

A reação de Mitsuda depois de oitenta anos

The mitsuda reaction after eighty years

Bernardo Beiguelman ¹**RESUMO**

O presente trabalho pretende ser uma revisão sucinta da literatura sobre a reação de Mitsuda, no ano em que se comemora seu octogésimo aniversário. Deu-se ênfase às contribuições fundamentais dos pesquisadores brasileiros para os estudos clínico-epidemiológico, histológico, genético e de experimentação animal dessa prova cutânea de importante valor para fins de prognóstico na hanseníase indeterminada e dimorfa e para a avaliação da resistência de comunicantes à manifestação da hanseníase virchowiana.

Descritores: Reação de Mitsuda. Lepromina. Antígeno de Mitsuda.

INTRODUÇÃO

Oitenta anos depois da primeira descrição da prova cutânea que viria a ser denominada reação de Mitsuda, é estranho o surgimento na literatura científica nacional de artigos tentando diminuir a sua importância em hansenologia. Além disso, é inadmissível, em trabalhos que pretendem fazer uma revisão sobre essa reação, a ausência total de autores brasileiros nas referências bibliográficas, como se fosse possível ignorar a notável participação da escola brasileira de hansenologia no estudo da reação de Mitsuda sob os pontos de vista clínico-epidemiológico, histológico, genético e de experimentação animal. Para impedir que se promova uma amnésia coletiva a respeito dessa contribuição científica nacional e, ao mesmo tempo, reafirmar a importância da reação de Mitsuda em hansenologia, foi que o autor do presente artigo, embora ciente de suas limitações, aceitou o honroso convite do Editor de

Hansenologia Internationalis para a difícil tarefa de escrever uma revisão sucinta sobre essa reação no ano de seu octogésimo aniversário.

A REAÇÃO DE MITSUDA

Em 1919 Kensuke Mitsuda ampliou bastante as investigações de Yoshinobu Hayashi, ao relatar na Revista Japonesa de Dermatologia e Urologia que a injeção intradérmica de uma suspensão feita a partir de hansenomas ricos em *M. leprae*, triturados e fervidos durante duas horas, não provocava resposta macroscopicamente visível (*reação negativa*) em hansenianos que, atualmente, seriam classificados como virchowianos (Hayashi, 1953; Mitsuda, 1953). Em oposição, provocava tal resposta (*reação positiva*) em grande proporção dos pacientes classificados, àquela época, como tendo hanseníase máculo-nervosa (provavelmente hanseníase tuberculóide e indeterminada). A suspensão feita a partir de hansenomas veio a ser denominada, posteriormente, de *Lepromin*, por Bargher (1927), designação essa que foi aportuguesada como *lepromina*. Nos últimos anos, por sugestão do Professor Abraão Rotberg, a lepromina também tem sido chamada no Brasil de *antígeno de Mitsuda*, *reagente de Mitsuda* ou, ainda, de *mitsudina*.

As observações iniciais de Mitsuda passaram a ser conhecidas no mundo ocidental após a Terceira Conferência Internacional de Hanseníase, realizada em 1923 em Estrasburgo (Mitsuda, 1924), quando ele relatou suas experiências em 403 hansenianos, nos quais constatou que a injeção intradérmica de 0,05 ml de uma suspensão contendo bacilos de Hansen mortos pelo calor, por ele preparada a partir 1 g de hansenomas por 10 ml de água fenicada a 0,5%, podia provocar, já após 24

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
Correspondência para R. Angelina Maffei Vita, 408
ap. 41 CEP 01 45 5-070 São Paulo, SP.

horas, o aparecimento de uma reação hiperêmica no local da inoculação. Essa reação passou, depois, a ser conhecida por reação *precoce à lepromina*, para diferenciá-la daquela que leva mais tempo para se manifestar e que, geralmente, é avaliada após 28 a 30 dias (*reação tardia à lepromina* ou reação de Mitsuda), mas que, em indivíduos sadios que não são comunicantes de hansenianos, pode ser avaliada mais tardiamente, ainda (Bechelli et al., 1963).

A reação precoce à lepromina, que é considerada positiva quando tem diâmetro entre 10 mm até mais de 20 mm, é provocada por um componente hidrossolúvel da lepromina, de origem bacilar e de natureza protéica (Hayashi, 1933; Fernandez, 1940; Kitano e Inoué, 1941; Lowe e Dharmendra, 1941; Dharmendra, 1941, 1942a; Fernandez e Olmos-Castro, 1942; Convit et al., 1975). Ela é igualmente chamada de reação *de Fernandez*, em homenagem ao hansenólogo argentino José Maria Manuel Fernandez, pela ênfase que ele deu ao estudo dessa resposta. Componentes protéicos de origem não-bacilar presentes na lepromina também podem atuar como irritantes e provocar reações precoces, mas o halo eritematoso suscitado por essas frações tem diâmetro inferior a 10 mm (Lopes de Faria, 1953).

Apesar de Mitsuda ter descrito a reação precoce à lepromina, ele dedicou maior atenção à resposta tardia que observara em hansenianos e em indivíduos sadios. A tradução para o português da descrição que ele fez, em francês (Mitsuda, 1924), da evolução da resposta no local da inoculação, após o aparecimento da reação hiperêmica inicial, demonstra bem seu maior interesse pela reação tardia: "Mas, coisa curiosa e muito interessante do ponto de vista da imunidade; nós notamos uma grande diferença no concernente ao modo de se comportar dessa reação hiperêmica na hanseníase maculosa e nervosa, de um lado, e na hanseníase tuberosa, de outro. Nessa última, a hiperemia local observada em 279 doentes era passageira, desaparecendo em alguns dias sem deixar vestígio, enquanto na primeira, a reação observada em 124 doentes aumentava em uma grande proporção deles (isto é, em 79% dos casos), de modo crescente nos primeiros quinze dias, tornando-se uma infiltração celular formando uma espécie de pápula, que ainda persistia durante mais uma semana".

Experimentando a inoculação da lepromina em dez indivíduos sadios, que não eram comunicantes de hansenianos, Mitsuda constatou a manifestação de uma reação tardia acentuada em sete deles. Por outro lado, a mesma inoculação efetuada em três enfermeiras, que haviam estado em contato com hansenianos por mais de dez anos, provocou, em todas, reação muito forte.

A grande repercussão internacional do trabalho de Mitsuda, entretanto, só foi alcançada dez anos depois da

Terceira Conferência Internacional de Hanseníase, em decorrência de um artigo de um seu discípulo, Fumio Hayashi (1933). Trabalhando na mesma linha, Hayashi (1933) confirmou as observações de seu mestre, ou seja, de que na hanseníase atualmente chamada virchowiana, e que, à época, era denominada nodular, a reação tardia a 0,1 ml da lepromina por ele preparada era quase sempre negativa (96% de 125 casos), sendo positiva na maioria dos doentes com hanseníase máculo-nervosa (97% de 64 casos).

Desde então, os testes feitos em todo o mundo com a lepromina integral foram incontáveis (mas, seguramente, da ordem de milhões) e serviram para confirmar seu valor inestimável como auxiliar para a classificação da hanseníase, pois ficou plenamente demonstrado que a reação de Mitsuda é, regra geral, negativa em indivíduos com hanseníase virchowiana, predominantemente positiva em pacientes com hanseníase tuberculóide e freqüentemente negativa em pacientes dimorfos. Em outras palavras, a exemplo de outras manifestações, os tipos polares, virchowiano e tuberculóide, de hanseníase comportam-se antiteticamente em relação à reação de Mitsuda. Nos pacientes com hanseníase indeterminada, ou *indiferenciada*, como foi proposto por Rabello (1976) a distribuição das respostas negativa e positiva varia de acordo com a amostra estudada (Rotberg, 1944; Quagliato, 1959; Bechelli et al., 1959, 1973), como consequência da variação da proporção de pacientes que, potencialmente, podem evoluir para o tipo virchowiano ou para o tipo tuberculóide de hanseníase. O importante, porém, é que, de há muito, ficou demonstrado o valor prognóstico da reação de Mitsuda em pacientes com hanseníase indeterminada, pois, neles, a positividade forte ao antígeno de Mitsuda é uma indicação de que não haverá evolução para o tipo virchowiano da doença (Rotberg, 1944). Nas fases reacionais, os pacientes com o tipo tuberculóide da hanseníase podem perder, temporariamente, a capacidade de responder positivamente ao teste de Mitsuda (Souza Lima e Souza Campos, 1947; Bechelli e Quagliato, 1953; Basombrio, 1956).

É geral a aceitação de que a resposta negativa ao teste de Mitsuda dos pacientes virchowianos é permanentemente observada, apesar de terem sido assinalados casos de reações positivas fracas nesses hansenianos, após tratamento (Souza Lima, 1938; Fiol et al., 1947; Basombrio et al., 1950; Schujman, 1951; Martinez-Dominguez, 1953; Bechelli et al., 1959; Azulay et al., 1960; Mukerjee e Kundu, 1961; Leiker, 1961c). De acordo com Bechelli et al. (1959), essas respostas em pacientes virchowianos não têm significação, porque as biópsias dessas reações, ao serem examinadas microscopicamente, não revelam granuloma tuberculóide, típico das reações positivas. Por outro lado, as reações de Mitsuda fracas em pacientes virchowianos parecem ter

ocorrido somente quando se fazia uso das antigas leprominas, com excesso de restos de tecido que atuavam como corpo estranho (Rabello Neto e Silva, 1955). De fato, as suspensões bacilares livres de tecido nunca foram capazes de provocar respostas positivas em pacientes virchowianos (Dharmendra et al., 1954).

A reação de Mitsuda também passou a ser considerada como de grande valor prognóstico em indivíduos sadios depois que ficou claro que, nessas pessoas, a resposta positiva indica resistência pelo menos à hanseníase do tipo virchowiano. Assim, por exemplo, Dharmendra e Chatterjee (1955), em um acompanhamento de 680 comunicantes de hansenianos durante 15 a 20 anos, puderam constatar que apenas um dentre 617 indivíduos Mitsuda-positivo manifestou hanseníase virchowiana, enquanto 14 (21,2%) dentre 63 Mitsuda-negativo vieram a apresentar esse tipo de hanseníase. No Brasil, as observações de Quagliato (1962) em comunicantes que se contagiaram concordaram com as de Dharmendra e Chatterjee (1955), ao evidenciar que aqueles que haviam respondido positivamente ao teste de Mitsuda não manifestaram hanseníase virchowiana.

Como curiosidade histórica, é interessante assinalar, aqui, que Mitsuda não percebera, de início, o valor prognóstico da reação tardia à lepromina, pois, supunha que a resposta negativa apresentada pelos doentes atualmente classificados como virchowianos decorreria de um esgotamento que os impediria de reagir ao *M. leprae*. Ao apresentar seus resultados na III Conferência Internacional de Hanseníase, Mitsuda relatou sua hipótese do seguinte modo: "Assim, nós podemos imaginar que num doente afetado por hanseníase maculosa e nervosa, do mesmo modo que num indivíduo sadio, a resistência frente ao bacilo de Hansen representa um grande papel do ponto de vista da defesa contra a invasão bacilar, enquanto que os hansenianos tuberosos, estando já fatigados pela luta contra o bacilo mostram apenas uma resistência muito débil" (Mitsuda, 1924). Essa explicação aventada por Mitsuda somente foi modificada quando seu assistente Hayashi (1933), que, acompanhou a evolução da doença em seus pacientes, demonstrou que os casos neurais (indeterminados) que se tornavam virchowianos eram os que haviam apresentado, desde o início, resposta negativa à lepromina.

