

REVISTA BRASILEIRA DE LEPROLOGIA

(2.a Série da Revista de Leprologia de São Paulo)
ORGÃO OFICIAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE LEPROLOGIA
E DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEPROLOGIA

VOLUME

SETEMBRO DE 1953

NUMERO 3

COMPORTAMENTO DO COBAIO E DO RATO, NORMAIS, INJETADOS COM "LEPROMINA" POR VIA INTRADÉRMICA

W. A. HADLER (*)

A "lepromina" (ou "lepromina integral") é uma suspensão de tecido lepromatoso triturado, em solução cloretada a 8,5 por mil, rica em *M. leprae*, esterilizada pelo calor e conservada em ácido fênico a 0,5%. Apresenta constituição complexa, contendo substâncias de natureza bastante diferente, as quais, de u'a maneira geral, podem ser agrupadas em hidrosolúveis e insolúveis na água.

Fazem parte da fração solúvel substâncias oriundas dos tecidos lesados (principalmente proteínas) e dos bacilos (proteínas e hidratos de carbono), libertadas mecânicamente durante o processo de preparação da suspensão; todas elas são capazes de atuar como irritantes inespecíficos fracos, quando introduzidas em tecidos normais (não sensibilizados); provocam reação inflamatória de intensidade variável, que se inicia poucas horas após a injeção intradérmica da "lepromina" e regride com relativa rapidez. De todas as substâncias hidro-solúveis que tomam parte nas reações inflamatórias iniciais, merecem destaque as proteínas bacilares, as quais têm a propriedade de produzir reação de sensibilidade "tipo tuberculínico" ⁹, quando injetadas em organismo préviamente sensibilizado ("reação precoce").

A fração insolúvel é constituída por células e pequenos fragmentos de tecido lepromatoso (termocoagulados), pelo *M. leprae* e por lípidos provenientes dos bacilos e dos tecidos lesados.

Enquanto a fração solúvel é, devido a sua grande difusibilidade, facilmente removível dos tecidos injetados, provocando reação inflamatória

(*) Médico da Secção de Patologia Experimental do Serviço de Pesquisas Científicas do D.P.L., São Paulo, Brasil.

fugaz, a fração insolúvel é eliminada com relativa dificuldade, dando origem, muitas vezes, a reação granulomatosa que perdura várias semanas ("reação tardia"); todos os componentes insolúveis tomam parte nesse tipo de reação, mas o *M. leprae* destaca-se como elemento determinante principal, uma vez que foi demonstrado⁵ que suspensões bacilares, livres de restos de tecidos, podem produzir a "reação tardia".

A injeção intradérmica de lepromina, no homem, constitui o que se denomina "reação da lepromina", ou "reação de Mitsuda"; há tendência em se ampliar o âmbito de tais denominações, no sentido de abranger também a reação quando executada em animais de laboratório.

A "reação da lepromina", foi estudada em várias espécies animais, principalmente no cão^{43, 57, 58, 10, 7, 8, 22, 23}. Os trabalhos referentes a cobaias e ratos^{3, 1, 10, 59, 24} são pouco numerosos e nem sempre concordantes; baseiam-se na observação de pequeno número de animais e limitam-se ao exame macroscópico do local da reação (faz exceção Watanabe⁵⁹). Uma vez que o estudo da estrutura histológica possui muito maior valor que a averiguação macroscópica, no que diz respeito ao critério de positividade, julgamos conveniente tomar como base as alterações histopatológicas provocadas pela "lepromina", ao analisarmos a referida reação. Foram feitas observações em número relativamente grande de cobaias e ratos presumivelmente normais; essas duas espécies foram as escolhidas em virtude de se comportarem de modo diverso, em face da "lepromina".

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos cobaias e ratos presumivelmente normais, isto é, em boas condições de saúde aparente e sem *prévio* contato com Mycobactérias.

Os cobaias, em número de 174 (95 fêmeas e 79 machos), possuíam idades diferentes, conforme se pode verificar pela ampla variação de peso, abrangendo animais desde 200,0 até 500,0 gms.; foram classificados em 3 grupos: a) 75 "cobaias adultos", com peso entre 400,0 e 500,0 gms.; b) 53 "cobaias adultos jovens", pesando entre 300,0 e 400,0 gms.; c) 46 "cobaias jovens", com 200,0-300,0 gms..

Os ratos, em número de 95 (52 machos e 43 fêmeas), formam também um grupo heterogêneo quanto ao peso; 38 são animais jovens com 100,0-140,0 gms. e 57 são animais adultos com 220,0-300,0 gms..

Todos os animais (cobaias e ratos) foram previamente injetados, por via intradérmica, com 0,1 ml. de tuberculina bruta (OT.) a 1/10; os resultados das leituras de 24 e 48 horas apresentaram-se negativos (*).

(*) O rato não apresenta sensibilidade tuberculínica mesmo quando portador de tuberculose evolutiva.

Dois dias após a leitura da reação tuberculínica todos os animais foram injetados com 0,1 ml. de "lepromina" (**), por via intradérmica. Cada animal recebeu uma única injeção.

Em 130 cobaios e 60 ratos fez-se o exame macroscópico do local injetado, diariamente até o 6° dia, cada 3 dias até o 30° dia e cada 10 dias até o 50° dia; foram anotados os caracteres e as dimensões (em milímetros) da lesão papulosa formada.

O exame microscópico feito em 44 cobaios e 35 ratos foi realizado mediante biópsia executada em períodos sucessivos da evolução da reação, em correspondência com o exame macroscópico (até o 18° dia foram biopsiados 15 cobaios e 9 ratos; entre o 18° e o 30° dia 24 cobaios e 16 ratos; entre o 30° e o 50° dia 5 cobaios e 8 ratos; 1 rato foi biopsiado com 70 dias e outro com 90 dias). O material retirado por biópsia foi fixado em solução de formol a 10%, incluído em parafina e corado pela H.E., Ziehl-Neelsen modificado, Mallory, e método de Gomori (reticulina). Na maioria dos casos foram feitos vários cortes em diferentes profundidades das lesões. Em 6 ratos e 7 cobaios fizeram-se cortes de congelação e coloração de lípidos pelo Sudan III.

RESULTADOS

I — MACROSCÓPICOS:

A) *Cobaios* - Os três grupos de cobaios assinalados não apresentaram variações significantes nos resultados. Verificou-se, de um modo geral, que nos animais jovens é menor a área de reação local, em relação aos adultos; porém, as diferenças são pequenas e inconstantes. Em vista desse fato e devido à presença de variações relativamente grandes, nos animais de um mesmo grupo, não se justifica a análise dos três grupos em separado.

A reação macroscópica local tem início 3 a 6 horas após a injeção da "lepromina"; traduz-se por pequena zona eritematosa (com 2 a 5 mms. de diâmetro), levemente infiltrada, cuja intensidade aumenta para atingir o máximo 24 horas após a inoculação; nessa época há uma pápula eritematosa (com diâmetro médio de 3,15 mms.), cujas dimensões apresentam amplas variações individuais, sem ultrapassar o limite máximo de 5,0 mms.. Tanto a pápula como o eritema regridem lenta e progressivamente até o 30° dia que sucede à inoculação (ver quadro I e gráfico n° 1), desaparecendo sem deixar vestígios.

(**) A "lepromina" foi fornecida pelo Dr. M. de Souza Lima, a quem agradecemos. A separação dos bacilos pelo clorofórmio mostrou que a "lepromina" utilizada continha 0,74 mgms. de bacilos por ml.; portanto, cada animal recebeu quantidade equivalente a 0,074 mgms. de bacilos.

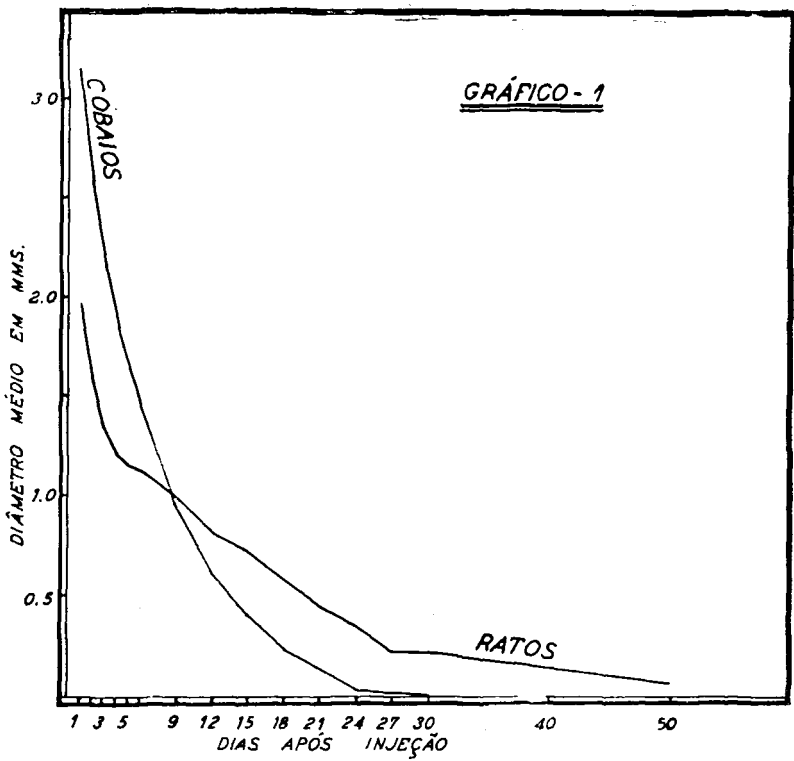


Gráfico 1 — "Reação da lepromina" em cobaias e ratos normais", evolução da reação macroscópica.

