

FRANCISCO MARCOS BEZERRA DA CUNHA

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Valor diagnóstico na hanseníase neural pura

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor. Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Lineu César Werneck

CURITIBA

2003

PARECER

Aos oito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e três, a banca examinadora, constituída pelos Professores Dr. Osvaldo José do Nascimento, Dr. Amilton Antunes Barreira, Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart, Dr^a. Rosana Hermínia Scola e Dr. Linneu César Werneck, exarou o presente parecer sobre a Tese elaborada por Francisco Marcos Bezerra da Cunha, do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Valor diagnóstico na hanseníase neural pura”.

A Banca Examinadora considerou que Francisco Marcos Bezerra da Cunha apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe Conceito “A”, correspondente ao Grau “A0,0”, sendo pois unanimemente recomendado a Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTOR EM MEDICINA e a publicação da tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 08 de dezembro de 2003.


Dr. Osvaldo José do Nascimento


Dr. Amilton Antunes Barreira


Dr. Isabela Maria B. Goulart


Dr^a. Rosana Hermínia Scola


Dr. Linneu Cesar Werneck

EPÍGRAFE

“A busca do conhecimento é uma luta incessante entre o não saber e o querer saber. Dialéctica presente no coração dos cientistas, que não se contentam somente em viver, mas buscam fazer valer e acontecer tudo que sonham.”

Caio César Henrique Cunha - 2003

DEDICATÓRIA

Ao Dr. Lineu César Werneck, incansável na arte de pesquisar e ensinar, pelos ensinamentos e apoio irrestritos. Com ele tenho aprendido muitas lições, mas destaco o amor às doenças neuromusculares, a honradez e a ética. Como foi bom tê-lo encontrado.

AGRADECIMENTOS

À minha **mãe**, que soube ser guerreira na criação de seus filhos.

Ao meu **pai**, desaparecido, do qual lamento não guardar nenhum fragmento de lembranças.

Aos meus avós **Lindolfo e Sinhara** dos quais guardo todas as lembranças.

Aos meus **filhos** que souberam suportar minha ausência durante este trabalho.

À **Anavôlda** boa companheira e sempre generosa na sua tolerância.

Aos meus irmãos **Beto, Dode, Diá e sobrinhos**.

Aos tios **Férrer**, que nunca economizou estímulos ao meu trabalho, e **Mary** que abdicou de suas horas de lazer ao lado das netas para revisar este texto.

À **Terezinha Férrer** exemplo de luta.

À **Angela Férrer e Luís Carvalho**, primos e amigos.

À **Risolene Bitu Alencar**, incansavelmente amiga.

À **Dra. Rosana Hermínia Scola** pelos incentivos e amizade.

Ao **Maurício César Werneck** que muito me ensinou e ajudou no Laboratório de Biologia Molecular, **Aline Freund** pelas valiosas sugestões e às **funcionárias do Laboratório de histoquímicas** do Serviço de Doenças Neuromusculares.

Ao **Dr. Fillus Neto**, do Departamento de Patologia da UFPR, pela contribuição de rever e detalhar os achados histológicos das lâminas dos pacientes.

Aos **professores e colaboradores** do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

À **Lúcia e Valéria**, da pós-graduação, dedicadas e especializadas no ofício de servir.

Aos **funcionários da biblioteca** do Hospital de Clínicas da UFPR.

À **Srta. Norma Carvalho Linhares e demais funcionários** da biblioteca da Faculdade de Medicina da UFC.

À **SOCENNE E À COOPNEURO** nossos estandarte e escudo, respectivamente, na luta por uma Neurologia melhor no Ceará.

Aos colegas do **PRONTONEURO**.

Aos **Drs. Carlos Maurício, demais colegas e Residentes** do Serviço de Neurologia do Hospital Universitário Prof. Walter Cantídio da UFC que acreditam na assistência, ensino e pesquisa na universidade pública.

Aos **Drs. Heitor Gonçalves e Paulo Cid**, que não hesitaram no apoio a este projeto, demais médicos e funcionários do Centro de Saúde Dona Libânia.

Ao **Dr. Adalberto Resende Santos**, pesquisador adjunto da FIOCRUZ, sempre solícito nas suas orientações.

À **Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart**, professora do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, MG, pelo estímulo e disponibilidade.

Ao **Dr. Adroaldo Rossetti** por sua paciência e sabedoria na ciência da estatística.

À **CAPES** pela bolsa que me concedeu.

À **FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA** do Paraná pelo financiamento.

Aos **pacientes hansênicos** com os quais pude dividir esperanças de uma vida melhor.

Finalmente, como é bom ter tantos e tanto a agradecer. Posso afirmar com certeza que nunca me senti sozinho e minha caminhada tornou-se mais agradável.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| EPÍGRAFE | II |
| DEDICATÓRIA..... | III |
| AGRADECIMENTOS..... | IV |
| LISTA DE ABREVIATURA..... | VIII |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS..... | X |
| RESUMO..... | XI |
| ABSTRACT..... | XII |
| 1- INTRODUÇÃO | 2 |
| 2 - REVISÃO DA LITERATURA..... | 5 |
| 2.1 - EPIDEMIOLOGIA..... | 5 |
| 2.2 - TRANSMISSÃO | 6 |
| 2.3 - MICROBIOLOGIA | 8 |
| 2.4 - IMUNOPATOGENESE | 11 |
| 2.5 - CLASSIFICAÇÃO | 23 |
| 2.6 - DIAGNÓSTICO | 29 |
| 2.6.1 - Anamnese | 29 |
| 2.6.2 - Exame dermato-neurológico | 30 |
| 2.6.3 - Investigação complementar..... | 33 |
| 2.6.4 - Classificação do grau de incapacidades física do doente | 34 |
| 2.7 - NEUROPATIA HANSÊNICA | 34 |
| 2.8 - HANSENÍASE NEURAL PURA..... | 39 |
| 2.9 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE | 43 |
| 3 - OBJETIVOS..... | 47 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 4.1- CASUÍSTICA..... | 49 |
| 4.2- MÉTODOS | 49 |
| 4.2.1- Critérios para classificação dos pacientes | 49 |
| 4.2.2- Anamnese | 51 |
| 4.2.3- Exame dermato-neurológico | 52 |
| 4.2.4- Exames complementares..... | 62 |
| 4.2.5- Coleta de amostras do nervo periférico | 66 |
| 4.2.6- Histopatologia do nervo periférico..... | 68 |
| 4.2.7- Extração do DNA de amostras do nervo periférico..... | 70 |
| 4.2.8- Técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase..... | 70 |
| 4.2.9- Eletroforese em gel de poliacrilamida | 71 |
| 4.2.10- Colaração e fixação..... | 72 |
| 4.3 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS | 73 |
| 5 - RESULTADOS | 76 |
| 6 – DISCUSSÃO | 86 |
| 6.1- Generalidades..... | 86 |
| 6.2- Histopatologia e o diagnóstico..... | 86 |
| 6.3- Reação em cadeia da polimerase da polimerase e o diagnóstico..... | 89 |
| 6.4- Relação entre a histopatologia e a reação em cadeia da polimerase..... | 91 |
| 6.5- Comentários finais..... | 95 |
| 7 - CONCLUSÕES | 99 |
| 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |
| 9 - ANEXOS | 121 |
| ANEXO 1 - PROCEDIMENTO PARA PREPARO DE SOLUÇÕES..... | 121 |
| ANEXO 2 - FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES PARA PCR | 122 |
| APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO | 123 |
| APÊNDICE 2 - FORMULÁRIOS..... | 124 |

LISTA DE ABREVIATURA

| | |
|--|--|
| μg – Micrograma | M. leprae – <i>Mycobacterium leprae</i> |
| μl – Micro litro | MB – Multibacilar |
| μM – Micromolar | MDT – Multidrogaoterapia |
| a. C – Antes de Cristo | MgCl – Cloreto de magnésio |
| ag – 10^{-18} gramas | mM – Milemolar |
| AgNO ₃ – Nitrato de prata | mM Milmolar |
| BAAR – Bacilo álcool-ácido-resistente | mRNA –Ácido ribonucléico mensageiro |
| BB – Borderline-Borderline | Na ₂ CO ₃ – Bicarbonato de sódio |
| BL – Borderline-Lepromatoso | NaH ₂ PO ₄ – Difosfato de sódio |
| BT – Borderline-Tuberculóide | NaOH – Hidróxido de sódio |
| d.C – Depois de Cristo | NK – Natural Killer |
| DNA – Ácido desoxi-ribonucleico | OMS – Organização Mundial de Saúde |
| ENL – Eritema nodoso leprótico | Pb – Pares de base |
| G – Grama | PB – Paucibacilar |
| Hab – Habitantes | PCR – Reação em cadeia da polimerase |
| HE – Hematoxilina eosina | PGL-1 – Ácido glicofenólico 1 |
| HI – Hanseníase indeterminada | PSSE – Potenciais somato-sensoriais evocados |
| HNO ₃ – Ácido nítrico | RNA – Ácido ribonucleico |
| HNP – Hanseníase Neural Pura | Rpm – Rotação por minuto |
| HT – Hanseníase tuberculóide | T - Tuberculóide |
| IB – Índice baciloscópico | TBE – Tris-Borato-EDTA |
| IFN- γ - Interferon-gama | TNF α - Fator de necrose tumoral- α |
| IL – Interleucina | TNF β - Fator de necrose tumoral- β |
| KCl – Cloreto de potássio | TNF- α - Fator alfa de necrose tumoral |
| LL – Hanseníase Lepromatosa | Tris-HCL – Tris-ácido clorídico |
| LTT – Teste de transformação linfocitária | TT – Tuberculóide |
| M – Molar | V - Volt |
| M. leprae – <i>Mycobacterium leprae</i> | |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática do <i>Mycobacterium leprae</i> (A) e estrutura química do trissacarídeo antígenicamente específico (B)..... | 9 |
| Figura 2. Padrão de resposta imunológica na hanseníase..... | 15 |
| Figura 3. Mecanismos bactericidas do macrófago em resposta ao <i>M. Leprae</i> | 16 |
| Figura 4. Representação esquemática da infecção hansênica em nível molecular..... | 21 |
| Figura 5. Representação esquemática dos pontos sensitivos padronizados das mãos e dos pés..... | 54 |
| Figura 6. Ramo cervical do nervo facial (Paciente 2)..... | 61 |
| Figura 7. Nervo retroauricular (Paciente 55)..... | 61 |
| Figura 8. Nervo ulnar com abscesso e fístula (Paciente 57)..... | 61 |
| Figura 9. Nervo cutâneo lateral da coxa espessado (Paciente 35)..... | 61 |
| Figura 10. Nervo fibular superficial espessado (Paciente 28)..... | 61 |
| Figura 11. Nervo safeno espessado (Paciente 56)..... | 61 |
| Figura 12. Nervo sural espessado (Paciente 44)..... | 61 |
| Figura 13. Nervo radial superficial com diferenças de amplitudes entre os lados (Paciente 19)..... | 66 |
| Figura 14. Nervo ulnar com bloqueio de condução e dispersão temporal (Paciente 51)..... | 66 |
| Figura 15. Biópsia de nervo sural (Paciente 30)..... | 67 |
| Figura 16. Epineurotomia e biópsia do nervo ulnar (Paciente 29)..... | 67 |
| Figura 17. Nervo normal. Coloração HE. Barra 200 μ . (Paciente 8)..... | 69 |
| Figura 18. Granuloma. Coloração HE. Barra 90 μ . (Paciente 13)..... | 69 |
| Figura 19. Granuloma com necrose caseosa. Coloração Tricromo de Gomori. Barra 100 μ . (Paciente 33)..... | 69 |
| Figura 20. Infiltrado inflamatório intersticial inespecífica. Coloração Tricromo de Gomori . Barra 50 μ . (Paciente 43)..... | 69 |
| Figura 21. Célula de Virchow com BAAR. Coloração Fite-Faraco. Barra 20 μ . (Paciente 37)..... | 69 |
| Figura 22. Gel de poliácridamida corada com prata e visualização de bandas que correspondem a fragmentos do DNA de <i>Mycobacterium leprae</i> com 372 pb..... | 73 |