A LEPRIMINA

A técnica de preparação da suspensão de hansenomas triturados, ricos em *M. leprae*, em solução isotônica de cloreto de sódio, esterilizada pelo calor e conservada com ácido fênico, convencionalmente denominada lepromina, sofreu algumas modificações, depois que foi concebida por Mitsuda. Durante muitos

anos, porém, a maioria dos hansenólogos seguiu, basicamente, a técnica de preparação recomendada por Fumio Hayashi (1933) que consistia, essencialmente, em triturar em um gral os hansenomas frescos que tinham sido fervidos em solução isotônica de cloreto de sódio durante 30 a 60 minutos, após o que se juntava, a cada grama do material triturado, 20 ml da solução isotônica usada para ebulição dos hansenomas, empregando-se nova solução no caso de não restar líquido suficiente. Filtrava-se essa suspensão através de gaze, aquecendo-se o filtrado a 60° C durante 60 minutos, adicionando-se, em seguida ácido fênico para obter concentração igual a 0,5%.

Rotberg (1937) e Bechelli e Rotberg (1956) forneceram mais detalhes técnicos e cuidados para a preparação dessa lepromina, que foi denominada de *lepromina integral*, com nome internacional *leprominum integrate (tipo Mitsuda)* e usada para inoculação intradérmica com o auxílio de uma seringa tuberculínica, provida de agulha fina e curta, para evitar refluxo. O volume injetado deveria ser de 0,1 ml, mas, na prática, a maioria sempre se guiou pelo diâmetro da pápula formada durante a operação (1 cm) e, a partir de 1968, foram muitos os que seguiram a recomendação de Hanks (1968a) para, nos casos de injeções sucessivas com agulhas descartáveis, empregar pequenos volumes de lepromina em seringas com uma bolinha de vidro, a fim de garantir a uniformidade da suspensão.

Um número apreciável de hansenólogos experimentou diluições da lepromina integral em proporções variáveis (Diniz e Abrahão Neto, 1953; Floch, 1954; Schujman, 1955; Guinto e Wade, 1958; Miranda, 1962, *inter alia*), não havendo concordância geral quanto aos resultados dessa prática. Kinnear-Brown e Stone (1961), por sua vez, sugeriram o emprego de inoculação por multipunctura de lepromina diluída e glicerinada a 10% porque, segundo eles, com essa técnica, 0,1 ml de lepromina seria suficiente para averiguar a resposta tardia em 25 indivíduos.

Evidentemente, desde o início, ninguém teve dúvidas de que a lepromina integral não era um reagente exemplar. Ao contrário, estava sabidamente longe do ideal por permitir a coexistência de elementos figurados (bacilos de Hansen e restos de tecido), de substâncias hidrossolúveis oriundas dos bacilos e dos hansenomas, bem como de lipídios (bacilares e teciduais). Além disso, como os técnicos que preparavam a lepromina nem sempre tinham o cuidado de fazer comparações microscópicas dos lotes produzidos sucessivamente, a concentração bacilar era variável, mesmo em relação a leprominas produzidas num único laboratório (Lechat e Hanks, 1963), já que, obviamente, o conteúdo dos bacilos nos hansenomas não é constante. Por essa razão, ainda na

década de 60 foram desenvolvidas técnicas para facilitar a contagem dos bacilos de Hansen na lepromina e sua uniformização (Hanks, 1968b,c).

A consciência de que a lepromina poderia ser melhorada fez com que se buscasse uma suspensão bacilar livre de restos de tecidos e de substâncias do hansenoma (*lepromina bacilar*), tendo sido a técnica mais empregada para sua preparação a de Dharmendra (1942b), que fazia uso do clorofórmio para extrair os bacilos, aproveitando o alto peso específico dessa substância e sua grande afinidade por micobactérias. Essa técnica consistia em triturar em clorofórmio os hansenomas previamente autoclavados, aspirando periodicamente o clorofórmio e repondo nova quantidade, com o cuidado de manter a proporção de 2 g de hansenomas para 50 ml de clorofórmio. A adição de novo clorofórmio era controlada pela pesquisa de bacilos em suspensão numa gota aspirada desse líquido. O clorofórmio era evaporado em banho-maria, o resíduo composto por bacilos e lipídios ressuspensado em éter, sendo essa suspensão centrifugada sob refrigeração, a fim de livrar os bacilos sedimentados do lipídio sobrenadante. Secava-se o resíduo em vácuo e preparava-se uma suspensão de bacilos secos a partir de 1 mg do resíduo para 10 ml de solução fisiológica fenicada, triturando o pó, previamente, com algumas gotas de hidróxido de sódio 0,1 N, a fim de facilitar a ressuspensão. Em trabalho posterior, Dharmendra *et al.* (1954) sugeriram reduzir ao mínimo o tempo de tratamento com clorofórmio (cerca de uma hora) e de trituração do pó de bacilos (cinco minutos).

O emprego da lepromina bacilar de Dharmendra não conseguiu substituir a lepromina integral porque as reações positivas provocadas pelo reagente de Dharmendra, além de serem menos duradouras, eram menos intensas do que as obtidas com a lepromina integral. Essa característica deve ser, provavelmente, uma decorrência do tratamento pelo clorofórmio e pelo éter, que enfraquecem a parede celular por remoção de lipopolissacarídeos dos bacilos, o que, prejudica, muitas vezes, sua ácido-resistência. Além disso, a técnica de Dharmendra não propicia boa eliminação dos lipídios do hansenoma.

As restrições apontadas para a lepromina bacilar preparada com o emprego do clorofórmio foram, igualmente, levantadas para aquelas produzidas com o auxílio de enzimas proteolíticas para a digestão dos restos teciduais dos hansenomas (Nakamura, 1957). A técnica sugerida por Hanks (1951) para a preparação de lepromina bacilar por centrifugação fracionada da suspensão de hansenomas em soluções de densidades diferentes afeta menos a estrutura bacilar, mas, por ser muito trabalhosa e de baixa rentabilidade, também não teve aceitação.

Atualmente, a preparação da lepromina integral obedece normas de padronização e segurança recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (Bloom *et al.*, 1979) que requerem cuidados na escolha e processamento dos hansenomas para a preparação da lepromina e testes de esterilidade, inocuidade, reatividade cutânea, conteúdo total de proteína, conteúdo total de fenol e contagem de *M. leprae*. De acordo com essas normas, a concentração de *M. leprae* deve estar entre 40 milhões e 160 milhões por ml, anulando, pois, a exigência anterior da Organização Mundial de Saúde de 160 milhões de bacilos por ml (Hanks *et al.*, 1970). Aqui é interessante lembrar que foram médicos e técnicos do antigo Instituto de Leprologia do Serviço Nacional de Lepra (Milan Tuma, Osmar Mattos, René Garrido-Neves, Marjeta Mazovec Treo e Paulo César de Cantuária Gama, 1969) os primeiros a demonstrar que, para fins práticos, é indiferente a lepromina conter 40 milhões ou 160 milhões de bacilos por ml.

Essas mesmas normas também são aplicáveis à lepromina integral preparada a partir de tecidos de tatus infectados por *M. leprae*. Isso porque, depois que Storrs (1971) e Kirchheimer e Storrs (1971) relataram a transmissão experimental da hanseníase em tatus e que se constatou que as bactérias causadoras das lesões nesses animais eram idênticas àquelas dos hansenianos (Convit e Pinardi, 1974), os tecidos de tatus infectados por *M. leprae* passaram também a ser utilizados como fonte de lepromina integral, a qual tem sido designada por *lepromina A*, sendo A a inicial de *armadillo*, que significa tatu, em espanhol e em inglês. A lepromina preparada a partir de hansenomas, tem sido, por sua vez, designada por *lepromina H*, indicando a letra H, obviamente, a origem humana da suspensão bacilar. A extração do *M. leprae* do fígado de tatus infectados pode ser feita praticamente livre de tecidos e sem tratamento enzimático, com rendimento razoável, por centrifugação em soluções de Percoll formando um gradiente de 40% a 100% (Mori *et al.*, 1984). No Brasil, a lepromina A foi utilizada em ampla investigação, pela primeira vez, por Petri *et al.* (1985).

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA REAÇÃO DE MITSUDA

Hayashi (1933), que fazia três leituras da resposta à injeção de lepromina, a primeira no 8º, a segunda no 16º e a terceira 24º dia após a inoculação, classificava as reações tardias em quatro classes: ausência de induração (-); induração com 3 a 5 mm de diâmetro (+); induração com 5 a 10 mm de diâmetro (++); induração purulenta com mais de 10 mm de diâmetro (+++).

Em 1946, na Conferência Panamericana de Lepra,

realizada no Rio de Janeiro (cf. Bechelli e Rotberg, 1956), foi proposta a leitura da reação de Mitsuda três a quatro semanas após a inoculação da lepromina e a seguinte classificação dos resultados: ausência de elemento visível ou palpável (reação negativa, -); elemento perceptível, sem os caracteres de positividade adiante descritos (reação duvidosa, ±); elemento saliente, infiltrado, de cor variando do róseo ao violáceo, progressivo e persistente, de 3 a 5 mm de diâmetro (reação positiva +); elemento saliente, infiltrado, de cor variando do róseo ao violáceo, progressivo e persistente, com mais de 5 mm de diâmetro (reação positiva ++); reação positiva com ulceração (reação positiva +++). Essa proposta, ratificada nos Congressos Internacionais de Leprologia de 1948 (Havana), de 1953 (Madrid) e de 1958 (Tóquio) é, contudo, conhecida como *classificação de Madrid*.

Em 1963, no VIII Congresso Internacional de Leprologia (Rio de Janeiro) sugeriu-se considerar como reação positiva as respostas com, pelo menos, 5 mm, pressupondo-se a utilização de lepromina com 160 milhões de bacilos de Hansen por ml. A classificação proposta levava em conta as classes — (ausência de reação); ± (induração com menos de 5 mm de diâmetro); + (enduração com 5 a 10 mm de diâmetro); ++ (induração com diâmetro igual ou superior a 10 mm).

Por outro lado, levando em conta a análise da variação das diversas classes de respostas macroscópicas à inoculação de lepromina integral, observadas consecutivamente após diferentes intervalos de tempo (Beiguelman e Quagliato, 1964; Beiguelman, Quagliato e Camargo, 1965), Beiguelman (1971 a) propôs considerar apenas três classes de reação: ausência de reação local ou presença de nódulo com menos de 3 mm de diâmetro (reação 0); nódulo com 3 a 5 mm de diâmetro (reação 1); nódulo com diâmetro superior a 5 mm, que pode estar ulcerado (reação 2).

Visto que essas diferentes propostas para a classificação macroscópica da reação de Mitsuda não diferem fundamentalmente entre si, a assim chamada classificação de Madrid (1953), que leva em conta cinco classes de resposta (-, ±, +, ++ e +++) continua a ser a mais amplamente utilizada.

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA REAÇÃO DE MITSUDA

As primeiras descrições das alterações teciduais, ao nível microscópico, em consequência da inoculação da lepromina integral também foram feitas por Mitsuda. Hayashi (1933), ao comentar que as suas observações concordavam com as de seu mestre, descreveu, com precisão, o que ocorre nas reações tipicamente positivas, relatando que, após a injeção de lepromina, apareciam alterações inflamatórias agudas, as quais eram substituídas

por alterações crônicas, com aparecimento de células epitelióides e gigantócitos, onde os bacilos haviam sido fagocitados. Descreveu, também, a presença de halo linfóide rodeando a área de infiltração de células epitelióides e de gigantócitos, onde, raramente, se observam bacilos álcool-ácido-resistentes.

