

Genética e hanseníase*

Genetics and leprosy

Bernardo Beiguelman¹

Abstract *The different research lines explored to investigate the importance of inherited human factors in determining resistance/susceptibility to the infection provoked by Mycobacterium leprae have been discussed in the present paper. A synthesis of these approaches allowed us to analyze the results of the investigations on the association of leprosy to genetic polymorphisms, familial distribution of leprosy, prevalence of leprosy and genetic distance, concordance rate of leprosy among twins, and genetic studies on Mitsuda reaction.*

Key words *Leprosy, Genetics, Infectious diseases*

Resumo *As diferentes linhas de pesquisa utilizadas para investigar a importância dos fatores hereditários humanos na determinação da resistência/suscetibilidade à infecção pelo Mycobacterium leprae foram discutidas no presente trabalho. Uma síntese dessas abordagens permitiu analisar os resultados das investigações sobre associação da hanseníase com polimorfismos genéticos, distribuição familiar da hanseníase, prevalência da hanseníase e distância genética, concordância da hanseníase em gêmeos e estudos genéticos sobre a reação de Mitsuda.*

Palavras-chave *Hanseníase, Genética, Moléstias infecciosas*

* Trabalho realizado com apoio do CNPq.
¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1.374, 05508-900 São Paulo, SP. bbeiguel@uol.com.br

Introdução

A hanseníase, designação adotada no Brasil para a lepra, é uma moléstia infecciosa crônica provocada pelo bacilo álcool-ácido-resistente (a.a.r.) e Gram-positivo, classificado como *Mycobacterium leprae*. Por ter sido descrito por Hansen em 1874, o *M. leprae* também é conhecido como bacilo de Hansen.

A hanseníase não é uma doença monomórfica porque, se a infecção pelo *M. leprae* tiver êxito, o cortejo fisiopatológico variará segundo diferentes padrões que, de acordo com o sistema de classificação seguido no Brasil, são quatro: virchowiano (antigamente denominado lepromatoso), tuberculóide, indeterminado e dimorfo. A hanseníase virchowiana e a tuberculóide são consideradas tipos, enquanto que a hanseníase indeterminada e a dimorfa são aceitas como grupos. Essas designações foram adotadas para que a palavra tipo indicasse as formas estáveis, isto é, aquelas nas quais o padrão de hanseníase não muda, e para que a palavra grupo indicasse as formas clínicas instáveis, ou seja, aquelas cujo padrão de hanseníase pode mudar.

Os tipos de hanseníase virchowiana e tuberculóide são também denominados tipos polares por se comportarem antiteticamente no que diz respeito à resistência tecidual à infecção pelo *M. leprae*. De fato, os macrófagos dos pacientes com hanseníase tuberculóide são capazes de destruir os bacilos de Hansen que fagocitam, impedindo, assim, a sua proliferação, enquanto que os macrófagos dos pacientes virchowianos não são capazes de digerir-los, o que propicia a sua sobrevivência e multiplicação no interior desses fagócitos, os quais, desse modo, se transformam em células de Virchow, repletas de bacilos a.a.r. e de gotas de gordura. Nos pacientes tuberculóides, os macrófagos, após a destruição dos bacilos fagocitados, adquirem o aspecto de células epitelióides, sendo suas lesões infiltrados do tipo sarcóide ou folicular, onde os bacilos a.a.r. são, regra geral, muito raros ou não detectados ao microscópio. Em oposição, as lesões de pacientes com hanseníase virchowiana são infiltrados, nos quais predominam as células de Virchow. É por essa razão que, se os pacientes virchowianos não forem tratados adequadamente, eles apresentarão piora progressiva e oferecerão risco de contágio, enquanto que as lesões tuberculóides poderão até apresentar regressão espontânea.

O grupo dimorfo é composto por pacientes que se situam na área interpolar, pois não podem

ser classificados em um dos tipos polares de hanseníase. Tais pacientes apresentam lesões com estruturas tanto da hanseníase virchowiana quanto da tuberculóide em reação. Certos pacientes dimorfos, que manifestam episódios reacionais sucessivos, podem sofrer alterações que os aproximam do pólo virchowiano. São eles os responsáveis pelo conceito de instabilidade atribuído aos doentes dimorfos, ou seja, por eles serem considerados um grupo. Opromolla (1981), porém, afirma que essas alterações não constituem transformações definitivas, porque se os dimorfos transformados em virchowianos são curados e, depois, recidivam, eles tornarão a exibir lesões dimorfas. De acordo com Opromolla (1981), portanto, os pacientes dimorfos deveriam constituir um tipo e não um grupo de hanseníase.

O grupo indeterminado inclui os pacientes que apresentam as manifestações iniciais da infecção pelo *M. leprae*. Suas lesões são infiltrados inflamatórios simples, em que os bacilos a.a.r. são raros ou não detectados ao microscópio, e, por essa razão, do ponto de vista epidemiológico, a hanseníase indeterminada é considerada benigna, do mesmo modo que o tipo tuberculóide dessa doença. A hanseníase indeterminada é instável, pois os pacientes que a manifestam podem permanecer nesse grupo ou evoluir para um dos tipos polares ou, ainda, passar para o grupo dimorfo. Em decorrência dessa instabilidade, a designação hanseníase indiferenciada, proposta por Rabello (1976) para esse grupo, parece mais adequada do que a denominação consagrada pelo uso.

A identificação do *Mycobacterium leprae* como agente etiológico da hanseníase teve como corolário a pronta rejeição da teoria da transmissão hereditária dessa moléstia, que era, até a descoberta de Hansen (1874), sustentada por importantes estudiosos do século 19, como Danielssen e Boeck (1848). A descoberta do agente patogênico da hanseníase, entretanto, não afetou a aceitação, baseada em dados empíricos, de que a infecção pelo *M. leprae* e as manifestações dela decorrentes dependem muito da predisposição individual, que os clínicos antigos denominavam terreno. Por outro lado, tendo em mente que toda manifestação fenotípica depende da participação de alguma entidade genética, estava subentendido, também, que esse grau de predisposição individual à infecção pelo *M. leprae* deveria estar na dependência de fatores hereditários do hospedeiro.

Apesar disso e de alguns autores como Rotberg (1937), no Brasil; e Tolentino (1938), Ay-

cock & McKinley (1938) e Aycock (1940), na década de 1930, chamarem a atenção para a necessidade da pesquisa genética na hanseníase, ela somente foi iniciada de modo sistemático e com grande intensidade, aqui no país, na década de 1960 (Beiguelman, 1962a, b, 1963a, b, 1964a-c, 1965, 1967, 1968; Beiguelman & Marques, 1964; Beiguelman & Quagliato, 1964, 1965; Beiguelman & Barbieri, 1965; Beiguelman *et al.*, 1965a, b, 1967, 1968a-c; Salzano & Hirschfeld, 1965; Salzano, 1967; Salzano *et al.*, 1967; Pinto Jr. & Beiguelman, 1967). Na mesma década, independentemente dos pesquisadores brasileiros, Spickett (1962a, b), na Inglaterra, também começou a estudar a hanseníase sob o enfoque genético. Infelizmente, as pesquisas desse promissor geneticista foram interrompidas por seu falecimento muito precoce.