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Distribuição dos pacientes com Hanseníase neural pura, segundo formas clínicas e sexo..... | 50 |
| Tabela 2. Dados clínicos na Hanseníase neural pura por formas clínicas | 52 |
| Tabela 3. Grau de força muscular adaptada para as ações básicas de prevenção de incapacidades na Hanseníase..... | 55 |
| Tabela 4. Casuística dos dados clínicos e eletrofisiológicos da Hanseníase neural pura | 59 |
| Tabela 5. Distribuição dos nervos comprometidos na Hanseníase neural pura... | 60 |
| Tabela 6. Padrões eletrofisiológicos de neuropatia na Hanseníase neural pura por formas clínicas | 64 |
| Tabela 7. Padrões eletrofisiológicos de neuropatia na forma tuberculóide da Hanseníase neural pura por tempo de doença | 65 |
| Tabela 8. Padrões eletrofisiológicos de neuropatia na forma borderline-tuberculóide da Hanseníase neural pura por tempo de doença | 65 |
| Tabela 9. Resultados histopatológicos e da PCR da Hanseníase neural pura..... | 77 |
| Tabela 10. Dados histopatológicos dos nervos na Hanseníase neural pura por formas clínicas | 78 |
| Tabela 11. Distribuição dos resultados do BAAR nos nervos da Hanseníase neural pura por formas clínicas..... | 78 |
| Tabela 12. Distribuição dos resultados da PCR (<i>M. leprae</i>) nos nervos na Hanseníase neural pura por formas clínicas | 79 |
| Tabela 13. Distribuição dos resultados da PCR (<i>M. leprae</i>) e BAAR nos nervos na Hanseníase neural pura | 79 |
| Tabela 14. Pacientes com Hanseníase neural pura distribuídos segundo forma clínica e tempo de doença até o diagnóstico..... | 80 |
| Tabela 15. Principais dados histopatológicos, BAAR e PCR (<i>M. leprae</i>) nas formas tuberculóide e borderline-tuberculóide da Hanseníase neural pura por tempo de doença | 81 |
| Tabela 16. Relação dos dados gerais, histopatológicos, BAAR e da PCR nos pacientes com diagnóstico de neuropatias não Hanseníase..... | 83 |
| Tabela 17. Cálculo de sensibilidade e especificidade dos dados clínicos, histopatológicos e da PCR na Hanseníase neural pura | 84 |

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que compromete os nervos, a pele e outros tecidos. É difícil fazer o diagnóstico da hanseníase neural pura (HNP). Este trabalho objetivou estudar o valor diagnóstico da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua correlação com a histopatologia dos nervos na hanseníase neural pura (HNP). Foram estudados 58 pacientes com suspeita diagnóstica de HNP no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, e do Centro de Saúde Dona Libânia, unidade de referência em hanseníase no Estado do Ceará, Fortaleza. Todos os casos foram submetidos a um protocolo pré-determinado constando de anamnese, exame dermatoneurológico, rotina laboratorial simples, pesquisa baciloscópica, eletroneuromiografia, histopatologia e PCR de amostras de biópsias de nervos selecionados. O nervo biopsiado foi dividido em dois fragmentos: um para histopatologia e outro para PCR. Da amostra para a PCR foi extraído o DNA e feito amplificação da seqüência específica-repetida do DNA *Mycobacterium leprae*, conforme Woods e Cole (1989). Dos 58 pacientes, 41 (70,7%) eram do sexo masculino e 17 (29,3%) do feminino. A idade média dos pacientes BT foi de 45,0 (\pm 18,2) anos, variando de 15 a 77 anos, (mediana de 44,5). Nos pacientes TT a idade média foi 36,2 (\pm 9,2) anos, variando de 17 a 53 anos, (mediana de 35,0 anos). O tempo de doença até o diagnóstico foi de 2,3 (\pm 2,2) anos, (mediana de 1,5 ano) na forma BT. Na forma TT foi de 2,0 (\pm 2,9) anos, (mediana de 1,0 ano). Os doentes puderam ser classificados de acordo com Ridley e Jopling (1966) em Borderline-Tuberculóide (BT), 40 casos (69%) e Tuberculóide polar (TT), 18 casos (31%). Os principais nervos comprometidos foram o ulnar (33,0%), o fibular comum (10,7%), o fibular superficial (16,1%) e o sural (17,3%). Os padrões de neuropatia foram: sensitivo-motora múltipla, 36 casos (62,1%); sensitivo-múltipla, 7 casos (12,0%); mononeuropatia sensitivo-motora, 11 casos (19,0%) e mononeuropatia sensitiva, 4 (6,9%). O nervo sural foi biopsiado em 38 pacientes (65,5%). O BAAR foi positivo nos nervos de 20 doentes, 34,5% do total dos casos, sendo 50% dos BT e nenhum TT. A PCR foi positiva nas amostras dos nervos de 29 (50%) do total dos doentes, sendo 27 pacientes (67,5%) na forma BT e 2 (11,0%) na forma TT. A PCR é um método útil no diagnóstico da hanseníase neural pura. Sua aplicação permite confirmar o diagnóstico de hanseníase, mesmo nos casos de biópsias neurais BAAR negativas.

ABSTRACT

Leprosy is a disease of nerves, skin and other tissues. Some times is difficult to make the diagnosis of the pure neural leprosy (PNL). To improve the diagnosis this study was done with the following objectives: 1. To study the diagnosis importance of the polymerase chain reaction in PNL; 2. To verify the relationship between the histopathological changes in the nerve and PCR for DNA of *M.leprae*. Fifty-eight patients with clinical suspicion of PNL were studied. They were patients from the Service of Neuromuscular Diseases of the Clinical Hospital of UFPR and Dona Libania Health Center (a reference unit for leprosy in the state of Ceará). All cases were submitted to a pre-determined protocol including anamnesis, dermatoneurological examination, laboratorial routine, bacilloscopia research, electroneuromiography, histopatology and PCR of the selected nerves. The nerve biopsy was divided in two fragments: one for PCR and another for histological study. From the sample for PCR, DNA was extracted and the sequence of DNA *M-leprae*-specific was amplified according to Woods and Cole (1989). After it was visualized with plates of agarose gel, was compared with positive and negative controls for *M.leprae* with another non-leprosy neuropathy. From 58 patients, 41 (70.7%) were males and 17 (29.3%) females. The age varied from 15 to 77 years (mean 45.0 years) in to BT forms and to TT forms the age varied 17 to 53 years (mean mean 36,2 years). The evolution of the disease ranged from 2.3 years (mean of 1.5 year) in to BT cases and to TT cases was 2.0 years (mean 1.0 year). The patients were classified according to Ridley and Jopling (1966) in to Borderline-Tuberculoid BT 40 cases (69%) and Tuberculoid polar TT 18 cases (31%). The main nerves involved was ulnar (33.0%), common peroneal (10.7%), superficial peroneal (16.1%) and sural (17.3%). The patterns of neuropathy: multiple motor-sensitive 36 cases (62.1%), multiple sensitive 7 cases (12.0%), motor-sensitive mononeuritis 11 cases (19.0%), sensitive mononeuritis 4 cases (6.9%). The sural nerve was biopsied in 38 cases (65.1%). The Acid-fast-bacilli (AFB) was positive in the nerves of 20 cases (34.4%) of BT in none of TT. The PCR was positive in the nerves of 29 patients (50%). Of these, 67,5% in to BT cases and 11,0% TT cases. The PCR is a useful diagnostic method in pure neural leprosy and allow the confirmation of the diagnoses in AFB negative nerves.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A hanseníase (Lepra, Doença de Hansen ou Morféia) é uma doença infecto-contagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que compromete o sistema nervoso periférico, a pele e outros tecidos [BROWNE, 1989b; BRYCESON & PTALZZGRAFF, 1990].

Trata-se de uma doença muito antiga. Os seus relatos perdem-se na pré-história e documentos antigos da humanidade como os papiros egípcios, os livros mosaicos e védicos, a Avesta persa e as tradições fenícias já a mencionavam. A primeira referência escrita sobre a hanseníase data de 600 a.C na Índia, onde a doença era conhecida como “Kushta”, em sânscrito. A primeira descrição inequívoca da doença cabe a Aretaeus, 150 d.C., chamando-a de “Elefantíase”. Contudo, a sua origem Africana ou Asiática é discutida. [BROWNE, 1989b; LECHAT, 1999; MITCHELL, 1993; SKINSNES, 1970; SKINSNES & ELVOVE, 1970].