Com a mesma finalidade de estudo histológico das respostas à inoculação da lepromina integral em seres humanos devem ser mencionados outros trabalhos, dentre os quais despontam os realizados no Brasil, (Schujman, 1936; Rabello Jr. e Rotberg, 1937; Nagai, 1938; Alayon, 1939; Alayon e Souza-Lima, 1940; Nolasco, 1940; Büngeler e Fernandez, 1940; Souza-Lima, 1942; Rodriguez, 1950; Yokota, 1953; Lopes de Faria, 1953; Bechelli et al., 1959; Azulay et al., 1960; Andrade, 1962; Alchorne et al., 1978; Thomas et al., 1980; Michalany e Michalany, 1983; Petri et al., 1985), além dos antigos estudos experimentais de Mariani (1924, 1925) com bacilos vivos e mortos. Entretanto, é importante assinalar que a investigação desse problema em grandes amostras, somente foi realizada por grupos de pesquisadores brasileiros (Luiz Marino Bechelli, Paulo Rath de Souza e Reynaldo Quagliato, 1959; Rubem David Azulay, Lygia M. César de Andrade, Cândido Silva, Américo V. Rabello Netto, Jacob D. Azulay, René Garrido-Neves e Avelino Miguez-Alonso, 1960; Nílceo Schwery Michalany e Jorge Michalany, 1983; Valéria Petri, Ernesto V. Mendes e Bernardo Beiguelman, 1985).

Bechelli et al. (1959) estabeleceram os seguintes critérios para classificar histologicamente a reação de Mitsuda:

1. Reação de Mitsuda histologicamente

positiva: infiltrado inflamatório crônico de certa intensidade, granulomatoso e constituído predominantemente por células epitelióides, assumindo a estrutura tuberculóide. Bacilos ácido-resistentes ausentes ou raros.

2. Reação de Mitsuda histologicamente negativa:

infiltrado inflamatório crônico banal (bacilos em geral ausentes ou em pequeno número) ou granulomatoso, sem estrutura tuberculóide e constituído por elementos histiocitários sem as características das células epitelióides (bacilos presentes em número substancial).

3. Quadro falando a favor de reação de

Mitsuda positiva: infiltrado inflamatório crônico de certa intensidade, porém não totalmente granulomatoso e nem constituído predominantemente por células epitelióides; aqui e ali mostram-se grupados, numa tendência mais ou menos nítida à formação de estruturas nodulares. Pode-se ver um ou outro gigantócito. Bacilos ausentes ou raros.

No estudo de Azulay *et al.* (1960), que foi ampliado por Andrade (1962), esses autores consideraram, do mesmo modo que Hadler (1953a,b) que bastaria a presença de células epitelióides no local do inóculo e a sugestão de uma estrutura tuberculóide em organização para diagnosticar reação de Mitsuda histologicamente positiva, pois isso revelaria a capacidade dos macrófagos de destruir os bacilos de Hansen fagocitados e sua transformação posterior em células epitelióides. No concernente à reação negativa, os critérios foram os mesmos de Bechelli *et al.* (1959).

Jorge Michalany, ao contrário, preferiu detalhar mais as respostas histológicas observadas nas biópsias das reações de Mitsuda. Assim, depois de adiantar a sua classificação em um trabalho de Alchorne *et al.* (1978), publicou, juntamente com Nílceo Schwery Michalany, a versão definitiva da mesma (Michalany e Michalany, 1983). Nela, a reação histologicamente positiva foi subdividida em três classes: **forte** (+++), nos casos em que há infiltrado inflamatório granulomatoso tuberculóide completo com arranjo folicular e ausência de bacilos ácido-resistentes; **moderada** (++) , quando o infiltrado inflamatório granulomatoso tuberculóide é incompleto ou completo, com esboço de arranjo folicular e ausência de bacilos ácido-resistentes, e **fraca** (+), nos casos em que o infiltrado granulomatoso tuberculóide é incompleto, com células epitelióides, mas sem arranjo folicular e com bacilos raros ou ausentes. A classe de reação **duvidosa** (±) **ou sugerindo positividade fraca** foi reservada para os infiltrados inflamatórios não-granulomatosos que mostram bacilos ácido-resistentes raros ou ausentes. Finalmente, a ausência de infiltrado inflamatório com presença de bacilos ácido-resistentes foi considerada como reação **negativa** (-). Essa classificação foi, praticamente, a mesma adotada no trabalho de Petri *et al.* (1985).

Como se vê, as classificações empregadas por Bechelli *et al.* (1959), Azulay *et al.* (1960) e Michalany e Michalany (1983) para a avaliação microscópica da reação de Mitsuda apresentam apenas diferenças de grau, visto que elas residem tão somente na vontade do pesquisador em fornecer mais ou menos detalhes do quadro histológico da resposta tardia à lepromina. Todas, entretanto, levam em conta os eventos que ocorrem nos macrófagos da pele (histiócitos) depois que eles fagocitam os bacilos da lepromina, sendo a positividade relacionada à digestão dos bacilos fagocitados pelos macrófagos e sua transformação em células epitelióides. Quando os macrófagos não digerem os bacilos fagocitados, que permanecem íntegros em seu interior, não existe dúvida em classificar essa resposta microscópica como histologicamente negativa. Como explicar, porém, os casos em que a biópsia da reação de Mitsuda revela infiltrados crônicos banais, com ausência de bacilos ou

com bacilos em pequeno número? Evidentemente, esse quadro histológico não pode ser catalogado entre as reações histologicamente positivas, mesmo quando há negatividade bacilar. A inexistência de células epitelióides e, pelo menos, de uma estrutura tuberculóide-símile, obriga a classificar tal quadro como histologicamente negativo. Mas, como explicá-lo?

Em conseqüência da dificuldade de determinar, nas reações macroscopicamente negativas, o centro da área em que a lepromina foi inoculada, é possível que, em alguns casos, essas estruturas não sejam representativas da lesão provocada pela inoculação da lepromina, simplesmente porque, como sugeriu Hadler (1957), os cortes histológicos podem não ter passado pelo centro das lesões. Contudo, nem em cortes seriados de respostas negativas com infiltrados crônicos banais (Andrade, 1962), nem em casos em que foram feitas marcações precisas do local do inóculo (Petri *et al.*, 1985), a sugestão de Hadler (1957) pôde ser comprovada. Também é possível, é claro, que essas respostas possam resultar de um erro técnico, provocado pela inoculação de poucos bacilos de uma lepromina não homogeneizada. Mas, também é plausível supor, para explicar o desaparecimento dos bacilos de Hansen injetados, que os macrófagos de uma parte dos indivíduos Mitsuda-negativo teriam pouco tempo de duração depois da fagocitose dos bacilos da lepromina. A ruptura das membranas dos lisossomos e vacúolos fagocíticos causaria a liberação descontrolada de enzimas e provocaria, assim, a autólise dessas células (Beiguelman, 1971 a).

No concernente à capacidade ou incapacidade de os macrófagos digerirem os bacilos de Hansen, que, por sinal, é, de há muitos anos, considerado como a micobactéria mais resistente à destruição biológica (Leloir, 1887; Metalnikov e Toumanoff, 1923; Souza-Araújo, 1931; Hadler, 1962), é importante assinalar que essas características dizem respeito a bacilos aparentemente íntegros, porque, em relação a leprominas compostas por bacilos fragmentados, a capacidade dos macrófagos de destruí-los parece ser universal (Beiguelman, 1968). Por outro lado, também é importante acentuar que, nos indivíduos Mitsuda-negativo, a incapacidade dos macrófagos de destruir o *M. leprae* é específica para essa espécie, já que outras micobactérias são digeridas, após fagocitose, pelos macrófagos de pacientes virchowianos tanto *in vivo* (Floch, 1952; Yokota, 1953; Yanagisawa *et al.*, 1960a,b; Leiker, 1961; Convit *et al.*, 1972, 1974) quanto *in vitro* (Beiguelman, 1968). Foi essa observação que levou Convit e colaboradores (1979) a tentar uma vacina que consistia de uma suspensão de BCG com bacilos de Hansen mortos pelo calor.

A análise microscópica da reação de Mitsuda não ficou restrita ao estudo histológico de biópsias feitas no local

da inoculação. De fato, Garrido Neves (1962) empregou um exame citobacterioscópico, que permite classificar microscopicamente as respostas ao teste de Mitsuda em duas classes alternativas, dependendo do comportamento dos macrófagos. Esse teste consistiu da análise do material colhido por raspagem dos bordos da incisão, feita com bisturi, na zona mediana da pele inoculada com lepromina. De acordo com Garrido Neves (1962), nas reações negativas predominam os macrófagos vacuolados com bacilos no citoplasma, enquanto que nas reações positivas predominam as células epitelióides e as células gigantes, tipo Langhans, com escassas granulações bacilares ou número escasso de bacilos com aspecto granuloso.

Outra maneira de analisar microscopicamente os resultados da fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos foi feita com o emprego de monócitos do sangue mantidos *in vitro*, os quais, nessas condições, adquirem as características dos histiócitos migrantes dos tecidos. Benevolenskaja (1932) parece ter sido a primeira a observar a capacidade fagocítica de macrófagos originados dessa forma, em relação ao *M. leprae*, tendo partido essa autora de amostras de sangue total, do mesmo modo que Treo e Silva (1963). Outros pesquisadores usaram técnicas diversas, diferenciando os monócitos depois de incubar todos os leucócitos separados do sangue como coágulo ou como creme leucocitário, ou depois de separá-los por centrifugação diferencial (Beiguelman e Barbieri, 1965; Beiguelman, 1966, 1967, 1968, 1971 b; Barbieri e Correa, 1967; Godal e Rees, 1970; Drutz e Cline, 1970; Delville, 1971; Pisani, Beiguelman e Opromolla, 1973; Parmaswaran et al., 1976; Veliath et al., 1979; Villalba-Freire-Maia, 1983a, b).

Com exceção de Godal e Rees (1970), Drutz e Cline (1970) e Parmaswaran et al. (1976), todos os autores observaram que os macrófagos oriundos de monócitos de hansenianos mantidos *in vitro* corresponderam a expectativa de não digerir os bacilos da lepromina quando procediam de pacientes virchowianos, seguramente Mitsuda-negativo, de digerir esses bacilos quando procediam de pacientes tuberculóides Mitsuda-positivo e de mostrar fraca atividade de lise bacilar nos pacientes dimorfos. Entretanto, nos indivíduos sadios, apesar de todos concordarem que neles existe uma variabilidade da capacidade de lise bacilar pelos macrófagos derivados dos monócitos, nem Pisani et al. (1973) nem Veliath et al. (1979) conseguiram observar uma associação entre a intensidade da reação de Mitsuda e a velocidade de lise dos bacilos *in vitro*, o que contraria os resultados publicados por Barbieri e Correa (1967).

CORRESPONDÊNCIA ENTRE AS CLASSES DE REAÇÃO DE MITSUDA LIDAS MACROSCÓPICA E HISTOLOGICAMENTE

A análise microscópica das biópsias das reações de Mitsuda provocadas pela lepromina integral em hansenianos revelou que, nesses pacientes, a resposta negativa (-) e as positivas fortes (+ + e +++) tiveram boa correspondência histológica. Assim, nos dados de Bechelli et al. (1959), cerca de 95% dos hansenianos com reação de Mitsuda macroscopicamente negativa mostraram uma resposta histológica igualmente negativa, enquanto que entre os pacientes com reação de Mitsuda ++ e +++, apenas 7% apresentaram resposta histologicamente negativa, devendo-se notar que nenhum hanseniano com resposta +++ apresentou quadro histológico negativo. Além disso, tanto no caso das reações + + + quanto nas reações ++ a estrutura histológica predominante foi o granuloma tuberculóide. Já entre os hansenianos com reação de Mitsuda fraca (+), a porcentagem daqueles com resposta histologicamente negativa foi maior (33%), crescendo para 67% entre aqueles com reação de Mitsuda duvidosa (±).

