

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA TECIDUAL AO
MYCOBACTERIUM LEPRAE

Regina de Castro Bicudo Pisani

970

Tese apresentada ao Departamento de Genética Médica para a obtenção do grau de Doutor. Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

-1972-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

"Muitas vezes ouvi-vos dizer como se estivésseis falando em sonho: "Aquele que trabalha no mármore e encontra na pedra a forma de sua alma, é mais nobre do que aquele que lavra a terra.

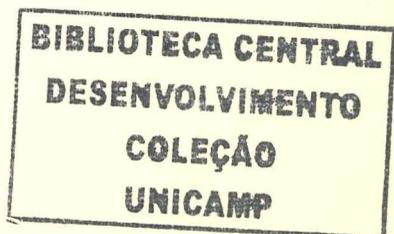
E aquele que agarra o arco-íris e o estende na tela em formas humanas é superior àquele que confecciona sandálias para os nossos pés".

Porém eu vos digo, não em sono, mas no pleno despertar do meio dia, que o vento não fala com maior doçura aos carvalhos gigantes do que à menor das folhas da relva ;

E grande é somente aquele que transforma o ulular do vento numa canção tornada mais suave pelo seu próprio amor".

O Profeta

Gibran Khalil Gibran



À memória de meu pai

À minha mãe

Ao Francisco e aos nossos filhos.

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

AGRADECIMENTOS

Correndo o risco de deixar de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, tornaram possível a apresentação desta tese, citando-as nominalmente, permitimo-nos externar a nossa gratidão a algumas poucas, esperando que os eventualmente não mencionados saibam compreender o lapso. Assim, manifestamos os nossos agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, Professor Titular e Chefe do Departamento de Genética Médica da Universidade Estadual de Campinas, mestre e pesquisador exemplar, o nosso reconhecimento, não só pela orientação segura que imprimiu a este trabalho, mas também, pelo estímulo que nos deu e pela atenção e amizade que nos dedicou.

Ao Prof. Dr. Luis Marino Bechelli, ex-Médico Chefe do Serviço de Leprologia da Divisão de Moléstias Transmissíveis da Organização Mundial da Saúde, pelo apoio que sempre deu ao Departamento de Genética Médica da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla, Diretor Clínico do Sanatório Aimorés, não só pela classificação clínica de quase todos os doentes de lepra que serviram para a realização deste trabalho, mas pela atenção com que sempre nos distinguiu.

Ao Prof. Dr. José Lopes de Faria, Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pela gentileza com que nos atendeu realizando todas as leituras histopatológicas das biópsias de reações de Mitsuda.

Aos Funcionários do Departamento de Dermatologia Sanitária de Campinas, pela presteza com que sempre nos atenderam.

Aos alunos do 4º ano da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, e aos doentes e comunicantes, pela boa vontade que sempre demonstraram durante o trabalho experimental.

Deixamos propositalmente para o fim, para dar mais ênfase ao nosso agradecimento, a menção da nossa gratidão aos funcionários do Departamento de Genética Médica, pelo alto padrão de trabalho técnico-científico, cordialidade, atenção e respeito, qualidades fundamentais para que se possa estabelecer um ambiente de trabalho capaz de permitir a criação científica.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	pag. 1
I.1 - As formas clínicas de lepra	pag. 1
I.2 - Associação familiar da lepra	pag. 2
I.3 - Contágio intra-familiar de lepra	pag. 3
I.4 - Variabilidade racial	pag. 4
I.5 - Estudos genealógicos	pag. 5
I.6 - Estudos gêmeares	pag. 6
I.7 - O teste lepromínico	pag. 6
I.8 - Comportamento dos macrófagos <u>in vitro</u> face o <u>M.leprae</u>	pag.10
I.9 - Objetivos do presente trabalho	pag.12
II- MATERIAL E MÉTODOS	pag.14
II.1 - A casuística estudada	pag.14
II.2 - O material de laboratório	pag.30
II.2.1 - Lavagem e esterilização do material	pag.31
II.2.2 - Preparação dos meios nutritivos	pag.32
II.2.3 - Extração de bacilos de lepra da lepro mina e sua inoculação em tubos de Leï ghton	pag.35
II.3 - Métodos	pag.37
II.3.1 - A reação tardia à lepromina	pag.37
II.3.2 - O teste <u>in vitro</u>	pag.37
III-RESULTADOS	pag.42
IV- DISCUSSÃO	pag.52
IV.1 - Casos lepromatosos e tuberculóides	pag.53
IV.2 - Casos dimorfos	pag.57
IV.3 - Casos indeterminados	pag.58
IV.4 - Casos de lepra de classificação incerta ..	pag.59
IV.5 - Indivíduos sadios	pag.60
V - RESUMO E CONCLUSÕES	pag.66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pag.69

I - INTRODUÇÃO

Antes que o Mycobacterium leprae (HANSEN) LEHMANN & NEUMANN fosse reconhecido em 1874 por HANSEN como o agente patogênico da doença infecciosa crônica, conhecida como lepra ou hanseníase, DANIELSSEN & BOECK (1848), entre outros, defendiam a hipótese de transmissão hereditária dessa moléstia.

Após a descoberta de HANSEN, a idéia da transmissão hereditária da lepra foi rapidamente abandonada. Entretanto, em nenhum momento foi posto em dúvida que a manifestação da lepra depende do grau de suscetibilidade ou resistência do hospedeiro à permanência e proliferação do bacilo, além de outros fatores associados ao agente patogênico e às condições ambientes, como, aliás, em qualquer infecção, aguda ou crônica.

Em vista disso, a ênfase dada às especulações sobre a existência de um componente genético do hospedeiro responsável pela manifestação da lepra (ROTBERG, 1937; TOLENTINO, 1938; AYCOCK & Mc KINLEY, 1938; AYCOCK, 1940) é, pois, de certo modo surpreendente.

A partir da década de 60, porém, o problema do eventual componente genético que intervém na determinação da suscetibilidade e resistência à lepra, passou a ser investigado de maneira mais sistemática e menos especulativa.

Não cabe, evidentemente, no presente trabalho fazer uma revisão de todas as investigações genético-epidemiológicas relacionadas à lepra. Por isso, nesta introdução, abordar-se-á, de maneira sucinta, alguns tópicos dessas pesquisas, apenas para que o leitor não familiarizado com as mesmas possa se situar dentro do problema-objeto da realização da presente tese.

I.1 - AS FORMAS CLÍNICAS DE LEPPRA

A lepra não é uma doença monomórfica. Compreende dois tipos polares, o lepromatoso e o tuberculóide, bem como

dois grupos interpolares instáveis, o indeterminado e o dimorfo. Enquanto os tipos polares são geralmente estáveis, os casos indeterminados e dimorfos podem evoluir seja para o tipo tuberculóide seja para o lepromatoso ou manterem-se como tais.

Os pacientes dos grupos tuberculóide e indeterminado, devido a ausência ou a raridade de bacilos nas lesões, geralmente não oferecem risco de contágio e são considerados como pertencendo a uma forma benigna de lepra, pelo menos do ponto de vista epidemiológico, ao contrário dos lepromatosos e dimorfos, tidos como pertencentes ao tipo maligno.

Os dois tipos polares de lepra apresentam diferente resistência tecidual ao M. leprae, o que poderia explicar o agravamento dos casos lepromatosos sem terapia adequada, bem como, a possibilidade de regressão espontânea das lesões, nos casos tuberculóides. Eventualmente, alguns casos tuberculóides podem tornar-se bacilíferos mas, mesmo nessa situação, eles passam a ser bacteriológicamente negativos em um período de seis a doze meses, ainda que não submetidos à sulfonoterapia (BEHELLI & GUINTO, 1970). Por outro lado, alguns lepromatosos podem desenvolver, quando em tratamento com sulfonas, um fenômeno conhecido como pseudo-exacerbação (SOUZA-LIMA & CERQUEIRA, 1946; SOUZA-LIMA & RATH DE SOUZA, 1949; SOUZA-LIMA, 1953) e que foi recentemente redescrito por RIDLEY (1969) sob a denominação de reação reversa. Nesses pacientes são comuns, durante essa fase, o aparecimento de lesões similares às tuberculóide em reação. Entretanto, a lepromino-reação tardia negativa, característica dos lepromatosos, permanece sem alteração.

I.2 - ASSOCIAÇÃO FAMILIAL DA LEPPRA

A associação familiar de uma moléstia transmissível é mais difícil de ser demonstrada em regiões onde ela é muito frequente do que em áreas onde ela é menos prevalente. Assim, muito embora não se possa deixar de considerar a existência de condições de exposição diferencial, mesmo em áreas de alta prevalência (BEIGUELMAN, 1968a), a constatação de tal associação em regiões de alta prevalência será um argumento mais

forte para indicar a possível participação de um componente hereditário na predisposição à moléstia, do que se igual demonstração for feita em condições de baixa prevalência.

Apesar de os dados sobre famílias com alta concentração de doentes de lepra serem antigos na literatura (DANIELSSEN & BOECK, 1848), só recentemente é que se demonstrou não ser casual a recorrência familiar desta moléstia, mesmo em regiões endemizadas, e que os tipos polares têm associação familiar (BEIGUELMAN et al. 1968a, 1968b) o que sugere que a associação familiar dos tipos polares está mais na dependência da variação genética do hospedeiro do que do M.leprae (BEIGUELMAN, et al. 1968a).

Considerando como verdadeiro o princípio epidemiológico segundo o qual indivíduos afetados pelo mesmo foco, são a consequência da infecção pela mesma linhagem bacilar, a sugestão feita por BEIGUELMAN et al. (1968a) ficaria favorecida, pois dentre 110 dos 111 pares de irmãos estudados pelos autores foi possível a identificação de um foco lepromatoso em relação a cada par. Além disso, dentre os 22 pares discordantes quanto a forma clínica de lepra, 31,8% apresentaram sinais da moléstia praticamente ao mesmo tempo.

I.3 - CONTÁGIO INTRA-FAMILIAL DE LEPPRA

Tanto os relatos a respeito da manifestação de lepra tuberculóide após inoculação acidental com M.leprae (PORRIT & OLSEN, 1947; AGUAS, 1967), quanto os trabalhos que assinalam o baixo risco de contágio conjugal dessa moléstia (ref. em QUAGLIATO, 1957; MOHAMED-ALI, 1956a), além dos clássicos depoimentos sobre tentativas de infecção em anima nobile, feitos por DANIELSSEN, PROFETA e MOURITZ no último século, contribuíram para ressaltar o fato de que a maior parte dos indivíduos oferece resistência tecidual ao M.leprae. Por outro lado, reforçaram a hipótese de que a suscetibilidade à lepra depende de um importante fator genético do hospedeiro.

Entretanto, o melhor argumento para a hipótese de que suscetibilidade à lepra está na dependência de um componen

te genético do hospedeiro é a demonstração de que o risco de contágio é proporcional ao coeficiente de consanguinidade entre os comunicantes e o caso-índice, visto que esse coeficiente indica a probabilidade de ocorrência de genes com origem comum nos consanguíneos. Está claro, porém, que o risco de contágio poderia ser consequência de um maior contato e não, da existência de genes comuns, já que o tempo de coabitação pode estar associado ao coeficiente de consanguinidade. Todavia, se entre não-consanguíneos, tais como cônjuges, com suficiente período de íntima coabitação, a proporção de contagiados for menor do que entre os filhos de doentes de lepra lepromatosa, a crítica citada acima diminui sua consistência.

Levando em consideração as formas clínicas da doença, o que não foi feito por outros autores (SPICKETT, 1962a ; MOHAMED-ALI, 1965b; RAO et al. 1969), BEIGUELMAN (1969, 1971) verificou que os consanguíneos de casos lepromatosos exibem, mais frequentemente, a mesma forma polar do que os não consanguíneos (cônjuges), a despeito do contato íntimo e prolongado entre estes últimos. Além disso, a frequência de doentes de lepra lepromatosa entre os filhos de casais com apenas um dos cônjuges apresentando o tipo lepromatoso foi independente do sexo do cônjuge afetado, apesar de se supor que, em média, haja maior contato entre filhos e mãe.

I.4 - VARIABILIDADE RACIAL

No que concerne à variabilidade racial da prevalência de lepra ou da distribuição de suas formas clínicas, os dados da literatura pertinente (LOWE, 1938; MUIR, 1940; COCHRANE 1947; RYRIE, 1948; AUSTIN, 1948; BECHELLI & ROTBERG, 1956, entre outros) não são suficientes para sugerir que as diferenças constatadas decorram de uma variação na frequência dos eventuais genes responsáveis pela determinação da resistência ou da suscetibilidade ao M.leprae (BEIGUELMAN, 1969, 1971). Entretanto, alguns trabalhos sugerindo que, a proporção de casos lepromatosos tende a se estabilizar à medida que a prevalência de lepra aumenta (KAPOOR, 1963; BECHELLI et al. 1966; BEIGUELMAN, 1972) e outros mostrando que as taxas de lepra lepromato-

sa nunca ultrapassam valores de 5 a 10 por 1000, mesmo que a prevalência de lepra seja maior que 20 por 1000 (DOULL et al. 1942; FONTE, 1967) falam a favor de que a suscetibilidade à lepra lepromatosa seja determinada geneticamente numa fração da população.

I.5 - ESTUDOS GENEALÓGICOS

SPICKETT (1962a) e PRASAD & MOHAMED-ALI (1966) aplicaram métodos de genética formal, para testar a hipótese de herança monogênica à suscetibilidade do hospedeiro ao M.leprae em estudos genealógicos. O primeiro autor usou genealogias publicadas na literatura pertinente (AYCOCK & Mc KINLEY, 1938; STEINIGER, 1941) enquanto PRASAD & MOHAMED-ALI (1966) analisaram famílias averiguadas num levantamento epidemiológico (NORDEN & MOHAMED-ALI, 1964).

Esse tipo de trabalho já foi criticado por BEIGUELMAN (1967, 1972) visto não ser razoável no presente estado de conhecimentos a respeito das formas clínicas de lepra, reunir famílias com formas diferentes dessa doença e analisar os indivíduos que as compõem como se pertencessem todos a uma mesma entidade clínica. Evidentemente, uma família com vários casos lepromatosos é bem diferente de outra onde todas as formas de lepra estão igualmente representadas. Também não se pode, por exemplo, estabelecer e comparar a probabilidade de recorrência de futuros casos da moléstia em duas famílias, cada uma com apenas um indivíduo afetado, se em uma delas o doente for da forma tuberculóide e na outra for um caso lepromatoso. É óbvio, que o risco de contágio intra-familial não é o mesmo em cada família. Em suma, não se pode deixar de considerar que a lepra é função de fatores genéticos e ambientes e que nas análises genealógicas se minimizam esses últimos como se a lepra fosse uma doença de origem endógena.

Só atualmente, começam a ser desenvolvidos métodos objetivos que levam em conta as influências do ambiente (HAUSFELD, 1970) os quais, eventualmente, poderão ser aplicados às análises familiares.

I.6 - ESTUDOS GEMELARES

Os trabalhos a respeito da concordância de lepra em gêmeos poderiam constituir em valioso meio para provar, ou não, a participação de um componente genético do hospedeiro na manifestação da lepra.

Entretanto, os trabalhos sobre a concordância da lepra em pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos existentes na literatura (KEIL, 1939; KINNEAR-BROWN & STONE, 1958; SPICKETT, 1962b; MOHAMED-ALI, 1965b; MOHAMED-ALI & RAMANUJAM, 1966) apresentam falhas metodológicas mais ou menos sérias (BEIGUELMAN, 1969, 1971). Apesar disso, eles não contradizem a afirmação de que a resistência à lepra depende de um componente genético do hospedeiro.

I.7 - O TESTE LEPROMÍNICO

Nos últimos anos grandes esforços têm sido empregados na padronização da lepromina, a qual, como se sabe, é uma suspensão estéril de bacilos de lepra mortos pelo calor e obtidos a partir de lepromas (HANKS, 1958a-c; HANKS et al., 1954, 1970).

A injeção intradérmica de 0,1 ml de lepromina pode provocar uma reação precoce (reação de Fernandez) que é lida em 48 horas e/ou uma reação tardia (reação de Mitsuda) que é examinada, clinicamente, após quatro semanas nos casos de lepra e de comunicantes. Os indivíduos sadios não comunicantes de doentes de lepra podem exigir um período maior para a leitura da resposta tardia máxima (BECHELLI et al. 1963).

Os dois tipos de reações à lepromina, precoce e tardia, foram primeiramente descritos por MITSUDA, em doentes de lepra e em indivíduos sadios (MITSUDA, 1916; cf. HAYASHI, 1933; MITSUDA, 1924).

A lepromino-reação tardia, lida clinicamente, é classificada em cinco graus de intensidade de acordo com a recomendação do VI CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPRA, realizado em 1953 em Madrid. (Vide métodos).

Grande número de autores fez análises histológicas de biópsias da reação de Mitsuda (MITSUDA, 1919, cf. HAYASHI, 1933; MARIANI, 1924, 1925; SCHUJMAN, 1936; NAGAI, 1938; ALAYON, 1939; ALAYON & SOUZA-LIMA, 1940; NOLASCO, 1940; BÜNGELER & FERNANDEZ, 1940; RODRIGUEZ, 1950; YOKOTA, 1953; FARIA, 1953; BECHELLI et al., 1959; AZULAY et al., 1960; ANDRADE, 1962, entre outros). Desses trabalhos, e principalmente do de BECHELLI et al. (1959), conclui-se que uma reação histológica tipicamente positiva é representada por um infiltrado granulomatoso, composto principalmente por células epitelióides, onde os bacilos álcool-ácido-resistentes estão ausentes ou são muito raros.

Alguns autores (AZULAY et al., 1960; ANDRADE, 1962) consideram também como reação de Mitsuda histologicamente positiva, às estruturas tuberculóide-símiles, isto é, ao infiltrado incompletamente granulomatoso no qual as células epitelióides estão grupadas frouxamente ou estão dispersas tendendo a formar uma estrutura nodular com poucas células gigantes. Os bacilos, quando presentes, são muito raros. Entretanto, BECHELLI et al. (1959) preferiram classificar esse tipo de reação como falando a favor de reação positiva.

Uma estrutura considerada como reação de Mitsuda histologicamente negativa é representada por um infiltrado com histiócitos ricos em bacilos fagocitados e não lisados. São também aqui incluídos os infiltrados inflamatórios simples, nos quais os bacilos álcool-ácido-resistentes são muito raros ou ausentes (BECHELLI et al., 1959; AZULAY et al., 1960).

Geralmente as biópsias de reações negativas e positivas ao teste de Mitsuda obtidas de pacientes de lepra mostram achados histológicos que correspondem ao resultado clínico, mas, a reação duvidosa mostra-se, em geral, histologicamente negativa (BECHELLI et al., 1959; AZULAY et al., 1960; ANDRADE, 1962).

Embora tal análise não tenha sido feita em um número apreciável de indivíduos sadios não-comunicantes de doentes de lepra, tem-se que entre os comunicantes as reações positivas são geralmente concordantes histologicamente. O mesmo

não é verdadeiro em relação às negativas e duvidosas, as quais nem sempre mostram concordância histológica (BECHELLI et al., 1959; AZULAY et al., 1960).

É sabido que as formas polares de lepra exibem um comportamento oposto no que concerne ao teste lepromínico. Assim, os pacientes lepromatosos são negativos ao teste de Mitsuda, enquanto que os tuberculóides são geralmente positivos. No referente aos grupos instáveis, os pacientes dimorfos se comportam como indivíduos lepromatosos, isto é, são lepromino-negativos ou fracamente positivos enquanto que, os casos indeterminados podem exibir respostas positivas ou negativas ao teste lepromínico. Os tuberculóides com surtos reacionais, podem responder negativamente à lepromina pelo menos temporariamente (BECHELLI & QUAGLIATO, 1953; BASOMBRIIO, 1956). Tal negatividade não foi, entretanto, observada em pacientes cujo último surto reacional havia ocorrido nos quinze meses anteriores ao teste de Mitsuda (BECHELLI & QUAGLIATO, 1953).

É fato estabelecido que a reação de Mitsuda tem um grande valor prognóstico mesmo em indivíduos sadios. Neles, uma resposta positiva indica que, praticamente, não existe a possibilidade de adquirirem lepra lepromatosa (DHARMENDRA & CHATERJEE 1955; QUAGLIATO, 1962). Por outro lado, a persistência de uma reação duvidosa ou negativa após repetidos testes lepromínicos, em indivíduos expostos à infecção, indica um alto risco de manifestação dessa forma polar maligna.

