatos de los 6 a los 9 meses fueron uniformemente negativos y aquellos de las marmotas doradas de Siria también fueron negativos o revelaron sólo la presencia ocasional de algún bacilo o globo, de tal modo que no pareció justificar el realizar el laborioso procedimiento de recuento bacilar.

Por otra parte, los extendidos por impresión de la superficie de sección de los testículos de las ratas a los que se administró la suspensión "viva", revelaron de modo general, apreciable cantidad de bacilos y globo. El presente informe se referirá especialmente a los datos obtenidos de esta serie de testículos de ratas hasta un período de 12 meses posterior a la inoculación, en que todas las ratas restantes fueron sacrificadas. También se referirá a un informe preliminar sobre los esfuerzos realizados para obtener el establecimiento y multiplicación del *M. leprae* en el testículo de la rata, por medio de reinoculaciones.

TABLA I

Cantidades de *M. leprae* expresadas en millones por testículo, obtenidas en intervalos de 4 a 12 meses después de la inoculación de 1/2 a 2/3 de millones de bacilos, en testículo de ratas alimentadas con una dieta carente en vitamina E con 15 % de aceite de hígado de bacalao.

	Testículo izquierdo	Testículo derecho		Testículo izquierdo	Testículo derecho
6 Mo.	2.0	2.0 (*)	8 Mo.	7.4	4.6
6.5 "	3.7	—	8 "	1.9	3.0
6.5 "	23.6	—	8 "	3.3	3.3 (*)
6.5 "	1.5	1.4	9 "	7.8	8.7
7 "	0.8	4.5	9.5 "	15.1	13.6
7 "	1.6	3.8	10 "	12.4	11.2
8 "	2.6	2.6 (*)	11 "	18.9 (**)	—
8 "	4.3	6.1	12 "	—	13.6 (**)

(*) Testículos mezclados para ser homogeneizados, asignándosele la mitad del recuento a cada testículo.

(**) Representa los testículos del mismo animal: uno extraído quirúrgicamente a los 11 meses, y el otro en la autopsia.

Considerando los 28 testículos anotados en la tabla nº 1 de los cuales se hicieron recuentos (en 3 casos, ambos testículos fueron usados en un solo homogeneizado haciéndose el promedio del recuento total), puede notarse que ningún testículo contuvo menor cantidad que el número de bacilos inoculados: 25 % contenían hasta 3 veces más, 39 % de 4 veces a 10 veces más y 36 % más de 10 veces, del número de bacilos inoculados. El número medio de bacilos recuperados fue aproximadamente de 6,6 millones por testículo, o sea cerca de 10 veces más el número de bacilos inoculados. Los testículos extraídos de 9 a 12 meses después de la inoculación, mostraron no solamente un uniforme alto contenido de bacilos, sino que también éstos fueron notablemente normales en su morfología y tinción. Dado el deseo de extraer la mayor

cantidad de información cuantitativa posible, sólo dos testículos fueron destinados para el estudio histológico. Uno de estos, proveniente de una rata cuyo otro testículo contenía 23,6 millones de bacilos, reveló al microscopio una extensa infiltración celular de los tejidos intersticiales (fig. 1) y acumulaciones intracelulares de bacilos ácido-resistentes (fig. 2).

Las lesiones histopatológicas se asemejaban mucho a las descritas en las orquitis leprosas humanas.

Los datos cuantitativos suplementados por los hallazgos histológicos indican claramente el crecimiento y reproducción del *M. leprae* en los testículos de las ratas en las condiciones experimentales señaladas.

No pareció práctico, en base al volumen del inóculo original y al deseo primordial de obtener la mayor evidencia posible sobre la multiplicación del *M. leprae* estudiar el destino de *M. leprae* en ratas alimentadas con la misma dieta complementada con vitamina E.

Suspensiones de los testículos de 4 de las ratas de la serie original, obtenidos de los 8 a los 12 meses después de la inoculación, fueron inoculados por vía intratesticular en grupos de 5, 4, 11 y 10 ratas mantenidas en la misma dieta experimental. El número de bacilos que aproximadamente se introdujo en cada testículo osciló entre 50.000 a 500.000. En algunos animales la cantidad inoculada en un testículo fue diez veces mayor que en el otro. En la mayor parte de los animales ambos testículos recibieron la misma cantidad de bacilos. En estos se planeó extraer un testículo después de 3 a 4 meses de dieta, para compararlo con el segundo testículo extraído de 4 a 8 meses después. Los datos preliminares en relación a dos de estas transmisiones justifican el breve comentario que sigue.

TABLA 2

Datos preliminares sobre la transmisión del *M. leprae* en la rata

Bacilos Inoculados (*)	3 meses	4 meses	6 meses
100.000 ^a	30.000	60.000	520.000
	40.000	187.000	540.000
	105.000		937.000
	493.000		
	920.000		
400.000 ^b	310.000		83.000
	450.000		315.000
			354.000

(*) Representa la emulsión de los testículos de 2 ratas anotadas en la tabla 1, una a los 8 meses (a) y la otra a los 10 meses (b) después de inoculadas.