Convit et al. (1972), empregando uma lepromina mais concentrada que a usual (640 milhões de bacilos por ml), para poder provocar uma reação tardia macroscopicamente perceptível em pacientes virchowianos, não conseguiram observar reação histologicamente positiva nos pacientes com lesões ativas nem nos bacteriologicamente negativos. Notaram, entretanto, que nos pacientes virchowianos há graus variados de incompetência de seus macrófagos para digerir os bacilos fagocitados. Assim, enquanto em alguns pacientes os bacilos da lepromina aparentavam integridade mesmo após 120 dias no local do inóculo (totalmente incompetentes), em outros os macrófagos mostravam maior competência para digerir tais bacilos, eliminando-os num período entre 90 e 120 dias (Convit et al., 1979).

Entre os comunicantes de hansenianos, os resultados de Bechelli et al. (1959) mostraram uma associação entre as respostas macroscópicas e histológicas à lepromina bem semelhante à observada nos hansenianos. Já em uma grande amostra de pessoas sadias (100) que não eram comunicantes de hansenianos, a investigação feita por Petri et al. (1985) do quadro histológico da reação de Mitsuda provocada por lepromina integral revelou um resultado diverso. Assim, tanto as biópsias dos 77 indivíduos Mitsuda-positivo (+, ++ e +++) quanto as dos 19 Mitsuda-duvidoso (±) mostraram diferentes graus de positividade histológica, sendo que, entre os Mitsuda-positivo, a intensidade das respostas macroscópicas não mostrou associação significativa com o grau de positividade histológica. Além disso, entre os

poucos Mitsuda-negativo (4), um apresentou positividade histológica.

Os resultados de Petri et al. (1985) falam, pois, a favor de que, entre os indivíduos sadios que não são comunicantes de hansenianos, qualquer reação tardia provocada pela lepromina no local da inoculação, mesmo que seja uma infiltração com menos de 3 mm de diâmetro, não deveria ser catalogada como reação de Mitsuda duvidosa (\pm) e muito menos negativa, porque ela seria uma indicação de que os macrófagos desses não-comunicantes são capazes de digerir o *M. leprae* fagocitado. Em outras palavras, para os não-comunicantes não se deveriam aplicar os mesmos critérios que são empregados para os comunicantes. Visto que a pesquisa de Petri et al. (1985) foi feita com lepromina integral A, seria interessante repetir essa investigação em outra amostra de não-comunicantes, com o emprego de lepromina integral H, a fim de comparar os resultados.

FATORES QUE INFLUENCIARAM A REAÇÃO DE MITSUDA EM INDIVÍDUOS SADIOS

Pode-se afirmar sem medo de errar que o conhecimento dos fatores que influenciam a reação de Mitsuda em indivíduos sadios foi, em grande parte, alcançado graças às contribuições da escola brasileira de hansenologia, a começar pela brilhante intuição de Rotberg, ao estabelecer, já em 1937, a sua hipótese sobre a natureza da reação de Mitsuda. De acordo com a hipótese de Rotberg (1937), apenas uma pequena fração da população seria, geneticamente, incapaz de reagir à infecção pelo bacilo de Hansen ou à inoculação desses bacilos mortos contidos na lepromina, razão pela qual esse grupo seria permanentemente Mitsuda-negativo. Segundo ele, os indivíduos pertencentes a essa fração da população seriam incapazes de responder imuno-alérgicamente ao *M. leprae* e, por isso, estariam contidos no que ele chamou de *margem anérgica*. Os indivíduos com hanseníase virchowiana se originariam, portanto, dessa fração da população. Ainda de acordo com Rotberg (1937) a maioria dos seres humanos nasceria com resistência à infecção pelo *M. leprae* mas, para demonstrar essa resistência geneticamente determinada, isto é, para demonstrar positividade ao teste de Mitsuda, essas pessoas necessitariam passar por um processo imuno-alérgico, que ele pensou, inicialmente, ser provocado somente pelo *M. leprae*. Posteriormente ele estendeu a experiência imunológica a outras micobactérias.

Numerosos estudos feitos desde então trouxeram argumentos a favor da consistência da teoria de Rotberg (1933), sendo muito importantes aqueles feitos por Walter Augusto Hadler, usando o modelo animal do cobaio e do

rato. Os macrófagos do cobaio têm a capacidade de digerir tanto o *M. leprae* quanto o *M. tuberculosis* que fagocitam (Hadler, 1953b). Por ser a destruição bacilar dentro dos macrófagos a condição essencial para o desenvolvimento de hipersensibilidade (Hadler, 1953a), essas micobactérias, bem como o *M. lepraemurium* têm a capacidade de provocá-la, o que pode ser demonstrado pelo teste tuberculínico (Hadler e Ziti, 1953). Os macrófagos do rato, por sua vez, não têm capacidade de destruir o *M. lepraemurium* nem o *M. leprae* da lepromina, mas digerem o *M. tuberculosis* fagocitado.

Quando inoculados intradermicamente com lepromina, tanto o cobaio quanto o rato mostram macroscopicamente pouca reação cutânea no local do inóculo, a qual pode ser catalogada como negativa. O estudo histológico, porém, revela que os macrófagos dessas duas espécies têm um comportamento diferente em relação ao *M. leprae*. Enquanto os macrófagos do cobaio digerem os bacilos da lepromina e se transformam em células epitelíodes, os do rato não conseguem lisá-los, de sorte que esses bacilos se acumulam em seu interior. A vacinação desses animais com BCG não altera a capacidade de lise dos macrófagos em relação ao *M. leprae*, mas afeta macroscopicamente a intensidade da resposta. De fato, os cobaios previamente hipersensibilizados mostram maior nódulo no local da inoculação da lepromina, mas a estrutura e citologia da lesão não difere da dos cobaios não vacinados (Hadler, 1956). Nos ratos vacinados com BCG, a sensibilização é menor do que a desenvolvida por cobaios nas mesmas condições. De qualquer modo, mesmo nos ratos que mostram reação macroscópica mais intensa no local da inoculação da lepromina, essa reação não pode ser catalogada como positiva porque não possui correspondência histológica (Hadler e Ziti, 1955).

Como se vê, de acordo com o modelo animal utilizado por Hadler, os macrófagos do rato se comportariam, em relação aos bacilos da lepromina, como os dos indivíduos da fração da população contida no que Rotberg denominou de margem anérgica. Os macrófagos do cobaio, por sua vez, se comportariam de modo análogo aos dos indivíduos resistentes à hanseníase, os quais, desde que devidamente sensibilizados, expressam macroscopicamente a capacidade de digerir os bacilos da lepromina, isto é, mostram-se Mitsuda-positivo. Por essa analogia, nos indivíduos cujos macrófagos são geneticamente capazes de destruir o *M. leprae* após fagocitose, a sensibilização poderia ser induzida tanto pelo *M. leprae* quanto pelo *M. tuberculosis* ou outras micobactérias com similaridade antigênica e que pudessem ser lisadas. Já nos indivíduos cujos macrófagos são geneticamente incapazes de destruir o *M. leprae*, a sensibilização provocada pelo *M. tuberculosis* ou outras micobactérias não seria capaz de alterar o comporta-

mento dos macrófagos em relação *M. leprae* fagocitado. Esse modelo explicaria, também, a razão pela qual Bechelli, Rath de Souza e Quagliato (1959) observaram em comunicantes de hansenianos, geralmente vacinados com BCG, respostas positivas ao teste de Mitsuda com histologia negativa.

O apoio à hipótese de Rotberg (1937) veio, também de resultados obtidos em seres humanos. Assim, ficou demonstrado que a inoculação repetida de lepromina era capaz de favorecer a positividade da reação de Mitsuda (Paula-Souza et al., 1953; Ignacio et al., 1955; Silva et al., 1955; Doull et al., 1957; Olmos-Castro e Arcuri, 1957; Rosemberg et al., 1960; Leiker 1961a,b; Beiguelman, Quagliato e Camargo, 1965). Por outro lado, a hipótese de que a infecção pelo *M. tuberculosis* também influenciaria a expressão da positividade da reação de Mitsuda foi fortalecida pela existência de associação entre as reações de Mantoux e de Mitsuda em indivíduos sem hanseníase (Souza-Campos et al., 1955; Lowe e Davey, 1956; Doull et al., 1957, 1959; Paula-Souza e Bechelli, 1960; Leiker, 1961 b; Beiguelman e Quagliato, 1965), sendo interessante assinalar que Kinnear-Brown e Stone (1961) observaram ser a positividade à lepromina mais alta nos indivíduos cuja positividade ao Mantoux havia sido provocada pelo BCG do que nos "naturalmente" Mantoux-positivo.

O estudo sobre o efeito do BCG na indução de positividade da reação de Mitsuda foi iniciado por Fernandez, em 1939, que desencadeou uma extensa bibliografia sobre esse assunto, na qual os estudiosos brasileiros ocuparam lugar de destaque (Rosemberg et al., 1950a-c, 1951a,b, 1952a-e, 1960; Souza-Campos, 1953a,b, 1956; Paula Souza et al., 1953, 1956; Silva et al., 1955; Bechelli et al., 1956; Bechelli e Quagliato, 1956; Quagliato, 1957; Souza-Campos et al., 1962, entre outros). Foi, porém, o trabalho impecável, do ponto de vista metodológico, de Nelson Souza-Campos, Walter Leser, Reynaldo Quagliato, Luiz Marino Bechelli e Abrahão Rotberg (1962), que permitiu demonstrar de modo inofismável que, em crianças entre seis meses a três anos de idade, a vacinação com o BCG suscita a manifestação da reação macroscopicamente positiva ao teste de Mitsuda, sem que se pudesse atribuir às inoculações prévias de lepromina uma participação nesse sentido.

As tentativas de provocar respostas positivas ao teste de Mitsuda em pacientes virchowianos vacinados com BCG não deram resultados animadores, pois houve pequena proporção de respostas fracamente positivas, sem persistência (Azulay et al., 1952; Convit et al., 1952; Quagliato e Bechelli, 1953; Costa e Teixeira, 1953; Dharmendra et al., 1953; Jonquieres e Masanti, 1954;

Lowe e McNulty, 1953; Schujman, 1956; Contreras et al. 1958). A eficiência da vacinação com BCG também foi menor nos filhos sadios de pacientes com hanseníase virchowiana, nos quais suscitou menos respostas positivas ao teste de Mitsuda do que entre os filhos de casais sem hanseníase (Beiguelman, Souza Campos e Pinto Jr., 1967). Esse resultado, bem como os casos conhecidos de parentes consangüíneos de pacientes virchowianos que sempre respondem negativamente ao teste de Mitsuda, mesmo após calmetização, favorecem, evidentemente, a hipótese de que não apenas esses pacientes, mas também uma parte de seus consangüíneos, pertencem a uma linhagem genética de indivíduos que não respondem ou só respondem fracamente à inoculação de lepromina. No mesmo sentido estão os dados de Cambiaghi (1960), ao demonstrar que a proporção de respostas positivas ao teste de Mitsuda significativamente menor nos filhos de comunicantes de pacientes virchowianos em comparação com os filhos de não-comunicantes de hansenianos do mesmo grupo etário.