Na década de 1960, porém, a genética carecia de uma metodologia para investigar a participação do componente genético humano na manifestação de doenças infecciosas, já que, nesse período, as pesquisas genéticas no campo médico estavam voltadas, primordialmente, para as doenças constitucionais e degenerativas. Essa situação contribuiu, evidentemente, para que as investigações feitas com o propósito de avaliar a contribuição genotípica humana na determinação da suscetibilidade à infecção hanseníase não perseguissem uma linha única de pesquisa, mas empregassem, tentativamente, uma gama variada de abordagens, as quais serão comentadas, em seguida.

Polimorfismos genéticos

Dentre as várias linhas abordadas, a investigação de polimorfismos genéticos em hansenianos recebeu, inicialmente, muita atenção, tendo sido analisados cerca de quarenta sistemas polimórficos, na esperança de encontrar associação significativa entre a hanseníase e algum marcador genético. Esses sistemas, por ordem alfabética, foram os seguintes: acetilação da diaminodifenilsulfona, adenilatocinase, antígenos Gm, antígenos HLA, alfa-1-antitripsina, beta-2-glicoproteína 1, beta-lipoproteína Ag, C3 (componente do complemento), ceruloplasmina, desaminase de adenosina, desidrogenase de 6-fosfato de glicose, desidrogenase de 6-fogluconato, desidrogenase láctica, esterase D, fator properdina B, fosfatase ácida, glioxalase, fosfoglicomutases 1, 2 e 3, haptoglobinas, hemoglobina S, NADH redutase de metemoglo-

bina, proteína grupo-específica (grupos Gc), pseudocolinesterase, reação gustativa à feniltiouréia, secreção de substâncias ABH, sistemas sanguíneos ABO, Diego, Duffy, Kell, Kidd, Lewis, MNSs, Rh, talassemia beta, transaminase glutâmica pirúvica e transferrinas (para referências vide Beiguelman, 1983).

Algumas dessas pesquisas, entretanto, deram resultados negativos, outras mostraram associações fracas e outras, ainda, não conduziram a conclusões unânimes. Isso, aliás, não deve surpreender, pois os resultados negativos tinham maior probabilidade de ocorrência *a priori*, já que os sistemas genéticos estudados foram, em sua maioria, tomados aleatoriamente para investigação. Tais sistemas foram estudados em hansenianos sem que houvesse alguma indicação lógica de que a suscetibilidade à hanseníase poderia depender dos genes polimórficos escolhidos (os antígenos HLA, evidentemente, fazem parte das raras exceções). Por outro lado, as grandes flutuações causadas pelo estudo de amostras de pequeno tamanho, as variações raciais e geográficas, os controles inadequados, e/ou a heterogeneidade da composição das amostras de hansenianos quanto às formas clínicas da doença, devem ter contribuído para a geração de resultados discordantes.

O que parece interessante ressaltar, em relação a essas pesquisas, é que elas não tiveram utilidade imediata para os hansenólogos práticos, apesar de sua relevância para alguns geneticistas. De fato, a demonstração, ainda que de modo indiscutível, de uma associação entre um sistema polimórfico escolhido aleatoriamente e a hanseníase, pode representar a detecção de um eventual desequilíbrio de ligação ou servir, somente, para indicar que a hanseníase é uma das várias forças que mantêm o polimorfismo analisado e que, reciprocamente, esse polimorfismo pode ter alguma influência na manifestação da hanseníase. Entretanto, o hansenólogo prático, que está interessado nas aplicações que a genética pode fornecer à hansenologia, não fará uso de tais informações, visto que elas não têm valor diagnóstico nem prognóstico.

Distribuição familiar

As investigações a respeito da distribuição familiar da hanseníase passaram por uma fase em que a preocupação primordial foi a de demonstrar a importância da distinção entre os tipos e grupos dessa doença nos estudos a respeito da

taxa de contágio intrafamiliar. Assim, o estudo dessa taxa em cônjuges de virchowianos e em famílias nas quais os indivíduos tinham pelo menos cinco anos de coabitação com um foco virchowiano (Beiguelman, 1971; 1972) deixou claro que, se as formas clínicas de hanseníase dos contagiados forem levadas em conta, os consangüíneos de focos virchowianos têm maior probabilidade de apresentar esse mesmo tipo polar do que os não-consangüíneos desses focos. Além disso, os consangüíneos de focos virchowianos têm menor probabilidade de manifestar outras formas de hanseníase, ocorrendo o inverso com os não-consangüíneos.

Essa conclusão, obtida no Brasil, foi apoiada por Smith *et al.* (1978), ao observarem que a prevalência da hanseníase virchowiana em famílias filipinas, nas quais um dos genitores tinha esse tipo da doença, era cerca de três vezes mais alta do que naquelas em que nenhum dos genitores era virchowiano ou manifestava outra forma da moléstia. Essa diferença não foi constatada em famílias em que um dos genitores manifestava hanseníase diferente da virchowiana.

Os estudos sobre a distribuição familiar da hanseníase também passaram por uma fase em que houve a preocupação de demonstrar que ela exibe agregação familiar. Tal demonstração em relação a uma doença infecto-contagiosa pode não ter grande significação genética, pois, para a ocorrência dessa associação podem ser prioritárias as condições de exposição diferencial ao agente etiológico e, ao contrário, de mínima importância a eventual predisposição genética à infecção manifestada pelo hospedeiro. Contudo, apesar de não ser condição suficiente, está claro que a agregação familiar de uma doença infecto-contagiosa é uma condição necessária para supor a intervenção de algum componente genético importante do hospedeiro na sua manifestação.

A hanseníase sempre foi considerada uma doença familiar, sendo bem antigas as descrições de genealogias com alta concentração de hansenianos (Danielssen e Boeck, 1848). Entretanto, a maioria desses dados se referia a famílias que viviam segregadas em populações nas quais a prevalência da hanseníase era baixa. Parecia, pois, necessário demonstrar que essa doença apresenta agregação familiar mesmo em populações com alta prevalência de hanseníase, já que aí aumenta a possibilidade de contato com focos extrafamiliares. Esse tipo de investigação teve início no final da década de 1960, quando ficou provada a ocorrência de

agregação familiar da hanseníase em uma população brasileira (Beiguelman *et al.* 1968a; Beiguelman, 1972). Essa agregação não foi, contudo, observada na Micronésia por Morton *et al.* (1972). Lá, entretanto, a prevalência da hanseníase virchowiana era a metade (22%) da observada no Brasil (45%), apesar de a prevalência global de todas as formas de hanseníase na Micronésia ser bem maior do que entre nós (Mattos, 1964; Sloan *et al.*, 1972). A discordância observada pode ser conseqüência dessa diferença, pois sabe-se que a probabilidade de encontrar recorrência familiar de hanseníase é maior nas famílias que incluem um paciente virchowiano do que naquelas em que isso não acontece (Kapoor, 1963).