QUADRO II — “REAÇÃO DA LEPROMINA” EM RATOS NORMAIS. RESULTADOS MACROSCÓPICOS EM 60 ANIMAIS OBSERVADOS

Nº dias após inoculação	Reação ausente		Presença de pápula eritenatosa, ou não, com:												Diâmetro médio em mm.
	Nº Abs.	%	0,1-1,0 mms.		1,1-2,0 mms.		2,1-3,0 mms.		3,1-4,0 mms.		Nº Abs.	%			
			Nº Abs.	%	Nº Abs.	%	Nº Abs.	%	Nº Abs.	%					
1	—	—	3	5,00	30	50,00	26	43,33	1	1,67	1,98				
2	—	—	12	20,00	31	51,67	17	28,33	—	—	1,58				
3	—	—	18	30,00	34	56,67	8	13,33	—	—	1,33				
4	3	5,00	20	33,33	30	50,00	7	11,67	—	—	1,21				
5	5	8,33	20	33,33	29	48,33	6	10,00	—	—	1,14				
6	7	11,67	18	30,00	29	48,33	6	10,00	—	—	1,12				
9	11	18,33	18	30,00	28	46,67	3	5,00	—	—	0,97				
12	18	30,00	17	28,33	23	38,33	2	3,33	—	—	0,80				
15	21	35,00	17	28,33	20	33,33	2	3,33	—	—	0,72				
18	27	45,00	17	28,33	15	25,00	1	1,67	—	—	0,56				
21	32	53,33	17	28,33	10	16,67	1	1,67	—	—	0,43				
24	39	65,00	12	20,00	8	13,33	1	1,67	—	—	0,34				
27	43	71,67	12	20,00	5	8,33	—	—	—	—	0,22				
30	43	71,67	12	20,00	5	8,33	—	—	—	—	0,22				
40	49	81,67	8	13,33	3	5,00	—	—	—	—	0,14				
50	55	91,67	5	8,33	—	—	—	—	—	—	0,07				

Em 18 animais (13,84%), a lesão inicial apresentou pequena ulceração central, a partir do 3°-6° dia, sendo infectada por germes piógenos; nestes casos a lesão envolveu deixando pequena cicatriz.

Analisando os resultados obtidos comparativamente com o que foi estabelecido como norma de leitura para a "reação da lepromina", no homem⁶⁴, verifica-se: a) a reação precoce mostrou-se negativa em 100,0% dos cobaios, pois todos apresentaram eritema local inferior a 5 mms. de diâmetro, na leitura de 48 horas; b) a reação tardia (leitura feita. no 21° dia) também se enquadra entre as reações negativas, em todos os animais, nos quais a lesão papulosa tem diâmetro inferior a 3 mms.. Portanto, de acordo com o critério utilizado, os cobaios reagem sempre negativamente à "lepromina"; mesmo que as normas estabelecidas para o homem não se apliquem diretamente ao cobaio, não se pode negar que neste a lesão local atinge dimensões inferiores às consideradas como significantes, na interpretação macroscópica das cuti-reações em geral.

B) *Ratos* — A reação é idêntica tanto nos ratos jovens como nos adultos e, por essa razão, os resultados serão analisados em conjunto.

A lesão local inicia-se 6 a 10 horas após a injeção da "lepromina", traduzindo-se por pequena área eritematosa com 1-3 mms. de diâmetro. Nas leituras de 24 e 48 horas verifica-se pequena pápula com dimensões variáveis (porém, nunca superior a 4 mms. de diâmetro), levemente eritematosa. Nos dias subseqüentes (4°-5° dia) o eritema tende a desaparecer, surgindo, por vezes, ligeira pigmentação pardo-amarelada. A regressão da lesão é lenta, não sendo completa até o 50° dia (ver quadro II e gráfico n° 1). Raramente observa-se pequena lesão ulcerosa (após o 3°-6° dia), que regride sem deixar vestígios (apenas 5 casos).

De acordo com o critério de leitura já citado⁶⁴ tanto a reação precoce como a tardia foram negativas em todos os ratos observados.

II — HISTOLÓGICOS :

A) *Cobaios* — O exame microscópico do local da injeção da "lepromina" mostra, a princípio, reação inflamatória de caráter predominantemente exsudativo, com grande número de neutrófilos (reação provocada pela fração hidro-solúvel da "lepromina") ; a seguir a lesão adquire caráter produtivo, cuja finalidade é eliminar a fração insolúvel da "lepromina" (representada principalmente pelos bacilos). Os dois tipos de reação citados não são independentes; eles se superpõem, havendo, apenas, predominância de um sobre o outro.

As lesões com 24-48 horas de evolução apresentam-se difusas, atingindo o derma e parte do hipoderma; há discreta congestão vascular, ligeiro edema e infiltrado celular situado nos interstícios do colágeno; pre-

dominam os neutrófilos, havendo alguns eosinófilos, células linfóides e monócitos. Na área central da lesão a maioria dos neutrófilos apresenta alterações degenerativas do citoplasma (microvacuolização) e do núcleo (picnose, cariólise), sem contudo haver formação de verdadeiro micro-abscesso. Nas zonas mais periféricas os neutrófilos são menos numerosos, permitindo verificar que alguns elementos conjuntivos fixos (células adventíciais, perianexiais e intersticiais) tomam parte na reação; seu núcleo apresenta-se menos compacto e o citoplasma mais visível que normalmente, constituindo elementos com núcleo linfóide e citoplasma escasso (fotomicrog. n° 1) e dotado de prolongamentos relacionados com raras fibrilas delgadas de reticulina; em alguns pontos as células descritas apresentam atividade proliferativa e por essa razão podem ser denominadas "células fixas ativadas". Destas, algumas passam a apresentar hipertrofia progressiva do citoplasma, o qual se torna fortemente vacuolizado, dando origem a elementos que, devido ao aspeto morfológico e à atividade fagocitária, são identificados como "macrófagos fixos". Possuem forma irregular e citoplasma amplo, dotado de extensos prolongamentos, crivado de vacúolos irregulares no tamanho e na forma; o núcleo é leptocromático e geralmente nucleolado. Apresentam-se isolados ou em pequenos grupos, com disposição aparentemente sincicial e estão relacionados com algumas delgadas fibrilas de reticulina. No interior dos vacúolos citoplasmáticos há número variável de bacilos AAR (geralmente 2 a 5), alguns dos quais alterados morfológicamente.

Além disso são também verificados bacilos livres e principalmente fagocitados por neutrófilos e monócitos.

Portanto, na reação de 24-48 horas predominam fenômenos inflamatórios exsudativos, de caráter agudo; porém, há proliferação e modificações morfológicas de células conjuntivas fixas, que culminam com a formação de pequeno número de "macrófagos fixos" (fotomicrog. n° 2).

Entre o 3° e o 6° dia a reação inflamatória aguda inicial apresenta-se bem menos intensa, encontrando-se apenas pequenos acúmulos de neutrófilos, raros eosinófilos e mononucleares. As "células fixas ativadas" proliferam e possuem tendência em se transformar em macrófagos. Os bacilos não são numerosos e encontram-se principalmente no interior dos macrófagos.

Do 6° ao 9° dia a reação é constituída predominantemente por "macrófagos fixos", entre os quais há alguns neutrófilos, células linfóides e raros eosinófilos; formam pequenos grupos situados entre os feixes de colágeno. Alguns macrófagos apresentam transformação morfológica progressiva, dando origem a elementos ainda dispostos em sincício e vacuolizados, mas com citoplasma condensado em torno do núcleo (corado em róseo pela H.E.). A célula descrita, que apresenta caracteres tanto do macrófago, como da "célula epitelióide", constitui uma fase de transição e será denominada "célula pré-epitelióide" (fotomicrogs. 3, 4 e 5).

Os bacilos são pouco numerosos nos macrófagos e excepcionais nas "células pré-epitelióides", nas quais há, certas vezes, substância levemente AAR. disposta difusamente, ou condensada em formações mal definidas.

Entre o 9º e o 12º dia aumenta progressivamente o número de "células pré-epitelióides", algumas das quais evoluem para elementos com citoplasma relativamente abundante e bem corado (rôseo vivo pela H.E.), levemente mais condensado em torno do núcleo e de aspeto finamente granuloso ; o núcleo é pequeno, oval, com estrutura densa e membrana nuclear delicada: são as "células epitelióides", que se dispõem entre as malhas de uma rede de reticulina regularmente densa (fotomicrogs. 5, 6 e 8).

Nas lesões desta época predominam os macrófagos e as "células pré-epitelióides" (sendo pouco numerosos os granulócitos), situados entre feixes do colágeno. Os bacilos são raros nos macrófagos e ausentes nas "células epitelióides".

Após o 12º dia, até o 21º dia, a estrutura da lesão apresenta algumas modificações; surgem "células epitelióides" de maiores dimensões, contendo 2-4 núcleos e as primeiras células gigantes, geralmente mal constituídas e pouco numerosas. Algumas "células epitelióides" tornam-se alongadas, progressivamente adquirem os caracteres do fibrócito e passam a produzir fibras colágenas (fotomicrogs. 6 e 7).

Nas porções mais centrais das lesões predominam as "células epitelióides"; porém, nas áreas mais periféricas os macrófagos são mais abundantes (a estrutura das lesões não é uniforme). São observadas pequenas coleções de neutrófilos distribuídas irregularmente.

Os bacilos são raros e verificados apenas no interior de alguns macrófagos.

Entre o 21º e o 27º dia a reação histológica atinge intensidade máxima; mesmo assim é discreta, havendo feixes de colágeno interposto aos grupos de "células epitelióides". O número de macrófagos é progressivamente menor, mas, é maior a tendência para a transformação fibrocítica das "células epitelióides". Há células gigantes bem constituídas, predominando as de tipo corpo estranho (fotomicrog. nº 6).

Os elementos das lesões dispõem-se de forma irregular, não nodular, sendo pouco freqüente o encontro de formações tuberculóides típicas. Em alguns pontos há células linfóides, formando um esboço de halo descontínuo, em torno de grupos de "células epitelióides".

Os bacilos são muito raros e encontrados apenas nos macrófagos; após o 24º dia são excepcionais, tendo sido encontrados raríssimos bacilos em sómente 1 dos 17 casos examinados.

Após o 27º dia são pouco numerosos os macrófagos e relativamente abundantes os fibrócitos, sem contudo haver fibrose nítida. Algumas "células epitelióides" apresentam alterações degenerativas do citoplasma (micro-vacuolização) e do núcleo (picnose, cariólise), que culminam com

a necrose celular; outras mobilizam-se e caem nos linfáticos; por fim, um menor número apresenta redução progressiva do citoplasma e maior densidade cromática do núcleo, tomando os caracteres morfológicos da "célula fixa em repouso". Devido a esses fenômenos há redução numérica das "células epitelióides", que se apresentam em pequenos grupos separados entre si por tecido fibroso jovem.