Poucos indivíduos são capazes de responder positivamente ao teste de Mitsuda em tenra idade (Paula Souza e Bechelli, 1960; Souza Campos et al., 1962), mas em várias populações do Brasil e do exterior ficou demonstrado que a proporção de pessoas Mitsuda-positivo aumenta com a idade apesar de, em nenhum grupo etário, a resposta positiva atingir a totalidade dos indivíduos (Rotberg, 1937; Del Favero, 1948; Martinez-Dominguez, 1953; Convit e Rassi, 1954; Guinto et al., 1955; Bechelli et al., 1957; Beiguelman, 1962; Beiguelman e Quagliato, 1965). Visto que a idade está associada a experiências imunológicas, o aumento da proporção de pessoas Mitsuda-positivo com a idade pode ser aceito como outra indicação de que a resposta tardia macroscopicamente positiva à inoculação de lepromina depende da influência de agentes sensibilizantes, o que não exclui, evidentemente, a importância da dinâmica hormonal durante o desenvolvimento para a expressão dessa resposta. Essa indicação, entretanto, adquire força quando se observa que a frequência de respostas positivas ao teste de Mitsuda é menor em populações rurais quando comparadas às urbanas (Beiguelman, 1962; Beiguelman e Quagliato, 1965). Esses dados são coerentes com os obtidos por Bechelli, Quagliato e Nassif (1957), em holandeses sem contato conhecido com hansenianos, e por Azulay (1962), em índios Carajás da Ilha do Bananal, que mostraram altíssima proporção de respostas negativas. Tais índios tinham, à época, contato relativamente pequeno com brancos e "diminutas possibilidades de infecções prévias com *M. leprae* e *M. tuberculosis*".

ESTUDOS GENÉTICOS SOBRE A REAÇÃO DE MITSUDA

Apesar de Rotberg ter proposto em 1937 uma hipótese genética para explicar a reação de Mitsuda, as investigações a respeito da possibilidade de tal reação ser um polimorfismo genético somente foram iniciadas 25 anos depois, em uma amostra de 220 famílias de Rio das Pedras, SP sem casos de hanseníase (Beiguelman, 1962). Nessa amostra, ficou demonstrado que a reação de Mitsuda é, indiscutivelmente, um caráter familiar, pois há uma grande associação entre as distribuições dessa reação nas gerações paterna e filial, resultante de os filhos de genitores Mitsuda-negativo terem maior probabilidade de apresentar resposta negativa ao teste de Mitsuda do que os filhos de genitores Mitsuda-positivo. Essa associação familiar permitiu aventar a hipótese de que ela poderia decorrer de um par principal de alelos autossômicos, com relação de dominância, sendo a resposta negativa ao teste de Mitsuda recessiva, aceitando-se, entretanto, que uma parte dos homozigotos recessivos poderia manifestar reação positiva, como decorrência da ação de fatores do ambiente (Beiguelman, 1962, 1963, 1971a).

A associação familiar da reação de Mitsuda foi confirmada em outra amostra, de 100 famílias sem casos de hanseníase, residentes em Cosmópolis, SP (Beiguelman e Quagliato, 1965; Beiguelman, 1971a), bem como em famílias de hansenianos do Brasil e da Índia (Beiguelman, 1965; Saha e Agarwal, 1979; Kundu et al., 1979). Além disso, ao analisar quantitativamente a reação de Mitsuda em famílias de hansenianos e naquelas sem essa doença, Botasso et al. (1984), na Argentina, constataram uma correlação significativa entre as médias das respostas dos genitores e dos filhos.

Nas famílias de hansenianos de Campinas, mais expostas do que as pessoas da população geral a agentes sensibilizantes (inoculações repetidas de lepromina, vacinação com BCG, exposição à infecção pelo *M. leprae*), a associação familiar da reação de Mitsuda foi mais acentuada do que nas famílias de indivíduos sadios (Beiguelman, 1965), provavelmente porque, nas primeiras, os agentes sensibilizantes acentuariam a correspondência entre a resposta macroscópica e a histológica à inoculação da lepromina

Nas famílias de hansenianos brasileiros, a hipótese de herança monogênica autossômica da reação de Mitsuda, com a reação positiva sendo o fenótipo dominante, ficou perfeitamente satisfeita quando foram levados em conta apenas as irmandades geradas por casais que incluíam pelo menos um cônjuge Mitsuda-positivo. Entretanto, entre os filhos de casais virchowianos e, portanto, indiscutivelmente Mitsuda-negativo, constatou-se que 30,9% responderam positivamente à inoculação da lepromina, em vez de todos, ou

praticamente todos, os membros das irmandades serem Mitsuda-negativo (Beiguelman, 1965). Para explicar essa discrepância foi aventada a hipótese de que a capacidade de lise, isto é, de destruição do bacilo de Hansen fagocitado pelos macrófagos poderia ser um fenômeno de limiar (Beiguelman, 1967, 1968, 1971a).

De acordo com com essa hipótese, tanto as pessoas classificadas como tendo o fenótipo *lisador* quanto aquelas com o fenótipo *não-lisador* teriam macrófagos com graus diferentes de lise (*limiões de lise*). Desse modo, tanto os lisadores quanto os não-lisadores seriam heterogêneos. Admitindo que, segundo o limiar de lise, tanto os lisadores quanto os não-lisadores se distribuiriam de modo unimodal, podia-se admitir, também, que a distribuição dos seres humanos segundo a capacidade de seus macrófagos em digerir o bacilo de Hansen seria bimodal. Essa capacidade de lise seria, pois, um caráter semi-descontínuo, com os fenótipos lisador e não-lisador discriminados pela região antimodal.

Assim, aceitar-se-ia um *gene principal* autossômico responsável pelo fenótipo lisador e um seu alelo principal responsável pelo fenótipo não-lisador. Em outras palavras, a capacidade de lise dos macrófagos em relação aos bacilos de Hansen fagocitados seria um caráter genético que dependeria muito de fatores do ambiente para se expressar. Por isso, em que pese a alta probabilidade de encontrar uma reação de Mitsuda histologicamente positiva nos indivíduos em que essa reação também é positiva macroscopicamente, isto é, em que pese a alta associação existente entre ambas, a primeira poderia ser herdada e a segunda não. Essa teoria também não exclui a possibilidade de ocorrência de genocópias do alelo não-lisador, isto é, de se admitir que a incapacidade de destruição dos bacilos de Hansen pelos macrófagos pode ser conseqüência de mais de um tipo de erro genético.

De acordo com essa nova proposta, poder-se-ia explicar a ocorrência dos cerca de 30% de indivíduos macroscopicamente Mitsuda-positivo observados por Beiguelman (1965) entre os filhos de casais virchowianos e, portanto, seguramente Mitsuda-negativo, como conseqüentes das seguintes causas:

1. alguns casais virchowianos poderiam ser constituídos por genocópias e, por causa dos genótipos discordantes, dariam origem a filhos com o genótipo lisador, capaz, portanto, de estar associado a uma reação de Mitsuda macroscopicamente positiva;

2. alguns filhos de casais virchowianos, apesar de seu genótipo não-lisador, poderiam ter sido transformados em lisadores (fenocópias), mormente se seu limiar de lise estivesse próximo do valor antimodal, em conseqüência de maior exposição à vacinação com BCG e inoculações repetidas de lepromina;

3. alguns filhos de casais virchowianos poderiam expressar respostas macroscopicamente positivas ao teste de Mitsuda sem correspondência histológica;

4. alguns filhos de casais virchowianos seriam ilegítimos, o que não era um acontecimento pouco freqüente entre esses casais (Pinto Jr. & Beiguelman, 1967).

Apesar de a teoria do limiar de lise também mostrar-se útil para explicar a ocorrência das diferentes formas de Hanseníase, os dados epidemiológicos mundiais sobre a Hanseníase virchowiana e tuberculóide, e os resultados da única análise quantitativa da reação de Mitsuda em gêmeos (Beiguelman, 1971a, 1983), ela não saiu do terreno da especulação. Tal situação permaneceu até recentemente, quando a investigação da distribuição familiar da reação de Mitsuda foi retomada por Feitosa, Krieger, Borecki, Beiguelman e Rao (1996) com aplicação do método de análise de segregação complexa de Lalouel et al. (1985). Os dados familiares disseram respeito a 544 famílias nucleares de hansenianos que tinham recebido atenção médica do Dr. Reynaldo Quagliato no Dispensário de Campinas do extinto Departamento de Profilaxia da Lepra do Estado de São Paulo. Todas as reações de Mitsuda haviam sido classificadas de acordo com as recomendações do Sexto Congresso Internacional de Hanseníase (Madri, 1953). Entretanto, levando em conta os estudos de Bechelli et al. (1959) e de Azulay et al. (1960) sobre a correspondência histológica das reações de Mitsuda em comunicantes de hansenianos, na análise realizada por Feitosa et al. (1996), as reações +, ++ e +++ foram consideradas como resposta positiva, ao passo que as reações - e ± foram classificadas como resposta negativa.

Os resultados da análise de segregação aplicada aos dados familiares de Campinas, SP, revelaram que a associação familiar da reação de Mitsuda notada pela primeira vez por Beiguelman (1962) é inquestionável, do mesmo modo que se deve aceitar, para explicar essa associação familiar, a transmissão mendeliana de um par principal de alelos. Essa mesma análise indicou, ainda, que o efeito do gene determinante da reação de Mitsuda positiva não é completamente dominante ($d = 1$), e sim parcialmente dominante ($d = 0,811$). Esses resultados acenam, pois, com a possibilidade de localização do

eventual loco gênico responsável pela reação de Mitsuda, o que equivale a dizer que eles apontam para a tentativa de, com o emprego de métodos da genética molecular, localizar um gene responsável pela predisposição à manifestação da Hanseníase virchowiana.

Sabendo-se que a região distal do braço inferior do cromossomo 2 humano (região 2q31- 2q37) contém um loco homólogo ao do *Bcg* do camundongo, responsável pela resistência ou suscetibilidade inata à infecção por numerosas micobactérias (Schurr et al., 1990), poder-se-ia tentar, como próximo passo, estudos de ligação da reação de Mitsuda com marcadores dessa região. Oxalá essa tentativa resulte em maior sucesso do que aquelas que tiveram por objetivo os estudos de ligação entre os marcadores dessa região do cromossomo 2 humano e a Hanseníase (Shaw et al., 1993; Levee et al., 1994).

CONCLUSÃO

Apesar de a lepromina integral ser considerada um reagente rústico, ela continua tendo importância fundamental em Hansenologia, porque, até o presente, não se encontrou um substituto para competir com a reação de Mitsuda em seu valor prognóstico, mormente na Hanseníase indeterminada e dimorfa, e na avaliação da resistência de comunicantes à manifestação da Hanseníase virchowiana. Por outro lado, graças ao estudo da reação de Mitsuda, pode-se antever a possibilidade de localizar, com o emprego de métodos da genética molecular, o eventual gene responsável pela predisposição à manifestação da Hanseníase virchowiana.

SUMMARY

The present paper intends to be a brief review of the literature on Mitsuda reaction at its eightieth anniversary. It is emphasized the fundamental contributions of Brazilian researchers to the clinic-epidemiologic, histologic, genetic and animal experimentation studies of this skin test, which has important prognostic value for indeterminate and borderline leprosy, and is also sensitive for evaluating the resistance of leprosy contacts to lepromatous leprosy.

