

COMPORTAMENTO *in vitro* FRENTE AO *Mycobacterium leprae* DOS MACRÓFAGOS DE PESSOAS SADIAS E DE PACIENTES COM HANSENÍASE

Dértia V. **FREIRE-MATA***

RESUMO: A capacidade fagocítica *in vitro* dos macrófagos humanos frente ao *M. leprae* foi analisada em uma amostra selecionada de indivíduos saudáveis e hansenianos (virchowianos e tuberculóides). Foram estudadas 176 pessoas caucasóides, pertencentes a famílias em que pelo menos um dos cônjuges era hanseniano. A análise do comportamento dos macrófagos foi realizada através de leituras das lâminas no 5.º, 10.º, 15.º, 20.º e 30.º dias após a inoculação do *M. leprae*. Os resultados mostraram uma alta variabilidade. Discute-se a classificação adotada e conclui-se que: (a) os indivíduos se distribuem ao longo de uma escala de valores no concernente à capacidade de lise dos seus macrófagos em relação ao ***M. leprae* fagocitado**; (b) os resultados obtidos dão suporte à "teoria do limiar de lise" de Beiguelman.

Palavras chave: Hanseníase. Macrófagos. *Mycobacterium leprae*.

1 INTRODUÇÃO

A capacidade fagocítica *in vitro* de macrófagos humanos frente ao *M. leprae* foi descrita pela primeira vez por Benewolenskaja¹¹. Mais tarde, Hanks^{16,17,10} trabalhou com culturas de tecidos de doentes e demonstrou haver degeneração dos macrófagos e acúmulo dos bacilos nas massas necróticas. Beiguelman^{2,9} observou que os macrófagos dos hansenianos fagocitavam *in vitro* os bacilos do *M. leprae* e se comportavam de modo diferente conforme proviessem de indivíduos com hanseníase virchowiana ou tuberculóide. Nos primeiros, os bacilos se mantinham aparentemente intactos mesmo após três semanas de incubação, enquanto nos últimos observava-se

lise bacilar, revelada pela presença de bacilos fragmentados, restos bacilares e coloração tênue. Conforme a capacidade dos macrófagos em digerir o *M. leprae*, os indivíduos foram classificados em *não-lisadores* e em *lisadores*^{3,4,10}. Tanto os lisadores quanto os não-lisadores incluíam indivíduos cujos macrófagos exibem diferentes graus de capacidade de lise do *M. leprae* ("teoria do limiar de lise" de Beiguelman)^{6,7,8}.

Delville¹³, estudando o comportamento *in vitro* dos macrófagos humanos frente ao *M. leprae*, em não-comunicantes de hansenianos, observou que em todas as culturas havia sinais de digestão bacilar, mas havia marcantes diferenças quantitativas, bem como diferenças no tempo gasto para a

(*) Departamento de Genética, Universidade Estadual Paulista, 18600 Botucatu, SP.

digestão. Esse autor sugeriu haver um mecanismo enzimático de digestão celular que é liberado por um fenômeno de limiar. Convit *et al.*¹² observaram que pacientes virchowianos inoculados com *M. leprae* possuíam bacilos íntegros até 120 dias e que alguns, após 90 a 120 dias, destruíam os bacilos.

Procuramos no presente trabalho observar o comportamento *in vitro* dos macrófagos humanos frente ao *M. leprae*. Para tanto, analisamos indivíduos sadios e hansenianos (virchowianos e tuberculóides).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos 176 pessoas caucasóides pertencentes a famílias nas quais pelo menos um dos cônjuges era hanseniano (propósito). As famílias foram averiguadas nos Dispensários de Dermatologia de Campinas e de Botucatu, SP (Tabela 1).