Vários trabalhos têm mostrado que as reações provocadas pela injeção de suspensões de outros bacilos álcool-ácido-resistentes ou de seus extratos, não são comparáveis à da lepromina (HAYASHI, 1933; FLOCH, 1952; YOKOTA, 1953; YAGANISAWA et al., 1960; GUINTO et al., 1962; COUDERT et al., 1965; BULLOCK, 1968), pois, essas suspensões são capazes de desencadear a formação de granuloma tuberculóide também em pacientes lepromatosos. Os compostos orgânicos, como o 2,4 dinitro-clorobenzeno (DNCB), apesar da alegada concordância com a lepromina (BASOMBRIIO et al., 1943; MOM & BASOMBRIIO, 1944, 1945) também não mostraram efeitos comparáveis com os daquele teste (AZULAY,

1948; TURK & WATERS, 1969).

Já foi demonstrado que a reação de Mitsuda é um caráter familiar (BEIGUELMAN, 1962, 1965, 1969, 1971; BEIGUELMAN & QUAGLIATO, 1965) e que a resposta exibida entre os elementos da geração filial está associada à apresentada pela geração paterna.

Também é fato comprovado que a proporção de indivíduos Mitsuda-positivo está associada à idade (DEL FAVERO, 1948; MARTINEZ-DOMINGUEZ, 1953; CONVIT & RASSI, 1954; GUINTO et al., 1955; BEIGUELMAN, 1962; BEIGUELMAN & QUAGLIATO, 1965; BECHELLI et al., 1970), a injeções repetidas de lepromina (PAULA-SOUZA et al., 1953; DOULL et al., 1957; OLMOS-CASTRO & ARCURI, 1957; ROSEMBERG et al., 1960; BEIGUELMAN et al., 1965) ou à vacinação com BCG (QUAGLIATO, 1957b; SOUZA-CAMPOS et al., 1962; BEIGUELMAN et al., 1967; BECHELLI et al., 1970).

A falta de sucessos nas tentativas para induzir uma resposta positiva ao teste lepromínico, em pacientes lepromatosos vacinados com BCG, deram força à hipótese de que a reação de Mitsuda depende de importantes fatores genéticos. As respostas fracas e duvidosas apresentadas por alguns casos lepromatosos (CONVIT et al., 1952; AZULAY et al., 1952; QUAGLIATO & BECHELLI, 1953; LOWE & Mc NULTHY, 1953; JONQUIERES & MASANTI, 1954; SCHUJMAN, 1956; CONTRERAS et al., 1958) são transitórias (SCHUJMAN, 1956) ou não mostram correspondência histológica (BECHELLI et al., 1959). Além disso, a proporção de indivíduos fortemente positivos é significativamente menor entre crianças calmetizadas, cujos pais são pacientes lepromatosos do que entre aquelas cujos pais são sadios (BEIGUELMAN et al., 1967).

Por outro lado, há indivíduos que são incapazes de apresentar uma reação positiva, apesar de submetidos à vacinação pelo BCG e a injeções repetidas de lepromina, enquanto outros mostram uma resposta positiva já em tenra idade (PAULA-SOUZA & BECHELLI, 1960; SOUZA-CAMPOS et al., 1962).

Um estudo quantitativo da reação de Mitsuda avaliada clinicamente em 127 pares de gêmeos sadios, não comunican-

tes de doentes de lepra, mostrou que os pares monozigóticos e dizigóticos apresentam coeficientes de correlação intra-classe semelhantes (BEIGUELMAN, 1969, 1971).

Antes de interpretar tal resultado como sendo uma indicação, de que a capacidade e incapacidade de lise dos bacilos de lepra pelos macrófagos também não é determinada geneticamente, deve-se considerar que a incapacidade lisogênica dos macrófagos poderia ser um caráter genético raro (BEIGUELMAN, 1969, 1971) tendo em vista que a lepra lepromatosa nunca alcança frequências maiores do que 1%, mesmo em regiões de alta prevalência (FONTE, 1967). Assim, uma amostra de gêmeos coletada ao acaso, deveria ser predominantemente composta de pares concordantes quanto à capacidade de lise, independentemente da zigosidade dos mesmos. Portanto, a semelhança do coeficiente de correlação intra-classe ou a razão de concordância das reações de Mitsuda nos pares monozigóticos e dizigóticos, demonstrariam, na realidade, que a expressão clínica da leprominoreação tardia, em indivíduos geneticamente leprominopositivos, não depende da influência de fatores hereditários. Entretanto, isso não falaria contra a hipótese de a reação de Mitsuda ser um caráter genético, mas indicaria serem as condições ambientais capazes de influenciar a resposta macroscópica à lepromina, somente entre os indivíduos geneticamente dotados para exibí-la (BEIGUELMAN, 1971, 1972).

I.8 - COMPORTAMENTO DOS MACRÓFAGOS IN VITRO FACE O M.LEPRAE

O trabalho de BENEWOLENSKAJA (1932) parece ter sido o primeiro a respeito da fagocitose in vitro de bacilos de lepra, pelos macrófagos do sangue.

Os trabalhos de HANKS (1947a-c) também sobre o destino do M.leprae in vitro, feitos quinze anos depois do de BENEWOLENSKAJA, não se referiram, entretanto, aos macrófagos do sangue, mas sim a culturas desenvolvidas a partir de biópsias de lesões lepromatosas e tuberculóides.

As pesquisas sobre a atividade lisogênica dos macrófagos derivados de leucócitos de sangue periférico sã foram

retomadas há cerca de dez anos, mas não houve muita concordância entre os diferentes autores que trabalharam nesse problema (TREGO & SILVA, 1963; BEIGUELMAN & BARBIERI, 1965; BARBIERI & CORREA, 1967, 1971; BEIGUELMAN, 1968b; GODAL & REES, 1970; DELVILLE, 1971).

Dois propósitos principais, motivaram os estudos in vitro sobre a capacidade lisogênica dos macrófagos, face os bacilos de lepra fagocitados:

1. investigar a possibilidade de obtenção de um teste mais refinado do que a lepromino - reação tardia (reação de Mitsuda) para avaliar a resistência à infecção pelo M.leprae. Visto que a reação de Mitsuda é a consequência dos acontecimentos que se seguem à fagocitose de bacilos mortos injetados, pelos histiócitos da pele, supôs-se que a reação in vitro, sendo uma resposta ao nível celular e sem as influências que atuam in vivo, poderia ser superior à reação de Mitsuda;
2. investigar a possível aplicação do teste in vitro para tentar avaliar a influência de fatores hereditários do hospedeiro com relação à resposta tecidual à infecção pelo M.leprae. Os estudos familiares e em pares de gêmeos (BEIGUELMAN, 1962, 1965, 1969, 1971; BEIGUELMAN & QUAGLIATO, 1965) somente estabeleceram definitivamente que a resistência tecidual, avaliada com base na reação de Mitsuda, é um caráter familiar e que a reação de Mitsuda exibida pelos filhos está associada à apresentada pelos pais. Aqui convém ressaltar que BEIGUELMAN (1967) fez várias restrições à aceitação de uma hipótese monogênica para explicar a associação familiar desse caráter.

Com exceção de TREGO & SILVA (1963), que estudaram dois casos dimorfos e sete casos com lepra indeterminada, os

outros autores que trabalharam no problema do comportamento dos macrófagos frente o M.leprae investigaram somente as formas polares de lepra (BEIGUELMAN & BARBIERI, 1965; BARBIERI & CORREA, 1967; BEIGUELMAN, 1968; GODAL & REES, 1970) e apenas os trabalhos de DELVILLE (1971) e BARBIERI & CORREA (1967, 1971) apresentam dados a respeito de indivíduos sadios.

As técnicas adotadas para a obtenção de macrófagos in vitro incluíram como fontes dessas células, sangue venoso total (BENEWOLENSKAJA, 1932; TREO & SILVA, 1963) fragmentos de coágulos de leucócitos (BEIGUELMAN & BARBIERI, 1965; BARBIERI & CORREA, 1967) e suspensão de leucócitos praticamente livres de eritrócitos (BEIGUELMAN, 1968; GODAL & REES, 1970; DELVILLE, 1971).

Entretanto, apesar da utilização de técnicas diferentes, todos os outros autores mencionados, com exceção de GODAL & REES (1970), concordam em que os macrófagos obtidos de sangue periférico, quando provenientes de pacientes lepromatosos, são incapazes de destruir o bacilo de lepra, enquanto os de pacientes tuberculóides, fagocitam e lisam o M.leprae, in vitro.

BARBIERI & CORREA (1967) considerando a capacidade lisogênica dos macrófagos como uma resposta positiva, e a incapacidade de lise para o M.leprae como negativa, relataram que dentre 50 indivíduos sadios obtiveram total concordância na comparação entre a reação de Mitsuda e o teste in vitro.

I.9 - OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Descrever uma técnica in vitro que permitisse uma avaliação mais fácil da capacidade lisogênica dos macrófagos derivados de sangue periférico, frente ao bacilo de lepra morto pelo calor.
2. Aplicar essa técnica a pacientes de lepra dos tipos polares e com formas clínicas diferentes destas, bem como, a indivíduos sadios não-comunicantes e comunicantes de casos de lepra.

3. Comparar os resultados obtidos com essa técnica, aos já relatados na literatura.
4. Investigar a eventual correlação entre os resultados do teste in vitro e a reação de Mitsuda na amostra de doentes e de sadios, e averiguar a possibilidade da utilização desse teste em estudos genéticos.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 - A CASUÍSTICA ESTUDADA

Para a realização do presente trabalho foram estudados 54 doentes de lepra e 57 indivíduos sadios.

Os doentes, compreendendo 10 lepromatosos, 10 tuberculóides, 10 dimorfos, 17 indeterminados e 7 casos de classificação clínica incerta, foram, quase todos, pacientes internados no Sanatório Aimorés (Bauru, SP). Os indivíduos sadios, todos submetidos a exame clínico e hematológico completo, foram representados por 40 não-comunicantes de doentes de lepra, estudantes e pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas e por 17 cônjuges de pacientes de lepra registrados no Departamento de Dermatologia Sanitária de Campinas, do qual procederam, também, alguns doentes estudados.

As histórias clínicas sumárias da amostra de doentes vêm apresentadas, em seguida. As indicações a respeito da composição étnica, sexual e etária das amostras sadias são dadas nas tabelas 2 e 3 no capítulo de resultados.

As histórias clínicas tanto dos pacientes internados no Sanatório Aimorés quanto dos pacientes em tratamento de Ambulatório do Serviço de Dermatologia Sanitária de Campinas, foram retiradas dos prontuários desses doentes.

- 1 - N.F., sexo masculino, caucasóide, 51 anos, fichado aos 50 anos, com início presumível da moléstia aos 42 anos. À época do fichamento mostrava infiltrações difusas na face e nos membros superiores e inferiores. Não houve alteração desse quadro após um ano de tratamento. A bacterioscopia de lesão, porém, passou de positiva a negativa. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 2 - E.F.P., sexo masculino, caucasóide, 18 anos, fichado aos 17 anos, com início provável da moléstia aos 14 anos. À

época do fichamento mostrava infiltrações difusas na face e nos membros superiores e inferiores, placas mal delimitadas na face e nódulos nas orelhas. Bacterioscopia positiva. Não houve alteração desse quadro após um ano de tratamento. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.

- 3 - F.F.S., sexo masculino, caucasóide, 45 anos, fichado aos 30 anos, com início presumível da moléstia aos 26 anos. À época do fichamento mostrava infiltrações difusas, eritema e lepromas no tronco e nos membros superiores e inferiores. Depois de obter alta apresentou várias reativações, tendo sido reinternado em 1963. Teve surtos de melhora e piora. À época da colheita de sangue para a feitura do teste in vitro apresentava nódulos disseminados de aspecto regressivo. A bacterioscopia é positiva persistente. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 4 - A.T., sexo masculino, caucasóide, 52 anos, fichado aos 51 anos, com início presumível da doença aos 41 anos. À época do fichamento mostrava eritema e infiltrações difusas na face, madarose superciliar quase total, ulceração do pálato, pápulas, máculas, placas eritêmato-ferruginosas, tubérculos e nódulos no tronco e nos membros superiores e inferiores, amiotrofias discretas, tubérculos nas palmas das mãos e úlceras nas pernas e nos pés. Após um ano de tratamento mostrou melhora, apresentando regressão da infiltração das orelhas bem como das pápulas e tubérculos do tronco e tubérculos ferruginosos no abdome, membros superiores e inferiores. Nos braços e antebraços apresenta nódulos de eritema nodoso. A bacterioscopia que era fortemente positiva no muco e lesão à época do fichamento, continuou positiva, apesar do tratamento. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 5 - F.M.F., sexo masculino, negróide, 59 anos, fichado aos 55 anos, com início presumível da moléstia aos 49 anos. À época

do fichamento apresentava pápulas e numerosos tubérculos na face, tronco e membros superiores e inferiores. Apresentou melhora depois de iniciado o tratamento, mas teve reações posteriormente. À época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava numerosos lepromas de aspecto estacionário. A bacterioscopia persistiu positiva. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.

6 - M.M., sexo masculino, caucasóide, 29 anos, fichado aos 28 anos, com início presumível da moléstia aos 23 anos. À época do fichamento apresentava infiltrações irregulares de tom eritêmato-pardacento e tubérculos mal individualizados na face. Eritema e infiltrações difusas, placas, pápulas e máculas ferruginosas no tronco e nos membros superiores e inferiores. Após um ano de tratamento mostrou melhora, apresentando eritema e infiltração difusa em regressão na face e nas orelhas, pápulas e tubérculos atróficos de cor pardacenta no abdome e parte posterior do tronco, discreta infiltração nas pernas e raros nódulos de eritema nodoso nos braços e antebraços. A bacterioscopia de muco e lesão foi positiva à época do fichamento e continuou positiva apesar do tratamento. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Esta última teve comprovação histológica. Classificado como doente de lepra lepromatosa.

7 - A.M.C., sexo masculino, caucasóide, 51 anos, fichado aos 50 anos, com início presumível da moléstia aos 44 anos. À época do fichamento apresentava eritema e infiltrações moderadas na face, infiltrações difusas nos membros superiores, eritema difuso nos membros inferiores, lesões ferruginosas nas nádegas e nas coxas, bem como pápulas na planta dos pés. Após um ano de tratamento apresentou melhora, mostrando infiltração discreta na face, orelhas e cotovelos e raros nódulos de eritema nodoso em várias fases evolutivas nos braços e antebraços. A bacterioscopia do muco e lesão foi positiva à época do fichamento

e continuou positiva, apesar do tratamento e melhora do paciente. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.

- 8 - J.G., sexo masculino, caucasóide, 27 anos, fichado aos 26 anos, com início presumível da moléstia aos 16 anos. À época do fichamento apresentava eritema difuso, pápulas, tubérculos e nódulos generalizados. Após um ano de tratamento mostrou-se melhorado, apresentando surtos discretos de eritema nodoso. A bacterioscopia positiva de muco e lesão à época do fichamento persistiu apesar da melhora do paciente. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas, tendo sido esta última confirmada histologicamente. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 9 - J.A.A., sexo masculino, caucasóide, 34 anos, fichado aos 33 anos, com início provável da moléstia aos 6 anos. À época do fichamento apresentava eritema e infiltração difusa discreta na face, tronco e membros superiores e inferiores, bem como tubérculos mal individualizados, de cor pardacento-amarelada em número regular. Após um ano de tratamento apresentou melhora, mostrando lesões tuberosas pouco elevadas em regressão na fronte e no mento, e discreta infiltração nas orelhas. A bacterioscopia positiva de muco e lesão à época do fichamento persistiu, apesar da melhora do paciente. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 10 - A.P.S., sexo masculino, caucasóide, 26 anos, fichado nessa idade, com início provável da moléstia aos 16 anos. Apresentava pápulas e numerosos tubérculos na face, tronco e membros superiores e inferiores. A bacterioscopia de muco e lesão foi positiva. Tanto a reação precoce, quanto a tardia à lepromina foram negativas. Classificado como doente de lepra lepromatosa.
- 11 - A.L.B., sexo feminino, caucasóide, 62 anos, fichada aos 55

anos, com início presumível da moléstia aos 49 anos. À época do fichamento apresentava placas eritematosas bem delimitadas no tronco e membros inferiores. Em janeiro de 1964 já estava branqueada, apresentando somente lesões residuais, continuando com baciloscopia negativa até a época do teste in vitro. O teste lepromínico tardio mostrou reação positiva forte (++) . Classificada como tendo lepra tuberculóide.

12 - B.S., sexo masculino, negróide, 54 anos, fichado aos 47 anos, com início presumível da moléstia aos 40 anos. À época do fichamento apresentava máculo-pápulas pardacentas e múltiplas na face, tronco e membros superiores e inferiores, e grande mácula hipocrômica mais ou menos delimitada na região lombar direita. A baciloscopia de lesão foi positiva. Após 10 meses de tratamento, só apresentava lesões residuais e, após um ano, mostrou baciloscopia negativa. A resposta precoce ao teste lepromínico foi fortemente positiva (+++), enquanto que a tardia mostrou-se discretamente positiva (+), clinicamente, mas foi histologicamente positiva. Classificado como tendo lepra tuberculóide.

13 - A.C., sexo masculino, caucasóide, 64 anos, fichado aos 34 anos. Nessa época mostrava mácula de limite nítido, anestésica e anidrótica no pé esquerdo. A baciloscopia foi negativa e reação precoce e tardia à lepromina fortemente positiva (+++). À época do teste in vitro não mostrava lesões e a bacterioscopia persistiu negativa. Classificado como tendo lepra tuberculóide.

14 - J.R.O., sexo masculino, caucasóide, 41 anos, fichado aos 33 anos, com início presumível da moléstia aos 26 anos. À época do fichamento mostrava máculas e placas eritêmato-hipocrômicas bem delimitadas e baciloscopia negativa. As lesões desapareceram com o tratamento. A reação precoce ao teste lepromínico foi moderadamente positiva (+) enquanto que a tardia mostrou-se fortemente positiva (+++). Classificado como tendo lepra tuberculóide.

- 15 - A.A.F., sexo feminino, caucasóide, 48 anos, fichada aos 35 anos, com início presumível da moléstia aos 29 anos. À época do fichamento apresentava placas eritematosas nos membros superiores e inferiores, bem como no tronco, com baciloscopia negativa. À época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava lesões residuais hipocrômicas e atróficas, com baciloscopia persistentemente negativa. Tanto a resposta precoce quanto a tardia ao teste lepromínico mostraram-se fortemente positivas (+++), sendo esta última confirmada histologicamente. Classificada como tendo lepra tuberculóide.
- 16 - E.L., sexo masculino, caucasóide, 15 anos, fichado com essa idade, apresentando máculas hipocrômicas extensas e eritêmato-hipocrômicas bem delimitadas no tronco e nos membros superiores e inferiores. A bacterioscopia de lesão mostrou resultado persistentemente negativo e a resposta tardia ao teste lepromínico foi positiva, tanto ao exame clínico (++), quanto ao exame histológico. Classificado como tendo lepra tuberculóide.
- 17 - L.C.R., sexo masculino, caucasóide, 16 anos de idade, fichado com essa idade, apresentando pequeno número de placas hipocrômicas e eritêmato-hipocrômicas bem delimitadas no tronco e nos membros superiores e inferiores. Com o tratamento, as lesões tornaram-se mais planas e a baciloscopia passou a ser persistentemente negativa. A resposta tardia ao teste lepromínico mostrou-se clinicamente fortemente positiva (+++). Houve confirmação histológica da positividade. Classificado como tendo lepra tuberculóide.
- 18 - J.N.S., sexo masculino, negróide, 15 anos, fichado com essa idade, com início presumível da moléstia aos 9 anos. À época do fichamento apresentava máculas hipocrômicas bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com descamação na periferia, que sugeriam tratar-se de placas de regressão. A baciloscopia de lesão foi persistentemente negativa. A reação tardia ao teste lepromínico mostrou-se francamente posi

- tiva (++) ao exame clínico e histológico. Classificado como tendo lepra tuberculóide.
- 19 - V.A.S., sexo feminino, negróide, 32 anos, fichada aos 29 anos, com início presumível da moléstia aos 23 anos. À época do fichamento apresentava face eritematosa, máculas eritêmato-pardacentas escamosas bem delimitadas no tronco e nos membros superiores e inferiores, e baciloscopia positiva de lesão (+). Em janeiro de 1968 teve um surto de reativação, começando a melhorar em março do mesmo ano. Um ano depois já estava branqueada, apresentando máculas hipocrômicas residuais, atróficas, no tronco e nos membros superiores e inferiores. O teste lepromínico tardio foi fracamente positivo à leitura clínica, mas a positividade foi confirmada histologicamente.
- 20 - G.B., sexo masculino, caucasóide, 76 anos, fichado em 1950 no Sanatório Pirapitingui como tendo lepra lepromatosa, apresentando infiltrações na face e no tronco, manchas eritematosas nas coxas e rinite, mas com baciloscopia negativa de muco e lesão. Atualmente só apresenta mutilações e não mostra lesões residuais cutâneas. Apesar de tal quadro poder indicar ser o paciente um caso branqueado de lepra lepromatosa, as respostas precoce e tardia ao teste lepromínico fortemente positivas (+++) falam a favor de que se trata de um caso de lepra tuberculóide.
- 21 - J.D.R., sexo masculino, caucasóide, 49 anos, fichado aos 43 anos. À época do fichamento apresentava infiltrações discretas na face, pápulas, máculo-pápulas, placas eritematosas e eritêmato-ferruginosas, algumas bem delimitadas, outras não, no tronco e membros superiores e inferiores. A baciloscopia de muco e lesão foi positiva (++) . Após um ano de tratamento apresentava lesões discretas e baciloscopia positiva (+) e à época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava apenas lesões residuais com baciloscopia negativa. A lepromino reação tardia foi duvidosa. Classificado co-

mo tendo lepra dimorfa.