Key words: Mitsuda reaction. Lepromin. Mitsuda's antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAYON, F.L. Histologia do lepromin-test nos lepromatosos. *Rev. Bras. Lepr.*, 7: 3-4, 1939.
2. ALAYON, F.L., SOUZA-LIMA, L. Sobre a histologia da reação de Mitsuda em lepromatosos. Nova contribuição ao seu estudo. *Rev. Bras. Lepr.*, 8: 367-374, 1940.
3. ALCHORNE, M.M.A., ROTBERG, A., MICHALANY, J., VARGAS, P.O., CASSIANO, T.P. Prognostic considerations based on a study of 38 hansenian patients submitted to Mitsuda tests 23 to 35 years previously. *Hansen. Int.*, 3: 5-11, 1978.
4. ANDRADE, L.M.C. Comparação entre os aspectos microscópicos e macroscópicos do teste lepromínico. *Bol. Serv. Nac. Lepra* (Rio de Janeiro), 21: 95-124, 1962.
5. AZULAY, R.D. Lepromino-reação em coletividades indenes de lepra. *Bol. Serv. Nac. Lepra* (Rio de Janeiro), 21: 353-360, 1962.
6. AZULAY, R.D., MOURA, A., MOURAO, G. A viragem da reação lepromínica pelo BCG administrado aos doentes lepromatosos em condições clínico-bacterioscópico-histológicas de "transferência para dispensário". *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 178-182, 1952.
7. AZULAY, R.D., ANDRADE, L.M.C., SILVA, C., RABELLO NETO, A.V., AZULAY, J.D., GARRIDO-NEVES, R., MIGUEZ-ALONSO, A. Comparison of the macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *Int. J. Leprosy.*, 28: 38-43, 1960.
8. BARBIERI, T.A., CORREA, W.M. Human macrophage culture. The leprosy prognostic test (LPT). *Int. J. Leprosy.*, 35: 377381, 1967.
9. BARGHER, P. Künstliche lepraspezifische Allergie und aktive Immunisierung gegen Lepra. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie*, 49: 346-353, 1927.
10. BASOMBRIO, G. The lepromin reaction in tuberculoid cases. *Int. J. Leprosy.*, 24: 86-87, 1956.
11. BASOMBRIO, G., GATTI, J.C., CARDAMA, J.E., COLOMBO, C.V. Modificaciones de la lepromino reacción. *Int. J. Leprosy.*, 18: 481-486, 1950.
12. BECHELLI, L.M., QUAGLIATO, R. Teste de Mitsuda na lepra tuberculóide em reação. *Rev. Bras. Lepr.*, 21: 51-58, 1953.
13. BECHELLI, L.M., QUAGLIATO, R. Dados epidemiológicos iniciais sobre a possível ação premunitória do BCG, via oral, em comunicantes de doentes de lepra. *Rev. Bras. Lepr.*, 24: 23-36, 1956.
14. BECHELLI, L.M., ROTBERG, A. *Compêndio de Leprologia*. Serviço Nacional de Lepra, Rio de Janeiro, 2a ed., 1956.
15. BECHELLI, L.M., QUAGLIATO, R., NASSIF, S.J. Lepromino-reação em holandeses radicados há 2-3 anos no Brasil e sem contacto conhecido com doentes de lepra. *Rev. Bras. Lepr.*, 25: 107-125, 1957.
16. BECHELLI, L.M., RATH-DE-SOUZA, P., QUAGLIATO, R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Lepr.*, 27: 172-182, 1959.
17. BECHELLI, L.M., PAULA-SOUZA, R. DE, QUAGLIATO, R., FERRAZ, N.T. BCG por via oral e positavação remota do teste lepromínico em escolares sãos. *Rev. Bras. Lepr.*, 24: 1-8, 1956.
18. BECHELLI, L.M., GARCIA, G., NAKAMURA, S., QUAGLIATO, R. Determinação da data da leitura da reação de Mitsuda com lepromina integral em indivíduos sãos, sem exposição prévia conhecida ao M. *leprae*. *An. VIII Cong. Int. Lepr.*, Rio de Janeiro, 3: 284-294, 1963.
19. BECHELLI, L.M., GARBAJOSA, P.J., GYI, M.M., WALTER, J., TAMONDONG, C. Late lepromin reaction in untreated patients with indeterminate leprosy under 21 years old in Burma. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 48: 113-116, 1973.
20. BEIGUELMAN, B. Hereditariedade da reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Lepr.* 30: 153-172, 1962,
21. BEIGUELMAN, B. Genetics and Leprosy. Heredity of Mitsuda's skin reaction. *An. VIII Cong. Int. Lepr.*, Rio de Janeiro, 3: 302-309, 1963.
22. BEIGUELMAN, B. The genetics of resistance to leprosy. *Int. J. Leprosy.* 33: 808-812, 1965.
23. BEIGUELMAN, B. Further results on the genetics of leprosy resistance. *Abstracts of Contributed Papers, III Int. Cong. Human Genet.* (Chicago, USA): 6-7, 1966.
24. BEIGUELMAN, B. Leprosy and genetics. A review of past research with remarks concerning future investigations. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 37: 461-476, 1967.
25. BEIGUELMAN, B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 17: 584-594, 1968.
26. BEIGUELMAN, B. Lepromin reaction: genetic studies including twin pair analysis. *Acta Leprol.*, No. 44: 5-65, 1971a.
27. BEIGUELMAN, B. Fate of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Int. J. Leprosy.*, 39: 896, 1971b.

28. BEIGUELMAN, B. An appraisal of genetic studies in leprosy. **Acta Genet. Med. Gemelloi.** 21: 21-52, 1972.
29. BEIGUELMAN, B. Leprosy and genetics: a review. **Braz. J. Genet.**, 6: 109-172, 1983.
30. BEIGUELMAN, B., QUAGLIATO, R. Sobre a reação de Mitsuda. **Rev. Bras. Lepr.**, 32: 39-46, 1964.
31. BEIGUELMAN, B., QUAGLIATO, R. Nature and familial character of the lepromin reactions. **Int. J. Leprosy.**, 33: 800-807, 1965.
32. BEIGUELMAN, B., BARBIERI, T.A. Comportamento dos macrófagos nas formas polares de lepra. **Ciênc. Cult.**, 17: 304-305, 1965.
33. BEIGUELMAN, B., QUAGLIATO, R., CAMARGO, D.P. Influence of repeated lepromin injections on the Mitsuda skin reaction. **Int. J. Leprosy.**, 33: 795-799, 1965.
34. BEIGUELMAN, B., SOUZA-CAMPOS, N., PINTO JR., W. Fatores genéticos e efeito da calmetização na reação de Mitsuda. **Rev. Paul. Med.**, 71: 271-278, 1967.
35. BENEWOLENSKAJA, S.W. Ueber die in-vitro-reaktion der embryonalen Gewebe and Leukozyten des Menschen auf Leprabazillen. **Arch. exp. Zellforsch.**, 13: 37-46, 1932.
36. BLOOM, B.R., CONVIT, J., GODAL, T., NOORDEEN, S.K., PERKINS, F.T., REES, R.J.W., SANSARRICQ, H., SHEPARD, C.C., TORRIGIANI, G., WALTER, J. Recommended safety requirements for the preparation of lepromin: a WHO Memorandum. **Bull. Wild. Hlth. Org.**, 57: 921-923, 1979.
37. BOTASSO, O.A., POLI, H.O., MORINI, J.C., RABASA, S.L. Estudio genético de la resistencia a la infección con el bacilo de Hansen en familias con o sin lepra. **Medicina** (Buenos Aires) 44: 467-470, 1984.
38. BUNGELER, W., FERNANDEZ, J.M.M. Estudo clínico e histopatológico das reações alérgicas na lepra. Ia. Parte: Investigações clínicas sobre a reação à lepromina (reação de Mitsuda). **Rev. Bras. Lepr.**, 8: 157-170, 1940.
39. CAMBIAGHI, O. Reação de Mitsuda em crianças de 5 a 13 anos de idade. Estudo comparativo entre comunicantes de doentes lepromatosos e não comunicantes de doentes de lepra. **Rev. Bras. Lepr.**, 28: 77-90, 1960.
40. CHAUSSINAND, R. Tuberculose et lépre, maladies antagoniques. Eviction de la lépre par la tuberculose. **Int. J. Leprosy.**, 16: 431-438, 1948.
41. CONTRERAS, E., GUILLEN, J., TABARIN, J., TERCENIO, J. Resultados clínicos y inmunológicos en hansenianos adultos vacunados con BCG por via oral. **Fontilles**, 4: 33-38, 1958.
42. CONVIT, J., RASSI, E. Lepromin and tuberculin tests in Venezuelan leprosy foci, induction of lepromin reactivity by BCG vaccination. **Int. J. Leprosy.**, 23: 303-310, 1954.
43. CONVIT, J., PINARDI, M.E. Leprosy. Confirmation in the armadillo. **Science**, 184: 1191-1192, 1974.
44. CONVIT, J., RASSI, E., RODRIGUEZ, F.C., CONTRERAS, R. Changes in the lepromin and tuberculin reactions of lepromin-negative leprosy patients after vaccination with BCG. **Int. J. Leprosy.**, 20: 347-354, 1952.
45. CONVIT, J., AVILA, J.L., GOIHMAN-YAHR, M., PINARDI, M.E. A test for the determination of competency in clearing bacilli in leprosy patients. **Bull. Wild. Hlth. Org.**, 46: 821-826, 1972.
46. CONVIT, J., PINARDI, M.E., AVILA, J.L., ARANZAZU, N. Specificity of the 48-hours reaction to Mitsuda antigen. **Bull. Wild. Hlth. Org.**, 52: 187-191, 1975.
47. CONVIT, J., ARANZAZU, N., PINARDI, M., ULRICH, M. Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. **Clin. Exp. Immunol.**, 36: 214-220, 1979.
48. CONVIT, J., PINARDI, M.E., RODRIGUEZ-OCHOA, G., ULRICH, M., AVILA, J.L., GOIHMAN-YAHR, M. Elimination of *Mycobacterium leprae* subsequent to local *in vivo* activation of macrophages in lepromatous leprosy by other mycobacteria. **Clin. Exp. Immunol.**, 17: 261-265, 1974.
49. COSTA, L., TEIXEIRA, G.M. BCG em portadores de lepra lepromatosa. **An. X Cong. Brasil. Hig.** (Belo Horizonte), Imprensa Oficial: 763-766, 1953.
50. DEL FAVERO, W. O censo intensivo de Candeias. **Arg. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 6: 87-235, 1948.
51. DEVILLE, J. *In vitro* behavior of macrophages from healthy persons against *M. leprae* and other mycobacteria. **Int. J. Leprosy.**, 39: 329-339, 1971.
52. DHARMENDRA. Studies of the lepromin test. (5). The active principle of lepromin is a protein antigen of the bacillus. **Leprosy India**, 13: 89-103, 1941.
53. DHARMENDRA. The immunological skin test in leprosy. I- The isolation of a protein antigen of *Mycobacterium leprae*. **Indian J. Med. Res.**, 30:1-7, 1942a. (Resumo em *Int. J. Leprosy*, 11: 91, 1943).