Em um tubo contendo 1 ml de citrato de sódio a 4%, foram colocados 10 ml de sangue periférico. Após a centrifugação do sangue durante 20 minutos a 1500 rpm, o plasma foi retirado e foram colocadas duas gotas de cloreto de cálcio a 4% para a formação de coágulo. Os coágulos foram lavados com solução fisiológica de Hanks e cortados em pequenos fragmentos antes de serem novamente lavados com essa solução. Esses fragmentos foram colocados sobre uma lamínula num tubo de Leighton e cobertos com meio de cultura (40% de soro de vitelo inativado e 60% de solução fisiológica de Hanks, além de 100 UI/ml de penicilina e 100 "g/ml de estreptomomicina). Após 5 dias procedeu-se à inoculação de 0,05 ml de uma suspensão de bacilos, diluída 4 vezes a partir de uma suspensão-mãe contendo aproximadamente 35×10^6 bacilos por ml, preparada a partir de lepromas obtidos no Hospital "Lauro de Souza Lima" de Bauru (SP). Os

lepromas foram autoclavados por 30 minutos a 1,5 atmosfera de pressão, triturados num gral com solução fisiológica de Hanks, filtrados em gaze e conservados em geladeira até o momento de inoculação. A contagem de bacilos foi feita pela técnica descrita por Hanks *et al.*²⁰ e Hanks¹⁸

O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias até o final da cultura. Com 5, 10, 15, 20 e 30 dias após a inoculação, uma lamínula com o material de cada cultura foi fixada em metanol, por 5 minutos, procedendo-se à coloração dos bacilos pela fucsina fenicada, fazendo-se coloração de fundo com o azul de metileno de Kühne.

As leituras das lâminas foram feitas procurando-se observar as características discriminadas a seguir, cada uma das quais foi classificada segundo três alternativas (ausentes, raros e numerosos, com exceção da vacuolização do citoplasma, em que as alternativas eram ausente, discreta, moderada e intensa) : macrófagos aglomerados; gigantócitos tipo corpo estranho (sincício). gigantócitos tipo Langhans; células "epitelióides"; macrófagos em degeneração ; núcleos picnóticos isolados; vacuolização do citoplasma; bacilos íntegros intracelulares; fragmentos bacilares; imagem negativa de bacilos; bacilos e/ou fragmentos em massas necróticas.

Foram consideradas células "epitelióides" as que apresentaram citoplasma finamente granuloso ou homogêneo, com limites celulares perfeitamente definidos e núcleo de tamanho médio a pequeno ; gigantócito célula multinucleada, tipo corpo estranho com numerosos núcleos no centro da célula e que pode ou não fagocitar ; gigantócito tipo Langhans, célula multinucleada cujos núcleos se dispõem na periferia celular e macrófago, célula que possui a capacidade de fagocitar com citoplasma finamente ou intensamente vacuo-

lizado com limites celulares não bem definidos e núcleo grande com nucléolo. Massas necróticas são restos celulares com ou sem núcleo picnótico.

As lâminas foram lidas e classificadas em teste cego por duas pessoas distintas, adotando-se os seguintes critérios para a classificação das reações dos macrófagos em presença do *M. leprae*:

a) *Reação negativa (não-lisador)* — Numerosos bacilos íntegros intracelulares e ausência de sinais de lise no interior das células, ausência de células "epitelióides" e de gigantócitos, principalmente do tipo Langhans e presença de numerosas massas necróticas com ou sem bacilos íntegros.

b) *Reação fracamente positiva (intermediário)* — Raros bacilos íntegros intracelulares e raros sinais de lise no interior das células. As células epitelióides, na maioria das vezes, estão ausentes. Os gigantócitos podem estar presentes, sendo mais numerosos no

15.º dia e tornando-se raros no 30.º dia. Ausência de gigantócitos do tipo Langhans e raras massas necróticas.

c) *Reação positiva (lisador)* — Ausência de bacilos íntegros intracelulares e numerosos sinais de lise no interior das células; presença de células "epitelióides", aumentando o número a partir do 20.º dia; gigantócitos aumentando de frequência do 15.º ao 30.º dia; presença dos gigantócitos do tipo Langhans em 50% dos casos; macrófagos praticamente ausentes a partir do 20.º dia e ausência de massas necróticas.