- 22 - V.L.R., sexo feminino, caucasóide, 18 anos, fichada aos 17 anos, com início presumível da moléstia aos 11 anos. À época do fichamento apresentava máculas eritematosas tipo tuberculóide no abdome, e nódulos, provavelmente , lepromatosos, no antebraço direito e nas pernas. A bacterioscopia de muco foi negativa mas a de lesão foi fortemente positiva (+++). Um mês após o seu fichamento sofreu um surto tipo pseudo-exacerbação com placas eritematosas ou eritêmato-ferruginosas mais ou menos bem delimitadas no tronco e membros superiores e inferiores, bem como edema das extremidades. Tanto as máculas, quanto o edema das extremidades regrediram com corticóide. À época da colheita de sangue para o teste in vitro mostrava-se melhorada, com bacterioscopia ainda positiva. Tanto a reação precoce, quanto a reação tardia à lepromina foram negativas. Classificada como tendo lepra dimorfa.
- 23 - F.M., sexo masculino, caucasóide, 58 anos, fichado aos 55 anos, com início presumível da moléstia aos 40 anos. À época do fichamento apresentava eritema e infiltrações difusas, máculas de cor ferruginosa, pápulas e lesões tuberosas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com aparência de doente do tipo lepromatoso. A bacterioscopia foi fortemente positiva (+++) tanto de muco, quanto de lesão. O paciente melhorou com o tratamento e após quatro meses teve um surto de reativação, ou talvez, um surto tipo tuberculóide reacional, com lesões eritêmato-papulosas e máculo pápulas. À época do teste in vitro estava com tubérculos cicatrizados de permeio a lesões em regressão. Tanto a reação precoce, quanto a tardia ao teste lepromínico foram negativas. Classificado como tendo lepra dimorfa.
- 24 - M.Y., sexo masculino, mongolóide, 45 anos, fichado aos 30 anos, com início presumível da moléstia aos 24 anos. À época do fichamento apresentava infiltrações difusas generalizadas e bacterioscopia positiva de muco (++) e

lesão (+). Apresentava vários surtos tipo tuberculóide reacional com baciloscopia positiva nas primeiras revisões. À época da colheita de sangue para o teste in vitro já se mostrava branqueado. A resposta tardia ao teste lepromínico foi discretamente positiva (+) sendo confirmada ao nível histológico. Classificado como tendo lepra dimorfa.

- 25 - J.O.C., sexo masculino, caucasóide, 39 anos, fichado aos 29 anos, com início presumível da moléstia aos 23 anos. À época do fichamento apresentava eritema difuso generalizado e placas bem delimitadas no braço direito. A biópsia cutânea feita um ano depois revelou estruturas com células epitelióides e bacilos raríssimos. À época da colheita de sangue para o teste in vitro a baciloscopia era negativa e não havia lesões em atividade. A reação tardia ao teste lepromínico foi discretamente positiva ao nível clínico (+) sendo confirmada ao nível histológico. Classificado como tendo lepra dimorfa.
- 26 - R.C., sexo masculino, caucasóide, 73 anos, fichado aos 71 anos, com início presumível da moléstia aos 65 anos. À época do fichamento apresentava placas eritêmato-ferruginosas irregulares, mas bem delimitadas, no tronco e face posterior dos braços. A bacterioscopia de muco foi negativa, mas a de lesão foi positiva (++) . Melhorou com o tratamento, mas após um ano apresentou um surto de piora, com novas lesões e icterícia. À época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava lesões em regressão, mas ainda com positividade bacterioscópica. A reação tardia à lepromina foi duvidosa. Clinicamente o paciente foi classificado como tendo lepra dimorfa.
- 27 - J.F., sexo masculino, caucasóide, 41 anos, fichado com essa idade, com início presumível da moléstia aos 35 anos. À época do fichamento mostrava placas eritematosas bem delimitadas no tronco e braços, edema das extremidades e bacterioscopia de muco e lesão positiva (++) . Após tratamento com corticóide e sulfonoterapia mostrou lesões em regressão, mas com baciloscopia ainda positiva. A respos

- ta ao teste lepromínico foi negativa. Classificado como tendo lepra dimorfa.
- 28 - J.M., sexo masculino, caucasóide, 53 anos, fichado aos 51 anos, com início presumível da moléstia aos 45 anos. À época do fichamento apresentava placas e máculo-pápulas eritematosas e eritêmato-ferruginosas bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores. A baciloscopia de muco e lesão realizada nessa ocasião foi positiva (+) com raros bacilos típicos. Um ano depois, por ocasião da regressão de um surto de piora, apresentou baciloscopia (+) em quatro lesões diferentes, com raros bacilos típicos, a maioria dos quais granuloso. À época da colheita de sangue para o teste in vitro, apresentava máculas residuais e lesões eritematosas atróficas. A reação precoce e tardia ao teste lepromínico mostrou-se moderadamente positiva (+), sendo esta última confirmada ao nível histológico. Classificado como tendo lepra dimorfa.
- 29 - D.V.L.F., sexo masculino, caucasóide, 51 anos, fichado aos 50 anos, com início presumível da moléstia aos 42 anos. À época do fichamento apresentava placas eritematosas bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com bacterioscopia negativa. À época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava lesões hipocrômicas residuais, persistindo a baciloscopia negativa. A resposta tardia ao teste lepromínico mostrou reação discretamente positiva (+), confirmada histologicamente. Classificado como tendo lepra dimorfa.
- 30 - M.F.G., sexo feminino, negróide, 60 anos, fichada aos 57 anos, com início presumível da moléstia aos 54 anos. À época do fichamento apresentava placas eritêmato-pardacentas múltiplas e bem delimitadas no tronco e nos membros superiores e inferiores, bem como, edema das extremidades. A bacterioscopia de muco e lesão foi negativa. Na vigência do tratamento, a paciente apresentou três surtos reacionais e, à época da colheita de sangue

para o teste in vitro, mostrou lesões praticamente regressivas. A reação tardia à lepromina foi clinicamente positiva (++) e teve confirmação histológica. Clinicamente a paciente foi considerada como um caso de lepra dimorfa.

- 31 - B.J., sexo masculino, negróide, 50 anos, fichado com essa idade, com início presumível da doença aos 49 anos. À época do fichamento apresentava máculas hipocrômicas no tronco e nos membros, sendo a baciloscopia de lesão negativa. Pouco tempo depois da colheita de sangue para o teste in vitro faleceu em consequência de cirrose hepática. Classificado como tendo lepra indeterminada.
- 32 - F.F., sexo masculino, negróide, 51 anos, fichado aos 50 anos, apresentando, nessa ocasião, ulcerações tróficas nos membros inferiores, e escamações no tronco e nos membros superiores, com bacterioscopia negativa de lesão. A resposta ao teste lepromínico precoce foi duvidosa, enquanto que a tardia mostrou forte positividade (++) . Classificado como tendo lepra indeterminada.
- 33 - J.C.B., sexo masculino, caucasóide, 60 anos, fichado aos 50 anos, com início presumível da moléstia aos 46 anos. À época do fichamento apresentava máculas eritematosas no tronco e nos membros e, quando da colheita de sangue para o teste in vitro, apresentava máculas hipocrômicas bem delimitadas. A bacterioscopia de lesão tem sido persistentemente negativa. O teste lepromínico precoce mostrou-se negativo, mas o tardio foi fortemente positivo (++) . Classificado como tendo lepra indeterminada.
- 34 - A.E.L., sexo masculino, caucasóide, 52 anos, fichado aos 47 anos, apresentando manchas, reliquats de lesões anteriores e parestesia nos membros inferiores. A baciloscopia de lesão mostrou-se negativa. Classificado como tendo lepra indeterminada.
- 35 - E.G.S., sexo feminino, caucasóide, 43 anos, fichada aos 26 anos, apresentando, nessa ocasião, lesões eritematosas no braço direito e face esquerda, pequena lesão eri

- tematosa na nádega direita e hipoestesia ao nível das lesões. A bacterioscopia foi negativa para muco e lesão, permanecendo negativa até a época da colheita de sangue para o teste in vitro. À época do fichamento a lepromi-
no-reação tardia mostrou-se positiva (++) . Classificada como tendo lepra indeterminada.
- 36 - A.C.I., sexo masculino, caucasóide, 27 anos, fichado aos 23 anos, apresentando, nessa ocasião, anestesia da face posterior e interna do braço direito, lesão rósea, anes-
tésica e alopécica no terço inferior da face externa da perna direita, bem como anestesia da borda externa do pé direito. A biópsia da lesão da perna direita revelou um discreto grau de infiltração inflamatória crônica inespe-
cífica, com negatividade bacterioscópica. Durante todo o tempo que se seguiu ao fichamento, o estado do pacien-
te permaneceu inalterado, persistindo as placas anestési-
cas e alopécicas. A resposta tardia ao teste lepromí-
nico foi negativa. Classificado como tendo lepra inde-
terminada.
- 37 - A.M., sexo masculino, caucasóide, 49 anos, fichado com essa idade, apresentando máculas hipocrômicas com limi-
tes imprecisos no tronco e bacterioscopia negativa. Clas-
sificado como tendo lepra indeterminada.
- 38 - H.R., sexo masculino, caucasóide, 57 anos, fichado com essa idade, apresentando máculas eritemato-hipocrômicas no tronco e membros inferiores, bem como mal perfurante plan-
tar no pé direito. A bacilosopia de lesão foi negativa e o teste lepromínico mostrou reação precoce negativa e reação tardia discretamente positiva (+). Classificado como tendo lepra indeterminada.
- 39 - F.D.B., sexo masculino, caucasóide, 73 anos, fichado com essa idade e com início presumível da moléstia aos 71 anos. Apresenta máculas eritemato-hipocrômicas na re-
gião mamária direita e bacilosopia negativa. Classifi-
cado como tendo lepra indeterminada.
- 40 - M.G., sexo masculino, caucasóide, 70 anos, fichado com

essa idade, apresentando máculas hipocrômicas no tronco e membros, com baciloscopia negativa. O teste lepromínico mostrou reação precoce discretamente positiva (+) e tardia fortemente positiva (++) . Classificado como tendo lepra indeterminada.

- 41 - E.A., sexo feminino, caucasóide, 37 anos, fichada aos 29 anos, com início presumível da moléstia aos 22 anos. À época do fichamento apresentava apenas amiotrofias e úlceras tróficas, com baciloscopia negativa persistente. Tem área anestésica na coxa direita. A resposta precoce ao teste lepromínico foi duvidosa e a reação tardia foi clinicamente positiva (++) sendo confirmada histologicamente. A paciente foi classificada clinicamente como um caso de lepra indeterminada.
- 42 - A.C., sexo masculino, caucasóide, 64 anos, com 60 anos à época do fichamento, quando apresentava eritema na face e fronte, regiões anestésicas nos membros superiores e inferiores, espessamento do cubital, mãos em garra e pé equinovaro. A bacterioscopia de muco e lesão mostrou-se, nessa ocasião, negativa. Um ano depois do fichamento apresentou mal perfurante plantar no pé esquerdo e lesões tróficas e, três anos após, lesões neurotróficas e amiotróficas, que obrigaram a amputação da perna esquerda. Quatro anos após o fichamento apresentava mal perfurante plantar do pé direito e amiotrofias. O paciente foi classificado como tendo lepra indeterminada.
- 43 - J.B.P., sexo masculino, caucasóide, 67 anos, fichado aos 44 anos, com início presumível da moléstia aos 33 anos. À época do fichamento mostrava máculas eritematosas na cabeça, tronco e membros. Tem sido reinternado frequentemente no Sanatório Aimorés (Bauru, SP) em consequência de ulcerações plantares. Não tem apresentado lesões em atividade, mas mostra amiotrofias. A bacterioscopia é negativa. Submetido ao teste lepromínico mostrou reação precoce discretamente positiva (+) e forte reação tardia (+++). O paciente foi classificado como tendo le

- pra indeterminada.
- 44 - F.L., sexo masculino, caucasóide, 52 anos, fichado aos 41 anos, quando apresentava máculas no tronco e amiotrofias nas mãos. À época da colheita de sangue para o teste in vitro mostrava amiotrofias nas mãos, mal perfurante plantar nos dois pés e máculas hipocrômicas no tronco. A baciloscopia foi persistentemente negativa. Classificado como doente de lepra indeterminada.
- 45 - A.G., sexo masculino, caucasóide, 57 anos, fichado aos 37 anos, apresentando, nessa ocasião, eritema róseo no tórax, bolhas de conteúdo hemático, cicatrização retardada nos dedos dos membros superiores, mácula eritematosa nas nádegas e mal perfurante plantar no pé esquerdo. A bacterioscopia mostrou-se negativa para muco, e positiva (+) para lesão. Durante os três anos que se seguiram ao tratamento, as biópsias de lesão revelaram uma histopatologia de lepra indeterminada, com negatividade bacterioscópica. À época da colheita de sangue para o teste in vitro o paciente apresentava amiotrofia da mão direita e mal perfurante plantar cicatrizado. A reação tardia ao teste lepromínico foi negativa. O paciente foi classificado como tendo lepra indeterminada.
- 46 - G.S., sexo masculino, negróide, 50 anos, fichado aos 43 anos, com início presumível da moléstia aos 35 anos. À época do fichamento apresentava garras cubitais e descação nas coxas. Na ocasião da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava manchas hipocrômicas na face e tronco, bem como garras cubitais. A baciloscopia foi persistentemente negativa. Foi classificado como tendo lepra indeterminada.
- 47 - A.C.B., sexo feminino, caucasóide, 79 anos, com 44 anos à época do fichamento em São Paulo. Transferida para o Dispensário de Campinas, SP, com 68 anos apresentava máculas eritemato-papulosas nos membros, lesões em regressão, hiperemia difusa generalizada na face e nas mãos. Após ficar branqueada, mostrou, sete anos depois, infiltração nos cotovelos, eritema na face e membros superio

- res e, posteriormente, apresentou eritema nos braços e nádegas, além de dores articulares. A lepromino reação tardia foi negativa. Foi classificada como tendo lepra indeterminada.
- 48 - J.Go., sexo masculino, negróide, 45 anos, fichado aos 44 anos, com início presumível da moléstia aos 36 anos. À época do fichamento apresentava reliquats de lesões ulceradas que poderiam ser sinais de aparente eritema nodoso. A baciloscopia de lesão mostrou resultado negativo. A resposta precoce ao teste lepromínico mostrou negatividade, mas a tardia revelou positividade, tanto macroscópica (+), quanto histologicamente. O paciente havia sido classificado, clinicamente, como sendo um caso de lepra lepromatosa branqueada.
- 49 - A.P.D., sexo feminino, caucasoíde, 27 anos, fichada aos 25 anos, com início presumível da moléstia aos 19 anos. À época do fichamento mostrava máculas e placas eritêmato-violáceas múltiplas e bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com bacterioscopia negativa. Em janeiro de 1969 já mostrava lesões planas e à época da colheita de sangue para o teste in vitro já se mostrava branqueada, com raras máculas hipocrômicas bastante atenuadas. A resposta tardia ao teste lepromínico foi, clinicamente, fortemente positiva (+++). Clinicamente a paciente podia ser classificada como tendo lepra dimorfa ou tuberculóide reacional.
- 50 - S.E.A., sexo masculino, negróide, 22 anos, fichado aos 20 anos, com início presumível da doença aos 14 anos. À época do fichamento mostrava placas e máculo-pápulas eritematosas e eritêmato-ferruginosas bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com baciloscopia negativa. À época da colheita de sangue para o teste in vitro mostrava lesões residuais bem atenuadas e com baciloscopia persistentemente negativa. A reação tardia ao teste lepromínico foi discretamente positiva (+) tanto ao nível clínico, quanto ao nível histológico. Clinicamente o paciente podia ser classifica

do como tendo lepra dimorfa ou tuberculóide reacional .

51 - E.F., sexo masculino, negroide, 40 anos. Segundo o paciente, ele foi submetido a tratamento desde a idade de 10 anos, no Estado do Paraná. Foi fichado no Sanatório Aimorés (Bauru, SP) em 1965, aos 35 anos de idade. Nessa ocasião apresentava lesões eritemato-hipocrômicas com eritema e infiltração marginal tipo tuberculóide, que logo desapareceram com o tratamento específico. O paciente apresenta perfurações do septo e lesões cicatriciais nas coxas e antebraços que podem ter sido placas supuradas produzidas durante tratamento com iodo. A reação precoce à lepromina foi positiva forte (++) enquanto que a tardia foi discretamente positiva (+), mas teve confirmação histológica. A biópsia de lesão lida por ocasião do fichamento foi diagnosticada como sendo de lepra lepromatosa. Entretanto, atualmente, o paciente apresenta baciloscopia de lesão negativa e a reação tardia ao teste lepromínico foi clinicamente positiva (+), sendo confirmado esse resultado histologicamente. Embora no prontuário do paciente conste que o mesmo é um caso de lepra tuberculóide, a sua evolução após internação no Sanatório Aimorés, fala a favor de que seja um caso de lepra dimorfa.

52 - M.J.R., sexo masculino, negroide, 32 anos, fichado aos 24 anos, com início presumível da moléstia aos 17 anos. À época do fichamento apresentava placas eritemato-vinhosas bem delimitadas na face, tronco e membros superiores e inferiores, com baciloscopia positiva de muco e lesão. Foi classificado, clinicamente, como tendo lepra tuberculóide reacional e esse diagnóstico foi confirmado em duas biópsias de lesões cutâneas com baciloscopia positiva (+). Durante a vigência do tratamento teve dois surtos com um ano de intervalo entre si. À época do teste in vitro já não mostrava lesões em atividade e tinha baciloscopia negativa. O teste lepromínico mostrou reação precoce positiva (++) , o mesmo ocorrendo com a resposta tardia (+) tanto ao nível clínico quanto ao nível histo-

lógico. Apesar de o doente ter sido classificado como sendo um caso de lepra tuberculóide, ele foi depois , considerado, clinicamente, como tendo lepra dimorfa, em consequência de sua evolução.