De qualquer modo, atualmente, todos os trabalhos mostram que a hanseníase exibe agregação familiar e o desenvolvimento espetacular de poderosos métodos de análise de segregação (Elston & Stewart, 1971; Morton & MacLean, 1974; Lalouel & Morton, 1981; Lalouel *et al.*, 1983) fez com que os estudos a respeito da distribuição da hanseníase em famílias evoluíssem para a investigação do eventual papel da hereditariedade na determinação dessa agregação. Entretanto, como veremos a seguir, apesar dessa evolução, as análises de segregação complexas que foram realizadas não conseguiram alcançar resultados satisfatórios, em decorrência das contradições constatadas.

Realmente, Serjeantson *et al.* (1979), analisando 340 famílias de hansenianos da Papua Nova Guiné, concluíram a favor da herança multifatorial tanto para a hanseníase virchowiana quanto para a não-virchowiana enquanto que, no mesmo ano, Smith (1979), após estudar 91 famílias com pelo menos um paciente virchowiano ou dimorfo, constatou que seus dados não foram inconsistentes seja com a hipótese autossômica recessiva monogênica, seja com a hipótese multifatorial. As análises feitas por Haile *et al.* (1985) de dados a respeito de 72 famílias do sul da Índia serviram para sugerir um modo recessivo de herança da hanseníase, com a ressalva de que ela ficou mais clara para o tipo tuberculóide dessa enfermidade. No entanto, a análise de segregação de Shields *et al.* (1987) a respeito de 269 irmandades de uma população isolada da Papua Nova Guiné, com 552 hansenianos, não pôde diferenciar entre a hipótese de um gene principal determinante da suscetibilidade à hanseníase e a de ser somente o ambiente o responsável pela agregação familiar observada.

Wagener *et al.* (1988), estudando 63 famílias tailandesas com pelo menos dois casos de hanseníase, concluíram a favor da existência de um gene principal com efeito dominante e penetrância incompleta para a suscetibilidade a essa doença sem distinção de formas clínicas. Para a hanseníase tuberculóide consideraram ser mais provável o modelo recessivo, mas a discriminação entre os vários modelos foi fraca. Abel e Demenais (1988) e Abel *et al.* (1989), por sua vez, após estudarem 27 genealogias averiguadas a partir dos hansenianos de uma ilha caribenha (Desirade), aceitaram a hipótese de que a suscetibilidade à hanseníase *per se* e à hanseníase não-virchowiana dependeria de um gene principal com efeito recessivo. Posteriormente, porém, Abel *et al.* (1995), estudando 285 famílias vietnamitas e 117 chinesas que residiam no Vietnã, concluíram que, somente nas famílias vietnamitas, poder-se-ia aceitar a participação de um gene principal co-dominante com dependência familiar residual na distribuição da hanseníase *per se* e que, para os fenótipos não-virchowianos, haveria rejeição da hipótese de transmissão mendeliana. Nas famílias chinesas houve forte rejeição da transmissão mendeliana para a hanseníase *per se* e não se evidenciou um componente familiar na distribuição da hanseníase não-virchowiana.

Finalmente, ao analisar 1.568 famílias de hansenianos de Campinas, Feitosa *et al.* (1995) não obtiveram evidências que permitissem aceitar a hipótese de transmissão mendeliana da suscetibilidade à hanseníase virchowiana, nem à hanseníase tuberculóide. No caso da suscetibilidade à hanseníase *per se* seus dados foram compatíveis com a hipótese de um gene principal com efeito recessivo, mas houve desvios da segregação mendeliana.

Evidentemente, as discordâncias entre os resultados das análises de segregação podem ter sido decorrentes de heterogeneidade genética, mas é possível, também, que elas sejam consequência da ação de fatores do ambiente ou de variações culturais que influenciam a transmissão da doença, as quais podem obscurecer o eventual papel desempenhado pela hereditariedade humana.

Prevalência da hanseníase e distância genética

A aplicação de modelos de distância genética à prevalência da hanseníase por dois grupos de

pesquisadores também conduziu a resultados discordantes. Bechelli *et al.* (1973b) analisaram a prevalência da hanseníase em 118 pares de aldeias birmanesas com distâncias variadas entre si, mas com condições biológicas, ambientais e socioeconômicas que eles consideraram uniformes. Pelo fato de a distribuição dos coeficientes de correlação entre as taxas de hanseníase nas aldeias estudadas não ter satisfeito a função monotônica decrescente esperada no caso do parentesco genético, isto é, por ter o tipo de distribuição desses coeficientes divergido da distribuição esperada para marcadores genéticos nas mesmas condições, Bechelli *et al.* (1973b) se posicionaram contra a hipótese genética para a concentração de hansenianos, considerando que ela seria, primordialmente, uma função do número de pacientes virchowianos.

Serjeantson *et al.* (1979), por sua vez, usando dados epidemiológicos da Papua Nova Guiné a respeito de 183 aldeias, contradisseram os resultados de Bechelli *et al.* (1973b), ao observar que a distribuição da hanseníase correspondeu a de 13 locos polimórficos em sua dependência de distância geográfica e diferenças lingüísticas.

É possível, porém, que a discordância entre esses dois grupos de pesquisadores tenha decorrido da aceitação indevida da hipótese de uniformidade das condições biológicas, ambientais e socioeconômicas nas aldeias birmanesas.

Concordância de gêmeos quanto à hanseníase

Os trabalhos nos quais foram comparadas as proporções de concordância da hanseníase em gêmeos monozigóticos e dizigóticos foram poucos (Spickett, 1962b; Mohamed-Ali, 1965; Mohamed-Ali & Ramanujam, 1966; Chakravarti & Vogel, 1973). Além disso, infelizmente, eles não levaram em conta três critérios importantes no estudo de uma moléstia infecto-contagiosa capaz de se manifestar sob diferentes formas clínicas (Beiguelman, 1972, 1974, 1978, 1983).

Esses critérios podem ser assim resumidos:

1) tanto os pares monozigóticos quanto os dizigóticos devem ter as mesmas oportunidades de exposição ao *M. leprae*;

2) os pares de cada sexo devem ser analisados separadamente, não sendo levados em conta os pares dizigóticos discordantes quanto a

sexo, porque a Hanseníase é mais freqüente em indivíduos do sexo masculino, pelo menos em grupos etários acima dos 14 anos (Doull *et al.*, 1942; Bechelli *et al.*, 1966; Beiguelman *et al.*, 1968b);

3) somente devem ser analisados os pares compostos por casos informativos no que diz respeito à concordância ou discordância quanto às manifestações da Hanseníase, o que equivale a dizer que não podem participar da amostra pares que incluam um paciente com Hanseníase indeterminada ou limítrofe, em decorrência da instabilidade desses grupos e da paucibacilaridade do grupo indeterminado. Também não podem participar da amostra pares compostos por pacientes tuberculóides, porque os casos esporádicos de Hanseníase tuberculóide são menos freqüentemente detectados que os familiares. Assim, em decorrência de condições de amostragem, pode haver um excesso aleatório de pares tuberculóides, seja entre os gêmeos monozigóticos, seja entre os dizigóticos, o que distorceria casualmente as conclusões a favor de maior concordância em uma ou outra classe de gêmeos.

