

## Desenvolvimento de preparado antigênico Mitsuda-símile e sua avaliação em pacientes multibacilares Mitsuda-negativos\* *Development of a Mitsuda-like antigen and its evaluation in multibacillary, Mitsuda-negative leprosy patients\**

Ruy Noronha Miranda<sup>1</sup>  
 Rogério A. Nascimento<sup>4</sup>  
 Ivone T. Dechandt<sup>7</sup>

Luiz Carlos Pereira<sup>2</sup>  
 Sandra L. de Mello<sup>5</sup>

Sérgio Fonseca Tarlé<sup>3</sup>  
 Lismary A. F. Mesquita<sup>6</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, manifesta-se por forma clínica denominada paucibacilar, benigna, Mitsuda-positiva, imunocompetente, e por outra forma, denominada multibacilar, grave, Mitsuda-negativa, imunodeficiente. Doentes multibacilares, eliminadores de bacilos, são considerados os mantenedores da endemia hanseniana.

**OBJETIVOS** - Os autores testaram cultura de micobactérias, obtida em laboratório, em pacientes Mitsuda-negativos, em busca de possível viragem imunológica.

**MÉTODOS** - Com a cultura de micobactérias, foi preparado antígeno mitsudina-símile, que foi testado em 28 hansenianos Mitsuda-negativos, os quais, após avaliação desse teste, foram submetidos a novo teste de Mitsuda. Outros 28 Mitsuda-negativos receberam a inoculação de placebo e, posteriormente, foram avaliados por meio de novo teste de Mitsuda.

**RESULTADOS** - Nos pacientes inoculados com a mitsudina experimental houve respostas favoráveis: em 25 deles reações macroscópicas positivas, em quatro das quais, com granuloma tuberculóide. Avaliados por meio de novo teste de Mitsuda, quatro deles responderam com típicas reações Mitsuda-positivas, com granuloma tuberculóide. Nos pacientes testados com placebo, as respostas foram negativas; a um novo teste de Mitsuda, houve uma resposta positiva.

**CONCLUSÕES** - Em hansenianos Mitsuda-negativos, testados com mitsudina experimental, foram constatadas 14,29% de respostas favoráveis, com reações de Mitsuda-símiles provocadas por essa mitsudina; testados os pacientes, novamente, com o antígeno de Mitsuda, foram constatadas 14,81% de respostas favoráveis, com reações positivas.

**Palavras-chave:** Antígeno de Mitsuda; Hanseníase; Imunidade celular

**Abstract:** *BACKGROUND* - Leprosy, a disease caused by *Mycobacterium leprae*, manifests itself into two clinical forms: the paucibacillary form is benign, Mitsuda positive and immunocompetent; the multibacillary form is severe, Mitsuda negative and immunodeficient. Multibacillary affected individuals, who release bacilli, are postulated to maintain endemic leprosy.

**OBJECTIVES** - The authors used cultivated mycobacteria to test Mitsuda negative patients, with the objective to induce immune conversion.

**METHODS** - A Mitsuda-like antigen was prepared from cultivated mycobacteria and tested in 28 Mitsuda negative leprosy patients. All patients were evaluated and then submitted to a new Mitsuda test. A control group of 28 Mitsuda negative leprosy individuals were inoculated with placebo and later evaluated by a second Mitsuda test.

**RESULTS** - Patients inoculated with the experimental Mitsuda antigen had favorable responses: 25 presented positive macroscopic reactions and four were tuberculoid granuloma. When submitted to a second Mitsuda test, four individuals presented typical positive Mitsuda reactions, with tuberculoid granuloma. Among the control group inoculated with placebo, the responses were negative, and there was one positive response observed for the second Mitsuda test.

**CONCLUSIONS** - In Mitsuda negative leprosy patients tested with an experimental Mitsuda antigen, we observed 14.29% of favorable responses, with Mitsuda-like reactions induced by the experimental Mitsuda antigen. When tested again with the Mitsuda antigen, we observed 14.81% of favorable responses with positive reactions.

**Keywords:** Mitsuda antigen; Leprosy; Cellular immunity

Recebido em 18.11.2003.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 01.06.2005.

\* Trabalho realizado na Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

<sup>1</sup> Prof. Emérito da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Dermatologista e Hansenologista, Pesquisador Titular - Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

<sup>2</sup> Prof. Titular de Dermatologia PUC-PR, Diretor de Ensino e Pesquisa da Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

<sup>3</sup> Prof. Adjunto de Dermatologia, PUC-PR, Hansenologista, Diretor de Assistência Médico-Social da Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

<sup>4</sup> Dermatologista (*in memoriam*).