- 53 - A.G.O., sexo masculino, negróide, 51 anos, fichado aos 42 anos, com início presumível da moléstia aos 36 anos. À época do fichamento apresentava máculas eritematosas bem delimitadas no tronco e membros superiores e inferiores e máculo-pápulas na face. Nessa ocasião, a biópsia de lesão revelou baciloscopia positiva (++) e foi diagnosticada como infiltração lepromatosa. Foi reinternado várias vezes por abandono de tratamento. À época da colheita de sangue para o teste in vitro apresentava máculas hipocrômicas de limites mais ou menos precisos no pescoço e na face. Apesar de o paciente ter sido inicialmente classificado como sendo um caso de lepra tuberculóide reacional, a sua evolução falou a favor de sua classificação clínica entre os casos de lepra dimorfa. A reação tardia ao teste lepromínico foi discretamente positiva (+) mas teve confirmação histológica.
- 54 - W.R., sexo masculino, negróide, 32 anos, fichado aos 30 anos. À época do fichamento apresentava mal perfurante plantar nos dois pés. Nunca apresentou lesões cutâneas. A baciloscopia permaneceu sempre negativa. Por ocasião do teste in vitro apresentava paralisia facial esquerda e mutilações nos pés. Entretanto o mal perfurante plantar, nos dois pés, poderia estar relacionado a uma polineurite alcoólica. A resposta ao teste lepromínico foi fortemente positiva (+++) com confirmação histológica. Também a reação precoce foi intensa (+++). Embora tenha sido classificado como sendo mais um caso de lepra tuberculóide, ele poderia não ser um caso de lepra.

II.2.1 - Lavagem e esterilização do material

As seringas, munidas de agulha 25x8, acondicionadas em tubos de vidro com orla de 23x120 mm envolvidos com papel de alumínio, foram esterilizadas em forno a 180°C durante uma hora. Antes de serem levadas a esse forno, as seringas foram mantidas durante 15 minutos em água em ebulição, lavadas com água bidestilada, postas a secar em forno a 40°C.

Os tubos de vidro utilizados para distribuir o sangue coletado foram siliconizados e esterilizados. Para isso, foram mergulhados durante 4 horas em uma solução aquosa de detergente, sem emulsão oleosa, à base de hidróxido de sódio (Solupan Super B), escovados, enxaguados abundantemente em água corrente e lavados com água bidestilada. Depois de secos em forno a 40°C, os tubos foram siliconizados (silicone a 2% em toluol) voltando ao forno de secagem. A esterilização, em forno a 180°C durante duas horas, foi feita com os tubos fechados por uma capa de papel de alumínio e acondicionados em caixas de metal, do tipo empregado como merendeira. O papel de alumínio usado na vedação dos tubos após a coleta de sangue, foi preparado cortando-se-o em pedaços quadrados, com 5 cm de lado, os quais foram acondicionados em placas de Petri com 20 cm de diâmetro. A lavagem e esterilização de tais placas obedeceu à mesma rotina dos tubos de vidro.

As pipetas Pasteur foram esterilizadas e siliconizadas sendo, para isso, mergulhadas em solução sulfo-nítrica (ácido sulfúrico e nítrico comerciais na proporção de 20:1) durante 4 horas, mantidas num lavador de pipetas durante 3 horas, lavadas em água bidestilada, e secas em forno a 180°C. Depois de siliconizadas e secas, elas foram embuchadas com algodão hidrófilo e mantidas em forno a 180°C durante 2 horas, acondicionadas em caixas cilíndricas de metal.

O processo de lavagem, siliconização e esterilização dos tubos de Leighton foi exatamente o mesmo descrito para os tubos de coleta de sangue, com a diferença que, após a secagem do silicone, introduziu-se uma lamínula (10x32mm) em cada tubo. Essas lamínulas foram preparadas deixando-se as

imersas em solução concentrada de detergente (8:1000), durante 1 hora, e submetendo-as a lavagem em água corrente durante 10 minutos, duas fervuras em água bidestilada, secagem entre duas folhas de papel de filtro e em forno a 40°C.

II.2.2 - Preparação dos meios nutritivos

A solução fisiológica de Hanks com hidrolisado de lactalbumina e antibióticos, que foi utilizada teve a seguinte composição, na quantidade de um litro:

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,12 g
Dextrose	1,00 g
Hidrolisado de lactalbumina	5,00 g
Fenol vermelho	2 ml
CaCl ₂	0,14 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
NaHCO ₃	0,35 g
Penicilina	100 U.I./ml
Estreptomomicina	100 µg/ml
H ₂ O tridestilada q.s.p.	1000 ml

A fim de evitar precipitação indesejável, os componentes dessa solução foram dissolvidos separadamente em água tridestilada e vertidos num balão de vidro, na sequência apresentada acima.

O fenol vermelho usado como indicador de pH, foi preparado a partir da dissolução de 1g em 28ml de NaOH 0,1N, completando-se o volume de 200 ml com água tridestilada. As eventuais correções de pH para a neutralidade foram feitas com o auxílio de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N conforme o caso.

A solução fisiológica de Hanks com hidrolisado de lactalbumina e antibióticos foi filtrada, sob pressão positiva, através de um filtro Seitz munido de placa esterilizante, montando-se para isso um sistema como o esquematizado na Fig. 1. A pressão positiva do compressor de ar foi regulada de sorte a permitir a filtração de 80 a 100 gotas por minuto, a fim de evitar ruptura da placa esterilizante.

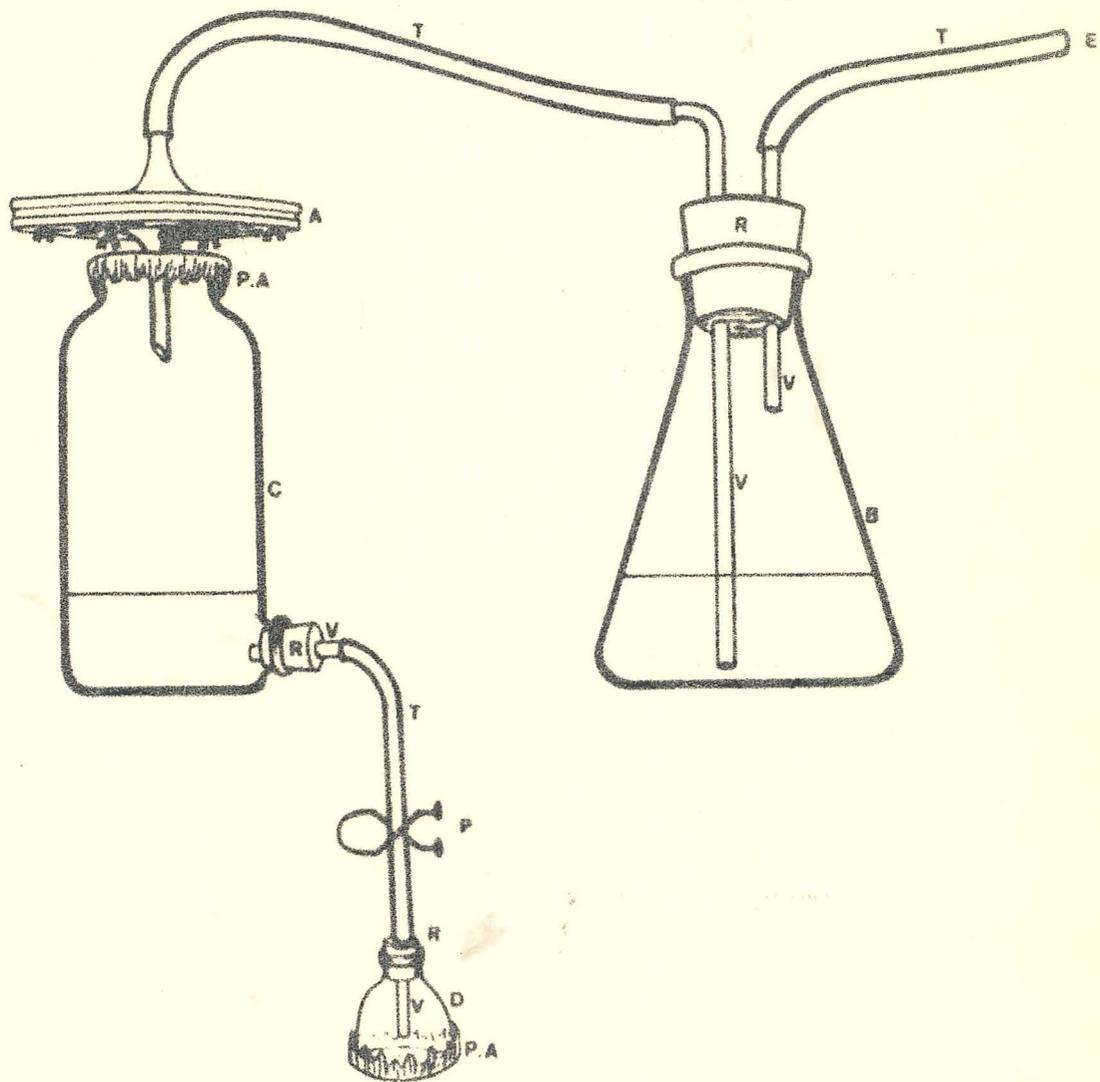


Fig. 1 - Sistema filtrante

A: filtro Seitz, munido de placa esterilizante; B: Erlenmeyer contendo a solução a ser filtrada; C: frasco de Mariotti, contendo a solução filtrada e estéril; D: campânula de proteção; E: extremidade a ser ligada na bomba injetora de ar comprimido; P.A: papel de alumínio; R: rolha de borracha; T: tubos de latex; V: tubos de vidro.

Os componentes do sistema representado na Fig. 1 foram esterilizados em autoclave durante 1 hora, sob 1,25 atmosferas de pressão e a 125°C. Para isso, o filtro Seitz foi levado à autoclave munido de placa esterilizante umedecida com água bidestilada, tubo de latex ligado ao orifício superior, e aberturas vedadas com papel de alumínio. O frasco de Mariotti e a campânula foram levados à autoclave em conexão, tendo-se o cuidado de vedar a abertura da campânula e do frasco de Mariotti com 3 folhas de papel de alumínio, bem como, o de manter o tubo de latex desobstruído pela presilha. Mesmo o frasco destinado a conter a solução a ser filtrada foi autoclavado já munido da rolha atravessada pelos tubos de vidro, cujos orifícios de abertura são fechados com papel de alumínio. Cada um dos três conjuntos foi levado à autoclave envolvido em papel Kraft.

A distribuição da solução filtrada e estéril foi feita em frascos do tipo vidro de xarope, com capacidade de 80 a 100 ml, lavados e esterilizados de modo idêntico aos tubos de vidro. Para isso, terminada a filtração, retirava-se, cuidadosamente, o filtro Seitz de sobre o frasco de Mariotti, vedando-se rapidamente a abertura deste com papel de alumínio esterilizado. Tomou-se sempre o cuidado de desmontar o filtro Seitz, a fim de verificar se a placa filtrante permaneceu, realmente, íntegra. Isso feito, removia-se o papel de alumínio que veda a campânula e, com o auxílio da presilha, regulava-se o fluxo da solução que escoava para os frascos colocados sob a campânula, de modo que fossem utilizados apenas 2/3 da capacidade total de cada frasco. Após cada operação dessas, flambava-se a abertura do frasco, adaptava-se uma rolha de borracha estéril e cobria-se a mesma com papel de alumínio. Os frascos eram, então, transferidos para uma estufa a 37°C onde eram mantidos durante 48 horas, a fim de submetê-los a um teste de esterilidade. Findo esse prazo, se não houvesse turvação ou alteração da cor da solução, ela era considerada estéril e estava pronta para ser usada ou guardada em geladeira.

O meio nutritivo de Mellnick usado teve a seguin

te composição na quantidade de 1 litro:

Solução fisiológica de Hanks com hidrolisado de lactalbumina	600 ml
Soro fetal bovino	400 ml
Penicilina	100 U.I./ml
Estreptomicina	100 µg/ml

O processo de esterilização, distribuição e teste de esterilidade do meio nutritivo de Mellnick foi idêntico ao utilizado para a solução fisiológica de Hanks descrito anteriormente.

O soro fetal bovino empregado foi obtido a partir da reunião de soros de vários fetos, cujo sangue era colhido em matadouros.

A coleta desse sangue é conseguida de maneira relativamente fácil. Mantendo-se o feto bovino de cabeça para baixo, com o cordão umbilical ligado, introduz-se numa jugular dissecada, uma agulha de 35x17 em conexão com um tubo de polietileno. Após recolher o sangue em tubos de 32x170 mm, não siliconizados, são eles dispostos em estantes, vedados com papel de alumínio e transportados para o laboratório, com certo cuidado para evitar hemólise.

No laboratório, os bordos do coágulo são destacados com um bastão de vidro, promovendo-se a separação do soro por centrifugação a 2500 r.p.m. durante 15 a 20 minutos.

Os soros dos diferentes fetos são misturados, passados em filtro Seitz munido de placa esterilizante e distribuídos segundo a mesma técnica descrita acima. Antes de armazenar o soro em congelador a -15°C , promove-se a sua inativação deixando os frascos durante 1 hora em banho maria a 56°C .

II.2.3 - Extração de bacilos de lepra da lepromina e sua inoculação em tubos de Leighton

O preparo da suspensão de bacilos utilizada nos inóculos, foi realizado em câmara asséptica, toda vez que se ia processar a inoculação. Para isso, em tubo de ensaio

siliconizado e estéril, acrescentava-se um volume de clorofórmio a um volume de lepromina integral diluída em solução salina estéril a 0,9%, na proporção de 1:20. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur ressuspendia-se rítmica e vigorosamente essa lepromina diluída, durante 5 minutos, após o que o tubo era arrolhado e mantido em repouso o tempo suficiente para que se processasse a separação entre a fase aquosa e o clorofórmio. Dada a sua grande afinidade pelas micobactérias, o clorofórmio passava a conter grande número de bacilos em suspensão. Ele era, então, aspirado e transferido para outro tubo de ensaio estéril e mantido em banho de gelo.

Dentro da câmara asséptica tomava-se uma série de tubos de Leighton siliconizados, esterilizados e providos de uma lamínula em seu interior. Cada um deles era inclinado suavemente, de sorte a permitir que a lamínula deslizesse até a abertura do tubo, fechada com uma capa de papel de alumínio. Quando isso era conseguido, o conjunto de tubos de Leighton era disposto em posição horizontal e retiravam-se as suas capas de papel de alumínio. Com uma pipeta Pasteur terminada em capilar, aspirava-se um volume de clorofórmio com bacilos em suspensão, suficiente para encher a parte capilar da pipeta. Sobre as lamínulas dos tubos de Leighton depositava-se uma gota dessa suspensão, tendo-se o cuidado, a cada operação, de agitar o clorofórmio contendo os bacilos.

Os tubos de Leighton eram fechados novamente com a capa de papel de alumínio, logo após a evaporação do clorofórmio da gota depositada nas lamínulas, as quais voltavam a ocupar a depressão existente nos tubos, fazendo-se-os inclinar suavemente.

É importante observar que o tempo decorrido entre o início da preparação da suspensão de bacilos em clorofórmio e a distribuição das gotas sobre as lamínulas nunca ultrapassou a 30 minutos, a fim de que a integridade bacilar não fosse prejudicada. Caso decorresse um tempo maior que 30 minutos, nova suspensão de bacilos era preparada.

A média de bacilos depositada nas lamínulas foi estimada como estando num intervalo de confiança de 95%, en

tre 66.485 a 78.609 bacilos.

II. 3 - METODOS

II.3.1 - A reação tardia à lepromina (reação de Mitsuda)

A reação de Mitsuda foi provocada em todos os indivíduos antes da coleta de sangue, pela injeção intradérmica de 0,1 ml de lepromina-padrão (standard lepromin) preparada no Departamento de Genética Médica da Universidade Estadual de Campinas, fazendo-se a leitura clínica da reação de Mitsuda 28 a 30 dias após a inoculação, excetuando-se a de 6 pacientes indeterminados, 5 dos quais foram transferidos do Sanatório Aimorés e um falecido.

O critério de classificação empregado na leitura clínica foi o recomendado pelo VI Congresso Internacional de lepra (Madrid, 1953):

1. ausência de elemento visível ou palpável: reação negativa (-);
2. presença de elemento perceptível com diâmetro inferior a 3 mm: reação duvidosa (+);
3. presença de infiltração franca, pápula ou nódulo, com diâmetro de 3 a 5 mm: reação positiva (+);
4. presença de infiltração nodular com diâmetro maior do que 5 mm: reação positiva (++);
5. presença de nódulo ulcerado: reação positiva (+++).

II.3.2 - O teste in vitro

Após assepsia com água e sabão, seguida de fricção com álcool a 70%, colhiam-se 20 ml de sangue venoso em uma seringa esterilizada e heparinizada (Liquemine - Roche).

O sangue coletado era distribuído em 4 tubos de 12x100 mm, providos cada qual de uma capa de papel de alumínio, que não era retirada, mas perfurada pela agulha da seringa. Após a injeção do sangue nos tubos, as capas eram cobertas por outras de papel de alumínio esterilizado.

Os tubos eram transportados para uma estufa a

37°C na qual eram mantidos, durante 30 a 40 minutos, inclinados em ângulo de 45° a fim de que se processasse a hemossedimentação. De modo geral, esse processo permitiu a separação, em cada tubo, de cerca de 1 ml de plasma rico em leucócitos em suspensão. Entretanto, nos casos em que a hemossedimentação era muito lenta, ela era acelerada através de centrifugação em baixa rotação (300 r.p.m.).

Quando o sangue era colhido em lugares muito distantes, ele chegava ao laboratório apresentando uma sedimentação excessiva dos leucócitos. Nesse caso, em uma câmara asséptica, e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a camada de leucócitos formada sobre as hemácias era ressuspensa no plasma. Essa operação era executada delicada e pacientemente, a fim de evitar um aumento excessivo de hemácias no plasma sobrenadante.

O plasma sobrenadante dos quatro tubos era aspirado e transferido para um tubo cônico graduado, siliconizado e esterilizado do mesmo modo que os tubos destinados à coleta de sangue. A esse plasma acrescentava-se solução fisiológica de Hanks contendo hidrolisado de lactalbumina e antibióticos, na proporção de 6 volumes dessa solução para 4 volumes de plasma.

Dependendo da quantidade de plasma obtido, tinha-se material suficiente para a distribuição da suspensão de leucócitos em 5 ou 6 tubos de Leighton, munidos cada qual, de uma lâmina 10x32 mm, na qual se havia inoculado previamente uma suspensão de bacilos de lepra (vide II.2.3).

Os tubos de Leighton eram incubados a 37°C, tendo-se o cuidado de mantê-los inclinados em ângulo de 5° a 10°. No 4º dia de incubação, acrescentava-se a cada tubo 1 ml de meio nutritivo de Mellnick e só a partir do 7º dia o meio das culturas passava a ser trocado duas vezes por semana. Nessas trocas, utilizou-se sempre o meio nutritivo de Mellnick com 40% de soro fetal bovino.

A fim de acompanhar o processo de fagocitose e de lise dos bacilos inoculados pelos macrófagos obtidos por diferenciação in vitro, retirava-se de 5 em 5 dias, uma la-

mínula de cada lote de tubos de Leighton.

A fixação do material das lamínulas dos tubos de Leighton foi feita mergulhando cada uma delas durante 5 minutos em metanol contido em um vidro de relógio. Após esse tempo, as lamínulas eram retiradas e mantidas em posição vertical sobre papel de filtro, a fim de que o excesso de metanol escorresse.

A coloração para pesquisa de bacilos a.a.r. foi feita mergulhando cada lamínula durante 20 minutos em um vidro de relógio contendo fucsina de Ziehl (10 g de fucsina básica, 100 ml de álcool a 95%, 50 g de fenol e água destilada q.s.p. 1000 ml). Após lavagem rápida em álcool clorídrico a 1% (1 ml de HCl concentrado em 99 ml de álcool a 95%), as lamínulas eram passadas em 3 banhos sucessivos de água, de 1 minuto cada.

A coloração dos elementos celulares era feita mergulhando cada lamínula em uma solução aquosa de azul de metileno a 0,5% durante alguns segundos, após os quais, as lamínulas eram lavadas em água corrente e secas ao ar ou em estufa a 37°C.

A montagem foi sempre feita em bálsamo após um minuto de diafanização em xilol.

Três graus de bacterioscopia foram propostos para quantificar o comportamento dos macrófagos in vitro face o M.leprae. Os critérios estabelecidos para a atribuição destes graus basearam-se, principalmente, na diminuição dos bacilos no inóculo, como uma avaliação indireta da intensidade de fagocitose e de atividade lisogênica dos macrófagos. Tais critérios são os seguintes:

Grau 0 - Bacilos extracelulares ausentes ou encontrados muito raramente. Macrófagos representados por células semelhantes a histiócitos, mas cuja frequência pode decrescer consideravelmente após longo período de incubação. Células consideradas como epitelióides, por causa de

seu citoplasma homogêneo ou finamente granulado mas de contorno nítido, encontradas com frequência. Macrófagos contendo bacilos não lisados, raros ou frequentes. Evidências de lise presentes ou já desaparecidas. Células degeneradas contendo bacilos não lisados, geralmente, ausentes.