3 RESULTADOS

No total, foram analisadas 176 pessoas caucasóides, sendo 60 pais e 116 filhos (Tabela 1). Uma mulher com hanseníase virchowiana, que poderia ter sido incluída em qualquer das subamostras (pais ou filhos), constou apenas da sub-amostra de pais.

TABELA 1 — Distribuição das famílias estudadas, de acordo com o tipo de casal e o sexo dos filhos examinados.

CASAIS *				NÚMERO DE FILHOS EXAMINADOS		
Marido		Mulher	N.º	Masc.	Fem.	Total
V	x	V	11	20	8	28
V	x	S	9	21	15	36
S	x	V	5	5	8	13
V	x	T	3	7	10	17
T	x	V	3	3	3	6
T	x	S	4	3	5	8
S	x	T	2	6	2	8
TOTAL			35	65	51	116

* V = Virchowiano; T = Tuberculóide; S = Sadio.

Dos 60 pais, 33,3% eram sadios, 15,0% apresentavam hanseníase tuberculóide e 51,7% manifestavam hanseníase virchowiana. Entre os 116 filhos, 95,7% eram sadios, 1,7% apresentavam hanseníase tuberculóide, 0,86% eram virchowianos e 1,7% manifestavam hanseníase indeterminada. A alta frequência de doentes entre os pais é explicada, como já foi dito, pelo fato de eles terem sido selecionados pela ocorrência de pelo menos um dos cônjuges com hanseníase.

Em média, os cônjuges tinham 29, $71 \pm 2,13$ anos de coabitação e a idade média dos cônjuges vivos era de $54,45 \pm 2,27$ anos para os do sexo masculino e $49,90 \pm 2,19$ para os do sexo feminino. Em relação aos filhos, a idade média mostrou um valor de $26,51 \pm 1,11$.

A investigação da consangüinidade entre os cônjuges permitiu a detecção de dois casais consangüíneos. Um era de primos em 2.º grau ($F = 1/32$) e outro de primos em 3.º grau ($F = 1/64$). Essa taxa de consangüinidade foi percentualmente maior do que a observada por Beiguelman entre os genitores de 1479 doentes de hanseníase. Embora as amostras não sejam necessariamente comparáveis, a diferença provavelmente deve decorrer de flutuações de amostragem.

Os resultados obtidos na análise do comportamento dos macrófagos, através de leituras das lâminas no 5.º, 10.º, 15.º, 20.º e 30.º dias após a inoculação do *M. leprae*, encontram-se em Freire-Maia¹⁴. Os resultados finais sobre a capacidade de use dos macrófagos face ao *M. leprae* encontram-se nos heredo-gramas estudados pela mesma autora, que poderá enviar aos interessados cópias dos resultados obtidos.

Dentre os 20 pais sadios, houve 2 nos quais as culturas não se diferenciaram (*nd*), 5 cujas culturas degeneraram (*dg*) e 3 cujas culturas não

passaram de 15 dias. Entre os que foram analisados, 4 mostraram-se não-lisadores (*n*); 4 intermediários (*i*); e 2 lisadores (*l*). Entre os 9 pais tuberculóides, 4 comportaram-se como não-lisadores e 4 como intermediários; em um caso a cultura não passou de 15 dias. Entre as culturas dos 31 pais virchowianos, 2 não se diferenciaram, 5 degeneraram e 1 não passou de 15 dias. Entre os 23 pais analisados, 82,6% comportaram-se como não-lisadores e 17,4% como intermediários.

Quanto às culturas dos 111 filhos sadios, em um caso a cultura não se diferenciou, em 21 ocorreu degeneração e em 11 as culturas não passaram de 15 dias. Entre as 78 culturas que foram analisadas, 46,2% se comportaram como não-lisadores, 39,7% como intermediários e 14,1% como lisadores. Dos 2 filhos tuberculóides, um se comportou como intermediário, enquanto a cultura do outro degenerou. A cultura do filho virchowiano não ultrapassou 15 dias. Dentre os 2 filhos indeterminados, um se comportou como não-lisador, enquanto a cultura do outro degenerou.