<sup>5</sup> Dermatologista Cirúrgica, Preceptora da Residência Médica na Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

<sup>6</sup> Patologista da Santa Casa de Curitiba - Curitiba (PR), Brasil.

<sup>7</sup> Bacharel em Ciências Contábeis, Diretora-presidente da Fundação Pró-Hansen - Curitiba, Paraná (PR), Brasil.

## INTRODUÇÃO

Hanseníase é doença infecciosa crônica que afeta globalmente cerca de 550.000 indivíduos por ano.<sup>1</sup> Causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), atinge primariamente a pele e o sistema nervoso periférico.<sup>2</sup> A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou, em meados da década de 1980, uma campanha mundial cujo objetivo era eliminar a hanseníase como problema de saúde pública (incidência < 1/10.000 habitantes) até o ano 2000. No entanto, em 2004, a doença ainda persiste em diversos países, com elevada prevalência, desde 1996.<sup>1</sup> Como não existe reservatório natural conhecido de importância biológica para o *M. leprae* e o tratamento atual, fornecido gratuitamente pela OMS a todos os pacientes, é bastante eficaz na cura da doença, a origem desses novos casos permanece obscura. O Brasil, com 40.000 hansenianos, é o segundo país do mundo em número de doentes, só superado pela Índia.<sup>1</sup>

A manifestação clínica da hanseníase é bastante heterogênea. Segundo o critério clássico de classificação das formas clínicas da doença proposto por Ridley e Jopling,<sup>3</sup> o paciente afetado pode apresentar um espectro de manifestações que varia entre as formas polares tuberculóide - mais branda e localizada - e virchoviana - sistêmica e mais grave. A hanseníase tuberculóide caracteriza-se por presença de poucas lesões de pele, raros bacilos detectáveis em biópsia de pele e nervos, e presença de forte resposta imunológica celular tipo Th1 anti-*M. leprae*. Pacientes com hanseníase virchoviana apresentam numerosas lesões de pele, com presença abundante de bacilos e anergia a antígenos do *M. leprae*.<sup>3</sup> As formas tuberculóide e virchoviana da doença correspondem aos tipos de hanseníase paucibacilar e multibacilar, respectivamente, preconizados pela OMS para fins de orientação terapêutica.

Uma característica que distingue o *M. leprae* de todas as outras bactérias patogênicas à espécie humana é sua inabilidade de crescer em meios de cultura artificiais. Essa característica pode ser analisada hoje sob a luz de dados recentes que indicam marcante redução evolutiva do genoma do *M. leprae*.<sup>4</sup> Comparativamente, enquanto o genoma do *M. tuberculosis* contém mais de 4.000 genes, o do *M. leprae* contém apenas 1.600 seqüências abertas de leitura (*open reading frames*, ORFs) previstas. Essa comparação sugere que o *M. leprae* perdeu cerca de 2.000 genes desde que divergiu evolutivamente a partir de uma micobactéria ancestral comum, resultando em um parasita intracelular obrigatório altamente especializado. A perda de função de genes envolvidos em vias metabólicas cruciais oferece uma tentadora explicação para a impossibilidade de cultivo desse microorganismo.

Miranda e cols. obtiveram o crescimento de microorganismos ácido-álcool-resistentes pela semeadura de linfa cutânea de hansenianos multibacilares em um meio de cultura original.<sup>5</sup> Admite-se que uma cultura de microorganismos é sugestiva de *M. leprae* se provocar, em testes cutâneos, respostas idênticas às provocadas pela mitsudina *standard* na reação clássica de Mitsuda,<sup>6</sup> isto é, respostas positivas nos pacientes paucibacilares (TT) hiperérgicos e negativas nos multibacilares (LL) anérgicos. A utilização de uma mitsudina bacilar experimental tipo Dharmendra,<sup>7</sup> denominada C12-004 e preparada a partir das culturas obtidas por Miranda e cols., provocou forte resposta positiva em pacientes multibacilares não reagentes ao teste de Mitsuda.<sup>8</sup> Esse resultado sugere que a bactéria cultivada não era *M. leprae*. De fato, tipagens das culturas obtidas por Miranda e cols., realizadas no Instituto Adolpho Lutz de São Paulo e em Biomanguinhos, no Rio de Janeiro, concluíram que a micobactéria cultivada era da espécie *M. kansasii*, conforme laudos oficiais expedidos.