No 40º dia ainda são observados alguns grupamentos de "células epitelióides"; nas lesões com 50 dias de evolução raramente são verificadas "células epitelióides" isoladas (quase sempre com alterações degenerativas) as lesões desaparecem sem deixar cicatriz fibrosa, a não ser nos casos em que houve ulceração.

Em resumo, o estudo histológico da "reação da lepromina" em cobaios, revela (além da fase inicial principalmente a cargo de neutrófilos) a formação de macrófagos à custa de "células fixas ativadas", os quais fagocitam e destroem o *M. leprae* e posteriormente transformam-se em "células pré-epitelióides" e "células epitelióides". Quando a lesão envolve, as "células epitelióides" degeneram, mobilizam-se, ou sofrem transformações para fibroblastos, ou para "células fixas em repouso".

B) *Ratos* — A reação inflamatória inicial (1"-3" dia) tem caráter exsudativo, com predomínio de neutrófilos; localiza-se no derma, atingindo geralmente o músculo cuticular e as áreas próximas do hipoderma. Sua intensidade é bem menor que a reação inicial dos cobaios. Após o 3º dia os fenômenos exsudativos são bastante discretos.

Dentro das primeiras 48 horas algumas células conjuntivas fixas do derma (intersticiais e peri-vasculares), que normalmente possuem núcleo pequeno e hipercoreado (de aspeto linfóide) e citoplasma escasso dotado de vários prolongamentos relacionados com fibrilas reticulares, apresentam modificações morfológicas; o citoplasma torna-se mais visível e o núcleo ligeiramente mais volumoso e menos denso, constituindo as "células fixas ativadas". Destas, algumas apresentam hipertrofia progressiva do citoplasma, o qual se cora levemente em rosa pela H.E. e contém diversos vacúolos irregulares; formam-se elementos volumosos, sem limites nítidos, dispostos em sincício aparente e dotados de propriedades fagocitárias (fagocitam bacilos AAR.); são os "macrófagos fixos", relacionados com raras e delgadas fibrilas de reticulina.

Os "macrófagos fixos" predominam sobre os demais elementos nas lesões com 3-5 dias de evolução (os leucócitos são pouco numerosos); contém número apreciável de bacilos no citoplasma.

Sucessivamente (6º-9º dia), à medida que aumenta o número de bacilos fagocitados, os macrófagos sofrem modificações morfológicas, transformando-se em elementos globosos, não vacuolizados, com citoplasma abundante e bem corado (cora-se em róseo-acinzentado pela H.E.), geralmente bem delimitado; o núcleo é oval e denso. Contém numerosos bacilos no citoplasma e estão relacionados com abundantes fibrilas de reticulina, dis-

postas em denso retículo (fotomicrog. n° 14). São as "células leprosas do rato" (*).

Nos períodos subseqüentes (12°-18° dia) aumenta progressivamente o número de "células leprosas", algumas das quais são volumosas e possuem 2-3 núcleos; há raras células gigantes. Agrupam-se em pequenos focos, geralmente bem individualizados, constituindo lesões em tudo idênticas às da lepra murina em período de estado (fotomicrog. n° 11) ; são ricas em bacilos AAR., sendo pouco numerosas as granulações AAR.

Entre o 18° e o 24° dia a reação é constituída por lesões nodulares porém, não tuberculóides), localizadas de preferência junto aos vasos sanguíneos, no derma e zonas próximas do hipoderma. São formadas pelo agrupamento de "células leprosas", entre as quais há poucas células com núcleo linfóide. O citoplasma de algumas "células leprosas" apresenta-se vacuolizado; o número de bacilos íntegros diminue progressivamente, à medida que aumentam as granulações AAR.. As lesões passam a apresentar aspetos involutivos progressivamente mais intensos, os quais são idênticos aos verificados nas lesões de lepra murina sob tratamento ¹³. Predominam as lesões em fase inicial de involução, algumas das quais possuem um halo descontínuo de células linfóides, com raros neutrófilos (fotomicrografia n° 12).

Após o 24° dia as alterações involutivas são mais acentuadas e mais constantes (predominam as lesões em fase média de involução) e, são numerosas as granulações AAR., ao contrário dos bacilos íntegros. As "células leprosas" e as fibrilas reticulínicas apresentam-se dissociadas (fotomicrografia n° 13).

A involução das lesões se processa lentamente, de modo que no 40° dia são observados aspetos de regressão avançada; os bacilos são raros e as granulações AAR. relativamente pouco numerosas. Algumas "células leprosas" degeneram e outras se transformam em elementos fusiformes que produzem substância colágena (fibrócitos), sem haver, no entanto, fibrose nítida. A mesma morfologia é observada aos 50 dias de evolução.

Nas lesões com 70-90 dias ainda são verificadas "células leprosas" isoladas, ou em pequenos grupos, contendo granulações AAR. de diversas dimensões. Devido aos fenómenos involutivos que se apresentam em fase avançada, as lesões assumem aspeto morfológico particular, relacionado ao processo regressivo; isto é, as modificações morfológicas das lesões dependem da involução e não revelam alteração da capacidade reacional dos tecidos do rato.

Em resumo, a injeção de "lepromina" produz, no rato, discreta reação inflamatória aguda inicial, em concomitância com o aparecimento de "células fixas ativadas", que se transformam em "macrófagos fixos"; êstes

(*) A "célula leprosa do rato" é observada na lepra murina, cujo agente etiológico é o *M. lepraemurium*; porém, devido à identidade morfológica, chamaremos também a célula que contém o *M. leprae* de "célula leprosa".

fagocitam bacilos AAR. e se transformam gradativamente na "célula leprosa do rato", as quais se agrupam em lesões nodulares. As lesões envolvem lentamente, ao mesmo tempo que os bacilos diminuem em número e se transformam em granulações AAR..

DISCUSSÃO

A injeção intradérmica de "lepromina" produz, tanto no cobaio como no rato, presumivelmente normais, reação local que macroscopicamente atinge pequenas dimensões, enquadrando-se, portanto, entre as reações negativas. As lesões cutâneas são inicialmente mais intensas no cobaio, mas evoluem e regridem mais rapidamente que no rato.

O estudo histológico revela comportamento diverso das duas espécies de animais, traduzido pela formação de estruturas de tipos diferentes, constituídas por células cuja atividade funcional é responsável por essa diferença. A fase inicial da reação, de caráter predominantemente exsudativo, é comparável nas duas espécies, havendo apenas maior intensidade no cobaio. Na fase sucessiva, na qual predominam os fenômenos produtivos, tanto no cobaio como no rato, há hipertrofia e proliferação de algumas células conjuntivas fixas ("células fixas ativadas"), principalmente perivasculares; estas transformam-se em "macrófagos fixos", com citoplasma vacuolizado, dispostos em estrutura de aspeto sincicial e relacionados com delgadas fibrilas de reticulina; contêm, no citoplasma, alguns bacilos fagocitados.

Até este ponto a citomorfologia da reação do cobaio e do rato é idêntica, havendo pequenas diferenças relacionadas com particularidades das espécies; mas, funcionalmente, os macrófagos das duas espécies comportam-se de modo diverso. Nas fases sucessivas da reação (devido à divergência da aptidão funcional dos macrófagos, relacionada com a sua transformação em células dotadas de atividade fisiológica diferente) surgem diversidades citológicas que se acentuam progressivamente.

No rato, à medida que o número de bacilos aumenta no citoplasma dos "macrófagos fixos", estes se transformam na "célula leprosa do rato", a qual, além de numerosos bacilos, contém gotículas coráveis pelo Sudan III. A formação das "células leprosas" tem início no 5º-6º dia e completa-se por volta do 15º dia. A origem da "célula leprosa" "in vitro" ⁶³ (verificada em culturas de fragmentos de baço de rato infectado com *M. lepraemurium*) é idêntica à descrita, "in vivo".

Esses fatos sugerem que o *M. leprae* não é destruído pelo macrófago do rato, o qual apenas fagocita e "armazena" os bacilos fagocitados; a transformação em "célula leprosa" parece decorrer da presença de partículas estranhas de reduzidas dimensões (bacilos), aparentemente inertes, cujo número aumenta progressivamente no interior do citoplasma do macrófago, devido a fagocitose de novos bacilos. Do mesmo modo que para os macrófagos cultivados "in vitro" ^{54, 2}, o *M. leprae* não apresenta efeito

tóxico, exercendo apenas ação mecânica sobre o fagócito do rato. Fato semelhante ocorre quando se injetam grandes e sucessivas doses de suspensões coloidais eletro-negativas, no rato; as partículas são captadas pelas células do S.R.E. (atrocitose), cujo citoplasma se torna progressivamente mais abundante e carregado de colóide; a célula apresenta-se globosa. Do mesmo modo que sucede com a injeção da "lepromina", várias células idênticas reúnem-se, formando pequenos acúmulos nodulares, que caracterizam o tipo de lesão.

Porém, enquanto as células que armazenam partículas coloidais conseguem livrar-se delas após tempo relativamente curto (relacionado principalmente com o coeficiente de difusão do colóide), as células que retêm bacilos somente se libertam deles após "fragmentação bacilar" (com formação de granulações), que se produz com grande lentidão. Mesmo nas lesões de ratos com 70-90 dias de evolução ainda são observadas granulações AAR., no interior das "células leprosas". Somente 21 dias após a injeção de lepromina verifica-se diminuição numérica dos bacilos e presença de numerosas granulações AAR., nas lesões histológicas do rato. Há evidências histológicas de que o *M. leprae* não é destruído pelo macrófago do rato, uma vez que as formas granulares são encontradas tardiamente e no interior da "célula leprosa".

Apesar do número de bacilos diminuir lenta e progressivamente nas lesões com mais de 21 dias de evolução (revelando destruição bacilar), não se verificam modificações histológicas fundamentais; há apenas alterações involutivas¹³ que culminam com o lento desaparecimento das lesões. A destruição bacilar sem dúvida liberta substâncias constituintes dos bacilos (proteínas, hidratos de carbono e lípidos), as quais não produzem modificações citológicas nem arquiteturas na lesão histológica fundamental. A presença de gotículas sudanófilas nas lesões em involução revela que, para o rato, os lípidos, na forma em que são libertados, não constituem estímulo capaz de suscitar reação granulomatosa.