Parece claro, pois, que, para a investigação da concordância da Hanseníase em gêmeos, eles deveriam ser averiguados a partir de pacientes virchowianos, levando-se em conta os pares com um irmão gêmeo do mesmo sexo que manifeste um dos tipos polares da Hanseníase. Os irmãos gêmeos sadios de pacientes virchowianos, que com eles coabitaram por mais de cinco anos após o início da Hanseníase, também poderiam ser informativos, mas isso dependeria do grau da gravidade da doença e da regularidade do tratamento dos pacientes.

Evidentemente, a obediência a esses critérios cria grandes dificuldades para a obtenção de um número apreciável de pares monozigóticos e dizigóticos, mas a cooperação internacional, proposta há tempos (Beiguelman, 1974; 1983), poderia trazer uma solução em curto prazo. De qualquer modo, apesar das críticas que podem ser feitas às investigações sobre a concordância da Hanseníase em gêmeos, elas não contrariaram a hipótese de que os elementos dos pares monozigóticos são mais propensos a manifestar a mesma forma dessa doença.

Reação de Mitsuda

A mitsudina, nome adotado no Brasil para a lepromina, é uma suspensão esterilizada de baci-

los de Hansen mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas de pacientes virgens de tratamento ou de tecidos de tatus infectados por *M. leprae*. Quando a mitsudina é obtida a partir de hansenomas, ela é denominada mitsudina H, para indicar a origem humana. No caso de ser extraída de tecidos de tatu, ela é denominada mitsudina A, letra inicial de *armadillo* que, tanto em espanhol quanto em inglês, significa tatu. A denominação mitsudina foi adotada no Brasil para homenagear Kensuke Mitsuda, o primeiro a relatar, na III Conferência Internacional de Hanseníase, realizada em 1923, em Estrasburgo, os resultados das experiências em larga escala com a suspensão de *M. leprae*, que ele vinha fazendo (Mitsuda, 1924, 1953).

Atualmente, a preparação da mitsudina obedece a normas de padronização e segurança recomendadas pela Organização Mundial de Saúde para a escolha e processamento dos tecidos utilizados para a extração dos bacilos, testes de esterilidade, inocuidade, reatividade cutânea, conteúdo total de proteína, conteúdo total de fenol e contagem dos bacilos de Hansen, cuja concentração deve variar entre 40 a 160 milhões por ml (Bloom *et al.*, 1979).

A injeção intradérmica de 0,1ml de mitsudina pode provocar uma reação precoce, que é lida 48 horas após a inoculação dessa suspensão, e uma reação tardia, que é denominada reação de Mitsuda. Em hansenianos e em seus comunicantes, a leitura da reação de Mitsuda é feita quatro semanas após a inoculação da mitsudina, mas em não-comunicantes de hansenianos a reação tardia à injeção de mitsudina pode levar mais tempo para se expressar clinicamente (Bechelli *et al.*, 1963). De acordo com o VI Congresso Internacional de Hanseníase (Madri, 1953), a ausência de resposta clínica é denominada reação negativa, enquanto que uma infiltração franca, pápula ou nódulo com mais de 3 milímetros de diâmetro, é denominada reação positiva, a qual pode ser + (3 a 5 mm), ++ (mais de 5 mm) e +++ (infiltração nodular ulcerada). Uma infiltração discreta com menos de 3 milímetros de diâmetro é considerada duvidosa (\pm).

A reação de Mitsuda é, regra geral, permanentemente negativa em indivíduos com Hanseníase virchowiana, predominantemente positiva em indivíduos com Hanseníase tuberculóide e freqüentemente negativa em pacientes dimorfos. Nos pacientes com Hanseníase indeterminada, a distribuição das respostas positiva e

negativa varia de acordo com a amostra estudada (Rotberg, 1944; Quagliato, 1959; Bechelli *et al.*, 1959, 1973a), como consequência da proporção de pacientes que, potencialmente, pode evoluir para o tipo virchowiano ou para o tipo tuberculóide de Hanseníase. O importante, porém, é que os pacientes com Hanseníase indeterminada que são Mitsuda-positivo não evoluem para o tipo virchowiano da doença (Rotberg, 1944).

A reação tardia provocada pela inoculação da mitsudina é uma consequência dos eventos que se seguem à fagocitose dos bacilos dessa suspensão, pelos macrófagos da pele (histiócitos). Na reação positiva esses bacilos são digeridos pelos macrófagos, que se transformam em células epitelióides sendo, por isso, a resposta positiva definida, histologicamente, pela presença dessas células, que assumem uma estrutura tuberculóide ou tuberculóide-símile, na qual os bacilos a.a.r. estão ausentes ou dificilmente encontrados. Na reação negativa não ocorre essa destruição dos bacilos fagocitados, nem se revela uma tendência à formação de uma estrutura tuberculóide (Bechelli *et al.*, 1959; Azulay *et al.*, 1960; Michalany & Michalany, 1983; Petri *et al.*, 1985). A reação de Mitsuda avalia, portanto, a capacidade que os macrófagos possuem de digerir os bacilos da mitsudina fagocitados, mas a associação entre essa capacidade, isto é, entre a resposta histológica à inoculação de mitsudina e sua expressão macroscópica nem sempre é completa. Assim, apesar de menos provável, é possível o encontro de respostas macroscópicas, tanto positivas quanto negativas, sem correspondência histológica (Bechelli *et al.*, 1959; Azulay *et al.*, 1960; Petri *et al.*, 1985).

Visto que os bacilos da mitsudina são sempre mortos pelo calor, está claro que a reação de Mitsuda não pode ser considerada como uma réplica da infecção hanseniana. Entretanto, a reação de Mitsuda possui valor prognóstico notável não apenas entre os pacientes indeterminados e dimorfos, mas por ter a experiência demonstrado que, entre os comunicantes de hansenianos, aqueles com resposta positiva não correm risco de manifestar Hanseníase virchowiana (Dharmendra e Chatterjee, 1955; Quagliato, 1962). Em outras palavras, a reação positiva de Mitsuda indica que os macrófagos de um indivíduo são capazes de destruir tanto os bacilos de Hansen mortos quanto os vivos. Já em relação às pessoas em que a resposta ao teste de Mitsuda é persistentemente negativa, po-

de-se dizer que, se expostas ao *M. leprae*, elas estarão sob risco de contágio e, quando contagiadas, de manifestar Hanseníase virchowiana, apesar de ser possível supor que a capacidade dos macrófagos de destruir os bacilos de Hansen fagocitados não é o único fator orgânico que impede a proliferação do *M. leprae*.