Estudos anteriores utilizaram diferentes preparações antigênicas na indução de resposta imune em pacientes hansenianos anérgicos.<sup>6,9,10</sup> As observações dos autores sugerem que uma mitsudina-símile preparada a partir do microorganismo cultivado poderia ser eficiente na indução de resposta imune ao antígeno de Mitsuda. Para testar essa hipótese, foi preparada e inoculada em pacientes hansenianos anérgicos a mitsudina-símile C12-004, sendo seus efeitos de indução de imunidade avaliados por meio de subseqüente teste de Mitsuda.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Pacientes

Cinquenta e seis indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem doenças intercorrentes ou gravidez, portadores de hanseníase e Mitsuda-negativos, em diversas fases de tratamento, foram sendo recrutados randomicamente entre os pacientes em tratamento ambulatorial na Fundação Pró-Hansen. O diagnóstico da doença foi efetuado por experientes hansenologistas com base em critérios clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos (reação de Mitsuda). A classificação dos tipos clínicos da hanseníase foi feita com base nos critérios descritos por Ridley e Jopling.<sup>3</sup> Os pacientes foram reunidos em dois grupos de 28 indivíduos; o primeiro, denominado "experimental", foi submetido à inoculação intradérmica da mitsudina experimental C12-004; o segundo grupo, denominado "controle", foi inoculado com um placebo. Todos os indivíduos recrutados foram instruídos sobre o projeto de pesquisa, sem saber a qual grupo pertenciam, instados a participar do mesmo e, uma vez con-

cordantes, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A execução do projeto foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pró-Hansen.

## 2. Cultura de micobactérias

Conforme descrito,<sup>5</sup> a cultura de micobactérias utilizada no projeto foi obtida em plasma humano de pessoa sadia, no desempenho de uma técnica original. O plasma contido em 20ml de sangue venoso do doador, separado dos elementos figurados do sangue pelo repouso ou centrifugação, foi semeado com linfa bacilífera de paciente multibacilar e mantido em estufa a 34°C, até que, em caso de positividade, houvesse formação do sedimento brancacento, da massa bacilar em crescimento, por volta do quadragésimo quinto dia de incubação. A análise óptica desse sedimento mostrou ser de microorganismos com todos os caracteres morfológicos e tintoriais das micobactérias. O importante é que a análise seqüencial desse sedimento não o reconheceu como *Mycobacterium lepræ*, mas, sim, *M. kansasii*. O repique de sigla 191/39FYA foi selecionado para o preparo da mitsudina experimental, que recebeu o rótulo de C12-004. Essa cultura foi validada mediante o crescimento de seus repiques, em meio caldo-plasma.

## 3. Preparo da mitsudina C12-004

A mitsudina experimental utilizada neste trabalho foi obtida segundo tecnologia do Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI) da Secretaria de Saúde do Paraná, que é credenciado para a produção e o fornecimento do antígeno de Mitsuda e que realizou todas as provas de qualidade da mesma. O conteúdo da cultura 191/39FYA foi transferido para um balão de Erlenmeyer contendo 100ml de meio caldo-plasma, no qual foi homogeneizado por agitação. Quatro alíquotas de 10ml dessa suspensão bacteriana foram distribuídas em tubos de centrifugação e centrifugadas até a separação dos microorganismos. O líquido sobrenadante foi decantado e descartado; o sedimento foi suspenso e lavado em soro fisiológico, e novamente obtido por centrifugação. Esse procedimento foi realizado mais uma vez, e, em seguida, o sedimento foi suspenso em 100ml de solução fisiológica fenicada a 0,5% para a contagem de bacilos, que revelou ser  $17 \times 10^6$  de microorganismos por mililitro. A suspensão foi envasada em frascos tipo penicilina, autoclavados a 120°C durante 20 minutos, sendo submetida às provas de qualificação: dosagem de componentes químicos, esterilidade, inocuidade, reatividade cutânea, teste de necrose na cobaia e pH, todas satisfatórias e emitidas em laudos oficiais. O placebo, participante da experiência, uma solução fisiológica, também foi submetido às provas mencionadas.

## 4. Mitsudina standard

A mitsudina standard utilizada neste estudo foi fornecida gentilmente pelo CPPI do Estado do Paraná.