A "célula leprosa do rato" possui grande atividade atrocitária^{34,18,21,28} mas não parece desempenhar atividade enzimica intensa. A presença de lípidos no interior do seu citoplasma sugere reduzida atividade lipolítica; aliás, foi demonstrado que a atividade lipolítica da "célula leprosa" é idêntica à da célula conjuntiva normal¹², ou mesmo inferior⁶.

No cobaio o estudo histológico da "reação da lepromina" revela, inicialmente, a presença de macrófagos contendo bacilos no citoplasma; à medida que os bacilos tendem a desaparecer do interior da célula, os macrófagos transformam-se em "células pré-epitelióides" e sucessivamente em "células epitelióides"; estas não contêm bacilos e não possuem substâncias coráveis pelo Sudan III.

A transformação do macrófago em "célula epitelióide" prolonga-se até o 21º dia após a injeção da "lepromina"; porém, o método histológico permite verificar diminuição progressiva do número de bacilos nas lesões, desde os primeiros dias de evolução. Essa diminuição é nítida no 6º-9º

dia; após o 24°-27° dia só excepcionalmente são encontrados bacilos. A destruição bacilar é bem mais rápida que a observada no rato e produz-se no interior dos macrófagos, uma vez que a "célula pré-epitelióide" muito raramente contém bacilos, apresentando apenas pequenas massas amorfas de substância levemente AAR..

Em concomitância com a destruição progressiva dos bacilos sobrevém a transformação dos macrófagos em "células epitelióides", sugerindo relação entre os dois fenômenos. Pode-se supor que substâncias oriundas da destruição suscitem essa transformação. O processo ocorreria de modo idêntico ao observado nas culturas de leucócitos ²⁰, ou de fagócitos do tecido subcutâneo ⁴¹, "in vitro", nas quais as células mononucleares a princípio hipertrofiavam-se (macrófagos), fagocitam eritrócitos e detritos celulares e, à medida que "digerem e assimilam" as substâncias fagocitadas, reduzindo-as a pequenas partículas, transformam-se em "células epitelióides".

A lesão granulomatosa verificada no local da "reação da lepromina" em cobaios, parece estar relacionada com a destruição do *M. leprae* pelos macrófagos, do que advêm substâncias cujas propriedades físico-químicas e principalmente químicas, são responsáveis pela transformação epitelióide. Os lípides bacilares podem ser tidos como responsáveis por essa transformação; vários autores ^{32, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52}, etc. demonstraram que os lípides do *M. tuberculosis*, principalmente os fosfátides, produzem, quando injetados nos tecidos de animais, inflamações granulomatosas com células epitelióides e gigantes. De modo idêntico, lípides extraídos do *M. phlei* e da *E. coli* têm a propriedade de suscitar reações histológicas do mesmo tipo ⁴⁰. Os lípides do *M. leprae* são semelhantes aos do *M. tuberculosis*, constituindo, inclusive as ceras ^{11,49}, estímulo capaz de provocar reações inflamatórias com células epitelióides e gigantes.

A generalidade dos trabalhos referentes à inflamação produzida pela injeção de lípides, evidencia que são necessárias doses relativamente grandes para que a reação se manifeste; isto é, as quantidades de lípides capazes de determinar a formação de estruturas granulomatosas (com células epitelióides), precisam ser bem superiores aos lípides contidos em certa porção de bacilos capaz de suscitar a mesma reação ⁴². Apesar de existirem pontos obscuros, não resta dúvida que algumas frações lipídicas, ou seus componentes (fosfátides e principalmente o ácido ftióico ^{37,56} e o ácido ftienóico ¹⁹), constituem estímulos que provocam reações granulomatosas, com todos os elementos citológicos do granuloma tuberculóide (*).

A transformação do macrófago em "célula epitelióide" não parece se dar devido à simples presença das substâncias libertadas no interior do macrófago; a coloração pelo Sudan III revela que a "célula epitelióide" não contém gotículas de lípides. Cunningham & Tompkins ⁴ opinam que

(*) Baseado nesses fatos vários AA. (44, 36, 22, 23) responsabilizam os lípides pela estrutura granulomatosa que caracteriza a reação positiva à "lepromina".

toda vez que substâncias estranhas são introduzidas nos tecidos, de molde a interferirem no metabolismo celular, formam-se "células epitelióides"; estas não constituem uma verdadeira transformação ou diferenciação do macrófago e sim um estado funcional do mesmo ²⁰, com repercussão em sua morfologia; terminado o estímulo algumas células epitelióides podem voltar ao estado de repouso ²⁹. Tudo indica que a formação da "célula epitelióide" está relacionada com intensa atividade funcional, metabólica, cuja finalidade é eliminar os produtos advindos da destruição bacilar.

A "célula epitelióide" apresenta atividade atrocitária relativamente pequena ⁵⁵, mas, possui grande atividade enzimica (fosfatase ácida ⁶², proteíneses ^{60,61}, etc., foram demonstradas) e, portanto, grande capacidade metabólica, uma vez que as enzimas constituem as principais responsáveis pelos processos químicos no interior de qualquer célula viva.

Êsses fatos sugerem que o tipo estrutural da "reação da lepromina" no cobaio, está na dependência da destruição dos bacilos pelo macrófago. mas também, se relaciona com a capacidade do macrófago em se transformar em uma célula dotada de grande atividade metabólica, capaz de desdobrar e eliminar os produtos oriundos da destruição bacilar ("célula epitelióide").

A estrutura histológica da "reação da lepromina" nas duas espécies estudadas apresenta diferenças que se resumem no seguinte: 1) no rato, o macrófago transforma-se na "célula leprosa" que possui grande atividade atrocitária e pequena capacidade metabólica; 2) no cobaio formam-se "células epitelióides" com reduzida função atrocitária e grande atividade metabólica; 3) a diferença fundamental entre os dois tipos de reação decorre, em princípio, da capacidade do macrófago do cobaio em destruir o *M. leprae*, ao contrário do macrófago do rato.

Existem semelhanças morfológicas entre a "célula leprosa do rato" e a "célula epitelióide" do cobaio; porém, a atividade funcional é bastante diferente nesses dois tipos de células, do que se depreende que o conceito funcional de tipo celular deve prevalecer sobre o morfológico.

A injeção de "lepromina" (R. de Mitsuda) feita no homem são, revela que uma minoria (cerca de 30%) reage negativamente, isto é, produz pequena pápula tardia ("reação tardia") inferior a 3 mms. de diâmetro, ou não apresenta a menor reação macroscópica local. Ao contrário, a maioria (cerca de 70%) reage positivamente, produzindo pápula maior que 3 mms.. O estudo histológico do local da injeção demonstra que nos casos negativos há discreta reação por parte dos tecidos, formando-se pequenas lesões com algumas células leprosas contendo bacilos AAR.³³, ou verdadeiras estruturas lepromatosas, com numerosos bacilos ⁵³. Nos casos positivos, todos os autores (desde Mariani ^{26,27}) assinalam a presença de granuloma tuberculóide, com "células epitelióides" e gigantes, sem bacilos.

A estrutura histológica da reação negativa no homem (fotomicrografias 16 e 17), corresponderia, portanto, à observada na resposta do rato à injeção de "lepromina"; há semelhanças morfológicas e principalmente

funcionais dos elementos componentes das lesões. Os bacilos são captados (mas não destruídos) por macrófagos que se transformam em "células leprosas", ricas em bacilos.

Histologicamente, a reação humana positiva identifica-se à produzida pela "lepromina" no cobaio; há destruição ativa do *M. leprae* pelos macrófagos e formação de lesões abacilares, nas quais predominam as "células epitelióides" (fotomicrog. n° 10).

Portanto, subordinado ao critério histológico, a "reação da lepromina" é negativa no rato e positiva no cobaio (em todos os animais observados). Os achados microscópicos correspondem aos resultados macroscópicos no rato, o que não acontece com o cobaio. Esse fato demonstra que pode haver discordância relacionada ao critério de leitura da reação; o estudo histológico da lesão tem significado fundamental, sendo imprescindível na interpretação dos resultados.

Na "reação da lepromina" em cobaios geralmente não há formação de verdadeiros tubérculos; os infiltrados de "células epitelióides" são difusos e evidenciam apenas pequena tendência à disposição nodular. No homem, a reação positiva freqüentemente apresenta estrutura tuberculóide típica (fotomicrog. n° 10). Porém, em ambos, as lesões são formadas pelos mesmos elementos citológicos, que desempenham funções idênticas: destruição dos bacilos e metabolização dos produtos oriundos dos bacilos destruídos. Em ambos é identificável o significado funcional da reação e as diferenças de aspeto morfológico provavelmente estão relacionadas a particularidades das espécies.

O comportamento da espécie humana em face à "lepromina" parece também estar relacionado com a capacidade funcional do macrófago, que lhe confere, ou não, aptidão para destruir o *M. leprae*. Foi demonstrado que nas culturas "in vitro" de "fibroblastos" de lesões tuberculóides de lepra¹⁵, as células destroem os bacilos e são por eles estimuladas; o mesmo não ocorre com as culturas de "fibroblastos" de tecido lepromatoso^{16,17}, cujas células degeneram e libertam os bacilos, sem destruí-los. Analisando-se o que o autor citado denomina "fibroblasto", verifica-se que são elementos dotados de grande atividade fagocitária e atócitaria e destituídos de produção de substância paraplastica (coldgena) são macrófagos fusiformes. Portanto, "in vitro", os macrófagos das lesões tuberculóides conseguem destruir o *M. leprae*, ao contrário do que ocorre com os macrófagos das lesões lepromatosas; quando a "lepromina" é injetada por via intradérmica nessas duas formas de lepra os fenômenos repetem-se, aparecendo estrutura tuberculóide apenas nos casos em que os bacilos são destruídos. Fato idêntico ocorre com o homem am leproso, lepromina positivo.

A "célula epitelióide" humana revela-se muito mais ativa fisiologicamente que a célula leprosa, uma vez que nas lesões tuberculóides geralmente não há lípidos demonstráveis³⁸, ao contrário das lesões lepromato-

sas^{38,39}. A "célula epitelióide" humana identifica-se, funcionalmente, "célula epitelióide" do cobaio.