Analisando-se os cônjuges sadios e tuberculóides, as frequências de pais e mães não-lisadores (respectivamente, 3/6 e 5/12) não sugerem a existência de diferença sexual. Considerando-se os tamanhos das sub-amostras, a análise da proporção sexual pode ser feita entre os 15 pais e 8 mães virchowianos (80,0% e 87,5% de não-lisadores, respectivamente) e entre os 26 filhos e 25 filhas sadios (respectivamente, 38,5% e 36,0% de não-lisadores), nenhuma dessas diferenças tendo se revelado significativa ($X^2 = 0,20$; g.l. 1; $0,90 < p < 0,95$; $X^2 = 0,03$; g.l. 1; $0,70 < p < 0,80$). Desta forma, podem ser agrupados os dados dos dois sexos.

Comparando-se a frequência de não-lisadores no total de sadios ($40/88 =$

45,5%), nos tuberculóides (4/9 = 44,4%) e nos virchowianos (12/23 = 82,6%), verifica-se a existência de uma alta heterogeneidade ($X^2 = 10,33$; g.l. = 2; $p < 0,01$).

A freqüência de não-lisadores entre os pais virchowianos (19/23 = 82,6%) não se mostrou estatisticamente diferente da freqüência encontrada entre os pais tuberculóides (4/9) mas revelou-se significativamente maior do que a freqüência entre os pais sadios (4/10) ($X^2 = 1,82$; g.l. = 1; $0,10 < p < 0,20$ e $X^2 = 4,13$; g.l. = 1; $0,02 < p < 0,05$, respectivamente). A freqüência de não-lisadores entre os filhos sadios (36/78 = 46,2%) não se mostrou estatisticamente diferente da freqüência entre os pais sadios (4/10) e entre os pais tuberculóides (4/9) ($X^2 = 0,15$; g.l. $p = 0,70$ e $X^2 = 0,05$; g.l. = 1; $0,80 < p < 0,90$, respectivamente), mas mostrou-se significativamente menor que a freqüência encontrada entre os pais virchowianos (19/23 = 82,6%; $X^2 = 9,53$; g.l. = 1; $p < 0,01$).

4 DISCUSSÃO

Relativamente à capacidade de lise dos macrófagos frente ao *M. leprae* fagocitado, os resultados deste trabalho mostram que os indivíduos sadios analisados (comunicantes) se distribuíram nas 3 classes (não-lisadores, intermediários e lisadores), com freqüências relativamente baixas de lisadores. Por outro lado, tanto os tuberculóides quanto os lepromatosos comportaram-se como intermediários ou não-lisadores, com uma freqüência muito alta de não-lisadores entre os virchowianos.

O fato de quatro virchowianos terem se comportado como intermediários (e, portanto, como lisadores fracos) deve decorrer, muito provavelmente, do fato de terem sofrido um surto reacional. É digno de nota que todos os quatro

que mostraram sinais fracos de lise estavam em fase de regressão da reação.

Quanto aos tuberculóides, os resultados estão aparentemente de acordo com os encontrados por Bechelli *et al.*¹, nos quais há 66,7% (4/21) de positividade clínica da reação de Mitsuda entre os que apresentaram negatividade histológica. Já os resultados de Pisani *et al.*²¹ mostraram que todos os tuberculóides analisados eram lisadores. Isto pode ser explicado pelo fato de a amostra estudada por esses autores ser constituída, na maioria, por indivíduos com Mitsuda fortemente positivo (++ e +++). A amostra aqui apresentada era constituída, na maioria, por indivíduos Mitsuda negativos ou fracamente positivos. Além disso, dois indivíduos haviam passado da forma indeterminada para a tuberculóide, e um dos pacientes exibia a forma tuberculóide reacional.

Outro ponto importante a ser discutido refere-se à classificação adotada, a qual não apresenta limites rígidos e bem delimitados. Procurou-se usar um número relativamente pequeno de classes (3), isolando-se os grupos extremos (lisador e não-lisador). Isso não significa que esses grupos sejam homogêneos quanto à capacidade de lise. O critério de classificação adotado, sendo prático, é mais qualitativo do que quantitativo.