## 5. Inoculação dos pacientes

Todos os indivíduos do grupo experimental, constatada a negatividade da reação de Mitsuda, foram inoculados intradermicamente na face anterior do antebraço direito com 0,1ml da mitsudina C12-004. Os indivíduos do grupo controle foram inoculados com 0,1ml da solução fisiológica. A leitura dos resultados das inoculações, em ambos os grupos, foi realizada conforme o cronograma da investigação, sendo consideradas positivas macroscopicamente aquelas que responderam com a formação de um tubérculo com 3mm ou mais de diâmetro, biopsiado para confirmação histopatológica. Depois de feita a biópsia excisional das respostas macroscópicas, todos os pacientes, como também os do grupo controle, foram submetidos a um novo teste de Mitsuda.

## 6. Análise estatística

Diferenças entre a proporção de indivíduos dos grupos experimental e controle que apresentaram resposta positiva à inoculação intradérmica com mitsudina standard posterior à exposição à mitsudina experimental C12-004 foram estimadas utilizando-se o Teste Exato de Fisher.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos nos 28 pacientes do grupo experimental estão apresentados na tabela 1. Vinte e cinco pacientes (89,28%) apresentaram reação macroscópica positiva à mitsudina experimental C12-004 (Figura 1); quatro (pacientes 6, 13, 24 e 27), ou 14,29%, apresentaram imagens histopatológicas tuberculóides Mitsuda-símiles (Figura 2); oito, pacientes (1, 5, 7, 10, 11, 14, 15 e 25) apresentaram respostas histopatológicas contendo células epitelióides ou gigantes (componentes da reação de Mitsuda positiva; figuras 3 e 4); em 11 pacientes (5, 6, 12, 13, 14, 15, 18, 21, 24, 26 e 27) verificou-se ausência de microorganismos na amostra histopatológica. Na seqüência, 27 pacientes do grupo experimental foram submetidos a nova prova de Mitsuda. Desses, quatro (14, 81%) responderam com reações de Mitsuda positivas (Figura 5); em outros dois pacientes (01 e 13), que também exibiram resposta macroscópica positiva, a análise histopatológica não mostrou a formação de granuloma tuberculóide, e, por isso, foram consideradas falsas reações de Mitsuda (Figura 6). Alguns pacientes que responderam macroscopicamente à inoculação da Mitsudina C12-004 mostraram respostas histopatológicas dis-

TABELA 1: Resultados obtidos no grupo experimental

Nº	Nome	Idade	Sexo	Forma clínica	Reação de Mitsuda	Mitsudina C12-004			Segunda reação de Mitsuda			Estados reacionais	Observações
						Macro	Histop	Bacilos	Macro	Histop	Bacilos		
01	BN	29	M	LL	0	+	BT	+	LL	+	Sim	Falsa reação de Mitsuda	
02	JNS	35	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Não		
03	RK	63	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Sim		
04	HJP	35	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Não	Fora de controle	
05	JMS	66	M	LL	0	+	BT	0	TT	0	Sim	Resposta favorável	
06	MAC	29	M	LL	0	+	TT	0	0	0	Sim		
07	OA	55	M	LL	0	+	BT	+	0	0	Sim		
08	ACH	55	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Sim		
09	DGF	59	M	LL	0	0	0	0	0	0	Não		
10	ACN	18	M	LL	0	+	BT	+	0	0	Sim		
11	MLO	46	M	LL	0	+	BT	+	0	0	Sim		
12	JCS	31	M	LL	0	+	I	0	0	0	Sim		
13	GD	56	M	BB	0	+	TT	0	I	0	Não	Falsa reação de Mitsuda	
14	SSK	42	M	LL	0	+	BT	0	0	0	Não		
15	RM	36	F	LL	0	+	BT	0	0	0	Não		
16	VLP	53	M	LL	0	+	I	+	0	0	Não		
17	PS	75	M	LL	0	+	I	+	0	0	Não		
18	CSC	46	F	LL	0	+	I	0	0	0	Sim		
19	RCF	28	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Sim		
20	SAM	21	M	LL	0	+	LL	+	0	0	Sim		
21	JSM	59	M	LL	0	+	I	0	TT	0	Não	Resposta favorável	
22	DMC	30	F	LL	0	+	LL	+	0	0	Não		
23	IB	61	M	LL	0	+	I	+	0	0	Não		
24	JAR	48	M	LL	0	+	TT	0	0	0	Sim		
25	RB NS	39	F	LL	0	+	BT	+	0	0	Não		
26	FK	58	M	I	0	+	I	0	TT	0	Não	Resposta favorável	
27	LAK	49	M	I	0	+	TT	0	TT	0	Não	Resposta favorável	
28	JO	56	M	I	0	0	0	0	0	0	Sim		