Grau 1 - Redução variável da concentração de bacilos no inóculo. Macrófagos representados por células semelhantes a histiócitos ou gigantócitos, cuja frequência pode decrescer consideravelmente após longo tempo de incubação. Células "epitelióides" encontradas frequentemente. Macrófagos contendo bacilos fagocitados e não lisados podem ser raros ou frequentes, mas os sinais de atividade lisogênica são claramente observados, dentro dos macrófagos. Massas necróticas contendo bacilos não lisados podem, ou não, estar presentes.

Grau 2 - Concentração de bacilos no inóculo praticamente inalterada. Os macrófagos mostram, geralmente, um tactismo muito discreto com relação aos bacilos e são geralmente semelhantes a histiócitos. Os gigantócitos, quando presentes, são muito raros. Os macrófagos que circundam o inóculo podem, ou não, conter numerosos bacilos não lisados e os sinais de atividade lisogênica são frequentemente insignificantes, quando presentes. Massas necróticas contendo bacilos não lisados são encontradas, em geral, após 15 dias de incubação.

Tais graus serviram para o estabelecimento de um

grau bacterioscópico combinado (GBC) que corresponde aos resultados observados nos dois últimos intervalos de incubação (20º e 25º dias). Isso porque tais valores tomados em conjunto pareceram refletir muito bem o comportamento dos macrófagos, no que se refere ao seu tactismo positivo pelos bacilos de lepra do inóculo, bem como à sua fagocitose e atividade de lise, mesmo nos períodos iniciais de incubação.

III - RESULTADOS

Os graus bacterioscòpicos combinados (GBC) atribuídos aos doentes de lepra estudados estão distribuídos segundo a forma clínica, grupo racial, sexo, idade, anos de observação clínica e reação de Mitsuda na Tabela 1.

A Tabela 2 expressa os resultados verificados nas amostras de indivíduos sadios, não-comunicantes de doentes de lepra, de acordo com o sexo, idade, reação de Mitsuda e o grau bacterioscòpico combinado (GBC) atribuído a cada indivíduo, enquanto a Tabela 3 apresenta a distribuição dos sadios comunicantes de doentes de lepra de acordo com o sexo, idade, forma clínica da doença do cônjuge afetado, tempo de coabitação após o aparecimento da doença, reação de Mitsuda e o grau bacterioscòpico combinado.

A Tabela 4, por sua vez, mostra a distribuição dos graus bacterioscòpicos médios verificados nos 111 indivíduos estudados durante os 25 dias de incubação, segundo o grau bacterioscòpico combinado, em intervalos de 5 dias.

A Tabela 5 apresenta de modo sumário a distribuição de doentes de lepra e de indivíduos sadios, segundo os diferentes GBC apresentados.

Em face do exposto no capítulo anterior a respeito dos diferentes graus de bacterioscopia, os resultados apresentados nas Tabelas 1 a 5, parecem ser suficientes para permitir a sua discussão no capítulo seguinte. Entretanto, a apresentação de alguns detalhes observados durante a leitura das lâminas, talvez tenha alguma pertinência no presente capítulo.

Tab. 1 - Distribuição dos doentes de lepra segundo sua forma clínica (L-lepromatoso, T-tuberculóide, D-dimorfo, I-indeterminado, NL-não doente de lepra), grupo racial (C-caucasóide, N-negróide, M-mongolóide), sexo, idade, anos de observação clínica, reação de Mitsuda (RM) e grau bacterioscópico combinado (GBC) verificado no teste in vitro.

CASO	FORMA CLÍNICA	GRUPO RACIAL	SEXO	IDADE	ANOS SOB OBSERVAÇÃO	RM	GBC
1. N.F.	L	C	M	51	1	-	2-2
2. K.F.P.	L	C	M	18	1	-	2-2
3. F.F.S.	L	C	M	45	15	-	2-2
4. A.T.	L	C	M	52	1	-	2-2
5. F.M.F.	L	M	M	39	4	-	2-2
6. N.M.	L	C	M	29	1	-(*)	2-2
7. A.H.C.	L	C	M	51	1	-	2-2
8. J.C.	L	C	M	27	1	-(*)	2-2
9. J.A.A.	L	C	M	34	1	-	2-2
10. A.P.S.	L	C	M	26	1	-	2-2
11. A.L.B.	T	C	F	62	7	++	0-0
12. B.S.	T	M	M	54	7	+(*)	0-0
13. A.C.	T	C	M	64	30	+++	0-0
14. J.H.O.	T	C	M	41	8	+++	0-0
15. A.A.P.	T	C	F	48	13	+++(*)	0-0
16. K.L.	T	C	M	15	1	++(*)	0-0
17. L.C.R.	T	C	M	16	1	+++(*)	0-0
18. J.H.S.	T	M	M	15	1	++(*)	0-0
19. V.A.S.	T	M	F	32	3	+(*)	0-0
20. G.B.	T	C	M	76	20	+++	0-0
21. J.D.R.	D	C	M	49	6	±	1-0
22. V.L.R.	D	C	F	18	1	-	1-0
23. P.H.	D	C	M	58	3	-	1-0
24. M.Y.	D	M	M	43	15	+(*)	1-0
25. J.O.C.	D	C	M	39	10	+(*)	1-0
26. R.C.	D	C	M	73	2	±	1-0
27. J.F.	D	C	M	41	1	-	0-0
28. J.H.	D	C	M	53	2	+(*)	1-0
29. D.V.L.F.	D	C	M	51	1	+(*)	1-0
30. H.F.G.	D	M	F	60	3	++(*)	1-0
31. B.J.	I	M	M	50	1	?	0-0
32. F.F.	I	M	M	51	1	++	0-0
33. J.C.B.	I	C	M	60	10	++	0-0
34. A.E.L.	I	C	M	52	5	?	2-2
35. E.C.S.	I	C	F	43	17	++	0-0
36. A.C.I.	I	C	M	27	4	-	1-0
37. A.M.	I	C	M	49	1	?	0-0
38. H.R.	I	C	M	57	1	+	1-1
39. F.D.B.	I	C	M	73	1	?	1-1
40. H.G.	I	C	M	70	1	++	1-0
41. E.A.	I	C	F	37	8	++(*)	0-0
42. A.C.	I	C	M	64	4	-	1-0
43. J.B.P.	I	C	M	67	23	+++	1-0
44. F.L.	I	C	M	52	9	?	1-0
45. A.G.	I	C	M	57	20	-	0-0
46. C.S.	I	M	M	50	7	?	0-0
47. A.C.B.	I	C	F	79	35	-	1-1
48. J.E.G.	L ou T	M	M	45	1	+(*)	0-0
49. A.P.B.	T ou D	C	F	27	2	+++	1-0
50. S.E.A.	T ou D	M	M	22	2	+(*)	0-0
51. E.F.	T ou D	M	M	40	5	+(*)	1-0
52. H.J.R.	T ou D	M	M	32	8	+(*)	0-0
53. A.G.O.	T ou D	M	M	51	9	+(*)	0-0
54. W.R.	T ou NL	M	M	32	2	+++(*)	0-0

* Reação de Mitsuda comprovada histologicamente.

Tab. 2 - Distribuição da amostra de indivíduos sadios não-comunicantes de doentes de lepra, segundo o sexo, idade, a reação de Mitsuda (RM) e o grau bacterioscópico combinado (GBC) observado nas reações in vitro.

NÃO-COMUNICANTES	SEXO	IDADE	RM	GBC
1. A.C.S.	M	25	+++	1-1
2. A.B.N.	M	23	+	1-1
3. C.M.	M	22	+	2-2
4. C.M.M.	F	21	+	2-1
5. C.L.C.V.	M	22	+++	1-1
6. D.J.S.	M	26	+++	2-2
7. D.A.	F	25	+++	1-0
8. E.F.	M	24	-	2-2
9. F.C.A.	M	24	+	1-1
10. F.S.F.	M	25	+	1-1
11. G.M.W.	M	23	+	2-2
12. H.C.S.	M	25	+++	1-0
13. H.O.S.	M	21	+	1-0
14. I.S.	F	24	+	2-2
15. J.B.L.	M	25	++	1-1
16. J.P.M.	M	22	+	1-1
17. N.S.	M	24	+	2-2
18. J.M.S.	F	22	+	1-1
19. L.G.F.	M	23	+++	2-2
20. M.A.B.P.	F	23	+	2-2
21. M.A.F.M.	F	23	-	1-1
22. J.A.F.M.	M	27	++	2-2
23. M.B.V.P.	F	21	+	1-1
24. P.M.H.	M	23	+++	2-2
25. P.C.T.	M	21	-	1-1
26. S.B.	F	22	+	1-1
27. S.P.	M	21	+	1-1
28. W.R.P.	M	20	-	2-2
29. R.P.	F	37	+++	1-1
30. A.M.C.	M	25	+++	1-1
31. R.O.	M	29	+++	1-1
32. A.M.C.	M	31	++	1-1
33. P.C.C.	M	29	++	2-2
34. W.P.J.	M	27	+++	1-0
35. P.L.G.	M	24	+++	1-0
36. A.C.C.	M	20	++	1-1
37. F.A.	M	30	++	2-1
38. B.B.	M	39	+++	1-0
39. E.M.C.	F	20	+	1-1
40. C.A.M.	M	25	+	1-1

Tab. 3 - Distribuição da amostra de comunicantes sadios de doentes de lepra segundo o sexo, idade, forma de lepra do cônjuge doente, anos de cohabitação depois do início da doença no foco, reação de Mitsuda (RM) e o grau bacterioscópico combinado (GBC) da reação in vitro. (L-lepromatoso; TR-tuberculóide reacional).

COMUNICANTE	SEXO	IDADE	CÔNJUGE	COHABITAÇÃO	RM	GBC
1. M.S.	F	56	L	11	+++	1-0
2. C.G.B.	F	51	L	9	++	1-1
3. M.A.S.	F	34	L	7	+++	1-0
4. A.F.	M	49	L	17	++	1-1
5. B.J.	F	73	L	18	++	2-2
6. J.L.A.	M	46	L	8	++	2-1
7. O.M.	F	33	L	12	++	1-0
8. A.J.	M	65	L	5	+	2-2
9. A.L.	F	72	L	15	+++	1-0
10. B.L.B	F	35	L	5	+++	1-1
11. C.B.C.	F	24	L	4	+++	1-1
12. F.P.N.	M	59	TR	11	++	1-0
13. B.B.C.	F	63	L	24	++	1-0
14. M.A.G.B.	F	26	TR	5	++	1-1
15. J.C.B.	M	27	TR	3	++	1-0
16. J.B.A.D.	M	32	L	7	+++	1-1
17. M.P.A.	F	29	L	2	++	2-2

Tab. 4 - Distribuição dos graus bacterioscópicos médios durante 25 dias de incubação, segundo o grau bacterioscópico combinado (GBC) apresentado.

GBC	Nº	TEMPO DE INCUBAÇÃO (DIAS)				
		5	10	15	20	25
0-0	24	1.42	0.91	0.60	0	0
1-0	29	1.69	1.41	1.24	1	0
1-1	29	1.97	1.62	1.28	1	1
2-1	3	2	2	2	2	1
2-2	26	2	2	2	2	2

Tab. 5 - Distribuição das amostras de doentes de lepra e de sadios, segundo o grau bacterioscópico combinado.

AMOSTRA	Nº	0-0	1-0	1-1	2-1	2-2
Lepromatosa	10	-	-	-	-	10
Tuberculóide	10	10	10	-	-	-
Dimorfa	10	1	9	-	-	-
Indeterminada	17	8	5	3	-	1
Classificação incerta	7	5	2	-	-	-
Não-comunicantes	40	-	6	20	2	12
Comunicantes	17	-	7	6	1	3
Total	111	24	29	29	3	26

As lâminas que aparecem na Fig. 2 mostram os diferentes tipos de respostas que puderam ser observados macroscopicamente na área do inóculo, após a incubação das lâminulas contendo macrófagos do sangue de pacientes tuberculóides, lepromatosos, dimorfos e de indivíduos sadios. Tal fotografia foi feita com a finalidade de ressaltar que entre os doentes tuberculóides e dimorfos (lâminas 1 e 2) a região correspondente ao inóculo já pôde ser facilmente reconhecida, mesmo macroscopicamente, após 5 a 10 dias de incubação, devido à maior concentração celular nessa área. Aliás, nos casos tuberculóides e dimorfos estudados o tactismo positivo dos macrófagos pelos bacilos já era evidente após 24 horas de incubação. Em oposição, nas culturas de lepromatosos, com 5 dias de incubação o tactismo dos macrófagos, se presente, era, contudo, muito discreto, somente se tornando comparável ao dos dimorfos e tuberculóides, ao redor do 15º dia de incubação (lâminas 3 e 4).

Um tactismo dos macrófagos pelo inóculo bacilar semelhante ao dos tuberculóides e dimorfos foi observado na maioria dos pacientes com lepra indeterminada, se bem que

alguns casos indeterminados, mostraram macrófagos com um comportamento semelhante ao dos lepromatosos, nos períodos iniciais de incubação (5 a 10 dias).

Nas preparações de macrófagos obtidos do sangue de indivíduos sadios, os elementos celulares mostraram uma acentuada tendência a aderir às regiões da lamínula que não tomaram contato com a suspensão bacilar. Entretanto, na parte mais central do inóculo, região na qual se fixam os bacilos, observou-se maior frequência de elementos celulares (lâminas 5 e 6).

A partir do 15º dia de incubação foram encontrados, nas culturas de lepromatosos, elementos celulares em degeneração, com frequência aumentada a partir do 20º dia. Tais células apresentavam citoplasma esgarçado, com bacilos não lisados em seu interior e com núcleo picnótico em frequência variável (Fig.3). Embora as preparações feitas a partir de material de pacientes dimorfos também apresentassem degeneração celular, esta foi menos intensa do que a observada no material de lepromatosos. Além disso, no caso dos doentes dimorfos, a área de degeneração restringiu-se ao inóculo. A comparação das lâminas 2 e 7 da Fig.2, de um paciente dimorfo, permite verificar a diminuição da concentração celular na área do inóculo, a qual se deu no intervalo entre o 15º e o 10º dia de incubação, em consequência da degeneração celular ocorrida durante esse período.

Outra observação digna de nota foi a ocorrência de vacuolação citoplásmica intensa nos elementos celulares das culturas de tuberculóides, dimorfos, indeterminados e de alguns sadios, sendo mais acentuada entre os primeiros (Fig. 4). Tal vacuolação diminuiu em intensidade, com o progredir da incubação, terminando ao redor do 20º dia, quando os núcleos de algumas dessas células se tornavam picnóticos, sucedendo-se a degeneração celular e, às vezes, a formação de massas necróticas. Convém ressaltar, entretanto, que com exceção dos dimorfos, não foram encontrados bacilos nas massas necróticas de outros casos em que ocorreu vacuolação do citoplasma dos macrófagos.

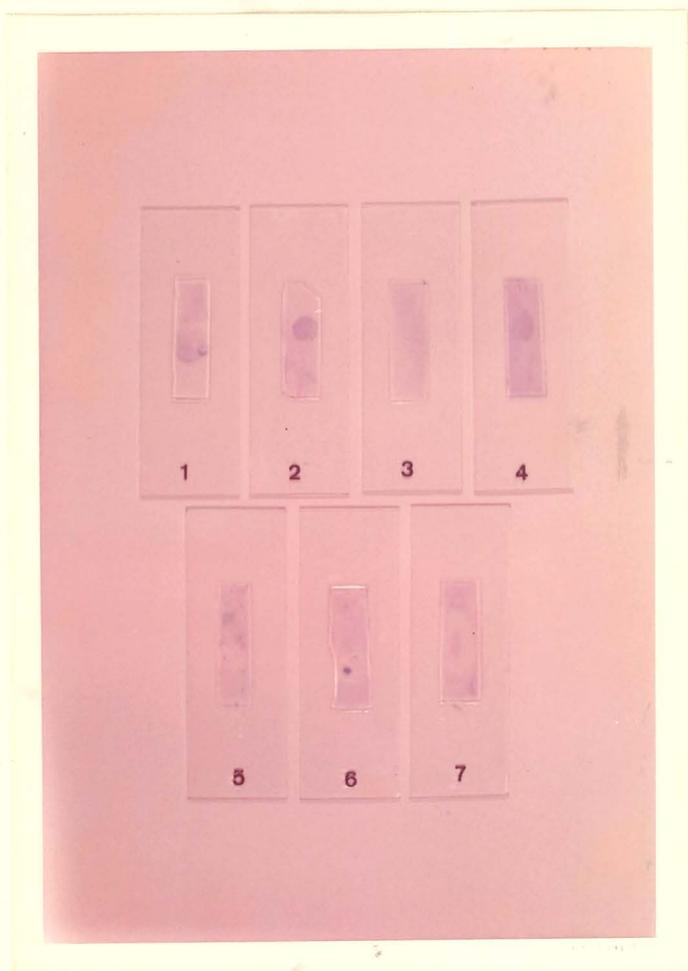


Fig.2 - Aspecto macroscópico das preparações obtidas das culturas de indivíduos com lepra tuberculóide, dimorfa, lepromatosa e de indivíduos sadios não-comunicantes de doentes de lepra.

- Lam. 1 - Tuberculóide (5º dia de incubação)
- Lam. 2 - Dimorfo (10º dia de incubação)
- Lam. 3 - Lepromatoso (5º dia de incubação)
- Lam. 4 - Lepromatoso (15º dia de incubação)
- Lam. 5 - Sadio (10º dia de incubação)
- Lam. 6 - Sadio (10º dia de incubação)
- Lam. 7 - Dimorfo (15º dia de incubação).

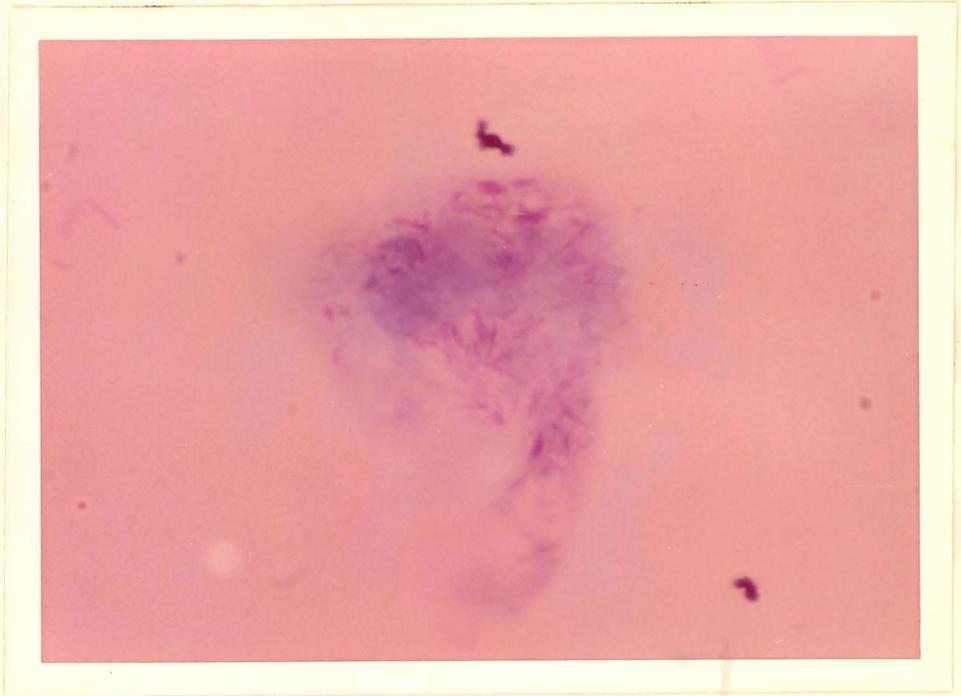


Fig.3 - Aspecto de uma célula em degeneração, fotografada com filme Kodak-color 35 mm, na preparação obtida da cultura de um lepromatoso, após 20 dias de incubação. Aumento: 884x.