En el primer experimento con 100.000 bacilos inoculados en cada testículo, un aumento significativo se observó en sólo dos de los 5 testículos examinados después de 3 meses, en ninguno de los dos testículos extraídos después de 4 meses, y en los 3 testículos examinados a los 6 meses después de la inoculación (tabla 2). En el segundo experimento, con 400.000 bacilos inoculados, no hubo indicación del aumento del número de bacilos durante los 3 y 4 meses después de la inoculación (tabla 2). Estos datos preliminares hacen algo más que sugerir que el bacilo, si no en todos los casos, en algunos se adapta al nuevo terre-

no y se multiplica. Un período adicional de 4 a 6 meses se necesitará para proveer más evidencias sobre la transmisión del bacilo de Hansen de animal a animal.

Discusión: El recuento del número de bacilos en el inóculo y en órganos o tejidos que lo contienen, es un procedimiento laborioso, pero cuyos beneficios justifican el esfuerzo que demanda, tal como lo demostró claramente Shepard (6) en su reciente inoculación en la almohadilla plantar de los ratones.

La información que hemos obtenido lleva de esta manera a dar un soporte sustancial a los trabajos previos de Bergel (2, 3), basados en los extendidos por la impresión de testículos, que una muy significativa multiplicación del *M. leprae* ocurre en los testículos de las ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes, similar a las que él usó en sus estudios. Ellos están también de acuerdo con los datos cuantitativos basados en procedimientos de recuentos algo distintos aplicados a testículos de ratas alimentadas con una dieta similar e inoculadas con una suspensión proveniente de un leproma obtenido, simultáneamente del mismo sujeto, tal como lo informó en la Conferencia de Carville de 1960, Eisman, Barkulis y Geftig, del Laboratorio Ciba. Estos últimos investigadores y también Bergel (2, 3) describieron que suplementando la dieta prooxidante con vitamina E, se suprime la multiplicación del bacilo. Como se mencionó previamente limitaciones en nuestro material experimental no nos permitieron obtener datos sobre este aspecto. Nuestra transmisión de animal a animal puede ser considerada como una confirmación parcial de los resultados de Bergel (2).

Las posibles relaciones entre factores dietéticos y la susceptibilidad a la infección leprosa han recibido gran atención desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Este tema ha sido revisado por Badger (1), quien también publicó sus experiencias indicando que la deficiencia dietética de vitamina B₁₂ aumenta grandemente la susceptibilidad de la rata a la infección con *M. leprae murium*. Por otra parte, usando inoculación en la almohadilla de la pata de ratones mantenidos en dietas comunes, Shepard (6) ha obtenido reacción granulomatosa y multiplicación de *M. leprae* combinado con sucesivos pasajes animales. Y contrastando con nuestra incapacidad de obtener un evidente crecimiento del *M. leprae* en marmotas doradas de Siria, con dieta prooxidante, Binford (4) ha obtenido granulomas y multiplicación bacilar así como también exitosa transmisión de animal a animal, inoculando testículos y orejas de marmotas doradas de Siria, alimentadas con dietas comunes.

Indiscutiblemente un variedad de factores, tales como números de bacilos del inóculo, especies y a lo mejor diferencias genéticas en susceptibilidad, modificaciones dietéticas y el estado general del animal, pueden jugar un importante papel. Se ha progresado en los últimos años, pero mucho aún se debe hacer, con el objeto de definir las condiciones y las especies más susceptibles, para el establecimiento y el estudio de la infección leprosa en los animales de laboratorio.