A primeira vista parece estranho que a espécie humana se comporte de duas formas diversas em face do *M. leprae* ("lepromina"), porquanto, suspensões de outras Mycobacterias (*M. lepraemurium*, *M. tuberculosis*), quando injetadas por via intradérmica, provocam sempre um único tipo de lesão: o granuloma tuberculóide. A explicação deste fato provavelmente relaciona-se com a dificuldade oposta pelo *M. leprae* aos agentes líticos "in vitro" e "in vivo"^{30, 31}; a injeção intradérmica de suspensões de *M. leprae* e de *M. tuberculosis*, no cobaio, revela que o primeiro é destruído muito mais lentamente, permanecendo maior tempo nos tecidos¹⁴. A resistência oferecida pelo bacilo da lepra à lise é, provavelmente, uma propriedade relacionada a fatores químicos e físico-químicos próprios, sendo independente da vitalidade da célula bacteriana. E' provável que, devido a resistência à lise, advenha a incapacidade de destruição do *M. leprae*, manifestada pelos tecidos de cerca de 30% dos homens sãos e pelos casos lepromatosos (*).

Os cobaios utilizados para o estudo da "reação da lepromina" são aparentemente normais, tuberculino-negativos e sem contato anterior com *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis*. A reação positiva observada não parece estar, portanto, relacionada com prévio contato com as referidas Mycobacterias; revela o comportamento dos tecidos do animal aparentemente normal, quando injetados pela primeira vez com o *M. leprae*.

A estrutura granulomatosa, com "células epitelióides", verificada na "reação da lepromina" em cobaios, não parece constituir manifestação primordial da resistência natural, uma vez que tanto o cobaio como o rato são, naturalmente resistentes ao *M. leprae* e apenas o primeiro reage com formação desse tipo de lesão. Também a ausência de estrutura tuberculóide não revela maior resistência natural, ao contrário do que fôra assinalado³⁵. Os dois tipos de reação (o do cobaio e o do rato) estão subordinados a particularidades reacionais dos tecidos, as quais constituem apenas um dos elementos que tomam parte no complexo mecanismo da resistência natural. O caráter da reação relaciona-se com a espécie animal, estando na dependência da capacidade de atuação do macrófago e do elemento que dele se origina.

Na espécie humana a presença dos dois tipos de reação está relacionada a fatores desconhecidos, mas, também, subordinados à função do macrófago e da célula que dele deriva. No caso particular da lepra humana, provavelmente devido a particularidades biológicas especiais do *M. leprae*, a reação formada por "células epitelióides" (reação de Mitsuda positiva), parece desempenhar papel primordial no mecanismo de resis-

(*) O *M. leprae*, ate o momento, e a única Mycobacteria que assim se comporta, em relação aos tecidos humanos, o que confere certo valor bacteriológico a "reação de Mitsuda".

tência natural à lepra, sendo os dois fenômenos identificados por alguns autores. Os dois aspectos estruturais, encontrados respectivamente nas reações positivas e negativas à "lepromina", são fundamentalmente diversos, principalmente no que diz respeito à função dos elementos que os constituem; não são apenas diferenças quantitativas, iguais às relacionadas com os graus de resistência à tuberculose, mas, qualitativas e subordinadas ao mecanismo mediante o qual os tecidos reagem a certas substâncias estranhas nêe introduzidas.

SUMMARY

The "lepromin" contains materials which the body can readily bring into solution (soluble fraction) and it contains still other materials which constitute the insoluble fraction. The principal components of the soluble fraction are the bacillary proteins liberated during the preparation of the "lepromin", which are active in eliciting hypertensive reactions in the sensitized body (early reaction to "lepromin"). The bodies of the *M. leprae* constitute the principal material of the insoluble fraction, which are difficult to bring into the soluble state (necessary for effective elimination) and are responsible for the later reaction to "lepromin".

In guinea-pigs and rats "lepromin reaction" has been considered by some AA., but mainly under macroscopic point of view; about the histopathology of this reaction in these two animal species only a few words were written.

The present paper concerns to the study of the "lepromin reaction" in 174 guinea-pigs and 95 rats, after intra-cutaneous injection of 0.1 ml. of "lepromin" (containing about 0.074 mgms. of *M. leprae*); 130 guinea-pigs and 60 rats were observed under macroscopic point of view: 44 guinea-pigs and 35 rats were studied histologically.

The macroscopic observation of the "lepromin reaction" shows negative results in all guinea-pigs and rats (early and latter reactions).

The microscopic examination of the "lepromin reaction" shows: a) an initial acute phasis (with neutrophyls predominance) less intense in the rat, but of same nature in both animals; b) a latter chronic phasis which show many differences in these two animal species.

In guinea-pig the connective fixed cell (interstitial and peri-vascular cells) is "activated" and change into "fixed macrophage", Which present phagocytic activity to *M. leprae*; the phagocytozed bacilli are destroyed by the latter. After bacillary destruction the macrophage become modified in appearance and undergo the transformation into "pre-epitheloid" and "epitheloid cell". These cells make up a granulomatous structure not typically tuberculoid. Forty days after "lepromin" injection the lesion shows almost complete involution.

The connective fixed cells of the rat are activated and change into macrophages which phagocytose and store the bacilli, without destroying

them; the number of stored bacilli increase and the macrophage undergo the transformation into the "rat leprous cell". These cells show numerous bacilli within and are arranged into nodular lesions which remain until the 90th day, showing very slow involution.

Thus the tissues of normal guinea-pigs and rats have a different behaviour against the insoluble fraction of "lepromin" (*M. leprae*). This different behaviour can be summarized as follows: a) the guinea-pig macrophage has ability to destroy the *M. leprae* undergoing the transformation into a cell with a little atrophic activity, but endowed of high metabolic activity (enzyme production); it is the "epithelioid cell" which produces degradation of the substance liberated by bacillary destruction; b) the rat macrophage, on the other hand, cannot destroy the *M. leprae* and undergo the transformation into the "rat leprous cell" endowed of high atrophic activity, but with a little metabolic capacity.

There are morphologic resemblances between the "rat leprous cell" and the "guinea-pig epithelioid cell", but physiologically they constitute two different and definite types of cells. Thus the idea of these cellular types is almost functional.

The histological picture of negative human "lepromin reaction" agrees with the microscopic reaction in the rat; on the other hand, the histological picture of positive human "lepromin reaction" agrees with the reaction in the guinea-pig. This latter animal shows a macroscopic negative reaction but is histologically positive; the histological examination has greater value regarding the interpretation of results.

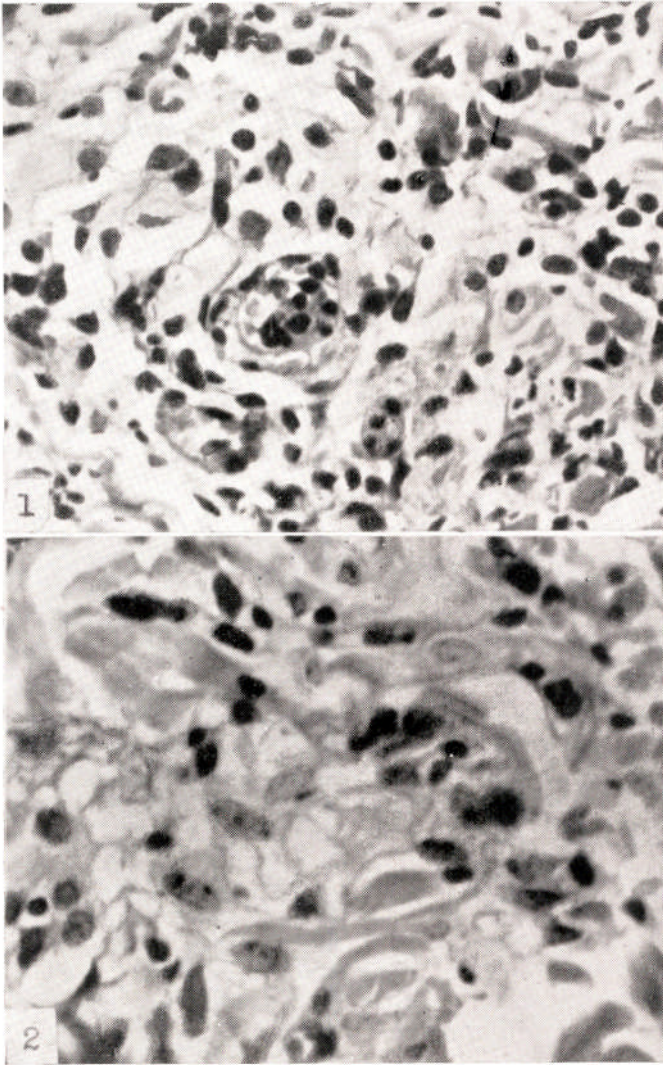
By analogy, we can suppose that in man the positive and negative lepromin reaction are determined by: a) the macrophage ability to destroy or not the *M. leprae*; b) the transformation of the macrophage into a cell type which it is endowed of different degrees of metabolic activity: "epithelioid cell" or "leprous cell".

The resistance exhibited by *M. leprae* to lysis it is probably related with the results of "lepromin reaction" in normal "non contacts" human beings.

The two different types of histological structures presented by the tissues of guinea-pig and rat, do not mean natural resistance degree, since both animals are highly natively resistents to *M. leprae*; the histological structure constitutes only a manner of reaction related with biological properties of normal tissues of these two species.

With respect to the man, the destruction of bacilli and the type of tissue reaction have a great deal in the mechanism of natural resistance against leprosy. By biological properties of the *M. leprae*, the positive lepromin reaction means a high degree of natural resistance against leprosy.