LL - multibacilar ou estrutura virchowiana

TT - tuberculóide ou estrutura granulomatosa

I - forma clínica ou estrutura indeterminada

BT e BB - imagem histopatológica TT e LL combinadas



FIGURA 1: Resposta à mitsudina C12-004, aos 25 dias

cordantes: virchowiana (LL), paciente 04 (Figura 7); indeterminada (I), paciente 12 (Figura 8) (HE x 400).<sup>11</sup>

Os pacientes do grupo controle, inoculados com o placebo, não forneceram respostas positivas à inoculação. Quando submetidos a subsequente teste de Mitsuda, apenas um deles apresentou resposta macroscópica positiva, que não foi analisada histopatologicamente. Não foi constatada diferença estatística significativa quando comparados os números de indivíduos de ambos os grupos que apresentaram reação de Mitsuda positiva posterior à inoculação da mitsudina C12-004 ou do placebo ( $P = 0,351$ ).

O permanente acompanhamento clínico dos pacientes, durante a execução da pesquisa, não evidenciou modificações significativas no curso próprio

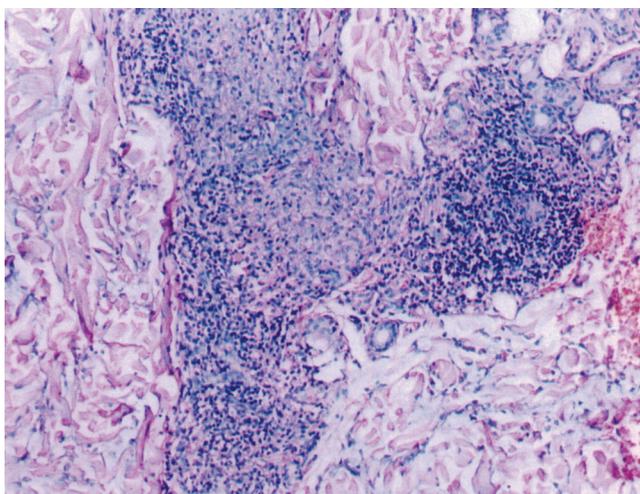


FIGURA 2: Resposta granulomatosa à mitsudina C12-004, aos 45 dias (HEx100)

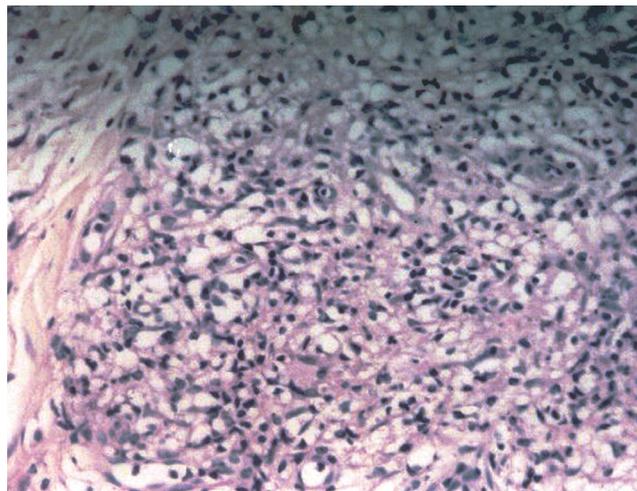


FIGURA 3: Resposta tardia à mitsudina C12-004, imagens virchowianas e tuberculóides, BT (HEx100)

da doença. Todos os pacientes prosseguiram com o tratamento poliquimioterápico (PQT). Os surtos reacionais da hanseníase, tipos I e II, manifestaram-se como é próprio dessa doença, durante o curso do Projeto, na população do grupo experimental (48,14%) e na do grupo controle (51,85%).

#### DISCUSSÃO

A intradermorreação de Mitsuda é teste usado na avaliação do tipo de resposta imune contra *M. leprae* apresentado por um indivíduo.<sup>2</sup> O resultado da reação de Mitsuda em pessoas sadias tem valor preditivo quanto ao tipo de manifestação clínica da doença a ser apresentada pelo paciente. Reação de Mitsuda positiva indica intensa resposta imune celu-