No Brasil, a doença foi trazida pelos colonizadores europeus e escravos africanos. Na população indígena não se conhece caso registrado de hanseníase antes da colonização [CUNHA, 2002; LIMA, 1897].

A doença incorporou o estigma da peste aterrorizando a humanidade, como uma enfermidade incurável. As deformidades físicas causadas pela doença contribuíram para o estigma. Mesmo os avanços no tratamento foram incapazes de evitar a segregação do paciente e eliminar o preconceito. A hanseníase hoje é curável em qualquer de suas formas, mas o doente continua excluído do convívio social [BROWNE, 1989b; JOPLING & McDOUGALL, 1991; NOORDEEN, 1993; SKINSNES & ELVONE, 1970].

Atualmente, a hanseníase é classificada do ponto de vista clínico e imuno-histopatológico, segundo Ridley & Jopling, em dois grupos polares: Tuberculóide (TT) e Lepromatoso (LL); e três tipos intermediários: Borderline-

Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB) e Borderline-Lepromatoso (BL). Nessa classificação são incluídos somente os casos com lesões de pele, associadas ou não com lesões de nervos [RIDLEY & JOPLING, 1966]. Nos doentes hansênicos, sem lesão de pele (Hanseníase Neural Pura - HNP), o diagnóstico não tem sido fácil, mesmo após investigação criteriosa. Considerando esse aspecto, os pesquisadores são motivados a estudar a utilização da biologia molecular, particularmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), como método diagnóstico da hanseníase neural pura [WOODS & COLE, 1989; HARTSKEERL et al., 1989; SANTOS et al., 1993; HACKEL, 1990; JOB et al., 1997a; SHI et al., 2000; GERRERO et al., 2002].

REVISÃO DA LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Estima-se, no mundo um número de hansenianos em registro ativo (Prevalência) de 1,25 caso por 10.000 habitantes (hab) (753.263 casos) com uma taxa de detecção (Incidência) de 12,3 casos por 100.000 hab. (738.284 casos). Nas Américas, o total é avaliado em 85.996 casos (Prevalência = 1,0:10.000) e 44.786 casos (Incidência = 5,5:100.00) [WHO, 2002].

No Brasil existem 77.676 casos da doença em registro ativo e 41.070 casos novos diagnosticados anualmente. Isso representa coeficientes de prevalência de 4,6 casos/10.000 hab. e incidência de 24,1:100.000 hab. Esses números colocam o Brasil no segundo lugar, em escala mundial, e no primeiro lugar em número de doentes na América Latina. Ainda no ano de 2000 foram detectados 1.574 doentes (16,6/100.000 hab.) no Paraná e 2.092 (29,0/100.00 hab.) no Ceará. No Paraná são 2.612 casos (2,7/10.000 hab.) e no Ceará 3.342 casos (4,6/10.000 hab.) em registro ativo nas respectivas Secretarias de Saúde. De acordo com os coeficientes de detecção, a doença é um problema grave e sério de saúde pública [BRASIL-SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2002; WHO, 2002].

Segundo os parâmetros para avaliação dos coeficientes de prevalências as regiões são consideradas hiperendêmicas quando houver mais de 20 casos/10.000 hab.; muito altas: 10 a 20 casos/10.000 hab.; altas: 5 a 10 casos/10.000 hab.; médios: 1 a 5 casos/10.000 hab.; baixos menos de 1 caso/10.000 hab. Para os coeficientes de detecção têm-se: hiperendêmicos com 4

casos/100.000 hab.; muito altos: 2 a 4 casos/100.000 hab.; altos: 1 a 2 casos/100.000 hab., médios: 0.2 a 1 casos/100.000 hab., baixos: < 0.20 casos/100.000 hab. [LOMBARDI, 1990; LOMBARDI & SUÁREZ, 1997; NOORDEEN et al., 1992; NOORDEEN, 1993; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE E ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1998; WHO, 1998].

2.2 - TRANSMISSÃO

O agente etiológico da hanseníase é o *Mycobacterium leprae* (Bacilo de Hansen) descoberto por Gerhard Henrik Armauer Hansen, na Noruega em 1873. Ao lado da *Pseudomonas aeruginosa* (*B. pyocyaneus*) e do *Bacillus anthracis*, faz parte do grupo de bactérias patogênicas mais antigas conhecidas pelo homem [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; JOPLING & McDOUGALL, 1991; VOGELANG, 1978; COLSTON, 1993a].

Os conhecimentos atuais revelam que a hanseníase parece não ser exclusiva da espécie humana, sendo encontrada em tatus, chimpanzés e outros macacos, naturalmente infectados com *M. leprae* [COLSTON, 1993a].

O modo de transmissão da hanseníase parece incerto, mas acredita-se que ocorra, principalmente, por meio de contato íntimo e prolongado com os doentes bacilíferos, formas Lepromatosa e Borderline, não tratados. As principais fontes de bactérias são as mucosas das vias aéreas superiores. A mucosa nasal é um reservatório de bacilos em até 55% de pacientes bacilíferos [CREE & SMITH, 1998; NATIONS et al., 1998; EBENEZER et al., 1999; PATTYN et al., 1993]. O *M. leprae* pode permanecer viável em escarros ressecados de doentes bacilíferos durante até nove dias [LOMBARDI, 1990; CREE & SMITH, 1998]. Camundongos imunossuprimidos, quando expostos a aerossóis com bacilos, podem desenvolver a infecção em taxas de 33% [NATIONS et al., 1998; COLSTON & HILSON, 1976]. Sugere-se que a transmissão vertical (transplacentária) tem ocorrido nos raros casos diagnosticados em crianças com menos de um ano de vida e expostas

intra-útero. Essa hipótese tem por base a elevação dos níveis dos anticorpos IgA e IgM em crianças com idade entre três e 24 meses [MELSON et al., 1980; MELSON et al., 1982]. A presença de *M. leprae* no leite materno de mães bacilíferas pode sugerir a via gastrointestinal como porta de entrada em lactentes [PEDLEY, 1967; PALLAN & McDERMONT, 1986]. O papel de insetos como vetores de bacilos é discutível [DEVASUNDARAM, 1993; ABRAHM et al., 1998].

Acredita-se que a infecção subclínica seja comum em áreas endêmicas. Estudos utilizando a PCR evidenciaram resultados positivos, indicando a presença do DNA do *M. leprae* na secreção nasal dos comunicantes domiciliares assintomáticos. Esses achados são relatados também em grupos controle sem evidência de contatos. [DE WIT et al., 1993]. Testes de sorologia com o ácido glicofenólico-1 (PGL-1) têm mostrado sua sensibilidade para detecção de infecção subclínica na hanseníase [BAUMGART et al., 1993; GUPTA, 1996; MILEP2 STUDY GROUP, 2000; PATTYN et al., 1993]. Um fato importante é que mesmo convivendo durante muito tempo na mesma casa com o doente não tratado, a maioria das pessoas não adoece. Cerca de 90% da população possui uma resistência natural ao Bacilo de Hansen e nunca vai contrair a doença [LOMBARDI & SUÁREZ, 1997]. O percentual que atinge ambos os cônjuges é de apenas 5% [NATIONS et al., 1998]. Nas crianças parece que o risco de contaminação é maior do que nos adultos, contudo, são muitos os relatos de remissão espontânea da doença nessa fase da vida. Soma-se a isso o fato de que nem todos os tipos de hanseníase são transmissíveis e, mesmo nos casos possíveis de contágio, o paciente deixa de contaminar após 15 dias de iniciado o tratamento. Quando ocorre a transmissão os primeiros sintomas da hanseníase aparecerão após um período de incubação variável de 3 a 5 anos [COLSTON, 1993a; JOPLING & McDOUGALL, 1991; LOMBARDI & SUÁREZ, 1997; SPIEGEL & BRADLEY, 1998; ABRAHM et al., 1998; BAUMGART et al., 1993].

2.3 - MICROBIOLOGIA

O *Mycobacterium leprae* é um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. Cora-se em vermelho pela Fucsina e não se descora pelo álcool e ácidos, o que o caracteriza como “bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)”. [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; COLSTON, 1993a]. Nos esfregaços de linfa e nos cortes histológicos, os bacilos podem ser bem visualizados pela técnica de Ziehl-Nielsen e Fite-Faraco modificado, respectivamente [JOPLING & McDOUGALL, 1991]. Nos tecidos infectados, os bacilos são vistos isolados ou agrupados em arranjos denominados globias. As globias representam uma característica peculiar do *M. leprae*, nas quais as micobactérias estão unidas por uma substância chamada gléia, que torna difícil a sua separação [BRENNAN, 1986; BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; JOPLING & McDOUGALL, 1991; REES, 1989].

Na microscopia eletrônica, o bacilo mostra uma estrutura comum ao gênero *Mycobacterium*: cápsula, parede celular, membrana e citoplasma [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990] (*Figura 1A*). A cápsula é um material vesicular ou espumoso, eletrotransparente, próprio do *Mycobacterium leprae*. Sua estrutura química é formada por dois lipídios, com função protetora, e um glicolipídio fenólico, composto por um trissacarídeo ligado por uma molécula fenol aos lipídios, que por sua vez se ligam a outros bacilos. Esse trissacarídeo é único e antigenicamente específico para o *M. leprae*, sendo chamado glico-lipídio fenólico-1 (PGL-1) [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990] (*Figura 1B*).