Antes de encerrar o presente tópico é importante enfatizar que a ampla literatura acumulada sobre a reação de Mitsuda deve muito às numerosas contribuições de pesquisadores brasileiros, que analisaram essa prova cutânea segundo enfoques clínico-epidemiológico, histológico, genético e de experimentação animal. Uma revisão enfatizando a participação brasileira no estudo dessa prova cutânea de importante valor para a avaliação da resistência de comunicantes à manifestação da Hanseníase virchowiana, além de seu valor prognóstico na Hanseníase indeterminada e dimorfa, foi publicada, recentemente, pelo autor (Beiguelman, 1999).

Estudos genéticos da reação de Mitsuda

Rotberg (1937) foi o primeiro a sugerir que a reação de Mitsuda poderia ter determinação genética, ao estabelecer a hipótese de que os indivíduos que manifestam a positividade dessa reação possuiriam um fator natural de resistência à Hanseníase virchowiana, possivelmente genético. A fração da população desprovida desse fator de resistência à proliferação do bacilo de Hansen, e que responderia permanentemente de modo negativo ao teste de Mitsuda, comporia aquilo que Rotberg denominou margem anérgica.

Entretanto, as investigações a respeito da possibilidade de a reação de Mitsuda ser um polimorfismo genético somente foram iniciadas 25 anos depois da publicação de Rotberg (Beiguelman, 1962b) em 220 famílias de Rio das Pedras (SP), predominantemente de origem norte-italiana, que incluíram apenas indivíduos sem Hanseníase (vide, também, Beiguelman, 1963a, 1971). Nessa amostra ficou demonstrado, de modo indubitável, que, na geração filial, a distribuição da resposta macroscópica tardia à inoculação da mitsudina estava fortemente associada à da geração paterna, isto é, os casais Mitsuda-negativo geraram proporção maior de filhos Mitsuda-negativo do que os casais Mitsuda-positivo. Nessa ocasião, o autor aventou a hipótese de que essa distribuição

poderia decorrer de um par principal de alelos autossômicos com relação de dominância completa, sendo recessiva a resposta negativa ao teste de Mitsuda. Uma parte dos homocigotos recessivos, entretanto, poderia manifestar o fenótipo oposto, como decorrência da ação de fatores do ambiente (Beiguelman, 1962b).

A associação familiar da reação de Mitsuda examinada macroscopicamente foi confirmada em outra amostra, que também não incluiu hansenianos, composta por 100 famílias brasileiras de Cosmópolis (SP) (Beiguelman & Quagliato, 1965), bem como em famílias de hansenianos de Campinas (Beiguelman, 1965) e da Índia (Saha & Agarwal, 1979; Kundu *et al.*, 1979). Além disso, ao analisar quantitativamente a reação de Mitsuda em famílias de hansenianos e naquelas sem essa doença, Botasso *et al.* (1984), na Argentina, constataram uma correlação significativa entre as médias das respostas dos genitores e dos filhos. Aqui é interessante assinalar que nas famílias de hansenianos brasileiros, a associação familiar da reação de Mitsuda foi mais forte do que nas famílias compostas por indivíduos sem hanseníase, provavelmente porque, nas primeiras, as pessoas estiveram mais expostas a agentes sensibilizantes (inoculações repetidas do antígeno de Mitsuda, vacinação com BCG e infecção primária do *M. leprae*) que acentuam a correspondência entre a resposta macroscópica e a histológica ao teste de Mitsuda.

A análise da distribuição da reação macroscópica de Mitsuda nas famílias de hansenianos brasileiros, levando em conta apenas as irmandades geradas por casais que incluíam pelo menos um genitor Mitsuda-positivo (41 casais compostos por paciente tuberculóide x cônjuge sadio(a) e 65 casais compostos por paciente virchowiano(a) x cônjuge Mitsuda fortemente positivo), também satisfaz a hipótese de herança monogênica autossômica, sendo a reação positiva o fenótipo dominante (Beiguelman, 1965). Entretanto, essa interpretação esbarrou no que pareceu, à época, um forte obstáculo à hipótese monogênica, pois, dentre os 81 filhos de 24 casais virchowianos estudados, e, portanto, indiscutivelmente Mitsuda-negativo, constatou-se que 30,9% responderam positivamente à inoculação do antígeno de Mitsuda.

Foi aventada, então, a hipótese de que a capacidade de lise, isto é, de destruição do bacilo de Hansen fagocitado pelos macrófagos, poderia mostrar diferentes graus de intensidade (Beiguelman, 1967, 1968, 1971). Desse modo,

tanto as pessoas classificadas com tendo o fenótipo lisador, quanto aquelas com o fenótipo não-lisador teriam macrófagos que mostrariam diferentes graus de capacidade de lise. Em outras palavras, entre os lisadores existiriam indivíduos cujos macrófagos expressariam mais fortemente sua capacidade de destruir os bacilos de Hansen fagocitados do que os de outros, mas os não-lisadores também seriam um grupo heterogêneo, pois incluiriam indivíduos com macrófagos incapazes de qualquer atividade de lise em relação aos bacilos de Hansen fagocitados, bem como indivíduos cujos macrófagos poderiam mostrar graus incipientes dessa lise. Essa capacidade incipiente de lise em indivíduos não-lisadores foi comprovada por Convit *et al.* (1979), que constataram, em pacientes virchowianos, que alguns possuíam macrófagos capazes de digerir os bacilos de uma mitsudina mais concentrada num período entre 90 e 120 dias, enquanto outros possuíam macrófagos nos quais os bacilos se apresentaram íntegros mesmo após esse tempo.

Se admitirmos que tanto o conjunto dos lisadores quanto o dos não-lisadores apresentam distribuição unimodal, segundo a capacidade de lise, pode-se admitir, também, que a distribuição dos seres humanos segundo a capacidade de seus macrófagos têm de lisar o bacilo de Hansen seria bimodal. Essa capacidade de lise seria, pois, um caráter semidescontínuo, com os fenótipos lisador e não-lisador discriminados pela região antimodal. Desse modo, aceitar-se-ia um gene principal autossômico responsável pelo fenótipo lisador e um seu alelo principal responsável pelo fenótipo não-lisador. A capacidade de lise dos macrófagos em relação aos bacilos de Hansen fagocitados seria um caráter genético cuja expressão clínica, isto é, macroscópica, dependeria muito de fatores modificadores do ambiente. Essa teoria permite aceitar a possibilidade de discordância entre as respostas macroscópicas e histológicas, apesar da grande associação entre ambas, além do que, ela não exclui a possibilidade de ocorrência de genocópias do alelo não-lisador, isto é, ela permite admitir que a incapacidade de destruição dos bacilos de Hansen pelos macrófagos pode ser consequência de mais de um tipo de erro genético.