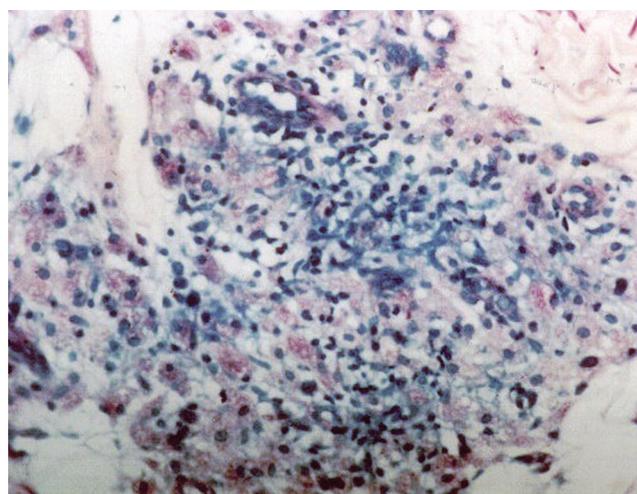


FIGURA 4: Resposta tardia à mitsudina C12-004, imagens virchowianas e tuberculóides, BT (HEx100)

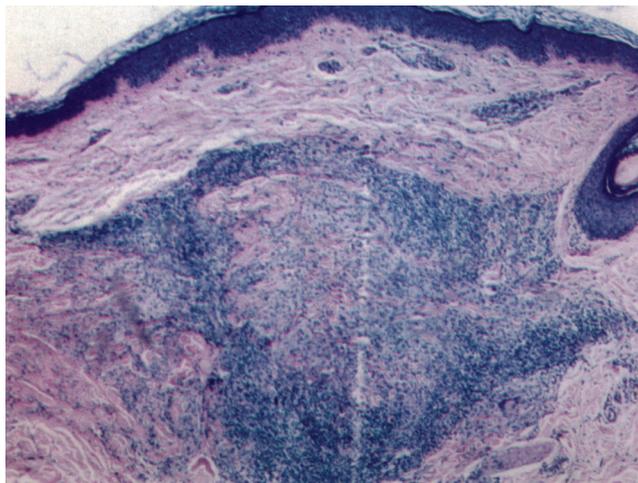


FIGURA 5: Reação de Mitsuda positiva induzida pela mitsudina C12-004 (HEX100)

lar, tipo Th1, e está associada a baixo risco de desenvolvimento da forma virchowiana da doença. Por outro lado, uma reação de Mitsuda negativa indica resposta imune predominantemente humoral, tipo Th2, e alto risco de manifestação da forma sistêmica, multibacilar da hanseníase.<sup>12,15</sup> Nesse contexto, considera-se válido procurar induzir imunidade celular específica contra o *Mycobacterium lepræ* no hanseniano anérgico (multibacilar, LL). A indução da positividade do teste de Mitsuda tem sido obtida pela exposição do doente anérgico a antígenos que não o *M. lepræ*. Na presente investigação, uma mitsudina experimental (C12-004) foi elaborada a partir de cultura de *Mycobacterium kansasii*, obtida de lesões cutâneas de portador de hanseníase multibacilar. A obtenção de cultura de micobactéria que não o *M.*

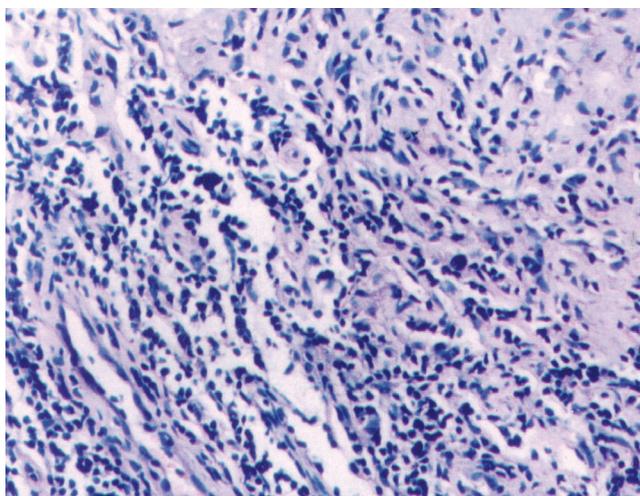


FIGURA 6: Estrutura histopatológica de uma falsa reação de Mitsuda (HEXx400)