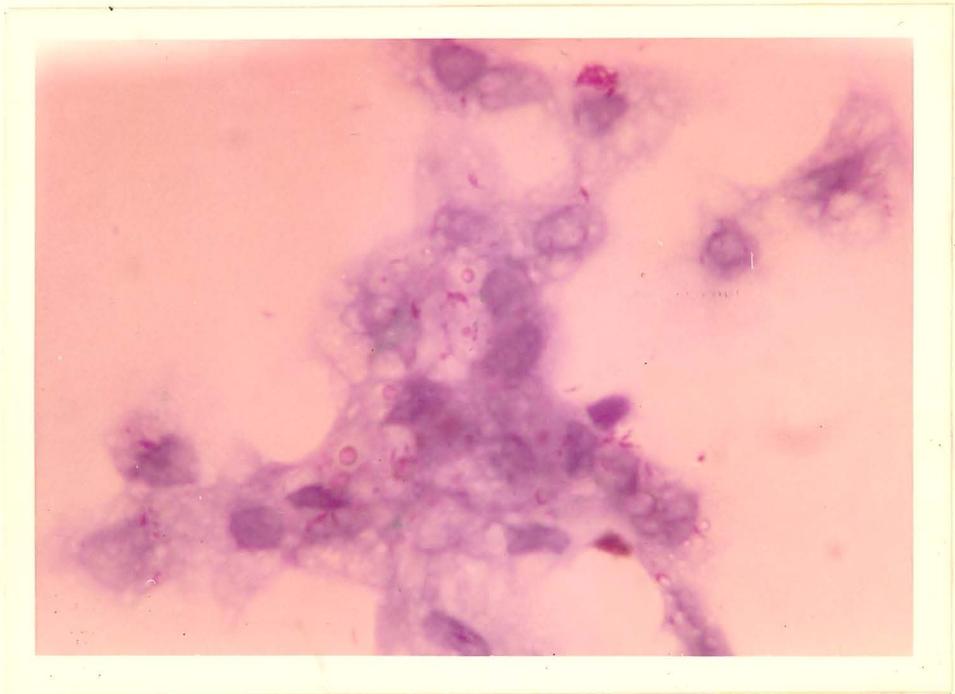


Fig.4 - Aspecto de uma cultura de um paciente com lepra tuberculóide, após 5 dias de incubação, mostrando intensa vacuolação citoplásmica dos elementos celulares. Fotografia obtida com filme Fuji-color - 35 mm. Aumento: 696x.

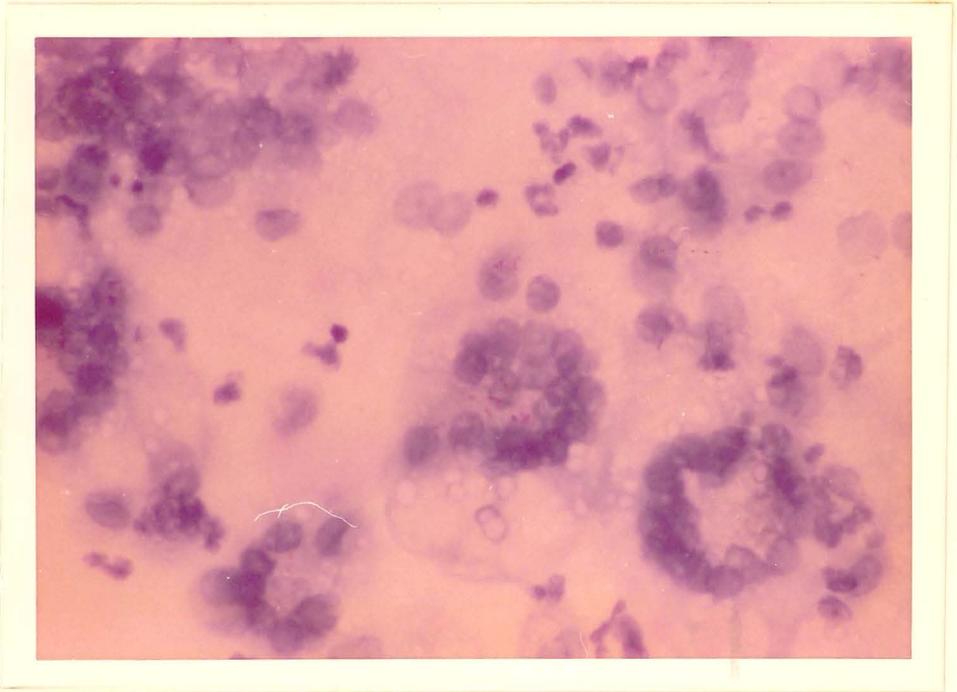


Fig.5 - Aspecto geral da preparação obtida da cultura de um paciente com lepra tuberculóide, após 5 dias de incubação, observando-se células multinucleadas (tipo Langhans). Foto obtida com filme Kodak-color 35 mm. Aumento 548x.

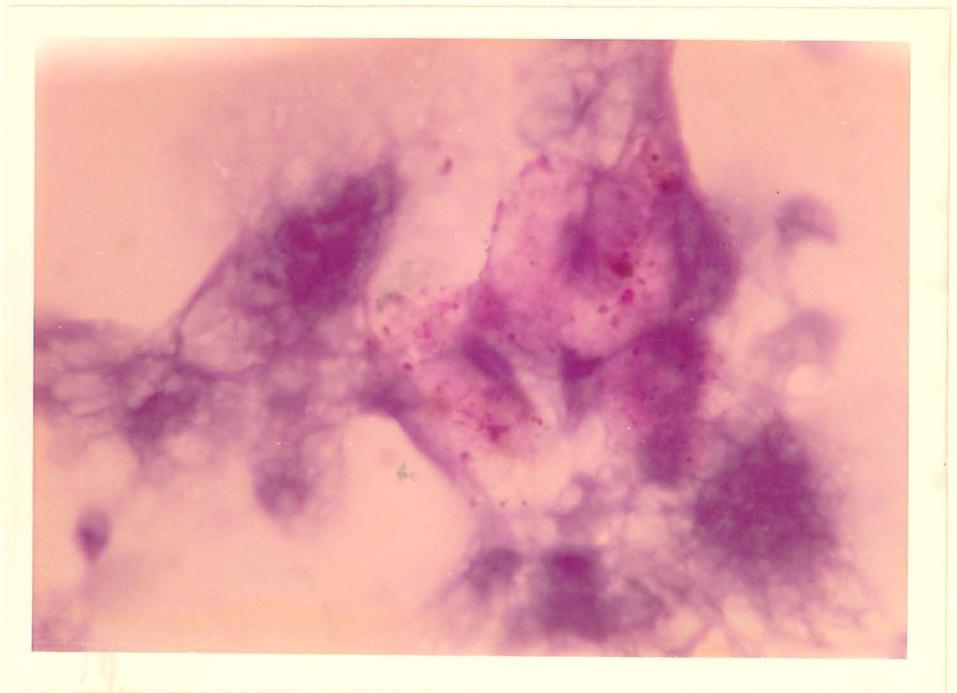


Fig.6 - Aspecto da preparação obtida da cultura de um tuberculóide, após 10 dias de incubação, vendo-se grandes vacúolos contendo restos bacilares. Foto obtida com filme Fuji-color 35 mm. Aumento 884x.

92/105

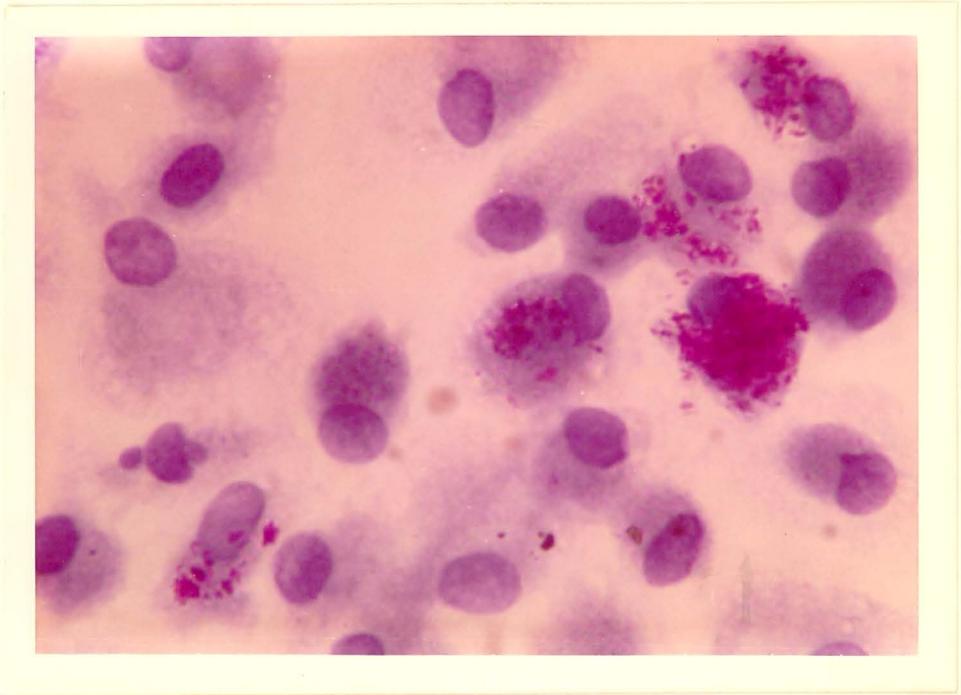


Fig.7 - Aspecto geral de uma cultura de indivíduo lepromatoso, após 20 dias de incubação, onde se vêem macrófagos isolados contendo bacilos intracitoplasmáticos. Foto obtida com filme Fuji-color 35 mm. Aumento: 884x.

IV - DISCUSSÃO

Antes de discutir as investigações que foram objeto do presente trabalho, torna-se importante argumentar a respeito da validade da escolha do grau bacterioscópico combinado (GBC) como indicador da capacidade dos macrófagos em lisar in vitro os bacilos de lepra mortos. Assim, de acordo com os dados apresentados na Tabela 4, verificou-se que os indivíduos com baciloscopia 0 no 20º dia, ou seja com GBC 0-0, foram os que mostraram macrófagos com atividade fagocítica e lisogênica mais alta em todos os intervalos de incubação. Uma intensidade menor dessas atividades foi observada nos indivíduos cujos macrófagos apresentaram um comportamento correspondente ao valor 1 e 0 nos 20º e 25º dias de incubação, ou seja GBC 1-0. Finalmente, as mais baixas intensidades de fagocitose e lise bacilar, corresponderam às culturas com GBC 1-1, 2-1 e 2-2.

Como se pode verificar pelos resultados evidenciados pelo GBC, a técnica escolhida ofereceu vantagens em relação às outras técnicas. De fato, a suspensão bacilar que por evaporação do clorofórmio passou a ser um ponto de referência fixo na lamínula, de fácil localização, permitiu acompanhar a evolução do comportamento dos macrófagos face o M. leprae. Em consequência, as relações macrófago-bacilos, no que se refere a tactismo e intensidade de fagocitose e lise, puderam ser mais precisamente avaliadas do que nas técnicas que utilizam bacilos em suspensão. Também em consequência da técnica utilizada, evitaram-se as situações de dúvidas na interpretação da leitura das lâminas, visto que a observação constante do inóculo bacilar eliminava as suspeitas, seja de remoção de bacilos durante as trocas de meio, seja de inoculação deficiente de M. leprae.

Por outro lado, se os graus baciloscópicos con-

siderados isoladamente, admitem um certo grau de variação na intensidade de fagocitose e lise bacilar, a combinação das leituras dos dois últimos intervalos de incubação, permitiu, como foi visto acima, definir melhor as classes de comportamento que foram encontradas.

IV.1 - CASOS LEPROMATOSOS E TUBERCULÓIDES

Quando os pacientes lepromatosos e tuberculóides são comparados no que se refere à evolução das culturas durante o período de incubação de 25 dias, algumas diferenças podem ser constatadas, a par da diferente capacidade de lise bacilar.

Assim, nas culturas provenientes de pacientes tuberculóides, o tactismo dos macrófagos pelos bacilos parece iniciar-se mais cedo. Além disso, com o progredir da incubação, ele se torna mais evidente, pela permanência dos elementos celulares dentro da área do inóculo. Tal tactismo só se observa nas culturas de lepromatosos a partir do 15º dia de incubação e só é evidenciado através da presença de elementos celulares, contendo bacilos fagocitados, em áreas afastadas do inóculo.

A menor intensidade da fagocitose observada nos lepromatosos, poderia decorrer da incapacidade de seus macrófagos em permanecerem preferencialmente dentro da área do inóculo, como acontece com os dos tuberculóides. Esta hipótese, contudo, não exclui a possibilidade da falta de algum fator, cuja atividade biológica agisse no sentido de manter os macrófagos dentro da área do inóculo, estimulando a sua capacidade fagocítica face os bacilos de lepra.

Além desse aspecto relativo ao tactismo dos macrófagos, foi bastante notável, nas culturas de lepromatosos, a degeneração de elementos celulares contendo bacilos fagocitados e não lisados. Raras vezes foram observados em culturas de tuberculóides, gigantócitos e macrófagos constituindo massas necróticas e nesses casos não foram observados bacilos e/ou fragmentos bacilares em seu interior.

Tal tipo de degeneração celular encontrada nos lepromatosos também foi observada por HANKS (1947c) em culturas de fibroblastos obtidos de lepromas.

No que se refere à atividade lisogênica dos macrófagos, os dados concernentes aos pacientes com os tipos polares da doença (Tabelas 1 e 5) foram compatíveis com a fisiopatologia dessas formas clínicas. Assim, os indivíduos lepromatosos que, geralmente, não mostram resistência tecidual ao M. leprae, constituíram um grupo homogêneo quanto à incapacidade de lise face os bacilos fagocitados in vitro. Seus macrófagos mostraram um comportamento correspondente ao valor 2 em todos os intervalos de incubação (GBC 2-2).

Ao contrário, todos os pacientes tuberculóides, que apresentam maior resistência tecidual à presença e multiplicação dos bacilos de lepra, mostraram um GBC 0-0 (Tabelas 1 e 5).

Esse comportamento in vitro dos macrófagos derivados do sangue de lepromatosos e de tuberculóides, está em perfeito acordo com os fatos bem conhecidos a respeito da resposta dos macrófagos da pele desses pacientes, frente aos bacilos de lepra mortos contidos na lepromina. Realmente, analisando em conjunto os dados de BECHELLI et al. (1959) e AZULAY et al. (1962) verifica-se que dentre as 30 biópsias de reações Mitsuda-negativas de casos lepromatosos estudadas por esses autores, em 29, isto é, em 96,7% foi constatado um infiltrado com histiócitos ricos em bacilos fagocitados e não lisados, ou seja, uma reação histologicamente negativa. Por outro lado, dentre 55 biópsias de reações de Mitsuda fortemente positivas (35 ++ e 20 +++), obtidas em casos com lepra tuberculóide, somente duas mostraram-se histologicamente negativas (ambas ++) sendo as restantes classificadas como positivas (BECHELLI et al., 1959). Dentre estas, parte apresentava um infiltrado granulomatoso composto principalmente por células epitelióides assumindo estrutura tuberculóide típica, enquanto outras, mostravam células epitelióides distribuídas frouxamente. Nes-

tas últimas, os gigantócitos foram observados muito raramente, mas em ambas as situações os bacilos a.a.r. estavam ausentes ou eram muito raros.

Se as observações de AZULAY et al. (1960) e de ANDRADE (1962) sobre mais quatro casos, também forem levadas em consideração, a frequência de positividade histológica, nos casos tuberculóides com reação de Mitsuda fortemente positiva será de 96,6%.

Em pacientes com reações de Mitsuda fracamente positivas, a frequência de positividade histológica é mais baixa e pode ser considerada como sendo de 64,7% se reunirmos os dados de BECHELLI et al. (1959) sobre 30 tuberculóides, os de AZULAY et al. (1960) e ANDRADE (1962) sobre mais quatro casos.

Considerando tais proporções como estimativas da probabilidade de a leitura macroscópica da reação de Mitsuda ter correspondência histológica, tem-se que uma amostra de 10 casos lepromatosos Mitsuda-negativo deveria conter 9,67 indivíduos com macrófagos incapazes de lisar o bacilo de lepra morto. Em 10 casos tuberculóides, com a intensidade da reação de Mitsuda distribuída com na presente amostra, o número teoricamente esperado de indivíduos com macrófagos capazes de fagocitar e destruir o M.leprae morto seria 9,02.

Entretanto, na amostra analisada no presente trabalho, esses números teóricos são mais altos. Assim, o número esperado de lepromino-reações tardias histologicamente negativas, nos lepromatosos, é de 9,74, visto que, dois dentre os 10 casos foram examinados histologicamente (casos nº 6 e 8).

No que concerne aos casos tuberculóides, observou-se positividade histológica em biópsias de duas reações Mitsuda-positivas +, (casos nº 12 e 19), duas positivas ++ (casos nº 16 e 18), bem como em duas reações positivas +++ (casos nº 15 e 17) não tendo sido os quatro casos restantes de reações positivas +++ examinados histologicamente (Tabe-

la 1). Dessa forma, esperam-se 10 indivíduos com reações histologicamente positivas.

Pode-se dizer, portanto, que os macrófagos derivados do sangue de pacientes com as formas polares de lepra, reproduzem in vitro a reação que os macrófagos da pele daqueles indivíduos apresentam in vivo, quando em presença dos bacilos de lepra contidos na lepromina.

Além disso, no que concerne aos pacientes lepromatosos e tuberculóides, parece existir uma concordância completa entre a reação in vitro e a resposta tardia à lepromina, seja clínica ou histologicamente analisada.

Os dados referentes ao teste in vitro também estão de acordo com os trabalhos de outros autores (TREQ & SILVA, 1963; BEIGUELMAN & BARBIERI, 1965; BEIGUELMAN, 1968; BARBIERI & CORREA, 1967) que afirmam serem os macrófagos derivados do sangue de lepromatosos incapazes de destruir o M.leprae fagocitado in vitro, e os de pacientes tuberculóides, capazes de fagocitar e lisar os bacilos de lepra, quando sob as mesmas condições.

Tais resultados discordam dos obtidos por GODAL & REES (1970), os quais compararam a capacidade fagocítica e lisogênica in vitro dos macrófagos derivados do sangue de 5 lepromatosos e de 5 tuberculóides, não assinalando diferenças entre os dois tipos polares de lepra. Sugeriram, por isso, que a discordância de seus resultados com os de outros autores (TREQ & SILVA, 1963; BEIGUELMAN & BARBIERI, 1965; BEIGUELMAN, 1968; BARBIERI & CORREA, 1967) poderia ser consequência de uma variabilidade racial da amostra. Entretanto, essa hipótese não é aceitável visto que, no presente trabalho, as amostras de pacientes lepromatosos e tuberculóides incluíram indivíduos de diferentes grupos raciais.

Conquanto pareça plausível supor a interferência de variações técnicas nas causas de discordância dos resultados de GODAL & REES (1970) é importante lembrar que a concordância de nossos resultados com os de outros

autores existiu apesar das diferentes técnicas adotadas , seja na inoculação dos bacilos em cultura, seja na obtenção dos macrófagos.

IV.2 - CASOS DIMORFOS

Os macrófagos dos pacientes dimorfos foram capazes de lisar os bacilos de lepra fagocitados in vitro, embora com intensidade menor do que os de casos tuberculóides. Com exceção do caso nº 27 que mostrou um GBC 0-0, os outros 9 casos apresentaram GBC 1-0 (Tabelas 1 e 5). No que concerne ao caso nº 27 dever-se-ia indagar se a intensidade de fagocitose e de lise face o M.leprae, poderia ter sido influenciada pela corticoterapia à época da coleta de sangue, bem como, pelo surto reacional que manifestava naquela ocasião.

A menor intensidade de fagocitose e de lise bacilar apresentada pelos dimorfos, quando comparados aos tuberculóides, encontra um paralelismo nos dados clínicos, uma vez que alguns pacientes dimorfos podem ser confundidos com pacientes tuberculóides em surto reacional.

No que concerne ao aspecto evolutivo das culturas, os pacientes dimorfos mostraram pontos de contato com os lepromatosos e tuberculóides. Assim, o tactismo positivo apresentado pelos macrófagos, nestes casos, foi semelhante ao observado nos tuberculóides. Os elementos celulares presentes, bem como a frequência com que foram encontrados, também se assemelham àqueles das culturas de tuberculóides. Entretanto, nas culturas de dimorfos houve ocorrência de degeneração celular que, embora com menor intensidade e restrita à área do inóculo, foi semelhante à constatada nas culturas de lepromatosos.