Observa-se ainda que, dentro de cada classe, existem indivíduos cujos macrófagos possuem diferentes capacidades de lise. Há, por exemplo, indivíduos intermediários que se aproximam mais dos lisadores (*il*) enquanto outros se assemelham mais aos não-lisadores (*ni*); além disso, há outros que não mostram tendência para nenhum dos dois extremos (*ii*). Em outras palavras, entre os indivíduos considerados intermediários (*i*) verificam-se casos mostrando poucos sinais

de lise (*ni*), outros cujos sinais de lise são mais intensos (*il*) e ainda os que mostram resposta tipicamente intermediária (*ii*). Uma reclassificação da classe intermediária (i) implicaria na adoção de um critério mais rígido também para as classes extremas (*n* e *I*). Com isso, alguns dos indivíduos incluídos nessas últimas classes passariam, respectivamente, para as novas classes (*ni* e *il*).

Usando-se essa nova classificação, pode-se verificar (Figura) que os virchowianos se concentram nos baixos níveis de lise (a maioria não apresentando lise alguma), enquanto os tuberculóides sugerem uma distribuição em que há relativamente maior intensidade de lise. Os pais sadios se distribuem ao longo de toda a escala, sugerindo uma bimodalidade de reações.

Em vista dos pequenos tamanhos das subamostras, esses resultados devem ser aceitos com as devidas cautelas e ressalvas. No entanto, eles servem para mostrar, sem qualquer sombra de dúvida, que não há apenas duas classes bem distintas e delimitadas de lisadores e não-lisadores. Pelo contrário, os indivíduos se distribuem ao longo de uma escala de valores, no concernente à capacidade de lise de seus macrófagos em relação ao *M. leprae* fagocitado.

A distribuição dos filhos sadios (Figura), que constituem uma subamostra bem maior, vem ao encontro daquela afirmação. Nessas condições, os indivíduos sadios seriam constituídos por duas frações, em cada uma das quais haveria variabilidade na intensidade de lise: os lisadores fracos (tendo em um dos seus extremos os *não-lisadores*) e os lisadores fortes (entre os quais os *lisadores* propriamente ditos representariam o grau máximo de lise).

A favor dessa conclusão existem os resultados de Delville¹³, o qual, inoculando bacilos vivos de *M. leprae*, em cultura de macrófagos de indivíduos

sadios não-comunicantes, observou em todas as culturas aspectos de digestão bacilar. Observou ainda marcantes diferenças quantitativas e diferenças no tempo gasto para a digestão. Comentou ainda que, no caso de se trabalhar com bacilos mortos, o comportamento é semelhante, mas o bacilo é mais lentamente digerido. Em seu trabalho, Delville¹³ não procurou classificar os indivíduos segundo a capacidade de lise dos macrófagos e, portanto, não apresentou freqüências, nem distribuição.

Os achados de Pisani *et al.*²¹ em culturas de indivíduos sadios, comunicantes e não-comunicantes, também demonstraram a existência de diferentes graus de capacidade de lise dos macrófagos em relação ao *M. leprae* fagocitado.

Os resultados apresentados no presente trabalho vêm dar suporte à "teoria do limiar de lise" proposta por

Beiguelman^{6,7,8}. De acordo com essa teoria, tanto os lisadores como os não-lisadores incluiriam indivíduos com diferentes graus de capacidade de lise (limiaries lisogênicos). Pode-se ver, pelo que foi discutido, que realmente há indivíduos com diferentes graus de lise, de tal forma que se poderia ter uma continuidade da curva de intensidade de lise.

De acordo com Beiguelman^{6,8}, os limiaries lisogênicos variariam de acordo com a idade. Em recém-nascidos, a capacidade de lise seria muito baixa ou inexistente, podendo no entanto alguns indivíduos apresentarem capacidade lisogênica ao *M. leprae* mesmo em tenra infância. Alguns indivíduos que não possuísem capacidade de lise ao nascimento manteriam essa condição por toda a vida (*não-lisadores*), enquanto outros (*lisadores*) adquiririam ou acentuariam essa capacidade, ou seja, em alguns indivíduos o caráter lisador seria congênito, enquanto em outros seria induzido.