54. DHARMENDRA. Studies of the lepromin test. (9) A bacillary antigen standardized by weight. **Leprosy India**, 14: 122-129, 1942b.
55. DHARMENDRA, CHATTERJEE, K.R. Prognostic value of the lepromin test in contacts of leprosy cases. **Leprosy India**, 27: 149-152, 1955.
56. DHARMENDRA, MAZUMDER, S., MUKERJEE, N. The possible role of BCG vaccination in prophylaxis against leprosy. **Leprosy India**, 25:163-168, 1953. •
57. DHARMENDRA, MUKERJEE, N., KHOSHOO, P.N. A comparative study of three antigens for Lhe lepromin test. **Int. J. Leprosy**, 22: 311-321, 1954.
58. DINIZ, O., ABRAHÃO NETO, H. Resultados da aplicação do antígeno de Mitsuda diluído. **Mem. VI Cong. Int. Lepr.**: 504-508, 1953.
59. DOULL, J.A., GUINTO, R.S., MALABAY, M.C. Effect of BCG vaccination, lepromin testing and natural causes in inducing reactivity to lepromin and to tuberculin. **Int. J. Leprosy**, 25: 13-37, 1957.
60. DOULL, J.A., GUINTO, R.S., MALABAY, M.C. The origin of natural reactivity to lepromin. **Int. J. Leprosy**, 27: 31-42, 1959.
61. DRUTZ, D.J., CLINE, M.J. Polymorphonuclear leukocyte and macrophage function in leprosy. **Int. J. Leprosy**, 38: 352-353, 1970.
62. FEITOSA, M.F., KRIEGER, H., BORECKI, I., BEIGUELMAN, B., RAO, D.C. Genetic epidemiology of the Mitsuda reaction in leprosy. **Human Heredity**, 46: 32-35, 1996.
63. FERNANDEZ, J.M.M. Estudio comparativo de la reacción de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas. **Rev. Arg. Dermat.**, 23: 425-452, 1939.
64. FERNANDEZ, J.M.M. The early reaction induced by lepromin. **Int. J. Leprosy**, 8: 1-14, 1940.
65. FERNANDEZ, J.M.M., OLMOS-CASTRO, N. La reacción provocada por la lepromina. Investigaciones efectuadas con diversos antígenos derivados del *Mycobacterium leprae*. **Rev. Argent. Dermatosisif.**, 26: 556-580, 1942.
66. FIOL, H., JONQUIERES, E.D.L., BRUSCO, C.M., MELAMED, A.J., FIRPO, C.J. Tratamiento de la lepra con promin (promanida). **Rev. Arg. Dermatosisif.**, 31: 531-537, 1947.
67. FLOCH, H. Réaction de Mitsuda et intradermo-réaction au BCG tué dans la lépre. Conclusions théoriques et pratiques. **An Inst. Pasteur**, 82: 517-527, 1952.
68. FLOCH, H. Discussion sur les resultats obtenus dans la reaction de Mitsuda a l'aide d'antigenes dilués. **Int. J. Leprosy**, 22: 139-143, 1954.
69. GARRIDO-NEVES, R. Interpretação das reações limítrofes ou duvidosas do teste lepromínico. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 21: 35-60, 1962.
70. GODAL, T., REES, R.J.W. Fate of *Mycobacterium leprae* in macrophages of patients with lepromatous or tuberculoid leprosy. **Int. J. Leprosy**, 38: 439-442, 1970.
71. GUINTO, R.S., WADE, H.W. Results of tests with serial dilutions of lepromin in separate groups of normal young children. With a comparison of two lepromins and the Dharmendra antigen. **Int. J. Leprosy**, 26: 328-345, 1958.
72. GUINTO, R.S., DOULL, J.A., MALABAY, E.B. A note on the lepromin reaction in males and females of the general population of Cordova, Mactan Islands, Cebu, Philippines. **Int. J. Leprosy**, 23: 131-134, 1955.
73. HADLER, W.A. Comportamento do cobaio e do rato normais injetados com lepromina por via intradérmica. **Rev. Bras. Lepr.**, 21: 165-194, 1953a.
74. HADLER, W.A. Estudo comparado das lesões provocadas pela injeção intradérmica de suspensões de *M. leprae* e *M. tuberculosis* em cobaias normais. **Rev. Bras. Lepr.**, 21: 315-340, 1953b.
75. HADLER, W.A. Influência da inoculação prévia de BCG sobre os resultados da reação da lepromina em cobaias. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 15: 5-62, 1956.
76. HADLER, W.A. Observações fornecidas pela experimentação aplicada. **Rev. Bras. Lepr.**, 25: 323-330, 1957.
77. HADLER, W.A. Importância da lepromino-reação em animais de laboratório. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 21: 306-352, 1962.
78. HADLER, W.A., ZITI, L.M. Estudo da sensibilidade tuberculínica em cobaias normais inoculados experimentalmente com *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis*. **Rev. Bras. Lepr.**, 21: 341-364, 1953.
79. HADLER, W.A., ZITI, L.M. Estudo da reação da lepromina no rato previamente inoculado com *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis* (BCG). **Rev. Bras. Lepr.**, 23: 53-75, 1955.
80. HANKS, J.H. Bacteriology of leprosy. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 54: 12-19, 1951.
81. HANKS, J.H. Precautions for injecting uniform doses of lepromin. **Int. J. Leprosy**, 36: 64-65, 1968a.

82. HANKS, J.H. Standardizable lepromins yielding uniform concentration of *M. leprae* per skin site. **Int. J. Leprosy**, 36: 66-75, 1968b.
83. HANKS, J.H. Microscopic counts of myco-bacteria conversion factors for the pinehead method. **Int. J. Leprosy**, 36: 76-77, 1968c.
84. HANKS, J.H., ABE, M., NAKAYAMA, T., TUMA, M., BECHELLI, L.M., MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, V. Studies towards the standardization of lepromin. **Bull. Wild. Hlth. Org.** 42: 703-709, 1970.
85. HAYASHI, E. Mitsuda's skin reaction in leprosy. **Int. J. Leprosy**, 1: 31-38, 1933.
86. HAYASHI, Y. Skin testing with leprosy bacillus suspensions. **Int. J. Leprosy**, 21: 370-372, 1953.
87. IGNACIO, J.L., PALAFOX, C.A., JOSÉ Jr., F.A. Mitsuda reactions induced by repeated lepromin testing in children removed at birth from their leprosy parents. Failure of BCG to induce strong reactivity in persistently moderate reactors. **Int. J. Leprosy**, 23: 259-269, 1955.
88. JONQUIERES, E.D.L., MASANTI, J.G. Vacu-nación con BCG y viraje de la lepro-minoreacción en enfermos de lepra. **Rev. Argent. Dermatosisif.**, 38: 137-144, 1954.
89. KINNEAR-BROWN, J.A., STONE, M.M. The multipuncture depot lepromin test: I. Technique and advantages. II. Application to the study of BCG induced lepromin reactivity. **Int. J. Leprosy**, 29: 1-13, 1961.
90. KIRCHHEIMER, W.F., STORRS, E.E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int. J. Leprosy**, 39: 693-702, 1971.
91. KITANO, H., INOUÉ, T. The Mitsuda reaction by vaccines treated with ultra-supersonic wave. **Int. J. Leprosy**, 9: 2939, 1941.
92. KUNDU, S.K., GHOSH, S., HAZRA, S.K., CHAUDHURY, S. Nature and familial character of lepromin sensitivity in 27 families and their sibilings. **Leprosy India**, 51: 465-474, 1979
93. LALOUEL, J.M., RAO, D.C., MORTON, N.E., ELSTON, R.C. A unified model for complex segregation analysis. **Am. J. Hum. Genet.**, 35: 816-826, 1985.
94. LECHAT, M.F., HANKS, J.H. The concentration of *M. leprae* in currently available lepromins. **Int. J. Leprosy**, 31: 348-352, 1963.
95. LEIKER, D.L. Studies on the lepromin test. I The influence of the bacillary and tissue components to dilutions of the lepromin. **Int. J. Leprosy**, 29: 157-167, 1961a.
96. LEIKER, D.L. Studies on the lepromin test. III. Influence of tuberculosis contact and other factors on the size of the lepromin reaction. **Int. J. Leprosy**, 29: 488-495, 1961b.
97. LEIKER, D.L. Studies on the lepromin test. IV. Influence of leprosy on the reactions to lepromin, tuberculin and the "875 Bacillus"suspension. **Int. J. Leprosy**, 29: 496-501, 1961c.
98. LELOIR, H. Essais d'inoculation de la lépre aux animaux. **Ann. Dermat. Syph.**, 8: 625-629, 1887.
99. LEEVEE, G., LIU, J., GICQUEL, B., CHANTEAU, S., SCHURR, E. Genetic control of susceptibility to leprosy in French Polynesia; no evidence for linkage with markers on telomeric human chromosome 2. **Int. J. Leprosy**, 62: 499-511, 1994.
100. LOPES-DE-FARIA, J. **Contribuição ao conhecimento da natureza da reação de Mitsuda**. Depto. Imp. Nac., Rio de Janeiro, 1953.
101. LOWE, J., DHARMENDRA. Studies of the lepromin test. (4) The early reaction to lepromin, its nature and its relation to the classical Mitsuda reaction. **Leprosy India**, 13: 81-88, 1941.
102. LOWE, J., McNULTY, F. Tuberculosis and leprosy. Immunological studies. **Leprosy Rev.**, 34: 61-90, 1953.
103. LOWE, J., DAVEY, T.F. Tuberculin and lepromin reactions in Nigeria. An analysis of the data of Lowe and McNulty. **Int. J. Leprosy**, 24: 419-423, 1956.
104. MARIANI, G. Osservazioni sopra una forma speciali di allergia cutanea nella lebbra (Lepra tuberculoide sperimentale nell'uomo). **Pathologica**, 16: 471-477, 1924.
105. MARIANI, G. Nuove osservazioni sulle reazioni provocate sperimentalmente com materiale lebbroso nell'uomo. **Giorn. Ital Dermat. Sif.**, 66: 402-426, 1925.
106. MARTINEZ-DOMINGUEZ, V. Estudio epidemiológico y clínico de la endemia de lepra en la Guinea Espanola. **Mem. VI Cong. Int. Lepr.**: 1104-1204, 1953.
107. METALNIKOV, S., TOUMANOFF, F. La lépre chez les insectes. **Compt. Rend. Soc. Biol.** (Paris), 89: 935-936, 1923.
108. MICHALANY, N.S., MICHALANY, J. Histopatologia da reação de Mitsuda em adultos sadios não comunicantes de hansenianos. **Hansen. Int.**, 8: 105-123, 1983.