Quanto à correspondência entre os resultados do teste in vitro e a leitura clínica da reação de Mitsuda, nenhuma associação pôde ser encontrada nos dimorfos. A Tabela 1 mostra que, apesar de a reação de Mitsuda incluir três respostas negativas, duas duvidosas, quatro

fracamente positivas e uma fortemente positiva (++) ao teste lepromínico, os dimorfos constituíram um grupo praticamente homogêneo, quanto ao comportamento dos macrófagos in vitro, face os bacilos de lepra.

No que se refere à possibilidade de associação entre a reação in vitro e a resposta histológica à injeção de lepromina, deve ser ressaltado que as biópsias das cinco reações clinicamente positivas, foram também histologicamente positivas, isto é, mostraram macrófagos capazes de fagocitar e lisar os bacilos contidos na lepromina. Infelizmente, os dados sobre a histopatologia das reações de Mitsuda clinicamente negativas em dimorfos, parecem ser quase inexistentes na literatura pertinente.

Quanto às reações in vitro, nossas observações estão em desacordo com as de TREO & SILVA (1963). Estes autores encontraram, em dois casos dimorfos analisados, um comportamento semelhante ao por eles observado entre lepromatosos. Convém lembrar, entretanto, que os dimorfos podem mostrar oscilações grandes, mesmo com respeito ao teste lepromínico, pois em 39 pacientes dimorfos, estudados por ALONSO (1966), 7 mostraram, em intervalo de tempo relativamente curto, lepromino-reações tardias, ora fortemente positivas, ora negativas.

IV.3 - CASOS INDETERMINADOS

Os 17 casos indeterminados não se comportaram de forma homogênea quanto à reação in vitro (Tabelas 1e5). Os macrófagos de oito casos indeterminados mostraram um GBC 0-0 (casos nº 31, 32, 35, 37, 41, 45 e 46) comportando-se como os de pacientes tuberculóides, cinco como os de dimorfos, pois apresentaram GBC 1-0 (nº 36, 40, 42, 43 e 44) e os restantes mostraram GBC 1-1 (nº 38, 39 e 47) ou GBC 2-2 (nº 34). Tal observação concorda com o fato já estabelecido de que este grupo é heterogêneo e constituído por indivíduos que podem evoluir para outras formas clínicas de lepra.

Se reunirmos em um único grupo os pacientes com GBC 1-1 e 2-2, tomando em consideração a sua menor intensidade de fagocitose e lise bacilar, a amostra presente poderia ser encarada como exibindo três classes de reações.

TREO & SILVA (1963), entretanto, observaram somente duas classes extremas de respostas, ou seja, a classe tuberculóide, comparável a de GBC 0-0, e a classe lepromatosa, comparável à GBC 2-2 ou 1-1, quando estudaram o comportamento in vitro dos macrófagos de sete pacientes in determinados.

Reunindo os dados de BECHELLI et al. (1959) sobre 82 pacientes aos 23 casos analisados por AZULAY (1960) e ANDRADE (1962) verifica-se que a frequência de positividade histológica, entre reações clinicamente negativas e duvidosas ao teste lepromínico, é de 38,1%; entre as reações fracamente positivas é de 84,6% e entre as fortemente positivas, 84,4% ($\chi^2 = 19,438$; 2 G.L.; $P < 0,001$).

Esses dados evidenciam que, embora existindo uma forte associação entre as leituras clínica e histológica da reação de Mitsuda, em pacientes indeterminados, a frequência de discordância entre elas é apreciável. Parece, portanto, prematuro afirmar, como fizeram TREO & SILVA (1963), que dentre pacientes indeterminados a resposta in vitro e a reação de Mitsuda sejam independentes. Deve ser ressaltado, ainda, que no presente trabalho, não foi encontrado nenhum caso com GBC 2-2 ou 1-1 entre doentes indeterminados com respostas fortemente positivas ao teste lepromínico.

IV.4 - CASOS DE LEPRA DE CLASSIFICAÇÃO INCERTA

Os sete casos de classificação incerta (nº 48, 49, 50, 51, 52, 53 e 54) incluíram um paciente transferido para o Sanatório Aimorés como pertencendo ao tipo lepromatoso (caso nº 48), cinco pacientes que não puderam ser classificados clinicamente, seja como dimorfos, seja como tuberculóides (casos nº 49, 50, 51, 52 e 53) e um paciente com perturbações neurológicas que não afastavam a hipótese

de lepra tuberculóide (caso nº 54).

O caso nº 48, à sua chegada no Sanatório Aimorês, mostrava sinais de uma reação lepromatosa anterior, bem como, uma resposta tardia à lepromina fracamente positiva. No teste in vitro apresentou um GBC 0-0 que poderia ser considerado como favorecendo a hipótese de que tal paciente teria desenvolvido o fenômeno da pseudo-exacerbação, descrito pela primeira vez com inúmeros detalhes por SOUZA-LIMA et al. (1949) e redescrito sob o nome de reação reversa por RIDLEY (1960).

De acordo com SOUZA-LIMA et al. (1949) a pseudo-exacerbação é uma reação aguda que pode ocorrer em pacientes lepromatosos durante o tratamento sulfônico, induzindo a manifestação de lesões com vários graus de semelhança às lesões de casos tuberculóides em reação. Tais lesões podem coexistir com as anteriores e serem transitórias ou de longa duração.

Entre os cinco casos que poderiam ser classificados como tuberculóides ou dimorfos, três exibiram GBC 0-0 (nº 50, 52 e 53) e dois um GBC 1-0 (casos nº 49 e 51). Se excluirmos o caso que, entre os dimorfos, apresentou um comportamento excepcional, ter-se-ia que o GBC 1-0 poderia sugerir a hipótese de atribuição do grupo "dimorfo" aos casos 49 e 51 e do tipo tuberculóide aos demais.

Finalmente, com respeito ao caso nº 54, o GBC 0-0 apresentado poderia favorecer a hipótese de diagnóstico de lepra tuberculóide, pois, como será visto mais adiante, nenhum indivíduo sadio apresentou GBC 0-0.

IV.5 - INDIVÍDUOS SADIOS

Os dados das Tabelas 2, 3 e 5 a respeito de indivíduos sadios, indicam que não existe nenhuma diferença com relação à distribuição dos comunicantes e não-comunicantes de doentes de lepra., No que concerne aos GBC apresentados. Assim, um teste de independência mostrou

um $\chi^2 = 4,565$; 2 G.L.; $0,10 < P < 0,20$ quando ambas as amostras foram comparadas, após reunir em uma só classe as reações 2-1 e 2-2, e um $\chi^2 = 0,806$; 2 G.L.; $0,50 < P < 0,70$ - quando somente os indivíduos fortemente Mitsuda-positivos foram tomados para comparação. Em vista desses resultados, os dados de ambas as amostras foram reunidos e os 57 indivíduos sadios distribuídos da seguinte forma 13(22,8%) com GBC 1-0, 26(45,6%) com GBC 1-1 e 18(31,6%) com GBC 2-1 ou 2-2.

Considerando os 57 indivíduos, no que diz respeito à reação de Mitsuda e ao GBC, verifica-se que dentre 10 Mitsuda-negativos e duvidosos, seis apresentaram GBC 1-1 (60,0%) e quatro (40,0%) GBC 2-2; dentre 12 Mitsuda-positivos(+), um mostrou GBC 1-0(8,33%), seis um GBC 1-1(50,0%) e cinco um GBC 2-2 e 2-1(41,67%);dentre 35 Mitsuda-positivos(++) e (+++), 12 manifestaram um GBC 1-0(34,29%), 14 um GBC 1-1(40,0%) e nove um GBC 2-2 ou 2-1(25,71%). Após reunir os indivíduos com GBC 1-0 e 1-1 em uma classe única, um teste de independência mostrou que não se podia atribuir qualquer associação entre o teste in vitro e a reação de Mitsuda ($\chi^2 = 2,609$; 2 G.L.; $0,20 < P < 0,30$).

Tais dados não confirmam os de BARBIERI & CORREA (1967, 1971) que insistiram em afirmar a existência, em indivíduos sadios, de uma completa associação entre o teste in vitro e o Mitsuda, considerando a atividade de lise como resposta positiva e a incapacidade lisogênica como negativa.

Os resultados que constam das Tabelas 2, 3 e 5 mostram que as reações in vitro manifestadas pelos macrófagos de indivíduos sadios e de pacientes de lepra não são comparáveis. De fato, dentre os primeiros, nenhum indivíduo apresentou GBC 0-0 e somente 13 mostraram um GBC 1-0. Tais resultados, conquanto concordem com os de DELVILLE (1971) que utilizou bacilos vivos, estão novamente em desacordo com os publicados por BARBIERI & CORREA (1967, 1971) que afirmam ter encontrado entre sadios, reações in vitro que reproduzem aquelas exibidas pelos lepromatosos e tuberculóides.

Parece oportuno frisar, com relação aos dados

apresentados por BARBIERI & CORREA (1967), que esses autores não especificaram nem o critério adotado para classificar os indivíduos como Mitsuda-positivo, nem deram informações complementares sobre os indivíduos constituintes da amostra que afirmam ter analisado. Mais ainda, a concordância entre o teste in vitro e a reação de Mitsuda, encontrada por eles é surpreendentemente alta, já que a resposta tardia ao teste lepromínico nem sempre encontra correspondência histológica em se tratando de indivíduos sadios comunicantes de doentes de lepra (BECHELLI et al., 1959).

Além disso, se realmente tal concordância fosse completa, é óbvio não se justificar a substituição de uma técnica tão simples como a da reação de Mitsuda por uma técnica sofisticada como a do teste in vitro, como pretendiam BARBIERI & CORREA (1967).

O baixo grau de atividade lisogênica face o bacilo morto, observado in vitro em macrófagos de indivíduos sadios, parece encontrar um paralelismo in vivo no comportamento dos macrófagos da pele. Os dados de BECHELLI et al. (1959) sugerem que nos indivíduos com reações histologicamente positivas, a frequência de reações tuberculóide-símiles, isto é falando a favor de positividade, mas não francamente positivas é mais alta entre os sadios do que entre os doentes de lepra. Assim, reunindo os dados de BECHELLI et al. (1959) a respeito de casos tuberculóides e indeterminados, verifica-se que dentre os 133 pacientes estudados, 48 (36,1%) mostraram estrutura tuberculóide-símile, enquanto em 48 comunicantes sadios Mitsuda-positivos a proporção de tal estrutura histológica (30 ou 62,5%) foi significativamente mais alta ($\chi^2 = 10,031$; 1 G.L.; $P < 0,001$).

Por outro lado, a observação de que em sadios não-comunicantes de doentes de lepra, a leitura da reação de Mitsuda deve ser feita após um período maior a contar da inoculação (BECHELLI et al., 1963), parece favorecer, também, a hipótese de que a capacidade lisogênica dos macrófagos de indivíduos sadios se expresse com menor intensidade do que a dos pacientes de lepra cujos macrófagos

sejam capazes de destruir o M.leprae morto.

Além disso, se considerarmos isoladamente os comunicantes que apresentam reação de Mitsuda positiva (++) e (+++), verifica-se que as proporções de indivíduos com GBC 2-2 ou 2-1, GBC 1-1 e GBC 1-0 serão respectivamente 18,75% (3), 37,50%(6) e 43,75%(7). Tomando para comparação os dados de BECHELLI et al. (1959) sobre 23 comunicantes, também com reação de Mitsuda positiva (++) e (+++), verifica-se que as leituras histológicas das biópsias de tais lepromino-reações mostram: 13,05%(3) de reações histologicamente negativas, 39,15%(9) de reações falando a favor de positividade e 47,8%(11) de reações positivas.

Na hipótese de que as classes de respostas in vitro, GBC 2-2 ou 2-1, GBC 1-1 e GBC 1-0 sejam comparáveis, respectivamente, às classes de reações histologicamente negativa, falando a favor de positividade e positiva, uma similaridade, entre as duas séries de dados, pode ser verificada ($\chi^2 = 0,211$; 2 G.L.; $0,70 < P < 0,90$).

Assim, os dados sobre os casos de lepra apresentados no presente trabalho permitem considerar a existência de três classes de reações in vitro: reação lítica, que poderia ser indicada por GBC 0-0, reação fracamente lítica, indicada pelo GBC 1-0 e reação não-lítica, que poderia ser representada por um GBC 1-1, 2-1 ou 2-2. Se considerarmos essas três classes, os casos lepromatosos seriam constituídos por indivíduos não-lisadores, os tuberculóides por lisadores e os dimorfos por indivíduos, em geral, fracamente lisadores, enquanto os indeterminados poderiam incluir três classes de reações.

Se, entretanto, a classificação acima fosse estendida aos sadios, a maioria deles (75,60%) deveria ser considerada como não-lisadora (45% com GBC 1-1; 5,3% com GBC 2-1 e 26,3% com GBC 2-2). Ora, tal conclusão dificilmente seria aceita, pois a ausência da capacidade lisogênica dos macrófagos face o M.leprae poderia significar suscetibilidade à lepra lepromatosa. No entanto, é sabido que, mesmo em regiões onde a lepra é altamente endêmica, a fre-

quência de lepromatosos nunca ultrapassa o valor de 1% (DOULL et al., 1942; FONTE, 1967).

Parece, portanto, atraente supor que, entre sadios, o GBC 1-0 indicaria um indivíduo lisador, enquanto os não-lisadores seriam indicados por GBC 2-2 ou 2-1. Entretanto, mesmo levando em conta essa hipótese, a frequência de não-lisadores permanece alta (31,60%). Além disso, não se encontrou no presente trabalho, nenhuma associação entre a intensidade da reação de Mitsuda e a capacidade lisogênica dos macrófagos derivados do sangue de indivíduos sadios.

Considerando, entretanto, que:

1) entre os comunicantes lepromino - positivos (++) e (+++) as classes de respostas obtidas in vitro são compatíveis com a hipótese de existência de um paralelismo entre elas e as classes de respostas histológicas estabelecidas por BECHELLI et al. (1959);

2) a proporção de indivíduos Mitsuda-positivos está associada à idade, a inoculações repetidas de lepromina ou à vacinação com BGC;

3) entre os comunicantes não foi encontrado nenhum indivíduo com GBC 0-0;

4) algumas das variáveis que atuam na expressão da lepromino-reação tardia não devem estar atuando in vitro, apesar dos leucócitos terem permanecido em soro autólogo durante 7 dias;

5) na amostra de doentes os resultados encontrados in vitro, parecem compatíveis, seja com os dados clínicos ou histopatológicos, seja com os que se referem à reação de Mitsuda;

passa a ser atraente aventurar uma explicação para a falta de coerência dos resultados obtidos em sadios, quando comparados aos de doentes de lepra.

Assim, supondo que a atividade lisogênica dos

macrófagos necessitaria de algum estímulo anterior, feito in vivo, para se expressar integralmente in vitro, os sadios não-lisadores (GBC 2-2 ou 2-1) poderiam incluir indivíduos capazes de, eventualmente, apresentarem uma atividade lisogênica mais intensa, se tivessem sido convenientemente estimulados in vivo, o mesmo podendo, obviamente, acontecer com aqueles fracamente lisadores (GBC 1-1). Entretanto, tais respostas ao teste in vitro apresentadas por indivíduos sadios, dificilmente mostrariam uma atividade de lise maior do que aquela traduzida pelo GBC 1-0. Esse grau bacterioscópico combinado poderia, eventualmente, ser o valor limite encontrado entre os indivíduos sadios lisadores do M.leprae e traduzir, entre os não doentes de lepra, o máximo de atividade de lise que eles poderiam atingir.

Para finalizar o presente capítulo é importante assinalar que a ausência de correlação verificada entre o teste de Mitsuda e o teste in vitro, em indivíduos sadios, impede que, com as técnicas atuais, esse teste substitua a reação de Mitsuda para a investigação da resistência à lepra lepromatosa, como querem BARBIERI & CORREA (1967). De fato, a reação de Mitsuda, como valor prognóstico já foi plenamente demonstrada, enquanto o teste in vitro apresentou resultados inconsistentes no que concerne aos sadios.

Por outro lado, os resultados obtidos em indivíduos sadios impedem, ainda, qualquer tentativa de utilizá-lo como meio para investigar o mecanismo genético da resistência e suscetibilidade à lepra.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

No capítulo de introdução do presente trabalho, foram abordados de maneira sucinta, praticamente, todos os tópicos das pesquisas sobre Genética e Epidemiologia de lepra, revendo-se, de modo sumário, o estado atual dos conhecimentos sobre as formas clínicas, a associação familiar, o contágio intra-familiar, os estudos genealógicos, os estudos gemelares e o teste lepromínico, após o que, foi feita a revisão dos estudos sobre o comportamento in vitro dos macrófagos humanos frente ao M.leprae. A respeito desse último problema foram ressaltadas a discordância de resultados entre os autores que nele trabalharam, a heterogeneidade das técnicas que empregaram, bem como, as escassas informações sobre o comportamento in vitro dos macrófagos do sangue de indivíduos sadios e de pacientes com lepra dimorfa e indeterminada. Isso levou à definição dos objetivos do presente trabalho, ou seja, a de:

1. Descrever uma técnica in vitro que permitisse uma avaliação mais fácil da capacidade lisogênica dos macrófagos derivados de sangue periférico, frente ao bacilo de lepra morto pelo calor.

2. Aplicar essa técnica a pacientes de lepra dos tipos polares e com as formas clínicas diferentes destas, bem como, a indivíduos sadios não-comunicantes e comunicantes de casos de lepra.

3. Comparar os resultados obtidos com essa técnica, aos já relatados na literatura.

4. Investigar a eventual correlação entre os resultados do teste in vitro e a reação de Mitsuda na amostra de doentes e de sadios, e averiguar a possibilidade da utilização desse teste em estudos genéticos.

No capítulo de material e métodos foram apresentadas, inicialmente, as histórias clínicas resumidas dos pacientes de lepra, a técnica de preparação dos meios nutritivos, bem como, a técnica empregada na extração dos bacilos. A técnica para a realização do teste in vitro foi descrita com todos os detalhes, que incluíram os critérios de leituras das lâminas.

No capítulo de resultados, foram apresentados os resultados das reações in vitro feitas em 54 doentes de lepra, distribuídos segundo a forma clínica, grupo racial, sexo, idade, anos de observação clínica, reação de Mitsuda e grau bacterioscópico combinado, bem como, a distribuição dos 40 sadios não-comunicantes e dos 17 sadios comunicantes de casos de lepra.

No capítulo IV foram discutidos, a validade da escolha do grau bacterioscópico combinado como um critério para classificar os indivíduos segundo o comportamento de seus macrófagos in vitro, face o M.leprae morto, bem como, algumas das vantagens da técnica empregada no presente trabalho.

Com isso completou-se e atingiu-se o primeiro objetivo do presente trabalho. Os resultados obtidos no teste in vitro foram discutidos e comparados aos de outros autores tendo sido investigada a eventual correlação entre a reação de Mitsuda e o teste in vitro.

Do capítulo de Discussão foi possível extrair-se algumas conclusões que satisfizeram os três outros objetivos da presente tese. Foram elas as seguintes:

1. Os dados concernentes aos pacientes de lepra permitem considerar, entre eles, três classes de reações in vitro: reação lítica, reação fracamente lítica, e reação não-lítica. Considerando essas três classes de reações, os casos lepromatosos seriam representados por indivíduos não-lisadores, os tuberculóides por indivíduos lisadores e os dimorfos por indivíduos, em geral, fracamente lisadores. Os pacientes com lepra indeterminada poderiam incluir as

três classes de reações, constituindo, também quanto ao teste in vitro, um grupo heterogêneo.

2. A análise dos resultados dos indivíduos sadios, no que concerne ao grau bacterioscópico combinado e às correspondentes classes de reações in vitro, mostra que a classificação empregada para os doentes de lepra não pode ser estendida aos indivíduos sadios. Mesmo que se suponha, entre eles, que a reação lítica seja representada pelo grau bacterioscópico combinado 1-0, a fracamente lítica pelo grau bacterioscópico 1-1 e a reação não-lítica pelo grau bacterioscópico combinado 2-2 ou 2-1, ainda assim, a proporção de indivíduos não-lisadores permanece alta.