TABELA 2 — Algumas características histológicas da classificação de hanseníase segundo Ridley & Jopling²⁴. Adaptado de Rea & Levan²² e Godal et al.¹⁵.

FORMAS DE HANSENIASE					
Aspectos Histológicos	Tuberculóide (TT)	Dimorfo com aspectos tuberculóides (BT)	Dimorfo (BB)	Dimorfo com aspectos virchowianos (BL)	Virchowiano (LL)
Histiócitos derivados de monócitos	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Presentes e Vacuolizados
Células epitelióides	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Ausentes
Células gigantes tipo Langhans	Presentes	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Bacilos	÷	+ -	+	++	+++

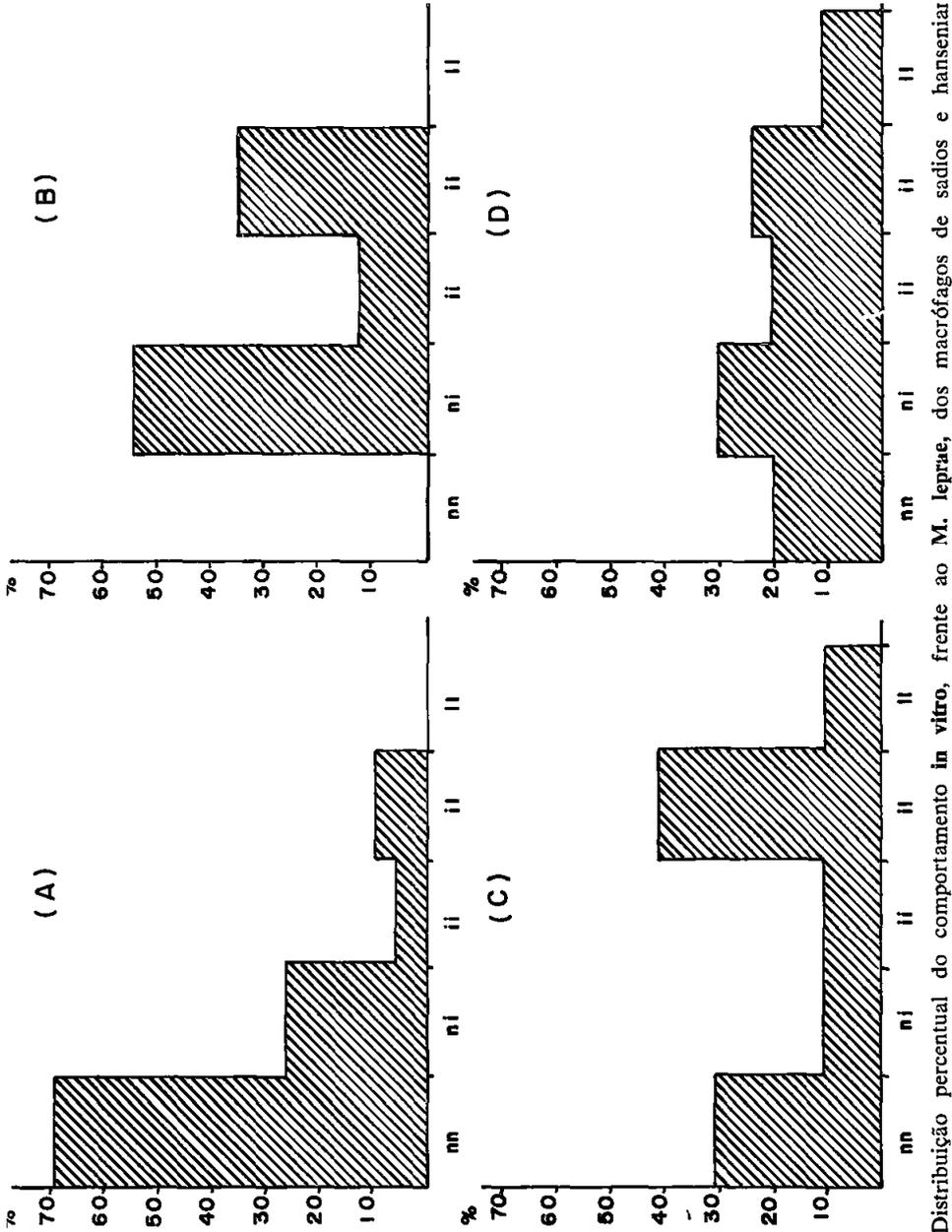


FIGURA — Distribuição percentual do comportamento *in vitro*, frente ao *M. leprae*, dos macrófagos de sadios e hanseníase