Mycobacterium leprae

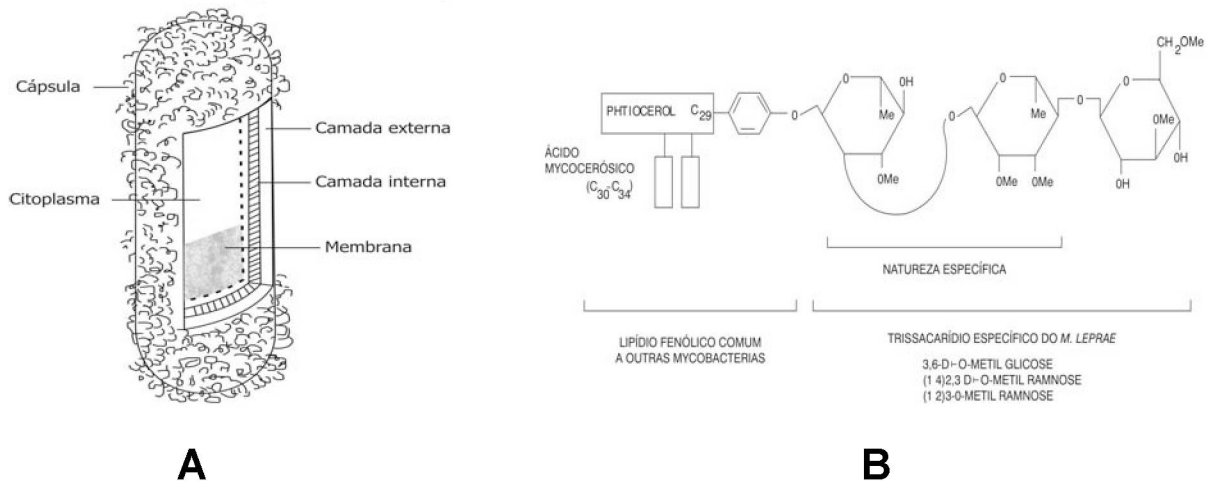


Figura 1- Representação esquemática do *M. leprae* (A) estrutura química do trissacarídeo antígenicamente específico (B) (Brycesson & Pfaltzgraft, 1990 e Seckl, 1985. Modificadas)

A parede celular é constituída por duas camadas: uma externa, eletrotransparente, com polissacídeos compostos de arabinogalactanos esterificados e ácidos micólicos, à semelhança de outras micobactérias; e outra interna de peptideoglicanos: carboidratos ligados por peptídios cujas seqüências de aminoácidos são específica do *M. leprae*, podendo ser utilizados no diagnóstico antígeno. A membrana é justaposta e aderida à parede celular. Trata-se de uma membrana com função de transporte molecular para fora e para dentro do microorganismo. É composta de lipídios e proteínas. Estas são, na sua maior parte, enzimas, podendo se constituir em bom alvo para a quimioterapia, e, também, em antígenos protéicos de superfície. O citoplasma contém depósitos granulares, ácido desoxiribonucléico (DNA) e ribossomos relacionados com a tradução e a multiplicação do material genético [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; BRENNAN, 1986; COLSTON, 1993a; COLSTON, 1993b; DRAPPER, 1986; REES, 1989].

Os principais elementos químicos do *M. leprae*, em torno de 20, são antígenos de baixa potência possíveis de serem identificados no soro de pacientes com hanseníase. Brennan, em 1981, descreveu o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) mostrando sua especificidade ao *M. leprae* através de uma pequena parte da

molécula chamada epítoto. A antigenicidade do *M. leprae* é determinada pelos antígenos carboidratos [BRENNAN, 1986; DRAPPER, 1986].

A identificação do *M. leprae* pode ser feita por meio de cultura em modelos experimentais, observando-se as seguintes características:

1- quando amostras infectadas são coradas pela fucsina, pré-tratado com piridina, tem-se uma perda da ácido-resistência [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990];

2- identificação sérica do glicolípido fenólico-1 (PGL-1) [BRENNAN, 1986; BRENNAN, 1994];

3- reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva para uma seqüência específica do *M. leprae* em amostras contendo DNA extraído da pele, nerve e outros tecidos [COLE et al., 2000; COLSTON, 1993b; EIGLEIMER et al., 2001; WHEELER, 2001; HACKEL, 1990; HASTSKEERL et al., 1989].

Nos estudos em modelos experimentais, o animal mais utilizado é o camundongo. A infecção foi inicialmente descrita por Charles Shepard (1960), e, desde então, usada com grande aplicação. Os ratos são inoculados na porção subcutânea da pata, em geral com 5 a 10 mil bacilos. Há um período médio de incubação de dois meses, seguindo-se um crescimento logarítmico, no qual se multiplicam de forma exponencial até o limite de 10^6 bacilos por pata inoculada por um período de seis meses. A infecção é autolimitada e localizada. Infecções mais graves são vistas em ratos imunossuprimidos de células T, por exemplo, após timectomias, irradiações e atimia congênita [REES, 1966; REES et al., 1967; REES, 1989; COLSTON & HILSON, 1976; SHEPARD, 1960; SHEPARD, 1968; SHEPARD, 1971] .

O modelo experimental de pata de camundongo tem sido extensivamente usado para controle e avaliação de campanhas contra o *M. leprae*, monitorização de infectividade de biópsias de pacientes durante a terapia e controle de resistência aos medicamentos [REES, 1989; SHEPARD, 1971]. Embora as informações obtidas sejam

valiosas e fundamentais no sucesso da multidrogaterapia (MDT), necessita-se de maior tempo para conclusões mais consistentes [COLSTON, 1993a; WATERS, 1993].

Os tatus (*Dasyus novemcintus*) são animais muito susceptíveis à infecção pelo *M. leprae* têm sido utilizados na pesquisa da hanseníase. Nesses animais superinfectados, os órgãos internos, com destaque para o fígado e pâncreas, podem conter mais do que 10^{10} *M. leprae* por grama de tecido. Desses organismos são obtidos bacilos purificados usados nas pesquisas de fisiologia, imunohistoquímica e biologia molecular [KIRCHHEIMER & STORRS, 1971].

Do ponto de vista da biologia molecular, maior disponibilidade de tecidos de tatus infectados facilita melhor extração de ácidos nucleicos do *M. leprae* com preparação de bibliotecas de DNA [CLARK-CURTISS et al., 1985].

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidas muitas técnicas moleculares para detectar e identificar microorganismos. Tais técnicas podem ser utilizadas nos casos em que a cultura seja inviável, destacando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) usada para amplificar pequenas quantidades de DNA ou RNA [BRENNAN, 1994; JOB et al., 1997a; KURABACHEW et al., 1998; SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1995; SANTOS et al., 1999; WICHITWECHKARN et al., 1995; De WIT et al., 1991; De WIT et al., 1993; SPIEGEL & BRADLEY, 1998; HARTSKEERL et al., 1989; PULST, 2000; RAFI et al., 1995; WHEELER, 2001; EIGLEMEIR et al., 2001; GILLIS & WILLIAMS, 1991; GILLIS, 1998].

2.4 - IMUNOPATOGÊNESE

A hanseníase pode ser considerada um modelo para o estudo da imunologia. Na relação germe-hospedeiro, a doença manifesta-se num espectro de polaridade da resistência imunológica. A forma tuberculóide (HTT) ocorre nos pacientes com alta resistência, levando à formação de um granuloma bem definido, pequeno número de lesões ausência ou presença escassa de bacilos. A forma

Lepromatosa (HL) surge nos indivíduos com baixa resistência, tendo uma resposta imuno-celular deficiente, lesões para múltiplos órgãos, disseminação bacilar em grandes proporções, atingindo muitas vezes 10^{10} bacilos/grama de tecido [AZULAY, 1997; BRITTON, 1993; CHOUDHURI, 1995].

No intermezzo desse espectro polar estão as formas instáveis, borderlines (HB), com variabilidade clínica e imunológica. A hanseníase borderline (HB) pode se aproximar da forma tuberculóide, hanseníase borderline-tuberculóide (HBT); ou da forma lepromatosa, hanseníase borderline-lepromatosa (HBL); ou, no meio do espectro, hanseníase borderline-borderline (HBB). Essa doutrina da polaridade imunológica, proposta por Rabelo em 1937, tem resistido ao tempo, sendo reforçada pelos novos conhecimentos imunológicos [AZULAY, 1997; FOSS, 1997; GOULART et al., 2002; RABELLO, 1937; RABELLO, 1976; RIDLEY, 1974; GELBER & REA, 2000].

A imunidade pode ser celular e humoral. A base dessas respostas imunológicas são os linfócitos dos tipos T e B. O primeiro relaciona-se com a imunidade celular e o segundo com a humoral. Deve-se ressaltar que a interação entre o macrófago e o linfócito T é fundamental na resistência à infecção hanseniana. Na HL ocorre uma incapacidade de os macrófagos destruírem o *M. leprae*, resultando na formação de uma célula rica em bacilos e com degeneração gordurosa intra-citoplasmática (Célula de Virchow) [AZULAY, 1997; MODLIN & BLOOM, 1993]. Não está esclarecido, ainda, se o defeito é do macrófago ou do linfócito, insensível na ativação do macrófago para destruir o germe. Pesquisas recentes têm demonstrado a ativação induzida artificialmente nessas células em doentes com hanseníase lepromatosa [BIRDI & ANTIA, 1989]. Na HT ocorre uma intensa resposta celular imuno-mediada, caracterizada pela formação de um granuloma bem definido. Predominam linfócitos T e macrófagos com uma coroa linfocitária densa como

resultado da liberação de antígenos e destruição tecidual local [AZULAY, 1997; BIRDI & ANTIA, 1989; BRITTON, 1993; GELBER & REA, 2000; COLSTON, 1993a; FOSS, 1997; LOCKWOOD & BRICÉSSON, 1998; OTTENFHOFF, 1994; SPIERINGS et al., 2000; GELBER & REA, 2000].

Há evidências de que os macrófagos dos doentes virchowianos possuem uma deficiência específica na lise dos bacilos quando comparados com os macrófagos dos doentes com hanseníase tuberculóide e de indivíduos saudáveis. Experimentos com culturas de macrófagos demonstram que componentes da estrutura do *M. leprae*, destacando-se o PGL-1, deprimem a produção de TNF- α nas células dos indivíduos saudáveis, suprimindo a imunidade celular [BIRDI & ANTIA, 1989; BRITTON, 1993; GELBER & REA, 2000; GOULART et al., 2002].