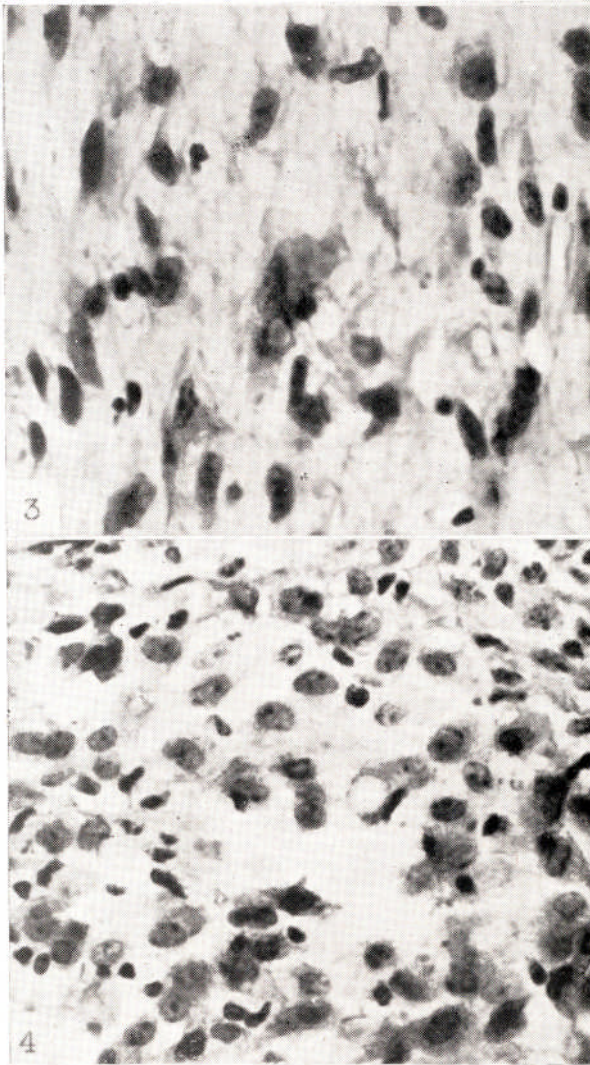
The histological picture of positive lepromin reaction is very different from the negative one; the differences are qualitative and not quantitative, as we can observe in the several degrees of tuberculosis acquired resistance.



Lesões histológicas provocadas pela injeção de "lepromina" no cobaio.

Fotomicrograf. n° 1 — H.E., 320x; "células fixas ativadas" e formação de "macrófagos fixos" a partir da célula adventicial com núcleo

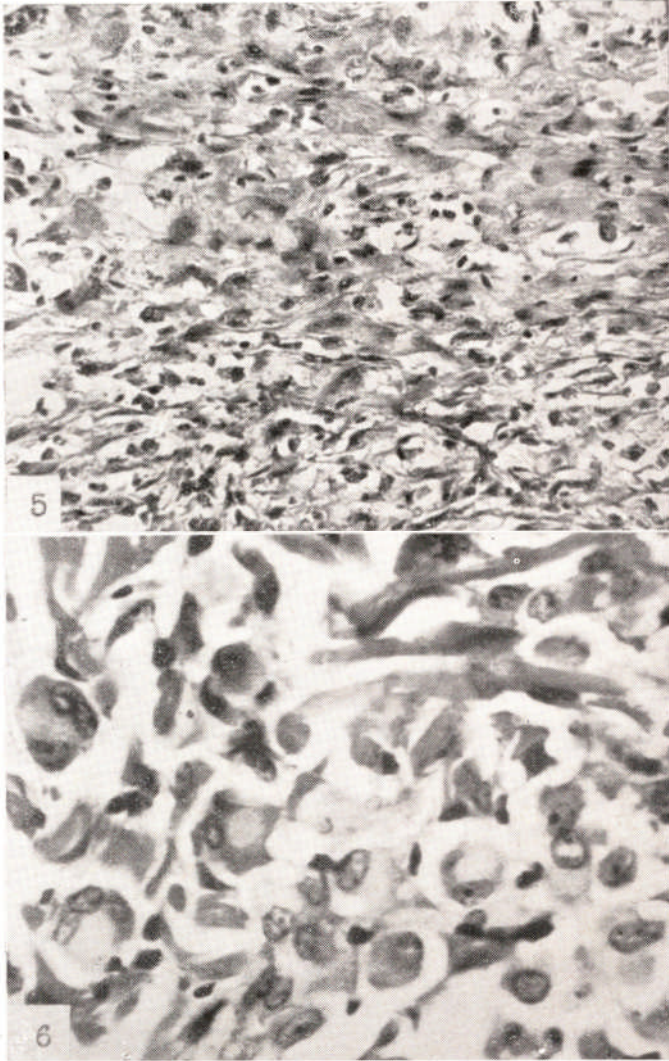
Fotomicrograf. n° 2 — H.E., 500 x; "macrófagos fixos" cujo citoplasma apresenta-se fortemente vacuolizado.



Lesões histológicas provocadas pela injeção de "lepromina" no cobaio.

Fotomicrograf. n° 3 — H.E., 500x; "macrófagos fixos" em transformação "pré-epitelióide".

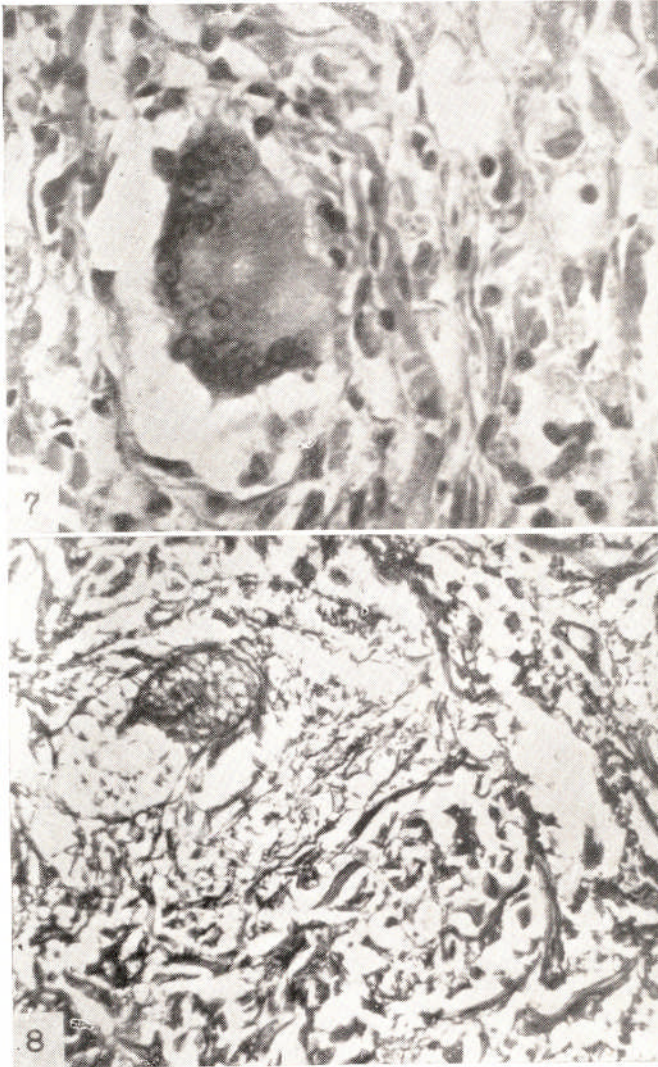
Fotomicrograf. n° 4 — HE., 410x; "células pré-epitelióides".



Lesões histológicas provocadas pela injeção de "lepromina" no cobaio.

Fotomicrograf. n° 5 — H.E., 200x; "células pré-epitelióides" e "células epitelióides".

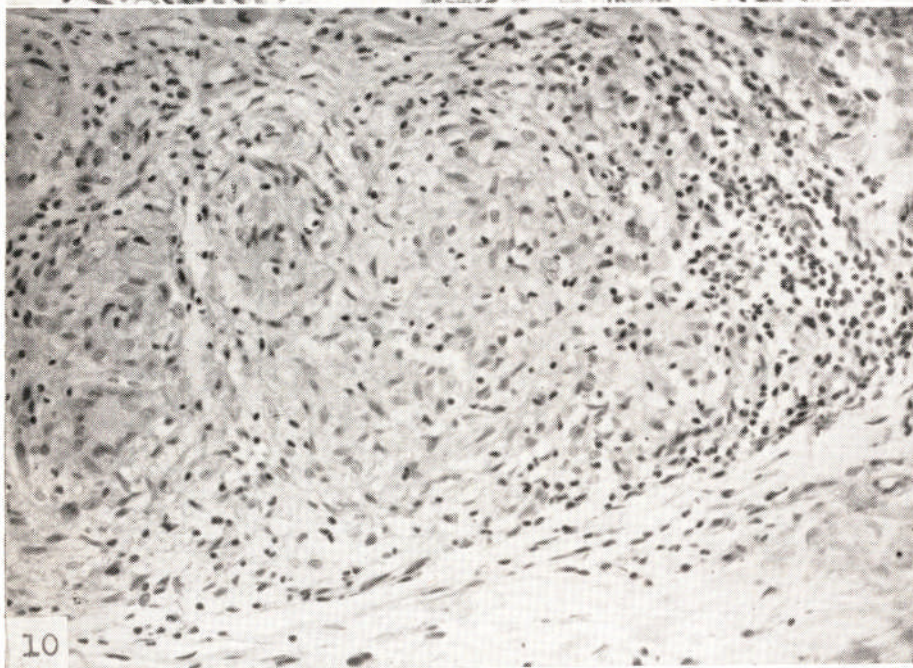
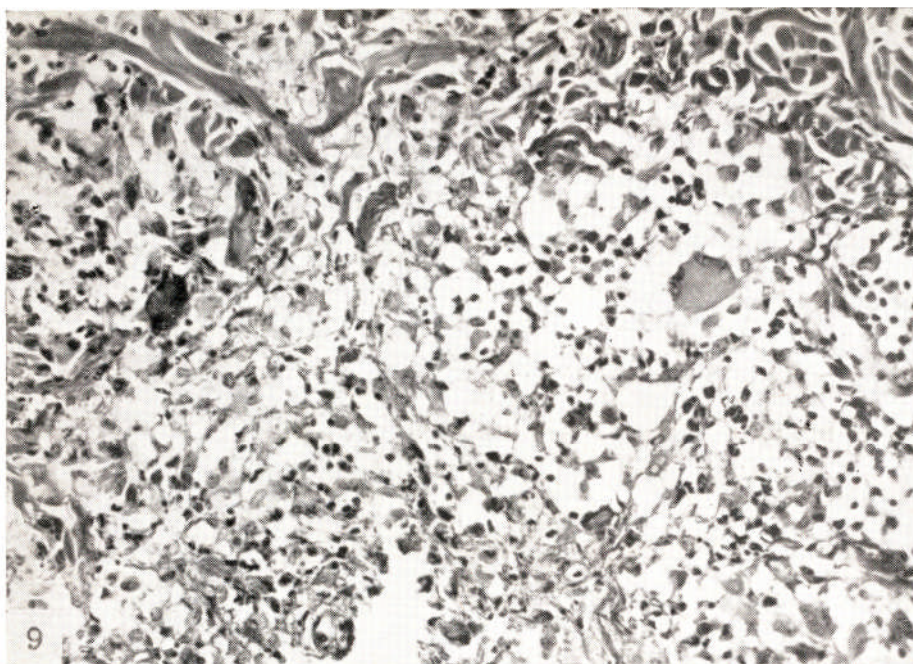
Fotomicrograf. N° 6 — H.E., 410x; "células epitelióides" e pequenas células gigantes (em formação).