De acordo com essa proposta, poder-se-ia explicar a ocorrência dos cerca de 30% de indivíduos macroscopicamente Mitsuda-positivo observados pelo autor (Beiguelman, 1965) entre os filhos de casais virchowianos e, portanto,

seguramente Mitsuda-negativo, como conseqüentes das seguintes causas:

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

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

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

4. alguns filhos de casais virchowianos seriam ilegítimos, acontecimento não muito raro entre esses casais (Pinto Jr. & Beiguelman, 1967).

Apesar de essa teoria, que admite diferentes graus de capacidade de lise, também mostrar-se útil para explicar tanto os dados epidemiológicos mundiais sobre a ocorrência e distribuição das diferentes formas de hanseníase quanto os resultados da única análise quantitativa da reação de Mitsuda em gêmeos (Beiguelman, 1971), ela não saiu do terreno especulativo. Tal situação permaneceu assim até que Feitosa *et al.* (1996) submeteram dados a respeito da distribuição da reação de Mitsuda em 544 famílias nucleares de hansenianos da região de Campinas à análise de segregação complexa, usando o método unificado de Lalouel *et al.* (1983).

Os resultados dessa análise confirmaram, de modo indubitável, que a reação de Mitsuda mostra agregação familiar e que, para a manifestação dessa reação, pode-se desprezar a participação de um componente multifatorial e aceitar as hipóteses de transmissão mendeliana e da existência de um gene principal, sendo o fenótipo reação positiva decorrente de um gene parcialmente dominante (grau de dominância = 0,811).

Como se vê, apesar de a mitsudina ser um reagente rústico, a reação tardia por ela provocada mostrou-se extremamente mais importante para as pesquisas de genética na hanseníase do que a própria hanseníase virchowiana porque, além de esse tipo de hanseníase estar completamente associado ao fenótipo Mitsuda-negativo, o nível de complexidade da reação de Mitsuda é, evidentemente, muito menor do

que aquele necessário à manifestação do tipo virchowiano. A pesquisa para encontrar o loco responsável pela reação de Mitsuda pareceu, pois, ser o caminho mais promissor do que qualquer outro para a localização dos alelos responsáveis pela suscetibilidade/resistência à hanseníase virchowiana.

Para iniciar essa investigação pareceu atracente fazer estudos de ligação entre a reação de Mitsuda e os marcadores polimórficos de um gene localizado na região distal do braço inferior do cromossomo 2 humano (região 2q35), o gene NRAMP1 (Alcaïs *et al.*, 2000; Hatagima *et al.*, 2001). Essa escolha se deu porque o gene NRAMP1 é homólogo do gene de camundongo, que já foi designado por Lsh, Ity ou Bcg (Blackwell, 1989; Vidal *et al.*, 1993; Cellier *et al.*, 1994) e é, atualmente, denominado Nramp 1 (natural resistance associated macrophage protein 1). Visto que, nesse gene, a substituição de um aminoácido apresentou associação com a suscetibilidade a vários parasitas intracelulares, como o *M. lepraemurium*, BCG e espécies de *Leishmania* e *Salmonella* (Blackwell, 1989; Schurr *et al.*, 1990), era tentador o estudo de ligação da reação de Mitsuda com marcadores dessa região.

Infelizmente, os resultados desses estudos foram contraditórios. Enquanto os de Alcaïs *et al.* (2000) falaram a favor de ligação significativa entre a reação de Mitsuda e a região NRAMP 1, os resultados obtidos por Hatagima *et al.* (2001) não forneceram qualquer evidência de existência de ligação entre a reação de Mitsuda e os três marcadores genéticos estudados. Os dados de Hatagima *et al.* (2001) juntam-se, pois, aos resultados igualmente negativos obtidos em estudos de ligação entre os marcadores dessa região do cromossomo 2 humano e a hanseníase (Shaw *et al.*, 1993; Levee *et al.*, 1994; Roger *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999) os quais, aliás, também contrariaram os de Abel *et al.* (1998).

É bem possível que todas essas discordâncias decorram da possibilidade, postulada por Roy *et al.* (1999), de existência de, pelo menos, dois mecanismos genéticos responsáveis pela suscetibilidade/resistência à hanseníase. Desse modo, as diferentes combinações de frequências dos locos em questão poderiam ser responsabilizadas pelos resultados discordantes encontrados pelos diferentes grupos de autores e, às vezes, por um mesmo grupo de pesquisadores. Contudo, tendo em vista o aumento crescente de evidências a favor da ligação do loco NRAMP1 com a tuberculose, que é, tam-

bém, uma doença infecciosa macrófago-dependente (Greenwood *et al.*, 2000), parece que a aparente heterogeneidade dos dados de ligação entre esse loco e a hanseníase pode ser uma indicação de maior complexidade genética no caso dessa doença, o que, evidentemente, estimulará empenho de maior número de pesquisadores.

Referências bibliográficas

- Abel L & Demenais F 1988. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade Island. *American Journal of Human Genetics* 42:256-266.
- Abel L *et al.* 1989. Genetic susceptibility to leprosy on a Caribbean island: a linkage analysis with five markers. *International Journal of Leprosy* 57:465-471.
- Abel L *et al.* 1995. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genetic Epidemiology* 12:63-82.
- Abel L *et al.* 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *The Journal of Infectious Diseases* 177:133-145.
- Alcaïs A *et al.* 2000. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *The Journal of Infectious Diseases* 181:302-308.
- Aycock WL 1940. Familial susceptibility as a factor of propagation of leprosy in North America. *International Journal of Leprosy* 8:137-150.
- Aycock WL & McKinley EB 1938. The role of familial susceptibility and contagion in the epidemiology of leprosy. *International Journal of Leprosy* 6:169-184.
- Azulay RD *et al.* 1960. Comparison of the macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *International Journal of Leprosy* 28:38-43.
- Bechelli LM, Rath de Souza P & Quagliato R 1959. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. *Revista Brasileira de Leprologia* 27:172-182.
- Bechelli LM, Martinez-Dominguez V & Patwary KM 1966. WHO epidemiologic random sample surveys of leprosy in Northern Nigeria (Katsina), Cameroon and Thailand (Khon Kaen). *International Journal of Leprosy* 34:223-243.
- Bechelli LM, Garcia G, Nakamura S & Quagliato R 1963. Determinação da data da leitura da reação de Mitsuda com lepromina integral em indivíduos sãos, sem exposição prévia conhecida ao *M. leprae*. *Anais do VIII Congresso Internacional de Leprologia*, Rio de Janeiro 3:284-294.
- Bechelli LM, Garbajosa PJ, Gyi MM, Walter J & Tamondong C 1973a. Late lepromin reaction in untreated patients with indeterminate leprosy under 21 years old in Burma. *Bulletin of the World Health Organization* 48:113-116.
- Bechelli LM, Barraí I, Gallego-Garbajosa P, Uemura K, Gyi MM & Tamondong T 1973b. Correlation between leprosy rates in villages different distances apart. *Bulletin of the World Health Organization* 48:257-260.
- Beiguelman B 1962a. Reação gustativa à feniltiocarbamida e lepra. *Revista Brasileira de Leprologia* 30:111-124.
- Beiguelman B 1962b. Hereditariedade da reação de Mitsuda. *Revista Brasileira de Leprologia* 30:153-172.
- Beiguelman B 1963a. Genetics and leprosy. Heredity of Mitsuda's skin reaction. *Anais do VIII Congresso Internacional de Leprologia*, Rio de Janeiro 3:302-309.
- Beiguelman B 1963b. Grupos sanguíneos e lepra. *Revista Brasileira de Leprologia* 31:34-44.
- Beiguelman B 1964a. Taste sensitivity to phenylthiourea among patients affected with both tuberculosis and leprosy. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 13:190-192.
- Beiguelman B 1964b. Taste sensitivity to phenylthiourea and leprosy. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 13:193-196.
- Beiguelman B 1964c. Sistema ABO e epidemiologia de lepra. *Revista Paulista de Medicina* 65:80-86.
- Beiguelman B 1965. The genetics of resistance to leprosy. *International Journal of Leprosy* 33:808-812.
- Beiguelman B 1967. Leprosy and genetics. A review of past research with remarks concerning future investigations. *Bulletin of the World Health Organization* 37:461-476.
- Beiguelman B 1968. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 17:584-594.
- Beiguelman B 1971. Lepromin reaction: genetic studies including twin pair analysis. *Acta Leprologica* 44:5-65.
- Beiguelman B 1972. An appraisal of genetic studies in leprosy. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 17:21-52.