3. Nos pacientes com os tipos polares de lepra, parece existir uma concordância completa entre a reação in vitro e a resposta tardia ao teste lepromínico, seja clínica ou histologicamente analisada. Nos dimorfos, tal associação não pôde ser demonstrada. Entretanto, todos os pacientes dimorfos com reações de Mitsuda clínica e histologicamente positivas mostraram, in vitro, macrófagos capazes de fagocitar e lisar o M.leprae morto. Quanto aos pacientes com lepra indeterminada, embora não tenha sido demonstrada nenhuma associação entre as respostas ao teste in vitro e a reação de Mitsuda lida clinicamente, também não se pôde concluir a favor de que, entre eles, tais reações seja independentes.

4. Apesar da técnica empregada no presente trabalho apresentar vantagens com relação às de outros autores, e do grau bacterioscópico combinado ter mostrado refletir o comportamento in vitro dos macrófagos face o M.leprae, a ausência de associação entre a reação de Mitsuda e o teste in vitro, em sadios, assinala que tal teste não pode substituir a reação de Mitsuda na investigação da resistência à lepra lepromatosa entre sadios. Mais ainda, tal resultado impede a utilização do teste in vitro como um meio para a investigação do mecanismo genético da resistência e suscetibilidade à lepra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUAS, J.T. de las- Inoculación accidental de la lepra por transfusión sanguínea en gemelos univitelinos. Fontilles, 6: 603-611, 1967.
- ALAYON, F.L.- Histologia do lepronin-test nos lepromatosos. Rev. Brasil. Lepr., 7: 3-4, 1939.
- ALAYON, F.L. e SOUZA-LIMA, L.- Sobre a histologia da reação de Mitsuda em lepromatosos. Nova contribuição ao seu estudo. Rev. Brasil. Lepr., 8: 367-374, 1940.
- 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.
- AYCOCK, W.L. and McKINLEY, E.B.- The role of familial susceptibility and contagion in the epidemiology of leprosy. Int. J. Leprosy, 6: 169-184, 1938.
- AYCOCK, W.L.- Familial susceptibility as a factor in the propagation of leprosy in North America. Int. J. Leprosy, 8: 137-150, 1940.
- AZULAY, R.D.- Estudo das intradermo-reações pelo 2-4 dinitroclorobenzeno e pela lepromina. An. Brasil Derm. Sifil., 23: 267-272, 1948.
- AZULAY, R.D.; MOURA, A. e MOURÃO, G.- A viragem da reação lepromínica pelo BCG administrado aos doentes lepromatosos em condições clínico-bacterioscópico-histológicas de "transferência para dispensário". Rev. Brasil. Lepr., 20: 178-182, 1952.
- AZULAY, R.D.; ANDRADE, L.M.C.; SILVA, C.; RABELLO NETO, A.V.; AZULAY, J.D.; GARRIDO-NEVES, R. and MIGUEZ-ALONSO, A.- Comparison of the macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. Int. J. Leprosy, 28: 38-43, 1960.

- BARBIERI, T.A. and CORREA, W.M.- Human macrophage culture. The leprosy prognostic test (LPT). *Int. J. Leprosy*, 35: 377-381, 1967.
- BARBIERI, T.A. and CORREA, W.M.- Delayed lepromin reaction and BCG application in first grade school children in São Paulo, Brasil. *Int. J. Leprosy*, 39: 750-755, 1971.
- BASOMBRIIO, G.; MOM, A.M.; NOUSSITOU, F. and LEON, R.- Estudios sobre reactividad cutanea experimental en lepra. *Rev. Argent. Dermatosisif.*, 27: 406-411, 1943.
- BASOMBRIIO, G.- The lepromin reaction in tuberculoid cases. *Int. J. Leprosy*, 24: 86-87, 1956.
- BECHELLI, L.M. e QUAGLIATO, R.- Teste de Mitsuda na lepra tuberculóide em reação. *Rev. Brasil. Lepr.*, 21: 51-58, 1953.
- BECHELLI, L.M.; SOUZA, P.R. de e QUAGLIATO, R.- Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. *Rev. Brasil. Lepr.*, 27: 172-182, 1959.
- BECHELLI, L.M.; GARCIA, G.; NAKAMURA, S. e 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. Internac. Leprol. (Rio de Janeiro)*, 3: 284-294, 1963.
- BECHELLI, L.M.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, V. and PATWARY, K.M.- WHO epidemiologic random sample surveys of leprosy in Northern Nigeria (Katsina), Cameroon and Thailand (Khon Kaen). *Int. J. Leprosy*, 34: 223-243, 1966.
- BECHELLI, L.M.; GARBAJOSA, G.; UEMURA, K.; ENGLER, V.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, V.; PAREDES, L.; SUNDARESAN, T.; KOCH, G. and MATEJKA, M.- BCG vaccination of children against leprosy

Preliminary findings of the WHO-controlled trial in Burma. Bull. WHO, 42: 235-281, 1970.

BECHELLI, L.M. and GUINTO, R.S.- Some recent laboratory findings on Mycobacterium leprae. Bull. WHO, 43: 559-589, 1970.

BEIGUELMAN, B.- Hereditariedade da reação de Mitsuda. Rev. Brasil. Lepr., 30: 153-172, 1962.

BEIGUELMAN, B.- The genetics of resistance to leprosy. Int. J. Leprosy, 33: 808-812, 1965.

BEIGUELMAN, B.- Leprosy and Genetics. A review of past research with remarks concerning future investigations. Bull. WHO, 37: 461-476, 1967.

BEIGUELMAN, B.- Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias. EDART, São Paulo, 1968a.

BEIGUELMAN, B.- Some remarks on the problem of the genetics of leprosy resistance. Acta Genet. Med. Gemellolol ., (Roma), 17: 584-594, 1968b.

BEIGUELMAN, B.- Hereditariedade e lepra. Tese apresentada para concurso de Docência-Livre de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1969.

BEIGUELMAN, B.- Lepromin reaction. Genetic studies including twin pair analysis. Acta Lepr., (Genève), 44: 5-65, 1971.

BEIGUELMAN, B. e BARBIERI, T.A.- Comportamento dos macrófagos nas formas polares de lepra. Ciência e Cultura, 17: 304-305, 1965.

BEIGUELMAN, B. and QUAGLIATO, R.- Nature and familial character of the lepromin reactions. Int. J. Leprosy, 33: 800-807, 1965.

- BEIGUELMAN, B.; QUAGLIATO, R. and CAMARGO, D.P.- Influence of repeated lepromin injections on the Mitsuda skin reaction. *Int. J. Leprosy*, 33: 795-799, 1965.
- BEIGUELMAN, B.; SOUZA-CAMPOS, N. e PINTO JR., W.- Fatores genéticos e efeito da calmetização na reação de Mitsuda. *Rev. Paul. Med.*, 71: 271-278, 1967.
- BEIGUELMAN, B.; DALL'AGLIO, F.F. e SILVA, E. da- Análise da recorrência familiar de lepra. *Rev. Paul. Med.*, 72: 105-110, 1968a.
- BEIGUELMAN, B.; DALL'AGLIO, F.F. e SILVA, E. da- Estudo das formas polares de lepra pela análise de pares de irmãos. *Rev. Paul. Med.*, 72: 111-119, 1968b.
- BENEWOLENSKAJA, S.W.- Ueber die in-vitro-reaktion der embryonalen Gewebe und Leukozyten des Menschen auf Leprabazillen. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 13: 37-46, 1932.
- BULLOCK, W.E.- Studies of immune mechanisms in leprosy. I. Depression of delayed allergic responses to skin test antigens. *New Eng. J. Med.*, 278: 298-304, 1968.
- BÜNGELER, W. e FERNANDEZ, J.M.M.- Estudo clínico e histopatológico das reações alérgicas na lepra. 1a. Parte: Investigações clínicas sobre a reação à lepromina (reação de Mitsuda). *Rev. Brasil. Lepr.*, 8: 157-170, 1940.
- COCHRANE, R.G.- Practical textbook of leprosy. Oxford, 1947.
- CONTRERAS, F.; GUILLÉN, J.; TABARIN, J. y TERCENIO, J.- Resultados clínicos e imunobiológicos en hansenianos adultos vacunados con BCG por via oral. *Fontilles*, 4: 33-38, 1958.

- CONVIT, J.; RASSI, E.; RODRIGUEZ, F.C. and 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.
- CONVIT, J. and RASSI, E.- Lepromin and tuberculin tests in Venezuelan leprosy foci. Induction of lepromin reactivity by BCG vaccination. *Int. J. Leprosy*, 23: 303-310, 1954.
- COUDERT, J.; BASSET, A.; ROUSSET, J.; PRADINAUD, R. et LU-HUYNH-THAN, H.- A propos de la valeur immunologique de la réaction de Mitsuda. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 58: 132-140, 1965.
- DANIELSSEN, D.C. et BOECK, W.- Traité de la Spédalskhead on Éléphantiasis des Grecs. French translation by L. A. COSSON, Baillière, Paris, 1848.
- DELVILLE, J.- In vitro behavior of macrophages from healthy persons against M.leprae and other mycobacteria. *Int. J. Leprosy*, 39: 329-339, 1971.
- DHARMENDRA and CHATTERJEE, K.R.- Prognostic value of the lepromin test in contacts of leprosy cases. *Leprosy in India*, 27: 149-152, 1955.
- DOULL, J.A.; GUINTO, R.S.; RODRIGUEZ, J.N. and BANCROFT, H.- The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, P. I. *Int. J. Leprosy*, 10: 107-131, 1942.
- DOULL, J.A.; GUINTO, R.S. and 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.
- FARIA, J.L. de- Contribuição ao conhecimento da natureza da reação de Mitsuda. Depto. Imp. Nac., Rio de Janeiro, 1953.

- FAVERO, W. del- O censo intensivo de Candeias. Arq. Serv. Nac. Lepra (Rio de Janeiro), 6: 87-235, 1948.
- FLOCH, H.- Réaction de Mitsuda et intradermo-réaction au BCG tué dans la lèpre. Conclusions théoriques et pratiques. Ann. Inst. Pasteur, (Paris), 82: 517-527, 1952.
- FONTE, J.- Epidemiologia e profilaxia da lepra. Bol. Serv. Nac. Lepra (Rio de Janeiro), 26: 31-46, 1967.
- GODAL, T. and REES, R.J.W.- Fate of Mycobacterium leprae in macrophages of patients with lepromatous and tuberculoid leprosy. Int. J. Leprosy, 38: 439-442, 1970.
- GUINTO, R.S.; DOULL, J.A. and MALABAY, E.B.- A note on the lepromin reaction in males and females of the general population of Cordova, Mactan Island, Cebu, Philippines. Int. J. Leprosy, 23: 131-134, 1955.
- GUINTO, R.S.; MALABAY, M.C. and DOULL, J.A.- Cutaneous responses to lepromin and to other mycobacterial antigens. Int. J. Leprosy, 30: 152-165, 1962.
- HANKS, J.H.- A study of the bacilli in tissue cultures of lepromata in serum media. Int. J. Leprosy, 15: 21-30, 1947a.
- HANKS, J.H.- The fate of leprosy bacilli in fibroblasts cultivated from macular and tuberculoid lesions. Int. J. Leprosy, 15: 31-47, 1947b.
- HANKS, J.H.- The fate of leprosy bacilli in fibroblasts cultivated from lepromatous lesions. Int. J. Leprosy., 15: 48-64, 1947c.
- HANKS, J.H.; CHATTERJEE, B.R. and LECHAT, M.F.- A guide to the counting of mycobacteria in clinical and experimental materials. Int. J. Leprosy, 32: 156-167, 1964.

- HANKS, J.H.- Precautions for injecting uniform doses of lepromin. *Int. J. Leprosy*, 36: 64-65, 1968a.
- HANKS, J.H.- Standardizable lepromins yielding uniform concentration of M.leprae per skin site. *Int. J. Leprosy*, 36: 66-75, 1968b.
- HANKS, J.H.- Microscopic counts of mycobacteria conversion factors for the pinhead method. *Int. J. Leprosy*, 36: 76-77, 1968c.
- HANKS, J.H.; ABE, M.; NAKAYAMA, T.; TUMA, M.; BECHELLI, L. M. and MARTINEZ-DOMINGUEZ, V.- Studies towards the standardization of lepromin. *Bull. WHO*, 42: 703-709, 1970.
- HAUSFELD, R.G.- An anthropological method for measuring exposure to leprosy in a leprosy-endemic population at Karimui, New Guinea. *Bull. WHO*, 43: 863-877, 1970.
- HAYASHI, F.- Mitsuda's skin reaction in leprosy. *Int. J. Leprosy*, 1: 31-38, 1933.
- JONQUIERES, E.D.L. y MASANTI, J.G.- Vacunación con BCG y virage de la leprominorreacción en enfermos de lepra. *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 38: 137-144, 1954.
- KAPOOR, P.- Epidemiological survey of leprosy in Maharashtra (India). *Leprosy in India*, 35: 83-89, 1963.
- KEIL, E.- Hereditary factors in leprosy. *Leprosy Rev.*, 10: 163-171, 1939.
- KINNEAR-BROWN, J.A. and STONE, M.M.- Tuberculoid leprosy in identical twins. *Leprosy Rev.*, 29: 53-55, 1958.
- LOWE, J. and McNULTY, F.- Tuberculosis and leprosy. Immunological studies. *Leprosy Rev.*, 34: 61-90, 1953.

- MARIANI, G.- Osservazioni sopra una forma speciali di allergia cutanea nella lepra (Lepra tuberculoide sperimentale nell'uomo). *Pathologica*, 16: 471-477, 1924.
- MARIANI, G.- Nuove osservazioni nelle reazioni provocate sperimentalmente con materiale leproso nell'uomo. *G. Ital. Derm.*, 66: 402-426, 1925.
- MARTINEZ-DOMINGUEZ, V.- Estudio epidemiológico y clinico de la endemia de lepra en la Guinea Española. *Mem. VI Cong. Internac. Leprol.*, Madrid, 1104-1204, 1953.
- ITSUDA, K.- Les lèpreux maculo-nerveux, d'une part, les tubéreux, d'autre part, se comportent différemment a la suite d'une inoculation d'émulsion de tubercule lépreux. *IIIe. Conf. Internat. Lépre (Strasbourg, 1923)* J.B. Baillière et Fils, Paris, 219-220, 1924.
- MOHAMED-ALI, P.- A study of conjugal leprosy. *Int. J. Leprosy*, 33: 223-228, 1965a.
- MOHAMED-ALI, P.- Genetic influence in leprosy. *Leprosy in India*, 37: 252-267, 1965b.
- MOHAMED-ALI, P. and RAMANUJAM, K.- Leprosy in twins. *Int. J. Leprosy*, 34: 405-407, 1966.
- MOM, A.M. y BASOMBRIÓ, G.- Estudio comparativo entre la leprominoreacción y la intradermoreacción por el 2-4 dinitroclorobenceno en enfermos de lepra, convivientes y controles sanos. *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 28: 165-169, 1944.
- MOM, A.M. y BASOMBRIÓ, G.- Estudios de reactividad cutánea en lepra. Las intradermoreacciones provocadas por la lepromina y el 2-4 dinitroclorobenceno. *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 29: 120-128, 1945.

- NAGAI, K.- Histopathologische befunde nach anstellung der Mitsuda'schen reaktion. La Lepro, 9: 26, 1938.
- NOLASCO, J.O.- The lepromin test in lepra reaction. II - Histology of the reaction lesions and persistence of the subjected bacilli. Int. J. Leprosy, 8: 285-296, 1940.
- NORDEEN, S.K. and MOHAMED-ALI, P.- A study of 579 families having multiple cases of leprosy. Leprosy in India, 36: 176-181, 1964.
- OLMOS-CASTRO, N. and ARCURI, P.B.- Lepromin hypersensitivity induced by integral lepromin in persons presumably free from leprosy. Int. J. Leprosy, 25: 375-379, 1957.
- PAULA-SOUZA, R.; FERRAZ, N.T. e BECHELLI, L.M.- Influência do BCG vivo e morto sôbre a reação de Mitsuda (Observações preliminares). Rev. Brasil. Lepr., 21: 43-50, 1953.
- PORRIT, R.J. and OLSEN, R.E.- Two simultaneous cases of leprosy developing in tatoos. Amer. J. Path., 23: 805-817, 1947.
- PRASAD, K.V.N. and MOHAMED-ALI, P.- Some genetic aspects in the epidemiology of leprosy. Leprosy Rev., 38: 49-56, 1966.
- QUAGLIATO, R.- Lepra conjugal. Rev. Brasil. Lepr., 25: 59-68, 1957a.
- QUAGLIATO, R.- Resultados colhidos pela vacinação com o BCG e meios de sua avaliação. Rev. Brasil. Lepr., 25: 368-389, 1957b.
- QUAGLIATO, R.- Interpretação das reações limítrofes ou duvidosas do teste lepromínico. Bol. Serv. Nac. Lepra (Rio de Janeiro), 21: 13-34, 1962.

- QUAGLIATO, R. e BECHELLI, L.M.- Tentativa de viragem de reação lepromínica pelo BCG em doentes de lepra. Int. J. Leprosy, 21: 591-592, 1953.
- RAO, P.S.S.; KARAT, A.B.A. and KARAT, S.- Epidemiological studies in leprosy in Gudiyatham Taluk. II. Patterns of familial aggregation of leprosy in an endemic area. Leprosy Rev., 40: 93-98, 1969.
- RIDLEY, D.S.- Reactions in leprosy. Leprosy Rev., 40: 77-81, 1969.
- RODRIGUEZ, R.P.- Reacción de Mitsuda, estudio histopatológico. Bol. Soc. Cubana Dermat. Sifil., 7: 1-16, 1950.
- ROSEMBERG, J.; SOUZA-CAMPOS, N.; AUN, J.N. and 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 antigens and to oral BCG vaccination. Int. J. Leprosy, 28: 271-283, 1960.
- ROTBURG, A.- Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromin tested cases. Rev. Brasil. Lepr., 5: 45-97, 1937.
- SCHUJMAN, S.- Histopatología de la reacción de Mitsuda. Estudio progresivo y comparativo de las reacciones que provoca en las diversas formas de lepra. Rev. Brasil. Lepr. 4: 469-475, 1936.
- SCHUJMAN, S.- Subsequent evolution of the induced Mitsuda reaction in clinically and bacteriologically negative lepromatous cases. Int. J. Leprosy, 24: 51-56, 1956.
- SPICKETT, S.G.- Genetics and the epidemiology of leprosy. I. The incidence of leprosy. Leprosy Rev., 33: 76-93, 1962a.

- SPICKETT, S.G.- Genetics and the epidemiology of leprosy .
II. The form of leprosy. Leprosy Rev., 33: 173-181,
1962b.
- STEINIGER, F.- Die erbliche disposition bei der entstehung
der lepra.Zschr. menschl. vererbungs - u. Konstitutions-
lehre , 25: 245-272, 1941.
- TOLENTINO, J.G.- The role of heredity in the transmission of
leprosy. Monthly Bull. Bureau Hlth (Manila), 18: 261-
272, 1938.
- TREO, M.M. e SILVA, C.O.- Comportamento do Mycobacterium le-
prae in vitro em sangue total ou plasma de leproso de di-
ferentes formas clínicas. An. VIII Cong. Internac. Le -
pra (Rio de Janeiro), 3: 484-494, 1963.
- TURK, J.L. and WATERS, M.F.R.- Cell mediated immunity in
patients with leprosy. Lancet, II: 243-246, 1969.
- YOKOTA, T.- The histopathological study of Mitsuda reaction
in the case of lepromatous leprosy. La Lepro, 22: 232-
235, 1953.
- SOUZA-LIMA, L. e CERQUEIRA, G.C.- Tratamento experimental
da lepra pelas diamino-difenil-sulfonas. II Conf. Pana-
mer. Lepra, Arq. Serv. Nac. Lepra (Rio de Janeiro), 4:
9-76, 1946.
- SOUZA-LIMA, L. and SOUZA, P.R. de- Pseudo-exacerbation of
leprosy due to the diamino-diphenyl-sulfones. Int. J.
Leprosy, 17: 19-21, 1949.
- SOUZA-LIMA, L.- Estado atual da terapêutica da lepra. Serv.
Nac. Lepra, São Paulo, 1953.
- SOUZA-CAMPOS, N.; LESER, W.; QUAGLIATO, R.; BECHELLI, L.M. e
ROTBURG, A.- Viragem da lepromino-reação em função de dife -
rentes estímulos. Influência da idade, nessa viragem, no
grupo etário de 6 a 34 meses. Rev. Brasil. Lepr., 29: 3-
20, 1962.