Lesões histológicas provocadas pela injeção de "lepromina" no cobaio.

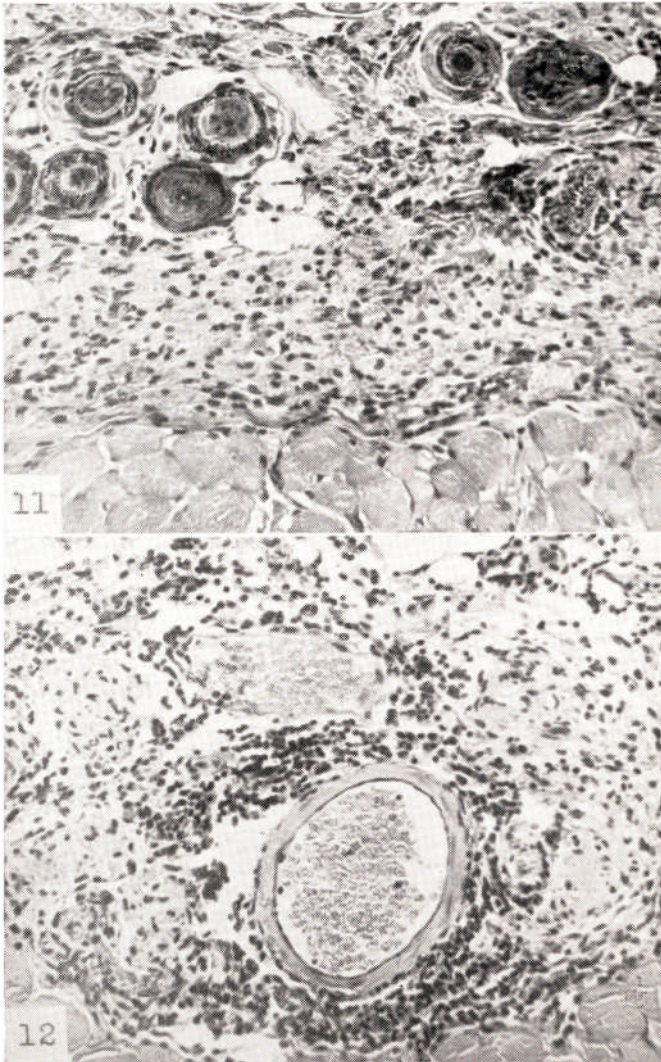
Fotomicrograf. n° 7 — HE., 320x; célula gigante tipo corpo estranho; "células epitelióides" em transformação fibrocítica.

Fotomicrograf. n° 8 — Met. de Gomori, 200x; fibrilas reticulares entre "células pré-epitelióides" e "epitelióides".



Fotomicrograf. n° 9 — HE., 200x; lesão provocada pela injeção da "lepromina" no cobaio; notar a disposição tuberculóide (não freqüente no cobaio) e o polimorfismo dos elementos que constituem a lesão (há macrófagos, "células pré-epitelióides" e "epitelióides", além de células com núcleo linfóide). No centro da lesão célula gigante tipo Langhans.

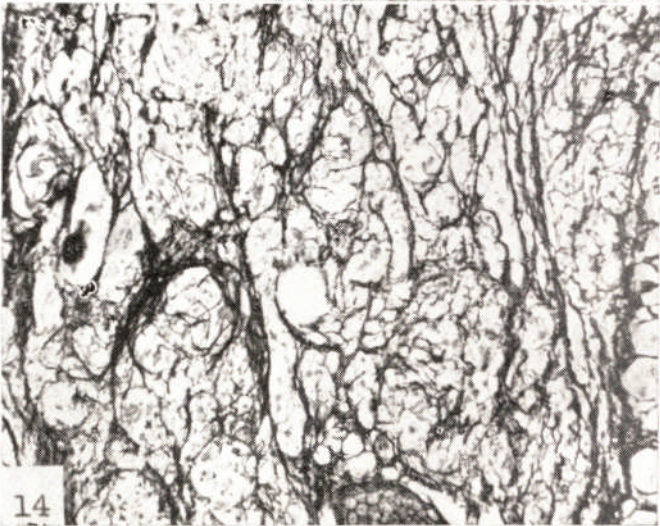
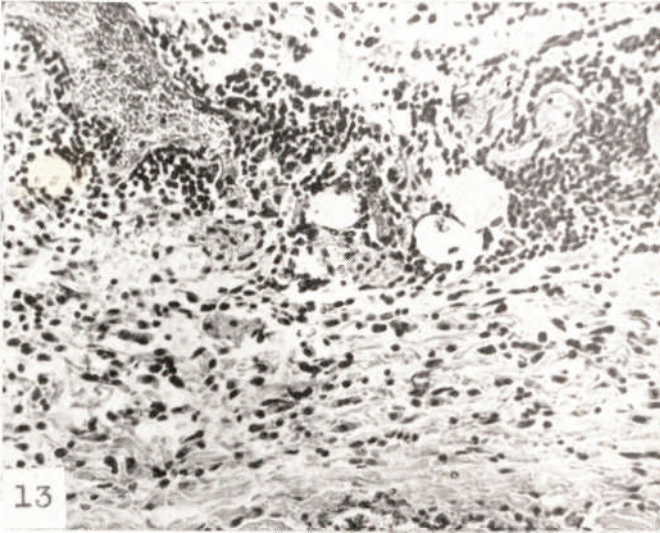
Fotomicrograf. n° 10 — HE., 200x; aspecto da "reação da lepromina" positiva no homem; disposição tuberculóide com predomínio de "células epitelióides"; célula gigante tipo Langhans e esboço de halo linfóide.



Lesões histológicas provocadas pela injeção da "lepromina" no rato.

Fotomicrograf. n° 11 — H.E., 200x; lesão nodular formada por "células leprosas", idêntica às lesões de lepra murina em período de estado.

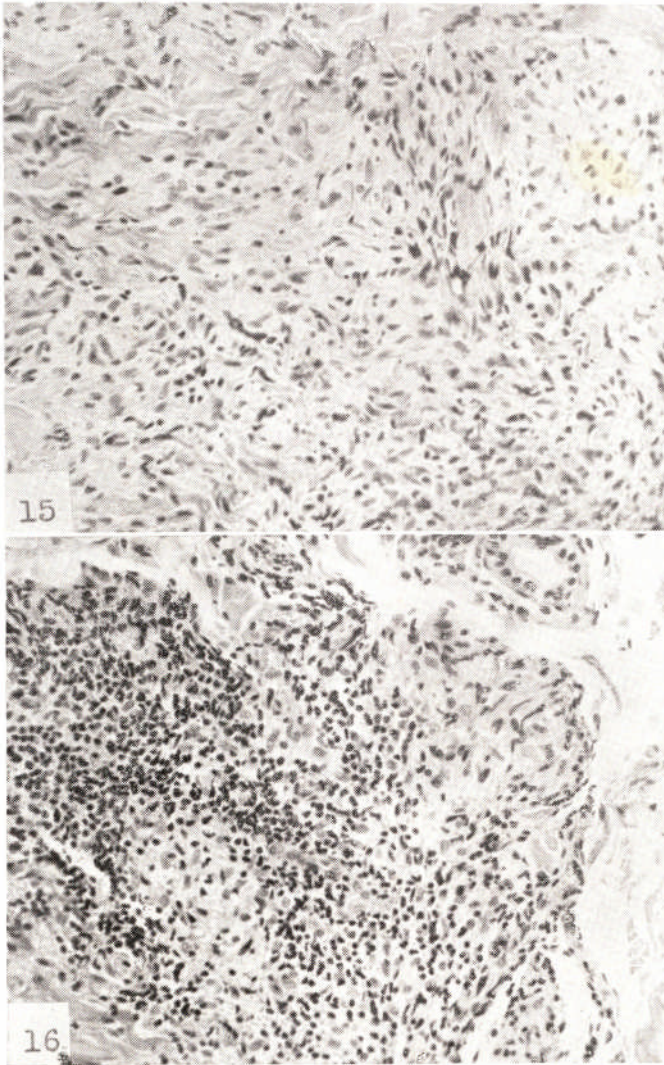
Fotomicrograf. n° 12 — H.E., 200x; lesões com alterações involutivas de intensidade média, separadas entre si por células com núcleo linfóide.



Lesões histológicas provocadas pela injeção da "lepromina" no rato.

Fotomicrograf. n° 13 — H. E., 200x; lesão em período avançado de involução; "células leprosas" dissociadas e presença de fibrócitos.

Fotomicrograf. n° 14 — Mét. de Gomori, 200x; fibrilas reticulares entre as "células leprosas". Lesão em período de estado.



Aspectos histológicos da "reação da lepromina" negativa no homem.

Fotomicrograf. n° 15 — HE., 200x; lesões nodulares formadas por células leprosas; estrutura lepromatosa (bacilos ++).