- Beiguelman B 1974. Um programa multinacional de investigação leproológica utilizando o estudo de gêmeos. *Ciência e Cultura* 26:459-468.
- Beiguelman B 1978. Genetics in leprosy, pp. 71-81. In Chatterjee BR (org.). *A window on leprosy, Gandhi Memorial Leprosy Foundation*. The Statesman Commercial Press, Calcutta, Índia.
- Beiguelman B 1983. Leprosy and genetics: a review. *Brazilian Journal of Genetics* 6:109-172.
- Beiguelman B 1999. A reação de Mitsuda oitenta anos depois. *Hansenologia Internationalis* 24:144-161.
- Beiguelman B & Marques MB 1964. Taste sensitivity to phenylthiourea and drugs with antileprotic effect. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 13:200-202.
- Beiguelman B & Quagliato R 1964. Sobre a reação de Mitsuda. *Revista Brasileira de Leprologia* 32:39-46.
- Beiguelman B & Quagliato R 1965. Nature and familial character of the lepromin reactions. *International Journal of Leprosy* 33:800-807.
- Beiguelman B & Barberi TA 1965. Comportamento dos macrófagos nas formas polares de lepra. *Ciência e Cultura* 17:304-305.
- Beiguelman B, Quagliato R & Camargo DP 1965a. Influence of repeated lepromin injections on the Mitsuda skin reaction. *International Journal of Leprosy* 33:795-799.
- Beiguelman B, Souza-Campos N & Pinto Jr. W 1967. Fatores genéticos e efeito da calmetização na reação de Mitsuda. *Revista Paulista de Medicina* 71:271-278.
- Beiguelman B, Dall'Aglio FF & Silva E da 1968a. Análise da recorrência familiar de lepra. *Revista Paulista de Medicina* 72:105-110.
- Beiguelman B, Silva E da & Dall'Aglio FF 1968b. Lepra e sexo. *Revista Paulista de Medicina* 72:120-129.
- Beiguelman B, Pinto Jr W, Dall'Aglio FF, Silva E da & Voza JA 1968c. G-6PD deficiency among lepers and healthy people in Brazil. *Acta Genetica et Statistica Medica* (Basel) 18:159-162.
- Beiguelman B, Marchi A, Hama T, Amin CC, Godoi MNC & Baptista TA 1965b. Fecundidade e lepra. *Revista Paulista de Medicina* 66:207-213.
- Blackwell J 1989. The macrophage resistance gene Lsh/Ity/Bcg. *Research in Immunology* 140:767-828.
- Bloom Bret *et al.* 1979. Recommended safety requirements for the preparation of lepromin: a WHO Memorandum. *Bulletin of the World Health Organization* 57:921-923.
- Botasso OA, Poli HO, Morini JC & Rabasa SL 1984. Estudio genético de la resistencia a la infección con el bacilo de Hansen en familias con o sin lepra. *Medicina* (Buenos Aires) 44:467-470.
- Cellier M *et al.* 1994. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue specific expression. *Journal of Experimental Medicine* 180:1.741-1.752.
- Chakravarti MR & Vogel F 1973. *A twin study on leprosy*. Geord Thieme Publishers, Stuttgart, 124 pp.
- Convit J, Aranzazu N, Pinaridi M & Ulrich M 1979. Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of Mycobacterium leprae and BCG. *Clinical and Experimental Immunology* 36:214-220.
- Danielssen DC & Boeck W 1848. *Traité de la spédalskhead ou éléphantiasis des Grecs*. Tradução francesa de Cosson LA. Baillière, Paris, 535 pp.
- Dave DS & Agrawal SK 1984. Prevalence of leprosy in children of leprosy parents. *Indian Journal of Leprosy* 56:615-621.
- Dharmendra & Chatterjee KR 1955. Prognostic value of the lepromin test in contacts of leprosy cases. *Leprosy in India* 27:149-152.
- Doull JA, Guinto RS, Rodriguez JN & Bancroft H 1942. The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, P.I. *International Journal of Leprosy* 10:107-131.
- Elston RC & Stewart J 1971. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Human Heredity* 21:523-542.
- Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, Beiguelman B & Rao DC 1995. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *American Journal of Human Genetics* 56:1.179-1.185.
- Feitosa MF, Krieger H, Borecki I, Beiguelman B & Rao DC 1996. Genetic epidemiology of the Mitsuda reaction in leprosy. *Human Heredity* 46:32-35.
- Greenwood CMT *et al.* 2000. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *American Journal of Human Genetics* 67:405-416.
- Haile RWC, Iselius L, Fine PEM & Morton NE 1985. Segregation and linkage analysis of 72 leprosy pedigrees. *Human Heredity* 35:43-52.
- Hansen GHA 1874. Undersøgelse angaaende Spedalskedens Aarsager (Investigations concerning the etiology of leprosy). *Norsk Mag. f. Laegev.*, 3 series, 4 (9) Suppl.:1-88. Case reports I - LIII. Apud Vogelsang ThM 1978. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912). The discoverer of the leprosy bacillus. His life and work. *International Journal of Leprosy* 46:257-332.
- Hatagima A, Opromolla DVA, Ura S, Feitosa MF, Beiguelman B & Krieger H 2001. No evidence of linkage between the Mitsuda reaction and the NRAMP 1 locus. *International Journal of Leprosy* 69 (2): no prelo.
- Kapoor P 1963. Epidemiologic survey of leprosy in Maharashtra State (India). *Leprosy in India* 35:83-89.
- Kundu SK, Ghosh S, Hazra SK & Chaudhury S 1979. Nature and familial character of lepromin sensitivity in 27 families and their siblings. *Leprosy in India* 51:465-474.
- Lalouel JM & Morton NE 1981. Complex segregation analysis with pointers. *Human Heredity* 31:312-321.
- Lalouel JM, Rao DC, Morton NE & Elston RC 1983. A unified model for complex segregation analysis. *American Journal of Human Genetics* 35:816-826.
- Levee G, Liu J, Gicquel B, Chanteau S & Schurr E 1994. Genetic control of susceptibility to leprosy in French Polynesia; no evidence for linkage with markers on telomeric human chromosome 2. *International Journal of Leprosy* 62:499-511.
- Mattos O 1964. Campanha nacional contra a lepra. Relatório da Assessoria Técnica. *Boletim do Serviço Nacional de Lepra* (Rio de Janeiro) 42:399-411.
- Michalany NS & Michalany J 1983. Histopatologia da reação de Mitsuda em adultos sadios não comunicantes de hansenianos. *Hansenologia Internationalis* 8:105-123.
- Mitsuda K 1924. Les lépreux maculo-nerveux, d'une part, les tubéreux, d'autre part, se comportent différemment a la suite d'une inoculation d'émulsion de tubercule lépreux. III^e. Conférence International de