* A = Virchowianos (n = 23); B = Tuberculóides (n = 9); C = Pais saudáveis (n = 10); D = Filhos saudáveis (n = 78).
A capacidade de lise aumenta de nn para iii.

Além disso, o fato de que entre os virchowianos se tenham encontrado muitos não-lisadores e poucos com alguma intensidade de lise, e que os tuberculóides tenham sempre mostrado sinais de lise (embora de intensidade variável nos diferentes indivíduos) também fala a favor da explicação dada por Beiguelman^{6,8}. Esse autor sugeriu que, entre os virchowianos, a maioria seria não-lisador, mas que entre eles poderiam ser incluídos alguns com alguma capacidade de lise. Situação oposta ocorreria entre os tuberculóides, os quais, em fases reacionais, poderiam incluir não-lisadores.

A classificação das formas clínicas da hanseníase proposta por Ridley &

Jopling²⁴ inclui 5 tipos diferentes (TT, BT, BB, BL e LL), sendo que, posteriormente, dois subgrupos (LI e TI) foram acrescentados por Ridley & Waters²⁵ e Ridley²³. Por razões de ordem clínica e laboratorial, os pacientes incluídos no presente trabalho não puderam ser classificados segundo os tipos citados acima. No entanto, se compararmos as diferentes capacidades de lise com os dados histológicos apresentados por Rea & Levan²² e Godal *et al*¹⁵, baseados na classificação de Ridley-Jopling, pode-se notar uma certa semelhança (Tabela 2), principalmente quando se consideram os 5 graus de capacidade de lise (II, li, ii, ni, nn), como se observa na Figura.

Agradecimentos

Ao Dr. Diltor V. A. Opromolla, do Hospital "Lauro de Souza Lima", de Baum (SP), pela cessão dos lepromas. Ao Dr. Walter Pinto Júnior e ao Sr. Pedro Gervásio Faulin, pela colaboração na fase de coleta de dados. Ao Dr. Bernardo Beiguelman, pela valiosa colaboração prestada em todas as fases do projeto, e a ele e

ao Dr. Ademar Freire-Maia, pela leitura crítica do manuscrito (a autora, naturalmente, é a única responsável pelos resultados e conceitos aqui apresentados). A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto (Procs. n.º 566/449; 67/157; 69/932).

ABSTRACT — The *in vitro* phagocytic capacity of human macrophages facing *M. leprae* was analysed in a selected sample of healthy and hanseniasis patients (Virchowian and tuberculoid) individuals. Families where at least one of the spouses presented Hansen's disease were selected and 176 white people were studied. The analysis of the macrophages' behavior was performed by reading the slides in the 5th, 10th, 15th, 20th and 30th days after inoculation of *M. leprae*. The classification is discussed. The results showed a high variability. The main conclusions reached are: (a) people differ in their capacity to lyse *M. leprae*, as measured by their macrophages' behavior *in vitro*; (b) the results obtained give support to Beiguelman's theory of the lysis threshold.

Key words: Hanseniasis. Macrophage. *Mycobacterium leprae*.

REFERÊNCIAS

1 BECHELLI, L.M.; SOUZA, P.R.; QUAGLIATO, R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Leprol.*, 27(4) :172-182, 1959.

Hansen. Int., 8(2):81-90, 1983

2 BEIGUELMAN, B. Further results on the genetics of leprosy resistance. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS, 3, Chicago, 1966. *Abstracts of Contributed Papers*. Chicago, 1966. p.6-7.