Fotomicrograf. n° 16 — HE., 200x; lesões nodulares formadas por células leprosas vacuolizadas (em involução), entre as quais há células com núcleo

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 — Barman, J. M. — Ensayo de inoculación de bacilos de Hansen a ratas blancas. *Rev. Med. Rosario* **35**:101, 1945
- 2 — Benewolenskaja, S. W. — Ueber die in-vitro-Reaktion der embryonalen Gewebe und Leukozyten des Menschen auf Leprabazillen. *Arch. exp. Zell-forsch.* **13**:37, 1932
- 3 — Chaussinand, R. — Prémunition relative antilepreuse par la vaccination au BCG. *Rev. Coloniale Méd. Cir.* **21**:170, 1949
- 4 — Cunningham, R. S. & Tompkins, E. H. — The epithelioid cell. *Am. Rev. Tuberc.* **23**:71, 1931
- 5 — Dharmendra — Studies of the lepromin test. IX: A bacillary antigen standardized by weight. *Leprosy in India* **14**:122, 1942
- 6 — Emerson, G. A., Anderson, H. H. & Leake, C. D. — Lipolytic activity of rat tissues in experimental leprosy. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **30**:150, 1932
- 7 — Feldman, W. H., Karlson, A. G. & Grindlay, J. H. — The Mitsuda reaction in dogs from a non-leprous area. *Mem. V Cong. Internat. Lepra, La Habana, 1949*, pág. 621.
- 8 — Feldman, W. H., Karlson, A. G. & Grindlay, J. H. — Mitsuda's reaction, with experimental observations in dogs. *Ann. New York Acad. Sci.* **54**: 53, 1951.
- 9 — Fernandez, J. M. M. — The early reaction induced by lepromin. *Internat. J. Leprosy* **8**:1, 1940
- 10 — Fielding, J. W. — The lepromin test in laboratory animals. *Med. J. Australia* **1**:439, 1944
- 11 — Gerstl, B., Tennant, R. & Pelzman, O. — Cellular reactions to mycolic acids. *Am. J. Path.* **21**:1007, 1945
- 12 — Guillot, C. F. & Manjon, F. — Lipases en la piel normal y en la piel leprosa. *Rev. Argentina Dermatosisif.* **31**:206, 1947.
- 13 — Hadler, W. A. — Estudo histológico das lesões de lepra inurina em involução. *Rev. Brasil. Leprol.* **19**:75, 1951.
- 14 — Hadler, W. A. — Trabalho em publicação.
- 15 — Hanks, J. H. — The fate of leprosy bacilli in fibroblasts cultivated from macular and tuberculoid lesions. *Internat. J. Leprosy* **15**:31, 1947.
- 16 — Hanks, J. H. — A study of the bacilli in tissue cultures of lepromata in serum media. *Internat. J. Leprosy* **15**:21, 1947
- 17 — Hanks, J. H. — The fate of leprosy bacilli fibroblasts cultivated from lepromatous lesions. *Internat. J. Leprosy* **15**:48, 1947
- 18 — Henderson, J. M. — A contribution to the pathology of cutaneous rat leprosy. *Indian J. Med. Res.* **16**:1, 1928
- 19 — Husseini, H. & Elberg, S. — Cellular reactions to plithiogenic acid and related branched-chain acids. *Am. Rev. Tuberc.* **65**:655, 1952
- 20 — Lewis, M. R. & Lewis, W. H. — Transformation of mononuclear blood-cells into macrophages, epithelioid cells and giant cells in hanging-drop blood-cultures from lower vertebrates. *Contr. to embryology, Carnegie Inst Washington* **363**:95, 1926
- 21 — Linhares, H. — Estudo sobre a célula leprosa do rato. *Mem. Inst. "Oswaldo Cruz"* **40**:183, 1944
- 22 — Lopes de Faria, J. — Estudo da reação à lepromina (Mitsuda em cães). *Histopatologia, significatio. Monog. Serv. Nac. Lepra, Rio de Janeiro, 1951*

- 23 — Lopes de Faria, J. — Contribuição ao conhecimento da natureza da reação de Mitsuda. Monog. Serv. Nac. Lepra, Rio de Janeiro, 1953
- 24 — Lyon, M. — Le rat ne reagit pas à la léproline de Mitsuda. Bull. Soc Path. Exot. **32**:134, 1939
- 25 — Manalang, C. — Significance of leprolin reaction in the natural and experimental transmission of leprosy. Month. Bull. Philippine Health Serv. **12**:308, 1932
- 26 — Mariani, G. — Osservazioni sopra una forma speciali di allergic cutanea nella lebra (Lepra tuberculoide sperimentale nell'uomo). Patologica **16**:471, 1924.
- 27 — Mariani, G. — Nuove osservazioni sulle reazioni provocate sperimentalmente con materiali lebbroso nell'uomo. Giorn. Ital. Dermat. Sif. **66**:402, 1925.
- 28 — Mauri, A. C. & Hadler, W. A. — Ação dos colóides eletro-negativos sôbre a evolução da lepra murina. Rev. Brasil. Leprol. **18**:155, 1950
- 29 — Maximaw, A. A. — Tuberculosis of mammalian tissue "in vitro". J. Infect. Dis. **34**:549, 1924
- 30 — Metalnikov, S. — L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles, *Galleria mellonella* Monog. Inst. Pasteur. Masson et Cie., Paris, 1927.
- 31 — Metalnikov, S. & Toumanoff, F. — La lêpre chez les insectes. Compt. rend. Soc. Biol. **89**:935, 1923
- 32 — Morse, P. E. & Stott, E. — Studies of the tissue reactions to various products of the tubercle bacillus. J. Lab. & Clin. Med. **2**:159, 1916
- 33 — Nagai, K. — Histopathologisch Befund nach Anstellung der Mitsuda'schen Reaktion. La Lepra **9** (supl.):26, 1938
- 34 — Oliver, J. — The origin of lepra cell. J. Exp. Med. **43**:233, 1926
- 33 — Pagel, W. — Tubercles and foreign-body granulomata. Experiments in mice and guinea pigs. Am. Rev. Tuberc. **46**:295, 1942
- 36 — Paras, E. M. — Chemical fractination of leprotic nodules. I: Isolation of the lipid fraction. Philippine J. Sci. **66**:155, 1938
- 37 — Raffel, S. — Chemical factors involved in the induction of infectious allergy. Experimentia **6**:410, 1950
- 38 — Rath de Souza, P. & Alayon, F. L. — Sôbre a presença de lipideos nas lesões cutâneas da lepra. Subsidio ao diagnóstico diferencial entre os diferentes tipos de lesão. Rev. Brasil. Leprol. **10**:371, 1942
- 39 — Rath de Souza, P. & Souza Lima, M. — Sôbre o mecanismo de ação terapêutica dos derivados sulfônicos na lepra lepromatnsa. Rev. Brasil. Leprol. **18**:59, 1950
- 40 — Ray, L. W. & Shipman, J. S. — Studies on the biochemistry and chemotherapy of tuberculosis. XXV: Tissue changes produced by the action of the lipins of tubercle, grass and colon bacilli and of liver. Am. Rev. Tuberc. **7**:88, 1923
- 41 — Reeves, D. L. — A study of the in vivo and in vitro behavior of the monocytes of the blood stream and connective tissue. Bull. Johns Hopkins Hosp. **55**:245, 1934
- 42 — Rich, A. R. — The pathogenesis of Tuberculosis. Charles C. Thomas, Springfields, 1951
- 43 — Rodriguez, J. N. — Observation on the leprolin (Mitsuda) reaction. Month Bull. Bur. Health, Manila **17**:389, 1937
- 44 — Rodriguez, J. N. — Observations on the leprolin (Mitsuda) reaction. Internat. J. Leprosy **6**:11, 1938

- 45 — Sabin, F. R. — Cellular reaction to fractions isolated from tubercle bacilli. *Physiol. Rev.* **12**:141, 1932
- 46 — Sabin, F. R. — Cellular reactions to tuberculo-proteins compared with the reaction to tuberculo-lipids. *J. Exp. Med.* **68**:837, 1938
- 47 — Sabin, F. R. — Cellular reactions to fractions from tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* **44**:415, 1941
- 48 — Sabin, F. R., Doan, C. A. & Forkner, C. E. — Studies on tuberculosis. *J. Exp. Med.* **52** (suppl.):1, 1930
- 49 — Sabin, F. R., Smithburn, K. C. & Thomas, R. M. — Cellular reactions to wax-like materials from acid-fast Bacteria. *J. Exp. Med.* **62**:751, 1935
- 50 — Smithburn, K. C. & Sabin, F. R. — The cellular reactions to lipid fractions from acid-fast bacilli. *J. Exp. Med.* **56**:867, 1932
- 51 — Smithburn, K. C. & Sabin, F. R. — The cellular reactions to acetone soluble fat from mycobacteria and streptococci. The effect of neutralization on the biological activity of the tuberculo-lipoid and of the phthioic acid derived from it. *J. Exp. Med.* **61**:771, 1935
- 52 — Smithburn, K. C. & Sabin, F. R. — Reactions of normal and tuberculous animals to tuberculo-protein and tuberculophosphatide. *J. Exp. Med.* **68**: 641, 1938
- 53 — Souza Lima, M. de — O teste de Mitsuda é reação alérgica? *Rev. Brasil. Leprol.* **10**:305, 1942
- 54 — Timofejewsky, A. D. — Explantationsversuche von leprirsens Gewebe. *Arch. Exp. Zellforsch.* **9**:182, 1930
- 55 — Tompkins, E. H. & Cunningham, R. S. — The cell found in tuberculous tissues as demonstrated by vital and supravital staining. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **48**:8, 1931
- 56 — Ungar, J., Coulthard, C. E. & Dickinson, L. — The pathogenic effect of phthioic acid and its synthetic analoges. *Brit. J. Exp. Path.* **29**:322, 1948
- 57 — Wade, H. W. — The lepromin reaction in normal dogs; preliminary report. *Internat. J. Leprosy* **9**:39, 1941
- 58 — Wade, H. W. — Sensitization of dogs by the lepromin reaction. *Mem. V Cong Internat. Lepra, La Habana, 1919*, pág. 617. Ed. Cenit.
- 59 — Watanabe, Y. — Experimental studies on animals concerning leprosy. IV: Allergy and inoculation of lepra materials. *Kitasato Arch. Exp. Med.* **12**: 355, 1935
- 60 — Weiss, C. — Proteinase and peptidase activity of polymorphonuclear leucocytes, monocytes and epithelioid cells of inflammatory exsudates. *Am. Rev. Tuberc.* **39**:228, 1939
- 61 — Weiss, C. & Boyar-Manstein, M. L. — On the mechanism of liquefaction of tubercles. I: The behavior of endocellular proteinases in tubercles develop. ing in the lungs of rabbits. *Am. Rev. Tuberc.* **63**:694, 1951
- 62 — Weiss, L. P. & Fawcett, D. W. — Cytochemical observations on chicken monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture. *J. Histochem. & Cytochem.* **1**:47, 1953
- 63 — Zinsser, H. & Carey, E. G. — A contribution to the study of rat leprosy. *J.A.M.A.* **58**:692, 1912
- 64 — Relatório da Comissão de Classificação da II Conferência Panamericana de Lepra. Rio de Janeiro, 1946. *Imunologia. Arq. Serv. Nac. Lepra* **5**:185, 1947