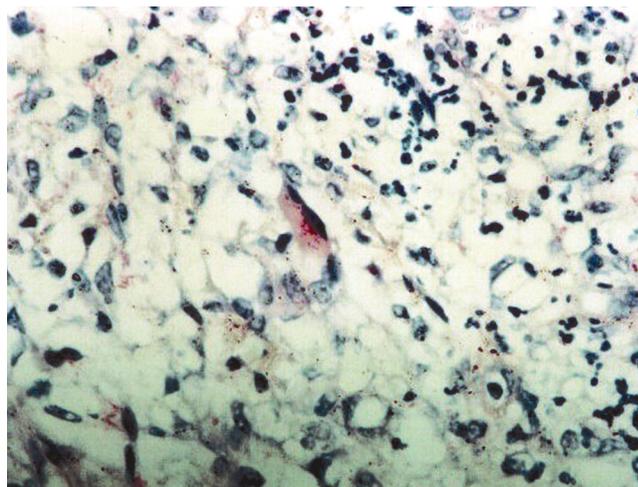


FIGURA 7: Resposta virchowiana (LL) em reação macroscópica positiva à inoculação da mitsudina C12-004 (Zihelx400)

*lepræ* a partir de lesão de paciente hanseniano multibacilar assemelha-se a achados de outros autores, conforme descrito por Cochrane<sup>14</sup> e, mais recentemente, por Chakrabarty.<sup>6</sup> A mitsudina C12-004, quando inoculada intradermicamente em pacientes anérgicos, promoveu resposta imune celular específica em 14,29% da população estudada. Esse resultado sugere capacidade de indução de imunidade celular com antígenos presentes na própria mitsudina C12-004. Foi evidenciada a viragem imunológica em quatro dos 27 pacientes submetidos a uma nova exposição a antígenos específicos do *M. lepræ*, isto é, em 14,81% da população estudada, que apresentaram reação de Mitsuda clássica positiva. Apenas um paciente apresentou coincidência de resultados positivos obtidos com a mitsudina C12-004 e a mitsudina *standard*. Merecem atenção outros resultados da

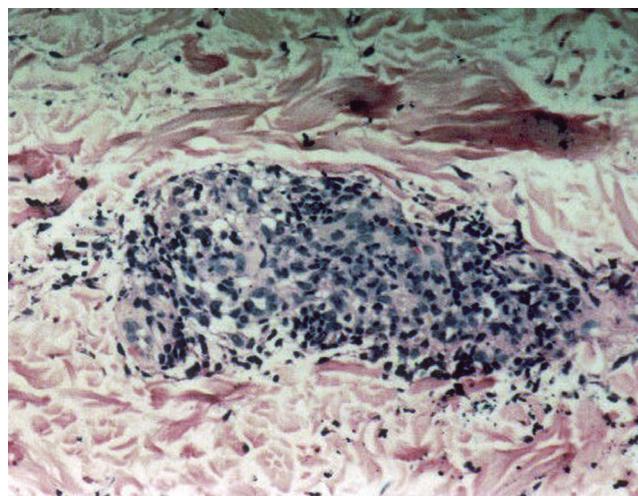


FIGURA 8: Resposta indeterminada (I) em reação macroscópica positiva à inoculação da mitsudina C12-004 (HEX400)

análise histopatológica obtidos com a inoculação da própria mitsudina experimental, quais sejam, resposta parcial tuberculóide em oito pacientes e ausência dos bacilos inoculados com a mitsudina experimental em 11 pacientes. As observações dos autores indicam ainda a ocorrência de duas falsas reações de Mitsuda, constatadas na prova final, caracterizadas pela não-correspondência de granuloma tuberculóide a uma resposta macroscópica positiva. Os 28 pacientes do grupo controle não mostraram qualquer resposta à inoculação do placebo. Quando testados por meio de um segundo teste de Mitsuda, apenas um paciente respondeu macroscopicamente, não tendo sido essa resposta avaliada em exame histopatológico. A ausência de significância estatística ( $P = 0.351$ ) para a diferença entre o número de indivíduos que apresentaram reação de Mitsuda positiva (1/28) é provavelmente devida ao pequeno número da população testada e sugere a replicação dos resultados em uma amostra ampliada.

Não foi interrompido o tratamento específico dos doentes durante o curso dos experimentos. A ocorrência de surtos reacionais em 48,14% dos pacientes do grupo experimental e 51,85% do grupo controle obrigou-os ao uso de corticóides e talidomida, o que pode ter influído negativamente nos resultados, devido à ação imunomodadora dessas drogas.

## CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente projeto permitiu constatar que foi possível obter indícios de imunidade celular em hansenianos multibacilares, Mitsuda-negativos, por meio de injeção intradérmica de uma

mitsudina bacilar preparada com cultura de micobactérias que não o *Mycobacterium leprae*.