- 3 BEIGUELMAN, B. Genética e epidemiologia das doenças transmissíveis com especial referência à lepra. *Cien. Cult.*, 17(4):449-460, 1965.
- 4 BEIGUELMAN, B. The genetics of resistance to leprosy. *Int. J. Lepr.*, 33(4):808-812, 1965.
- 5 BEIGUELMAN, B. Hereditariedade da reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Lepr.*, 30(4):153-172, 1962.
- 6 BEIGUELMAN, B. *Hereditariedade e lepra*. São Paulo, 1969. n.p. [Tese-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto].
- 7 BEIGUELMAN, B. Lepra e Genética. *Cien. Cult.*, 34:1121-1146, 1982.
- 8 BEIGUELMAN, B. Lepromin reaction: genetics studies including twin analysis. *Acta Lepr.* (44) :5-65, 1971.
- 9 BEIGUELMAN, B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 17(4):584-594, 1968.
- 10 BEIGUELMAN, B. & QUAGLIATO, R. Nature and familial character of the lepromin reactions. *Int. J. Lepr.*, 33(4):800-807, 1965.
- 11 BENEWOLENSKAJA, S.W. Über die in-vitro - Reaktion der embryonalen Gewebe und Leukocyten des Menschen auf Leprabacillen. *Arch. Exper. Zellforsch.*, 13:37-46, 1932.
- 12 CONVIT, J.; ARANZAZU, N.; PINARDI, M.; ULRICH, M. Immunological changes observed in determinate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Clin. Exp. Immunol.*, 36(2):214-220, 1979.
- 13 DELVILLE, J. *In vitro* behavior of macrophages from healthy persons against *M. leprae* and other mycobacteria. *Int. J. Lepr.*, 39:329-339, 1971.
- 14 FREIRE-MAIA, D.V. *Análise familiar do comportamento "in-vitro" dos macrófagos humanos frente ao Mycobacterium leprae*. São Paulo, 1972. 142p [Tese-Faculdade de Medicina da UNICAMP].
- 15 GODAL, T.; MYRVANG, B.; STANFORD, J.L.; SAMUE, D.R. Recent advances in the immunology of leprosy with special reference to new approaches in immunoprophylaxis. *Hanseníase*, 7(1/2):7-31, 1976.
- 16 HANKS, J.H. The fate of leprosy bacilli in fibroblasts cultivated from lepromatous lesions. *Int. J. Lepr.*, 15(1) :48-64, 1947.
- 17 HANKS, J.H. The fate of leprosy bacilli in fibroblasts cultivated from macular and tuberculoid lesions. *Int. J. Lepr.*, 15(1):31-47, 1947.
- 18 HANKS, J.H. Microscopic counts of Mycobacteria conversion factors for the pinhead method. *Int. J. Lepr.*, 36(1) :76-77, 1968.
- 19 HANKS, J.H. A study of the bacilli in tissue cultures of lepromata in serum media. *Int. J. Lepr.*, 15(1) :21-30, 1947.
- 20 HANKS, J.H.; CHATTERJEE, B.R.; LECHAT, M.F. A guide to the counting of Mycobacteria in clinical and experimental materials. *Int. J. Lepr.*, 32(2):156-167, 1964.
- 21 PISANI, R.C.B.; BEIGUELMAN, B.; OPROMOLLA, D.V.A. *In vitro* behavior of blood derived macrophages against killed *M. leprae*. *Int. J. Lepr.*, 41(1):14-24, 1973.
- 22 REA, T. & LEVAN, N.E. Current concepts in the immunology of leprosy. *Hanseníase*, 9(1/2):13-25, 1978.
- 23 RIDLEY, D.S. Review of the five-group system for the classification of leprosy according to immunity. *Int. J. Lepr.*, 40(1):102-103, 1972.
- 24 RIDLEY, D.S. & JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int. J. Lepr.*, 34(3):255-273, 1966.
- 25 RIDLEY, D.S. & WATERS, M.F.R. Significance of variations within the lepromatous group. *Lepr. Rev.*, 40(3):143-152, 1969.