Além disto, o *M. leprae*, parece ter mecanismos para escapar da resposta imunológica do hospedeiro. O linfócito T dos pacientes virchowianos não se reproduz *in vitro* na presença do *M. leprae*, mas pode responder nos casos em que os bacilos sejam purificados de seus antígenos. Nakamura et al. (1997) demonstraram que o *M. leprae* fagocitado parece inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos, inclusive o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 e IL-6. A quantidade de citocinas será fundamental na direção das respostas [NATIONS et al., 1998; MODLIN & BLOOM, 1993; ROACH et al., 2002; SPIERINGS et al., 2000].

A resposta imunológica ao *M. leprae* determina a evolução da infecção e, também, a forma clínica da hanseníase [LOCKWOOD & BRICÉSSON, 1998; SIELING & MODLIN, 1994]. Os linfócitos T e macrófagos têm um papel importante na identificação e resposta aos antígenos do *M. leprae*. Esta reação é desencadeada quando os macrófagos fagocitam o *M. leprae*, passando a produzir as citocinas (IL-1, TNF- α e IL-12) que atuam sobre os linfócitos T, particularmente a população CD4+, ativando-os para a produção de suas próprias citocinas, como a interleucina-2 (IL-2). Esta resposta aumentada ocorre devido ao recrutamento e ativação dos linfócitos T. Por sua vez, a

IL-2 estimula a expansão dos linfócitos CD8+ e antígenos não específicos das células *natural killer* (NK) nas lesões [BRITTON, 1993; SARNO & SAMPAIO, 1996; MODLIN, 1995].

Os macrófagos, os linfócitos CD4+ e as células NK produzem o Interferon-gama (INF- γ), a principal citocina responsável pelo mecanismo bactericida dentro do macrófago parasitado. Em modelos murinos de infecção intracelular, resposta imune resistente versus suscetível, parece ser regulada por duas subpopulações de células T subdivididas em Th1(*Helper*) e Th2 (*Supressor*), tendo uma função imuno-reguladora especificamente mediada pelas citocinas. O balanço entre os dois modelos determina a forma da doença e sua patogênese [GOULART et al., 2002; SIELING & MODLIN, 1994]. Em suma, no centro de um granuloma tuberculóide as células Th1 produzem interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ). A partir da liberação dessas citocinas as células Th1 aumentam a imunidade celular, ativando os macrófagos e promovendo sua auto-ativação, estimulando o crescimento da célula T-antígeno específica, resultando na doença menos agressiva ou curando espontaneamente. Ao contrário, as células Th2 aumentam a resposta humoral e os macrófagos contaminados presentes nas lesões virchowiana e produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10, as quais inibem os macrófagos e a célula Th2 na função de promover a resposta imuno-mediada, formando-se as Células de Virchow [WEIR, 2000]. A IL-4 estimula a produção de IgE associada à IL-10, estimula os linfócitos B e inibe a ativação dos macrófagos com conseqüente infecção progressiva e formas mais graves da doença (Figura 2).

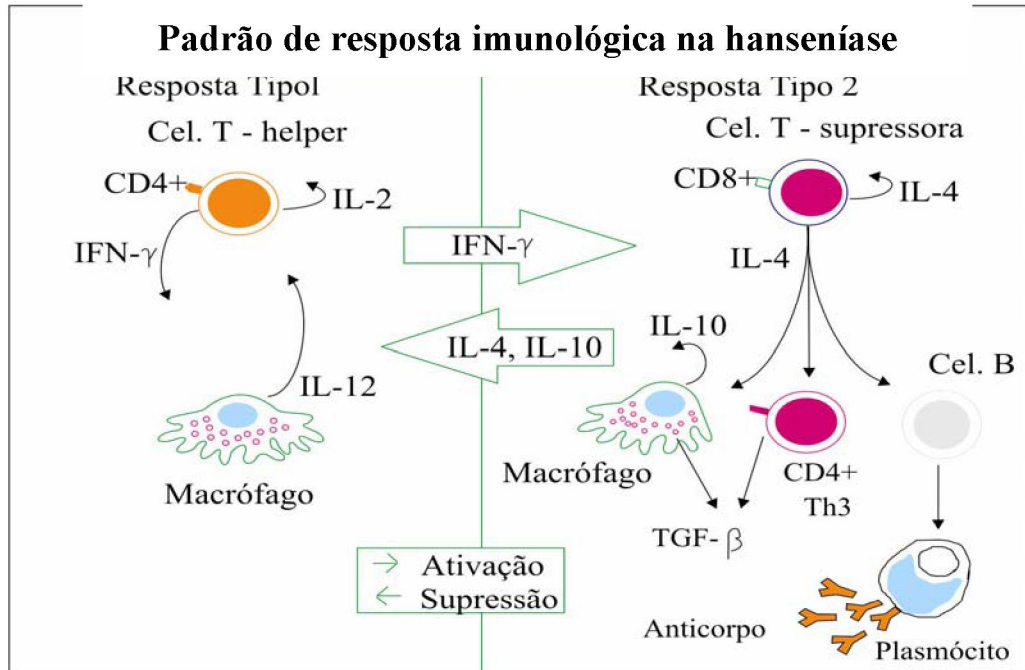


Figura 2: Na forma TT, no padrão de resposta tipo 1, a IL-2 é um fator de crescimento autócrino para células T helper que faz a ativação do macrófago mediada pelo IFN- γ (imunidade mediada por célula). No padrão de resposta tipo 2, na forma LL, IL-4 é um fator de crescimento para células T supressoras, estimulando a diferenciação de células B para produção de anticorpos (imunidade humoral). Na presença de IL-4, uma subclasse de célula TCD4+ (Th3) são ativadas para a produção de TGF- β , potente fator supressor de macrófago. Citocinas de macrófagos são cruciais em cada padrão: no tipo 1, IL-12 é um poderoso estímulo para células T helper; no tipo 2, IL-10 suprime o próprio macrófago. Citocinas produzidas em um tipo de resposta podem mutuamente se inibir de um modo multifacetado, simplificado aqui por duas grandes setas (Goulart, 1995. Adaptado de Modlin & Bloom 1993. Reproduzido com permissão).

Não se conhece como os linfócitos T (Th1 e Th2) diferem entre si e quais os fatores que induzem as suas modificações. Acredita-se que a herança genética responsável pelas moléculas dos antígenos de apresentação do Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) determine a resposta imunológica a ser seguida após a fagocitose do bacilo no interior do macrófago [SUZUKI et al., 1993; YAMAMURA et al., 1992] (Figura 3).

Fatores genéticos têm relação com a doença como elemento pré-disponente. O HLA-DR-3 tem sido associado à forma tuberculóide da doença e o HLA-DQ1 com a virchowiana. Uma relação da prevalência da forma clínica da hanseníase foi demonstrada em gêmeos homozigóticos, mas não em dizigóticos [BEIGUELMAN, 2002; CURTISS III et al., 2000].

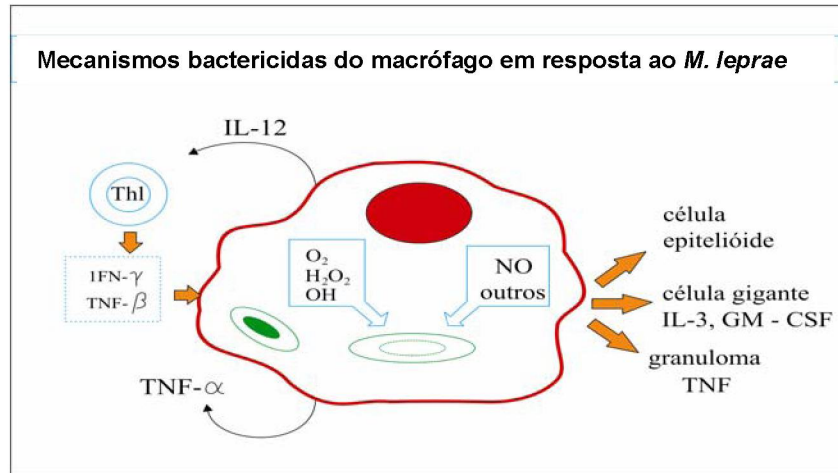


Figura 3: Macrófago Φ ativada na forma clínica Tuberculóide produz IL-12, que estimula a sub-população Th1 a produzir grande quantidade de IFN- γ , principal ativador de radicais microbicidas (derivados do oxigênio e do nitrogênio) no macrófago. Esse macrófago ativado secreta de forma autócrina TNF- α que é o mantenedor do granuloma (Goulart, 1995. Adaptado de Britton, 1993. Reproduzido com permissão).

Na HT, ocorre uma resposta competente imuno-mediada. Na HL, os pacientes são imuno-incompetentes para essa resposta. A avaliação funcional dos linfócitos T pode ser feita com os testes de transformação linfocitária (LTT) que mostram que os pacientes hansenianos respondem ao *M. leprae* íntegro e aos seus antígenos clonados de 18 Kda e 65 Kda isolados do bacilo [LOCKWOOD & BRYCESSON, 1998].

Na HL, os pacientes são incompetentes para a resposta celular imuno-mediada em decorrência de defeitos inespecíficos dos linfócitos e macrófagos. Nos LTT ocorre uma resposta ineficaz ao *M. leprae* íntegro ou aos seus antígenos clonados [SUZUKI et al., 1993].

A disfunção dos linfócitos T e macrófagos pode ser decorrente de uma anergia clonal ou supressão ativa [NATIONS et al., 1998; MODLIN & BLOOM, 1993]. Defeitos na produção de citocinas têm sido demonstrados nos pacientes com HL. Estudos de cultura de células T não responsivas à HL demonstraram reversão da incompetência celular. Injeções intralésionais de IL-2 obtiveram resposta imune localizada com eliminação do *M. leprae* pelos macrófagos [MODLIN & BLOOM, 1993]. Os defeitos nos

macrófagos em HL podem ser destacados em relação à apresentação e identificação do antígeno; na produção da IL-1; na falha na incapacidade do macrófago destruir o *M. leprae* e na supressão do macrófago pelas células T [SINHA et al., 1992].