- Lèpre (Strasbourg, 1923), J. B. Baillièrre et Fils, Paris: 219-220.
- Mitsuda K 1953. On the value of a skin reaction to suspension of leprosy nodules. *International Journal of Leprosy* 21:347-358.
- Morton NE, Lew R, Hussels LE & Little GF 1972. Pinglelap and Mokil Atolls: historical genetics. *American Journal of Human Genetics* 24:277-289.
- Morton NE & MacLean CJ 1974. Analysis of family resemblance. III. Complex segregation analysis of quantitative traits. *American Journal of Human Genetics* 26:489-503.
- Mohamed-Ali P 1965. Genetic influence in leprosy. *Leprosy in India* 37:252-267.
- Mohamed-Ali P & Ramanujam K 1966. Leprosy in twins. *International Journal of Leprosy* 34:405-407.
- Opromolla DVA 1981. *Noções de hansenologia*. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, 209 pp.
- Petri V, Mendes EV & Beiguelman B 1985. Histology of the Mitsuda reaction of healthy adults with no known contacts with leprosy patients. *International Journal of Leprosy* 53:540-545.
- Pinto Jr W & Beiguelman B 1967. Taxa de ilegitimidade e lepra. *Revista Paulista de Medicina* 71:267-270.
- Quagliato R 1959. Classificação de lepra – Madri, 1953. Critério clínico. Confronto com os resultados da bacterioscopia, imunologia e histologia – 250 casos do Dispensário de Campinas (1949-1958). *Revista Brasileira de Leprologia* 27:17-32.
- Quagliato R 1962. Interpretações das reações limitrofes ou duvidosas do teste lepromínico. *Boletim do Serviço Nacional de Lepra* (Rio de Janeiro) 21:13-34.
- Rabello FA 1976. The indeterminate group of hanseniasis, and its basic connotation: the polar concept. An evaluation and a refutation of the so-called "spectral" approach. *Hansenologia Internationalis* 1:111-119.
- Roger M, Levee G, Chanteau S, Gicquel B & Schurr E 1997. No evidence for linkage between leprosy susceptibility and the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. *International Journal of Leprosy* 65:197-202.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CGN & Hill AVS 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *The Journal of Infectious Diseases* 179:187-191.
- Rotberg A 1937. Some aspects of immunity on leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromi-tested cases. *Revista Brasileira de Leprologia* 5:45-97.
- Rotberg A 1944. Valor prognóstico da lepromino-reação de Mitsuda; observação de 445 casos durante 5-6 anos. *Revista Brasileira de Leprologia* 12:367-377.
- Saha K & Agarwal SK 1979. Immune deficit in patients with lepromatous leprosy: its nature and relation to genetic factors, spectrum, and duration of the illness. *International Journal of Leprosy* 47:1-6.
- Salzano FM 1967. Blood groups and leprosy. *Journal of Medical Genetics* 4:102-106.
- Salzano FM & Hirschfeld J 1965. The dynamics of the Gc polymorphism in a Brazilian population. *Acta Genetica Statistica Medica* (Basel) 17:116-125.
- Salzano FM, Suñé M & Ferlauto M 1967. New studies on the relationship between blood groups and leprosy. *Acta Genetica Statistica Medica* (Basel) 17:530-544.
- Schurr E, Buschman E, Malo D, Gros P & Skamene E 1990. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *The Journal of Infectious Diseases* 161:634-639.
- Serjeantson SW, Wilson SR & Keats BJB 1979. The genetics of leprosy. *Annals of Human Biology* 6:375-393.
- Shaw M-A *et al.* 1993. An RFLP map for 2q33-q37 from multicaso mycobacterial and leishmanial disease families: no evidence for an Lsh/Ity/Bcg gene homologue influencing susceptibility to leprosy. *Annals of Human Genetics* 57:251-271.
- Shields ED, Russell DA & Pericak-Vance MA 1987. Genetic epidemiology and susceptibility to leprosy. *The Journal of Clinical Investigation* 79:1.139-1.143.
- Sixth International Congress of Leprosy (Madrid) 1953. Immunology. The lepromin reaction. *International Journal of Leprosy* 21:531-535.
- Sloan NR, Worth RM, Jano B, Fasal P & Shepard CC 1972. Acedapsone in leprosy treatment: trial in 68 active cases in Micronesia. *International Journal of Leprosy* 40: 48-52.
- Smith DG 1979. The genetic hypothesis for susceptibility to lepromatous leprosy. *Human Genetics* 50: 163-177.
- Smith DG, Blumberg BS, Guinto RS & Wittenstein FS 1978. Genetics in leprosy, pp. 82-102. In Chatterjee BR (org.). *A window on leprosy*. *Gandhi Memorial Leprosy Foundation*, The Statesman Commercial Press, Calcutta, India.
- Spickett SG 1962a. Genetics and the epidemiology of leprosy. I – The incidence of leprosy. *Leprosy Review* 33: 76-93.
- Spickett SG 1962b. Genetics and the epidemiology of leprosy. II – The form of leprosy. *Leprosy Review* 33: 173-181.
- Tolentino JG 1938. The role of heredity in the transmission of leprosy. *Monthly Bulletin of the Bureau of Health* (Manila) 18:261-272.
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E & Gros P 1993. Natural resistance in infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-485.
- Wagener DK, Schauf V, Nelson KE, Scollard D, Brown A & Smith T 1988. Segregation analysis of leprosy in families of northern Thailand. *Genetic Epidemiology* 5:95-105.
- White SJ, Stone MM & Howland C 1978. Genetic factors in leprosy: a study of children in Uganda. *The Journal of Hygiene* (London) 80:205-216.