109. MIRANDA, R.N. Variabilidade do teste lepromínico decorrente das várias causas (técnica de inoculação, qualidade do inóculo, área cutânea etc.). **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 21: 77-94, 1962.
110. MITSUDA, K. Les lépreux maculo-nerveux, d'une part, les tubéreux, d'autre part, se comportent différemment a la suite d'une inoculation d'émulsion de tubercule lépreux. **Ille. Conf. Int. Lèpre (Strasbourg, 1923)**. J. B. Baillière et Fils. Paris: 219-220, 1924.
111. MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to suspension of leprous nodules. **Int. J. Leprosy**, 21 : 347-358, 1953.
112. MORI, T., MIYATA, Y., YONEDA, K., ITO, T. Collection method for *Mycobacterium leprae* from infected armadillo liver. **Int. J. Leprosy**, 52 : 41-43, 1984.
113. MUKERJEE, N., KUNDU, S. The late lepromin reaction in subsided lepromatous cases. **Int. J. Leprosy**, 29 : 14-19, 1961.
114. NAGAI, K. Histopatologische Befunde nach Anstellung der Mitsudá schen Reaktion. **La Lepra**, 9 : 26, 1938.
115. NAKAMURA, M. Studies on the chemical composition of the murine leprosy bacillus. **La Lepra**, 26: 1-7, 1957.
116. NOLASCO, J.O. The lepromin test in lepra reaction. II- Histology of the reaction lesions and persistence of the injected bacilli. **Int. J. Leprosy**, 8: 285-296, 1940.
117. OLMOS-CASTRO, N., ARCURI, P.B. Lepromin hypersensitivity induced by integral lepromin in person presumably free from leprosy. **Int. J. Leprosy**, 25: 375-379, 1957.
118. PAULA-SOUZA, R., BECHELLI, L.M. Correlação entre as reações lepromínica e tuberculínica em crianças de 0 a 4 anos. **Rev. Bras. Lepr.**, 28: 203-210, 1960.
119. PAULA-SOUZA, R., FERRAZ, N.T., BECHELLI, L.M. Influência do BCG vivo e morto sobre a reação de Mitsuda (Observações preliminares). **Rev. Bras. Lepr.**, 21: 43-50, 1953.
120. PAULA-SOUZA, R., BECHELLI, L.M., FERRAZ, N.T., QUAGLIATO, R. BCG vivo de 15 dias e morto em escolares sãos e viragem ou intensificação da lepromino-reação. **Rev. Bras. Lepr.**, 24: 9-22, 1956
121. PARMASWARAN, M., GIRDHAR, B.K., DEO, M.G., KANDHARI, K.C., BHUTANI, L.K. Macrophage function in leprosy. **Int. J. Leprosy**, 44: 340-345, 1976.
122. PETRI, V., MENDES, E.V., BEIGUELMAN, B. Histology of the Mitsuda reaction of healthy adults with no known contacts with leprosy patients. **Int. J. Leprosy**, 53: 540-545, 1985.
123. PINTO JR., W., BEIGUELMAN, B. Taxa de ilegitimidade e lepra. **Rev. Paul. Med.**, 71: 267-270, 1967.
124. PISANI, R.C.B., BEIGUELMAN, B., OPROMOLLA, D.V.A. *In vitro* behavior of blood derived macrophages against killed *M.leprae*. **Int. J. Leprosy**, 41: 14-24, 1973.
125. QUAGLIATO, R. Resultados colhidos pela vacinação com o BCG e meios de sua avaliação. **Rev. Bras. Lepr.**, 25: 368-389, 1957.
126. QUAGLIATO, R. Classificação de lepra- Madrid, 1953. Critério clínico. Confronto com os resultados da bacterioscopia, imunologia e histologia — 250 casos do Dispensário de Campinas (1949-1958). **Rev. Bras. Lepr.**, 27: 17-32, 1959.
127. QUAGLIATO, R. Interpretação das reações limítrofes ou duvidosas do teste lepromínico. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 21: 13-34, 1962.
128. QUAGLIATO, R., BECHELLI, L.M. Tentativa de viragem da reação lepromínica pelo BCG em doentes de lepra. **Int. J. Leprosy**, 21: 591-592, 1953.
129. RABELLO, F.A. The indeterminate group of hanseniasis, and its basic conotation: the polar concept. An evaluation and a refutation of the so-called "spectral" approach. **Hansen. Int.** 1: 111-119, 1976.
130. RABELLO JUNIOR, ROTBERG, A. Nota preliminar sobre a alergia histológica na lepra. **Arch. Dermat. Syphil.**, 1: 140141, 1937.
131. RABELLO NETO, A.S., SILVA, C. O teste lepromínico em comunicantes de casos de lepra. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 14: 107-121, 1955.
132. RODRIGUEZ, R.P. Reacción de Mitsuda: estudio histopatológico. **Bol. Soc. Cubana Dermat. Sidi.**, 7: 1-16, 1950. (Resumo em **Int. J. Leprosy**, 18: 442-443, 1950).
133. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. I- Ação positivamente do BCG sobre a lepromino-reação. **Rev. Bras. Lepr.**, 18: 3-23, 1950a.
134. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. II- Da inter-relação entre as reações tuberculínica e lepromínica em filhos de doentes de lepra. **Rev. Bras. Lepr.**, 18: 117127, 1950b.

135. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. III- A lepromino-reação em crianças de descendência não leprosa vacinadas com BCG por via oral. Dissociação entre alergia tuberculínica e reação de Mitsuda *Rev. Bras. Lepr.*, 18: 128-143, 1950c
136. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. IV- A lepromino-reação em crianças vacinadas um ano antes com BCG, descendentes de doentes de lepra. Dissociação entre alergia tuberculínica e reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Lepr.*, 19: 8-18, 1951a
137. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. V- Tempo de positividade da reação de Mitsuda após a introdução simultânea de BCG por via oral e de lepromina por via intradérmica. *Rev. Bras. Lepr.*, 19: 1926, 1951b.
138. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. VI- Inversão da reação de Mitsuda com o BCG oral em indivíduos reiteradamente negativos à lepromina durante vários anos. *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 67-74, 1952a.
139. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. VII- Influência do BCG oral sobre a reação de Mitsuda em indivíduos previamente positivos. *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 75-83, 1952b.
140. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. VIII- Positivização remota do Mitsuda por efeito da vacinação pelo BCG oral. *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 84-96, 1952c.
141. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. IX — Reatividade focal precoce da reação lepromínica conseqüente à prova de Mantoux. *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 97-103, 1952d.
142. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. X- Reação de Mitsuda induzida por diversos esquemas de vacinação pelo BCG oral e pela técnica de multipuncturas de Rosenthal. *Rev. Bras. Lepr.*, 20: 183-196, 1952e.
143. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N. Correlação tuberculina-lepromina. *Rev. Bras. Lepr.*, 23: 23-40, 1955.
144. ROSEMBERG, J., SOUZA-CAMPOS, N., AUN, J.N., PASSOS-FILHO, M.C.R. Immunobiologic relations between tuberculosis and leprosy. X. Comparative study of the results of the lepromin test in subjects submitted to serial injections of Mitsuda's antigen and to oral BCG vaccination. *Int. J. Leprosy*, 28: 271-283, 1960.
145. ROTBERG, A. Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classifications of forms of the disease. Based on 1529 lepromin-tested cases. *Rev. Bras. Lepr.*, 5: 45-97, 1937.
146. ROTBERG, A. Valor prognóstico da lepromino-reação de Mitsuda; observação de 445 casos durante 5-6 anos. *Rev. Bras. Lepr.*, 12: 367-377, 1944.
147. SAHA, K., AGARWAL, S.K. Immune deficit in patients with lepromatous leprosy: its nature and relation to genetic factors, spectrum, and duration of the illness. *Int. J. Leprosy*, 47: 1-6, 1979).
148. SCHUJMAN, S. Histopatología de la reacción de Mitsuda. Estudio progresivo y comparativo de las reacciones que provoca en las diversas formas de lepra. *Rev. Bras. Lepr.*, 4: 469-475, 1936
149. SCHUJMAN, S. Estudio evolutivo del estado inmunológico en los casos lepromatosos beneficiados com diversos medicamentos antileproso (chaulmoogra y sulfonas). *Mem. III Conf. Panamer. Lepr.*, 1: 195-198, 1951.
150. SCHUJMAN, S. The use of dilute antigens in lepromin tests. *Int. J. Leprosy*, 23: 291-294, 1955.
151. SCHUJMAN, S. Subsequent evolution of the induced Mitsuda reaction in clinically and bacteriologically negative lepromatous cases. *Int. J. Leprosy*, 24: 51-56, 1956.
152. SCHURR, E., BUSCHMAN, E., MALO, D., GROS, P., SKAMENE, E. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J. Infect. Dis.*, 161: 634-639, 1990.
153. SHAW, M.-A., ATKINSON, S., DOCKRELL, H., HUSSAIN, R., LINS-LAINSON, Z., SHAW, J., RAMOS, F., SILVEIRA, F., MEHDI, S.Q., KAUKAB, F., KHALIQ, S., CHIANG, T., BLACKWELL, J. An RFLP map for 2q33-q37 from multicaso mycobacterial and leishmanial disease families: no evidence for an Lsh/Ity/Bcg gene homologue influencing susceptibility to leprosy. *Ann. Hum. Genet.*, 57: 251-271, 1993.
154. SILVA, C.O., RABELLO NETO, A.V., CASTRO, I. Ação do BCG sobre a lepromino-reação em comunicantes de casos de lepra. *Bol. Serv. Nac. Lepra* (Rio de Janeiro), 14: 124-135, 1955.
155. SIXTH INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY (MADRID) Immunology. The lepromin reaction. *Int. J. Leprosy*, 21: 531-535, 1953.

156. SOUZA-ARAUJO, H.C. Experimental leprosy and treatment of leprosy. **Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.**, 24: 557-612, 1931.
157. SOUZA-CAMPOS, N. BCG in the prophylaxis of leprosy. A preliminary report. **Int. J. Leprosy**, 21: 307-312, 1953a.
158. SOUZA-CAMPOS, N. O BCG na profilaxia da lepra (revisão bibliográfica). **Rev. Bras. Lepr.**, 21: 292-314, 1953b.
159. SOUZA-CAMPOS, N. O BCG na profilaxia da lepra. Positividade em seguida à reinoculação de antígeno de Mitsuda. Resultados práticos até agora observados. **Rev. Bras. Lepr.**, 24: 173-187, 1956.
160. SOUZA-CAMPOS, N., ROSEMBERG, J., AUN, J.N. Correlação tuberculina-lepromina. **Rev. Bras. Lepr.**, 23: 23-40, 1955
161. SOUZA-CAMPOS, N., LESER, W., QUAGLIATO, R., BECHELLI, L.M., ROTBERG, A. Viragem da lepromino-reação em função de diferentes estímulos. Influência da idade, nessa viragem, no grupo etário de 6 a 34 meses. **Rev. Bras. Lepr.**, 29: 3-20, 1962.
162. SOUZA-LIMA, L. Estudo crítico do "test" lepromina (R. de Mitsuda). **Rev. Bras. Lepr.**, 6: 443-449, 1938.
163. SOUZA-LIMA, L. O teste de Mitsuda é reação alérgica? **Rev. Bras. Lepr.**, 10:305-319, 1942.
164. SOUZA-LIMA, L., SOUZA-CAMPOS, N. **Lepra tuberculóide**. Edit. Renascença, São Paulo, 1947
165. STORRS, E.E. The nine banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. **Int. J. Leprosy**, 39: 703-714, 1971.
166. THOMAS, J., JOSEPH, M., RAMANUJAM, K., CHACKO, C.J.G., JOB, C.K. The histology of the Mitsuda reaction and its significance. **Leprosy Rev.**, 51: 329-339, 1980.
167. TREO, M.M., SILVA, C.O. Comportamento do *Mycobacterium leprae* in vitro em sangue total ou plasma de leprosos de diferentes formas clínicas. **An. VIII Cong. Int. Lepr.** (Rio de Janeiro), 3: 484-494, 1963.
168. TUMA, M. Considerações acerca da natureza do princípio ativo do antígeno de Mitsuda. **Bol. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 21: 273-289, 1962.
169. TUMA, M., MATTOS, O., GARRIDO-NEVES, R., TREO, M.M., GAMA, P.C.C. A contagem bacilar como critério para a padronização da lepromina. **Boi. Serv. Nac. Lepra** (Rio de Janeiro), 28: 41-48, 1969.
170. VELIATH, A.J., BEDI, B.M.S., BALASU-BRAHMANYAN, M. Behaviour of macro-phages to *Mycobacterium leprae*. A tissue culture study. **Leprosy India**, 51:330-335, 1979.
171. VILLALBA-FREIRE-MAIA, D. Comportamento *in vitro* frente ao *Mycobacterium leprae* dos macrófagos de pessoas sadias e de pacientes com hanseníase. **Hansen. Int.**, 8: 81-90, 1983.
172. VILLALBA-FREIRE-MAIA, D. Análise familiar do comportamento *in vitro* dos macrófagos humanos frente ao *Mycobacterium leprae*. **Hansen. Int.**, 8: 91-100, 1983.
173. YANAGISAWA, K., ASAMI, N., MAEDA, M., ISHIHARA, S., GOTO, S., KOBAYASHI, S., TACHIKAWA, N. Comparative studies of intradermal reactions provoked by Dharmendra antigen and the antigens of various acid fast bacilli. **La Lepra**, 29: 226-231, 1960a.
174. YANAGISAWA, K., ASAMI, N., MAEDA, M., MUROHASHI, T., ABE, M., NAKAYAMA, T., GOTO, S., KOBAYASHI, S., ISHIHARA, S. Comparative studies of intradermal reactions provoked by Kedrowsky bacillus antigen and Dharmendra antigens. **La Lepra**, 29: 232-238, 1960b.
175. YOKOTA, T. The histopathological study of Mitsuda reaction in the case of lepromatous leprosy. **La Lepra**, 22: 232-235, 1953.