A imunidade celular, expressa na resistência à infecção pelo *M. leprae*, tem como método básico na sua avaliação o teste de Mitsuda. Apesar dos progressos nas pesquisas, o teste de Mitsuda constitui-se em instrumento valioso na avaliação imunológica da doença [FOSS, 1997; BECHELLI et al., 1980]. Este teste consiste na inoculação intradérmica de suspensão contendo três antígenos bacilares: o integral (bacilos e tecidos de hansenoma), o bacilar (exclusivamente bacilos) e o protéico (fração protéica bacilar), extraídos de humanos ou tatus. Após a inoculação, a leitura deve ser realizada em 28 dias, podendo ocorrer um tubérculo com ou sem necrose: reação positiva e, na ausência dessa resposta, reação negativa [BECHELLI et al., 1980; FOSS, 1997; HARBOE, 1989; KROTOSKI et al., 1993; MITSUDA, 1953; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1996]. O resultado pode ser lido e expresso em padrão sugerido pela OMS [WHO, 1982]: 0 ou negativo = ausência de reação; 1 a 3 mm = duvidoso e 4 mm ou mais = positivo. A histopatologia dessa lesão-resposta é a presença de um granuloma. Pode ser obtida uma resposta precoce ou fenômeno de Fernandez, caracterizado por uma infiltração e eritema depois de 48 a 72 horas, e, do ponto de vista histopatológico, têm-se achados inflamatórios com polimorfonucleares, linfócitos T e, ocasionalmente, degeneração fibrinóide [KROTOSKI, 1993]. Também pode ocorrer na hanseníase de Lúcio e Latapi, após seis horas da aplicação, uma área inflamatória necrotizante conhecida por reação de Medina [AZULAY, 1997; BECHELLI et al., 1980; FOSS, 1997; HARBOE, 1989; KROTOSKI et al., 1993; MEYERS & MARTY, 1991; MITSUDA, 1953; MODLIN et al., 1983; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1996].

A imunidade humoral depende do linfócito B e está relacionada com uma hipergamaglobulinemia do tipo IgG e IgE, aumento de linfócitos B no sangue periférico e anticorpos específicos, predominantemente IgM, contra o glicolípido-fenólico (PGL-1). Estes anticorpos não oferecem proteção significativa, numa relação inversa entre as respostas humoral e celular [AGIS et al., 1988; BRASIL et al., 1998]. A sua importância reside no fato de serem anticorpos específicos, sendo utilizados para métodos diagnósticos, visto que na imunodifusão e imunofluorescência na HL há níveis elevados de anticorpos, enquanto na HB os níveis de anticorpos são mais baixos. Nos pacientes HL e HBL observa-se aumento da resposta humoral com títulos elevados de anticorpos específicos anti-PGL-1, decorrentes das altas concentrações de antígenos PGL-1 no sangue periférico, refletindo alta carga bacilar. A determinação sérica e tecidual desses anticorpos é feita por meio de reação imunoenzimática do tipo Elisa [KLATSER et al., 1996]. O anti-PGL-1 pode ser útil no monitoramento da resposta terapêutica, como marcador de recidiva da doença, na medida que se pode estabelecer uma correlação entre índice baciloscópico, níveis de anti-PGL-1 e carga bacilar. Nos doentes com HT e HBT esses anticorpos podem estar nos níveis da normalidade ou ligeiramente elevados [AZULAY, 1997; BRASIL et al., 1998; CHO et al., 1993; CHOUDHURI, 1995; GOULART et al., 2002; FOSS, 1997; KLATSER et al., 1996; ROCHE et al., 1991].

Na compreensão da resposta imunológica deve ser considerada a susceptibilidade à doença, o fluxo bacilar (medido pelo índice baciloscópico) e a presença ou ausência de resposta imune (Mitsuda positivo ou negativo respectivamente). A reatividade imunológica (Mitsuda positivo) relaciona-se com a ausência ou presença de poucos bacilos nas lesões. Nas formas borderline ocorre um equilíbrio entre essas duas condições [BRITTON, 1993; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1996].

Todavia, uma questão que sempre levantou discussões é a tentativa de explicar o neurotropismo do bacilo. De princípio, sabe-se que a bactéria tem duas

características próprias: invadir e se reproduzir no interior das células de Schwann, além de produzir o ácido glico-fenólico 1, presente na cápsula que envolve o bacilo [OTTENHOFF, 1994].

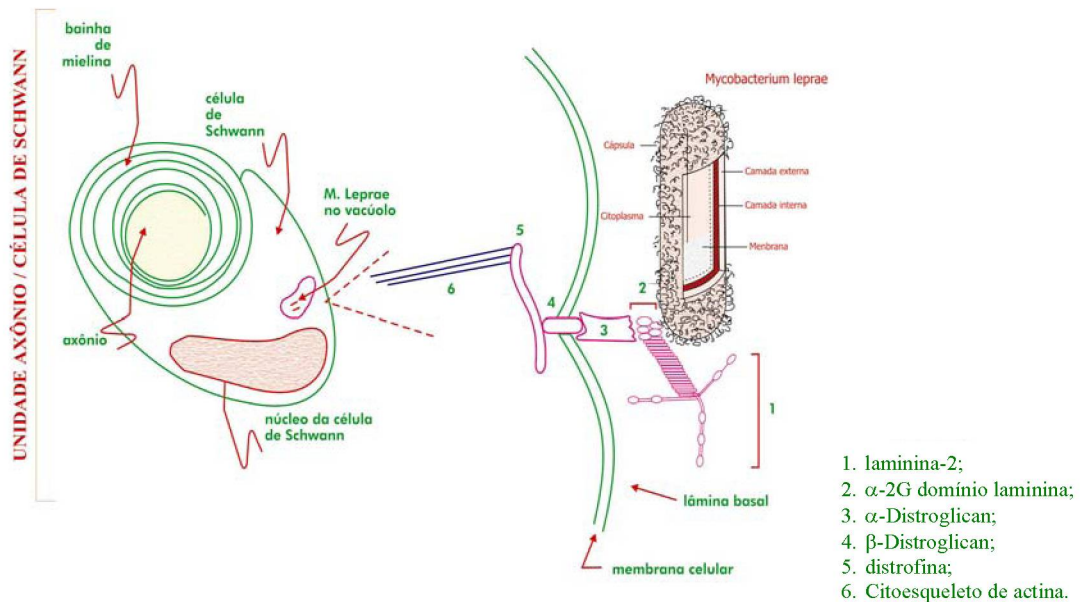
Não há dúvidas de que a hanseníase é uma infecção preferencial pelo nervo periférico [STORNER, 1979; JOB, 1989; NEGESSE et al., 1993; RIDLEY et al., 1987]. Histologicamente, os bacilos são vistos na célula de Schwann mielinizada, nos vacúolos intracelulares e nos macrófagos migrantes do sangue para o espaço perineural [CHIMELLI et al., 1997]. Na patogênese da infecção neural ocorre uma desmielinização e remielinização crônicas. Desse fato, tem-se uma calcificação com perda da função neural, produzindo uma neuropatia periférica não traumática [CHIMELLI et al., 1997; FREEDMAN et al., 1999; STORNER, 1979].

Apesar da célula de Schwann ser conhecida como alvo do *Mycobacterium leprae*, a base molecular desse tropismo somente foi esclarecida recentemente. Rambukkana e cols. publicaram dois trabalhos que esclarecem o mecanismo molecular da afinidade seletiva do *M. leprae* pela célula de Schwann. Esses estudos identificaram uma glicoproteína que se liga por opsonização à superfície do *M. leprae*, a qual, por sua vez, se liga a um receptor da superfície da célula de Schwann, desse modo promovendo a penetração do bacilo no interior da célula [RAMBUKKANA et al., 1997; RAMBUKKANA et al., 1998].

A unidade célula de Schwann/axônio está protegida por uma lâmina basal que contém moléculas matrizes extracelulares do tipo lamininas, colágeno tipo IV, proteoglicans e outras. As lamininas são glicoproteínas compostas de três cadeias e, apesar de ter onze isoformas distintas, as principais são alfa-2, beta-1 e gama-2 que são encontradas na lâmina da célula de Schwann do nervo periférico [FREEDMAN et al., 1999; SAITO et al., 1999]. Na lâmina basal da célula de Schwann no nervo periférico, a forma predominante é a laminina-2 [MATSUMARA et al., 1997].

No seu primeiro trabalho, Rambukkana e cols mostraram que o *M. leprae* se liga especificamente à cadeia alfa-2 da laminina-2, localizada no terminal-C no domínio G. Portanto, a célula de Schwann tem na sua superfície proteínas que podem se ligar aos componentes da matriz extracelular da lâmina basal. [RAMBUKKANA et al., 1997]. No segundo trabalho, Rambukkana e cols. mostraram que o *M. leprae* se liga à área G da laminina-2, que, por sua vez, se liga à alfa-distroglican da superfície da célula de Schwann. A alfa-distroglican, por sua vez, se liga à molécula beta-distroglican da membrana. Ao penetrar no meio intracelular, a beta-distroglican se liga à distrofina, uma proteína intracelular que se liga à actina. A partir da união dessas quatro proteínas (laminina-2, alfa-distroglican, beta-distroglican e distrofina) se estabelece uma ponte entre o *M. leprae* e o citoesqueleto da célula de Schwann. [RAMBUKKANA et al., 1998]. Portanto, dessa ligação na superfície da célula de Schwann foi observada uma cascata de complexos alfa-distroglican/*M. leprae*, a qual leva à penetração do bacilo no vacúolo citoplasmático, estabelecendo a infecção hansênica no nervo. O fato de a laminina-2 e de a alfa-distroglican estarem restritas ao nervo periférico condiciona a presença exclusiva do bacilo nessa parte do sistema nervoso [BRENAN & VISSA, 2001; FREEDMAN et al., 1999; MARQUES et al., 2001; MATSUMARA et al., 1997; NG et al., 2000; RAMBUKKANA et al., 1997; RAMBUKKANA et al., 1998; RAMBUKKANA, 2000a; RAMBUKKANA, 2000b; RAMBUKKANA, 2001; RAMBUKKANA et al., 2002; RIDLEY et al., 1987; SAITO et al., 1999; SAVE & SHETTY, 2001; SPIERINGS et al., 2000; STORNER, 1979; SUNEETHA et al., 2001; WEINSTEIN et al., 1999; YAMADA et al., 1996]. (Figura 4).