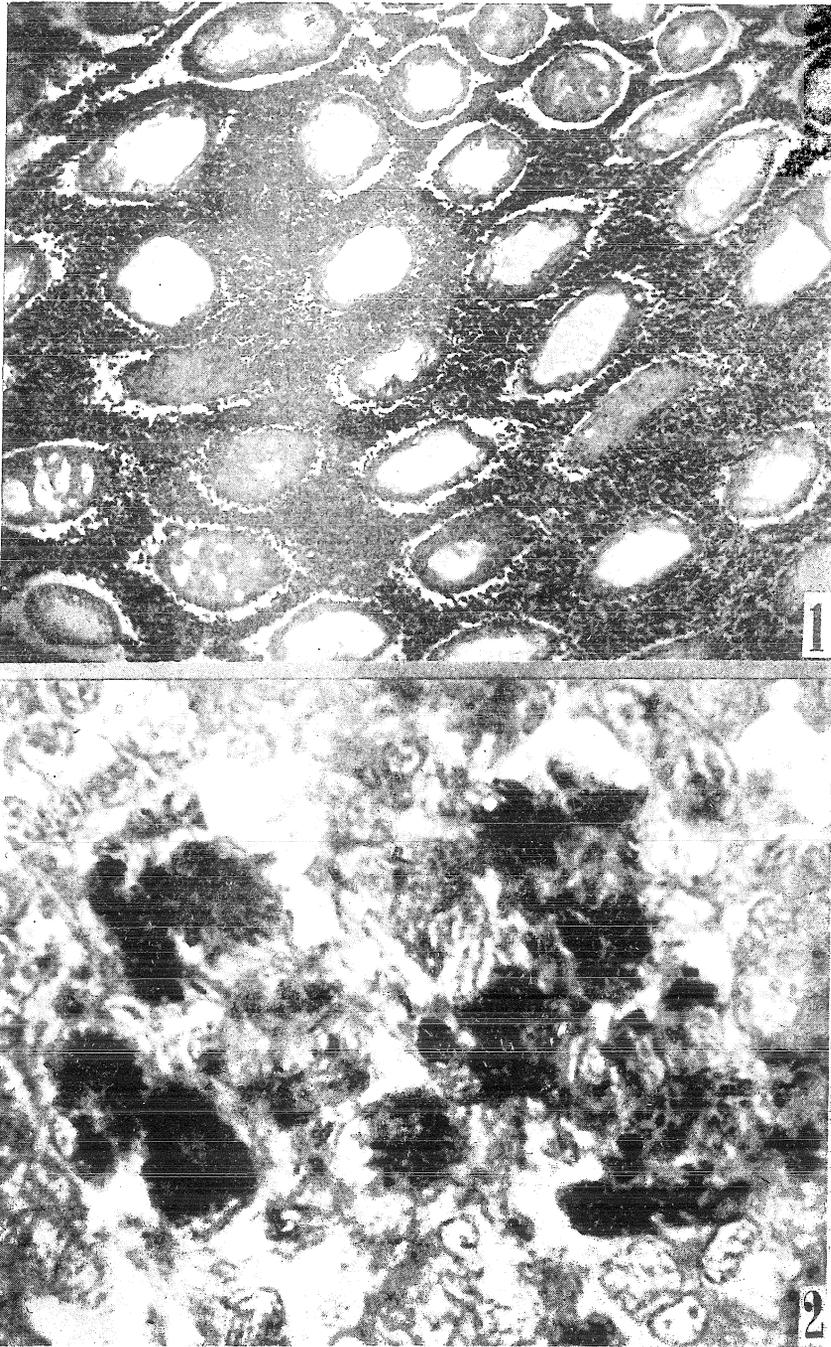
S U M A R I O

En base a los recuentos de bacilos en emulsiones de testículos inmediatamente después de inoculados con una suspensión del *Mycobacterium leprae* y en testículos obtenidos 8 a 12 meses después de la inoculación, se concluye que el bacilo de la lepra humana puede ser mantenido y experimentar una significativa multiplicación en los testículos de ratas alimentadas con una dieta conteniendo el 15% de aceite de hígado de bacalao y deficiente vitamina E.

Inoculaciones similares en marmotas doradas de Siria y gatos, con dietas semejantes, dieron resultados negativos.

BIBLIOGRAFIA

1. *Badger, L. F.* — The possible relation of nutrition to leprosy. Proc. Sixth Pacific Science Congress (held at Berkeley, Stanford and San Francisco, July 24 - Aug. 12 1939), *V*, 965-971.
2. *Bergel, M.* — Inoculación del *Mycobacterium leprae* a ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes. *Semana Médica*, *III* (1957), 480-487; 1148-1151; 1313-1318.
3. *Bergel, M.* — Influence of various pro-oxidant nutritional conditions on the growth *in vivo* of *M. leprae*. *Leprosy Review* (1959), 153-158.
4. *Binford, C. H.* — Histiocytic granulomatous Mycobacterial lesions produced in the golden hamster (*Cricetus auratus*) inoculated with human leprosy. *Lab. Invest.*, *8* (1959), 901-924.
5. *Hilson, G. R. F. and Elek, S. D.* — Intratesticular multiplication of *Mycobacterium leprae murium* in normal and suramin-treated animals. *Internat. J. Leprosy*, *25* (1957), 380-391.
6. *Shepard, C. C.* — The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J. Exper. Med.*, *112* (1960), 445-454.



1. — Corte de un testículo de rata 6 $\frac{1}{2}$ meses después de la inoculación con una suspensión de *M. leprae*. Entre los tubos seminíferos degenerados hay extensos acúmulos de linfocitos entremezclados con numerosos histiocitos, conteniendo muchos bacilos ácido-resistentes. Zenker, hematoxilina y eosina. 150 aumentos.
2. — Grupos de histiocitos de la figura 1, mostrando gran número de bacilos intracelulares y ácido-resistentes. Zenker, coloración ácido-resistente de Fite-Faraco. 1.200 aumentos.