A própria mitsudina experimental provocou reações positivas Mitsuda-símiles em quatro (14,29%) de 28 pacientes testados. Um posterior teste de Mitsuda clássico respondeu, em outros quatro de 27 (14,81%), com reações de Mitsuda positivas.

Admite-se que a porcentagem de respostas favoráveis poderia ser mais elevada se a concentração de microorganismos na mitsudina experimental fosse superior a 17 milhões de microorganismos por mililitro.

A presença de células epitelióides e gigantes nos exames histopatológicos de respostas macroscópicas à mitsudina experimental, consignadas como BT na tabela, em oito pacientes, foi interpretada como uma tentativa dos respectivos organismos em desenvolver imunidade celular. A não-coincidência do padrão das respostas histopatológicas aos dois antígenos, mitsudina experimental e *standard*, faz admitir que o estímulo antigênico difere entre os mesmos. As respostas em que não foram vistas as bactérias injetadas com a mitsudina experimental sugerem que os respectivos organismos adquiram a capacidade de lisar as bactérias.

A inoculação de placebo em 28 outros pacientes de um grupo chamado "controle", não produziu respostas, e uma segunda testagem com a mitsudina *standard* forneceu resposta macroscópica positiva em um paciente.

Não houve, nos dois grupos de pacientes, modificações apreciáveis no curso de suas doenças, sofrendo eles as costumeiras reações hansenianas nas freqüências conhecidas. □

## AGRADECIMENTOS

Os autores não poderiam ter realizado os trabalhos do presente Projeto sem o valioso apoio das seguintes entidades, às quais são imensamente gratos: à Diretoria da Fundação Pró-Hansen, na qual tiveram curso os trabalhos; ao CEP da Fundação Pró-Hansen, por ter autorizado a execução do Projeto e emitido os pareceres relativos a seus oito relatórios trimestrais; ao CPPI do Paraná, pelo fornecimento da mitsudina *standard* e o preparo da mitsu-

dina C12-004; ao laboratório da Santa Casa de Curitiba, pela realização dos exames e fotografias histopatológicos; à Conep do MS, por ter acolhido todos os oito relatórios trimestrais referentes ao Projeto; aos pacientes submetidos às provas, por seu espírito de colaboração. Um especial agradecimento ao professor Marcelo Távora Mira, por ter procedido a revisão do texto.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leprosy - global situation. *Weekly Epidemiological Record*. 2000;75:226-31.
2. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet*. 1999; 353:655-60.
3. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966; 34:255-73.
4. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 409:1007-11.
5. Miranda RN, Sounis ELM, Emmel Th, Dechandt HS, Miranda RPG, Dechandt IT. Cultivo de micobactérias em plasma humano. *An Bras Dermatol*. 1989; 64: 291-6.
6. Chakrabarty AN, Dastidar SG, Chandra AK, Mukherjee M, Chaudhuri SK. A comparative study on the Mitsuda type response to antigens of chemoautotrophic nocardioform bacteria and to standard lepromin in leprosy patients. *Acta Leprologica*. 1999; 11: 105-12.
7. Dharmendra. Studies of the lepromin test (9) a bacillary antigen. *Lepr India*. 1942; 122-9.
8. Miranda RN, Pereira CAZ, Filus Neto J, Dechandt IT. Resultados da inoculação intradérmica em hansenianos de uma suspensão de micobactérias cultivadas *An Bras Dermatol*. 1991; 66: 277-84.
9. Convit J, Aranzazu N, Pinardi ME, Ulrich M. Immunological changes observed in indetermined and lepromatous leprosy patients and Mitsuda negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Immunol*. 1979; 36: 214-20.
10. Talvar GP. Towards development of a vaccine against leprosy. *Lepr India*. 1978; 50: 492-7.
11. Perri AJ 3rd, Hsu S. A review of thalidomide's history and current dermatological applications. *Dermatol Online J*. 2003; 9:5.
12. Lastoria JC, Opromolla DV, Fleury RN, Habermann F, Curi PR. Serial Mitsuda tests for identification of reactional tuberculoid and reactional borderline leprosy forms. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1998; 66:190-200.
13. Godal T. Immunological aspects of leprosy-present status. *Prog Allergy* 1978; 25:211-42.
14. Cochrane RG. *Leprosy in theory and practice*. Bristol: John Wrigth & Sons; 1959. p.12-4.

---

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

*Fundação Pró-Hansen  
Fernando Amaro, 1116  
80050-020 - Curitiba - PR  
Tel./Fax: (41) 3263-2757  
E-mail: fprobansen@onda.com.br*