A hanseniase pode apresentar uma seqüela persistente, independente do sucesso do tratamento e da cura microbiológica. Uma melhor compreensão do mecanismo da infecção neural pelo *M. leprae* à luz da biologia molecular resulta em novas pesquisas e avanços no tratamento, prevenção e reabilitação da neuropatia hansênica [DOCKRELL et al., 2000; FREEDMAN et al., 1999; GUERRERO et al., 2002; SPIERINGS et al., 2000; WILSON, 1993].



(Freedman e colabs. 1999 – modificada)

Figura 4 – Representação esquemática da infecção hansênica em nível molecular

Na evolução da infecção hansênica podem ocorrer episódios agudos reacionais ou fenômenos de hipersensibilidade que aparecem em 50% do total dos pacientes [CHOUDHURI, 1995; NAAFS, 1994; SAUDERSON, 2000]. São classicamente conhecidas quatro reações imunológicas de Gel e Coombs: anafilática, citotóxica, imunocomplexos e reação celular tardia. As duas últimas ocorrem nos pacientes com hanseníase e são, respectivamente, chamadas de eritema nodoso leprótico (ENL) ou reação tipo 2 e reação reversa ou tipo 1. [FOSS, 1997]. A reação reversa (Tipo 1) obedece a um mecanismo celular mediado pelos linfócitos T que aumentam por causa dos antígenos bacilares, ocorrendo com maior frequência nos doentes HT e HBT [BRITTON, 1993; FOSS, 1997; GOULART et al., 2002]. Na histopatologia observa-se presença de granuloma com infiltrado inflamatório e um influxo de células CD4+ positivas. Ocorre aumento do número de receptores para interleucina-2 (IL-2) e a expressão do HLA-DR em células do infiltrado e em queratinócitos da epiderme como indicativos da produção de interferon-gama (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [SARNO & SAMPAIO, 1996; SARNO et al., 2000; ROACH et al., 2002].

Sabe-se que o mRNA e a expressão de citocinas IL-1B, TNF- α , IL-2 e IFN- γ encontra-se elevada nas lesões, sugerindo um padrão típico de Th1. No caso, do padrão Th2 as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 estão em níveis baixos. No estudo imunohistoquímico a presença de IFN- γ e TNF- α associadas à detecção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no citoplasma dos macrófagos, têm sido reconhecidas como uma atividade macrófágica competente [BRITTON, 1993; GOULART et al., 2002].

A Reação tipo 2 ou eritema nodoso leproático (ENL) ocorre nos pacientes HL e HBL. É reconhecida como uma reação do tipo imuno-complexos, considerando a presença de imunoglobulinas e complementos nas lesões e complexos imunes circulantes. A ocorrência desse tipo de reação é freqüente em doentes antes, durante ou após o tratamento poliquimioterápico [NAAFS, 1994]. Trata-se de uma reação inflamatória sistêmica que resulta em depósitos de imuno-complexos, comprometendo a pele, nervos, linfonodos, fígado, baço, peritônio, testículos, olhos, articulações, tendões, músculos e ossos [FOSS, 1997; NAAFS, 1994; SAUDERSON, 2000]. Também, ocorre febre, leucocitose, estimulação policlonal de anticorpos, níveis baixos de complemento C3d e presença de imuno-complexos nos tecidos lepromatosos. Há também evidências do aumento da atividade dos linfócitos T durante os episódios de ENL. Nos episódios agudos há elevação dos níveis de CD8+, aumento de IL-2 e TNF- α [BRITTON, 1993; CHOUDHURI, 1995; FOSS, 1997; GOULART et al., 2002; NAAFS, 1994; RIDLEY & JOPLING, 1966; ROACH et al., 2002; SARNO & SAMPAIO, 1996; SARNO et al., 2000; SUZUKI et al., 1993; WEIR, 2000; YAMAMURA et al., 1992].

2.5 - CLASSIFICAÇÃO

O Tratado Médico Indiano (“*Shusrata Samhita*”), 600 a.C, esboça a mais antiga classificação da hanseníase que se conhece. Tinha por base aspectos clínicos:

A- Sem lesão de pele (Alterações sensitivas e deformidades)

B- Com lesão de pele (Sintomas sensitivos)

C-Com lesão de pele (Ulceração).

Estas três formas podem ser relacionadas como neural pura e lesões cutâneas [DHARMENDRA , 1989; MITCHELL, 1993].

As inúmeras classificações propostas basearam-se em aspectos morfológicos das lesões. Em 1937, Rabello, um dermatologista brasileiro, estabeleceu o conceito das formas polares da hanseníase. com base nos dados histopatológicos, A partir da hanseníase indeterminada, os pacientes sem tratamento evoluiriam para a forma polar tuberculóide (HT) se tivessem boa resistência (Mitsuda positivo) ou para a forma lepromatososa (HL) nos casos de ausência de resistência ao *M. leprae* (Mitsuda negativo) [RABELO, 1937; RABELLO, 1976].

No Congresso Internacional de Lepra, Madri (1953), foi encaminhada pela Associação Indiana de Leprologistas, ao Comitê de Técnicos em Classificação, a proposta de incluir dois grupos na classificação da hanseníase: o “Máculo-anestésico” e o “Polineurítico”. Apesar disso, ficaram definidos tipos, grupos e variantes, conforme critérios clínicos e baciloscópicos [INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 1953].

Tipo Lepromatoso (Macular, Difusa, Infiltrada, Nodular Neurítico puro)

Tipo Tuberculóide (Macular, Tuberculóide menor, Tuberculóide maior, Neurítico puro)

Grupo Indeterminado (Macular, Neurítico puro)

Grupo Borderline (Infiltrado, Outros)

Definiu-se que apresentada como Tipo, a doença teria aspectos clínicos e biológicos definidos e estáveis; como Grupo ocorreria menos definição de características, menos estabilidade e evolução imprevisível. Variedades compreenderiam a subdivisão de cada Tipo ou Grupo [DHARMENDRA, 1989].

A forma neurítica pura foi interpretada não como uma entidade clínica definida, mas como uma variedade do Grupo Indeterminada e Tipo Lepromatoso. Na época, para muitos pesquisadores, a existência dessa variedade parecia duvidosa nessas formas. Também, não foi incluída no Grupo Borderline, no qual a “variedade neural pura” era freqüentemente encontrada [DHARMENDRA, 1989].

Na verdade, a Classificação de Madri não distingue o comprometimento neural secundário associado às lesões dermatológicas do primário, na ausência dessas. Na presença de lesões de pele não há dificuldades, desde que a doença é classificada de acordo com essas lesões e a presença ou não de bacilos. Isto não ocorre nas lesões neuríticas primárias. A partir desses aspectos, a Associação Indiana de Leprologia propôs a classificação da hanseníase nos seguintes grupos: lepromatoso, tuberculóide, borderline-tuberculóide, borderline-lepromatoso, indeterminado e polineurítico. Portanto, não se acrescentava muito à Classificação de Madri, na qual os critérios de polaridade da doença, propostos por Rabello, foram aceitos. Nesta última acrescentou-se um novo grupo de pacientes, o qual se denominou de “borderline”. Esse grupo também evoluiria a partir da forma indeterminada, porém, apresentando aspectos clínicos característicos das formas polares HT ou HL. Tratava-se, portanto, de pacientes interpolares. Esse grupo de doentes foi definido como clinicamente instáveis e com tendência a evoluir para as

formas HL ou T, se não tratados [DHARMENDRA, 1989; INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 1953].

Ridley & Jopling, dois médicos ingleses, em 1966, propuseram uma modificação da classificação de Madri, introduzindo o conceito da classificação espectral da hanseníase, dividida em dois grupos polares: Tuberculóide (TT) e Lepromatoso (LL), e três tipos intermediários: Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB) e Borderline-Lepromatoso (BL) [RIDLEY & JOPLING, 1966].

Na hanseníase tuberculóide, a doença é limitada por uma resposta celular imuno-mediada. As lesões podem ser eritemato-hipocrômicas, eritematosas, eritemato-escamosas, com bordas elevadas ou microtubérculos. Por vezes, o centro da lesão está aparentemente poupado, mostrando a evolução centrífuga do processo. O comprometimento de anexos cutâneos pode levar à alopecia (queda total ou parcial dos pêlos) e anidrose nas lesões maiores [RIDLEY & JOPLING, 1966; RIDLEY, 1974]. Não raro, pode ser encontrada apenas alopecia sem alterações pigmentar da pele. As placas variam de forma, tamanho e número, mas a forma HT clássica não apresenta tendência à disseminação, podendo ocorrer cura espontânea [BRYCESON & PFALTZGRFF, 1990]. Alterações sensitivas na ausência de lesões de pele, com ou sem espessamento evidente de nervo, poderão, às vezes, ser a única manifestação clínica - *Forma Neural Pura* [NOORDEEN, 1972; NATIONS et al., 1998]. Não raramente, observa-se a presença de calosidades e úlceras profundas localizadas em áreas de compressão óssea. As lesões dermatológicas são raras nas regiões mais quentes do corpo, tais como virilhas e axilas. Nervos superficiais próximos às lesões de pele podem ser palpados [BRYCESON & PFALTZGRFF, 1990]. Do ponto de vista histopatológico, encontram-se granulomas bem definidos com macrófagos e linfócitos *T helper* no centro e uma coroa linfocitária densa formada por linfócitos T supressores ou

citotóxicos. Raros bacilos podem estar presentes [DHARMENDRA, 1989; FLEURY, 1989; RIDLEY, 1974; RIDLEY & JOPLING, 1966; RIDLEY & JOB, 1989].

Na hanseníase lepromatosa, o *M. leprae* multiplica-se intensamente com disseminação hematogênica devido a ausência de uma resposta celular imuno-mediada. Anticorpos são formados contra o bacilo, mas não impedem o crescimento da infecção nos diversos tecidos. Os doentes apresentam infiltração difusa com numerosas lesões eritematosas, eritemato-acastanhadas, infiltradas, brilhantes, mal definidas e de distribuição simétrica. Na face e regiões malares, a infiltração difusa e a perda dos pêlos superciliares (madarose) mostram um aspecto peculiar chamado de “fácies leonina” [BRYCESON & PFALTZGRFF, 1990]. Os nódulos e os tubérculos podem surgir em todo o tegumento, às vezes de aspecto tumoral, semelhante a quelóides: é a hanseníase histióide, uma forma que alguns autores consideram potencialmente resistente à sulfona [JOPLING & McDOUGALL, 1991]. Essa forma da doença tem um comprometimento sistêmico, com manifestações viscerais importantes. Não é incomum o comprometimento dos olhos, testículos, rins, destruição da cartilagem nasal e perfuração do septo nasal, fibrose, nodulação e ulceração da laringe à rouquidão e estridor respiratório. Nos doentes não tratados de forma adequada pode ocorrer amiloidose secundária, insuficiência renal e infecções intercorrentes, e morte [BRYCESON & PFALTZGRFF, 1990; DHARMENDRA, 1989; JOPLING & McDOUGALL, 1991; NATIONS et al., 1998; RIDLEY & JOB, 1989].

A hanseníase borderline situa-se entre os dois pólos da doença. Os pacientes borderline-tuberculóide (BT) têm lesões maiores e em maior número do que os pacientes com hanseníase tuberculóide polar (TT). Nos casos com tendência BB e BL, as lesões são mais numerosas, assimétricas, menos definidas e com bordos elevados. São eritematosas, eritemato-violáceas, ferruginosas, infiltradas, edematosas, brilhantes, com contornos internos bem definidos, centro deprimido,

aparentemente poupado, hipocrômico ou com coloração de pele normal. Seu caráter de instabilidade imunológica pode ocasionar variações nos diferentes tipos de lesões, dependendo da posição no espectro. As alterações sensitivas são menos intensas nos casos de hanseníase borderline [BRYCESON & PFALTZGRFF, 1990; DHARMENDRA, 1989; JOPLING & McDOUGALL, 1991; RABELO, 1937; RIDLEY & JOPLING, 1966; RIDLEY & JOB, 1989].

A hanseníase indeterminada (HI) não faz parte da Classificação de Ridley e Jopling. É considerada uma forma transicional, com padrão imunológico ainda não definido. Em geral, as crianças são mais comprometidas por esta forma e apresentando mácula hipocrômica única com perda sensitiva [JOB et al., 1997b]. Histologicamente, pode ter poucos bacilos na pele ou nos nervos dérmicos, ou apenas um infiltrado linfocitário inespecífico sem bacilos. Nesses casos pode ocorrer remissão espontânea ou evolução para as formas avançadas da doença [DHARMENDRA, 1989; FLEURY, 1989; JOB et al., 1997c; NATIONS et al., 1998].

Esses grupos foram definidos com precisão, considerando aspectos clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos. A definição de cada um foi primariamente baseada no número de bacilos por cortes histológicos. Os resultados do tratamento foram avaliados pelo Índice bacteriológico (IB) correlacionado com a classificação proposta. Inúmeros trabalhos têm confirmado a correlação entre os vários achados imunológicos e os cinco grupos de Ridley e Jopling [FLEURY 1989; RIDLEY, 1974; RIDLEY & JOPLING, 1966].

Nos estudos de Ridley & Joplin (1966), foram incluídos somente casos com lesões de pele, associados ou não com lesões de nervo. A forma neural pura não foi incluída dentro do espectro, assim como aquelas lesões do grupo indeterminado da Classificação de Madri. A respeito dessas duas apresentações da doença, Ridley & Jopling referem que no caso da hanseníase neural pura o espessamento de nervo aparece precocemente nos casos TT, mas pode ser visto

em todos os casos à exceção dos casos LL. Relata-se que nos TT se tem um ou dois nervos comprometidos e vários nervos nos doentes BT ou BB. A presença de abscesso de nervo é indicativo de formas TT ou BT. O teste de Mitsuda e a biópsia de nervo podem ser valiosos nesses casos, apesar de essa avaliação não ser fácil na maioria das vezes. Para esses autores, a histopatologia de nervos é essencialmente a mesma da pele, inclusive pelo fato da necrose caseosa ocorrer apenas nas formas TT e BT [RIDLEY & JOPLING, 1966].

Do ponto de vista operacional, com a implantação da multidrogaterapia em 1982, a Organização Mundial de Saúde dividiu os pacientes de acordo com o IB em paucibacilares (PB) com IB menor que 2+ da Escala de Ridley e multibacilar (MB) com IB igual ou maior que 2+ [RIDLEY, 1974; WHO, 1982]. Em 1998, a OMS reconsiderou a sua classificação, retirando o IB e aplicando critérios exclusivamente clínicos: PB com menos de seis lesões e MB com seis ou mais lesões dermatológicas. Nessa classificação, os pacientes com doença neural pura também não estão são incluídos [WHO, 1998; CROFT et al., 1998; TALHARI, 1996].

No Brasil, o Ministério da Saúde a hanseníase nos seguintes termos conforme a Portaria 817 de 26.07.2000:

- Paucibacilar : menos de 5 lesões de pele e/ou um tronco nervoso.
- Multibacilar: 5 ou mais lesões de pele e/ou mais de um tronco nervoso.

Nesse grupo são colocados todos os casos com baciloscopia positiva, qualquer que seja o IB [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000].

Os pacientes de forma neural pura com um único tronco nervoso envolvido são considerados paucibacilares e com dois ou mais troncos multibacilares [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000].

Essa definição de caso PB ou MB é importante na medida que os casos serão incluídos nos regimes de 6 doses ou 12 doses mensais na multidrogaterapia [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA , 2001].

2.6 - DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de hanseníase é feito a partir do exame dermatoneurológico, pesquisa de BAAR nas lesões de pele e investigação complementar, quando necessário [LOCWOOD & BRYCESSON ,1998; BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990].

Três sinais principais têm sido usados no diagnóstico hanseníase [WHO, 1998; SAUDERSON & GROENEN, 2000]:

A- lesões de pele hipocrômicas ou eritematosas com perda sensitiva;

B- espessamento de nervo com alterações sensitivas em áreas correspondentes;

C- presença de *Mycobacterium leprae* na pele.

Um ou mais desses três sinais confirmam o diagnóstico da doença.

2.6.1 - Anamnese

Deve-se inquirir o paciente sobre a sua história clínica e epidemiológica. São destacadas as lesões de pele, as alterações sensitivas (hipoestesia, anestesia, sensação de dores e desconforto, queimação e formigamento), as motoras (tróficas, dificuldades para deambular e preensão) e os distúrbios visuais. É importante saber o tempo de início e evolução dos sinais e sintomas apresentados, contatos domiciliares ou eventuais com doentes hansênicos, e tratamento específico anterior

relacionado à doença [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; BROWN, 1989a; CUNHA, 1985; FELICIANO et al., 1998; TALHARI & NEVES, 1997].

2.6.2 - Exame dermatoneurológico

Realizado, preferencialmente, com o paciente despido na presença de luz natural. Devem ser pesquisadas [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA, 2001; ECHEVARRIA & CERVERA, 2002]:

2.6.2.1 Pele, mucosas e anexos: Avaliação de toda a superfície corporal do paciente com o intuito de identificar lesões. As áreas com maior frequência de comprometimento são a face, as orelhas, as nádegas, os braços, as pernas e as costas, não esquecendo a mucosa nasal e a cavidade oral [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA, 2001]. No caso da identificação de lesões na pele procede-se a pesquisa de sensibilidade.

2.6.2.2 - Sensibilidade: Lesões de pele com alterações de sensibilidade por comprometimento dos ramos sensitivos dérmicos são um indicador de hanseníase. Podem ser encontradas diminuição (hipoestesia) ou ausência de sensibilidade (anestesia). Na fase inicial de uma lesão hanseníase pode ocorrer aumento da sensibilidade (hiperestesia). Podem ser pesquisados ser estudados dois tipos de sensibilidade, a superficial e a profunda. A pesquisa da sensibilidade superficial (táctil, térmica e dolorosa) deve ser entendida como um recurso importante no diagnóstico clínico da hanseníase [NAAFS & DAGNE, 1977; FACER et al., 2000]. A sensibilidade táctil pode ser testada utilizando-se o teste do algodão ou monofilamentos de Semmes-Weinstein, sendo este o preferido por possibilitar uma monitorização quantitativa [BIRKE et al., 2000].

Na sensibilidade profunda estuda-se a discriminação da distância entre dois pontos, utilizando um compasso com régua milimetrada aplicado à distância mínima de 2mm, e máxima de 20. Os estímulos são aplicados simultaneamente em diferentes áreas no sentido distal-proximal, com uma leve pressão. Inicia-se com uma distância de 10 mm, aumentando ou diminuindo, conforme as respostas. O paciente responde se sente um ou dois pontos.

O teste de sensibilidade deve ser feito também na córnea, utilizando-se um pedaço de fio dental, para verificação da diminuição ou ausência da sensibilidade protetora da córnea, causada pelo envolvimento do nervo trigêmeo. O resultado é interpretado seguindo a *Escala da American Society of Surgeries of the Hand* [OMER, 1981; CAMARGO & BACCARELLI, 1997; ECHEVARRÍA & CERVERA, 2002; DICK & BRIEN, 1999; BROWN, 1989 a; SAUDERSON & GROENEN, 2000; PREMKUMAR et al., 1998].

2.6.2.3 - Palpação de nervos: Consiste na verificação do comprometimento de nervos, visando prevenir lesões neurais e incapacidades. Na palpação do nervo é importante verificar a presença de dor espontânea, choque ou dor à palpação, assimetria com nervo contralateral, espessamento nítido, consistência, abscesso e/ou aderências no seu trajeto [BROWNE, 1989a; DHARMENDRA, 1980; BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990]. Os nervos pesquisados com maior frequência são: supra-orbitário, retro-auricular, ulnar, mediano, radial motor, radial superficial, ulnar dorsal superficial, fibular comum, fibular superficial, tibial posterior, sural e outros nervos como o ramo cervical do nervo facial, os supra-claviculares, os cutâneo medial e lateral do antebraço, cutâneo lateral da coxa, safeno e nervos perilesionais dérmicos [ECHEVARRÍA & CERVERA, 2002; DASTUR et al., 1966; DASTUR et al., 1970; DHAR et al., 1993; RICHARD e CORRY, 1997; THEUVENET et al., 1993; CHACO et al., 1968; SAUDERSON & GROENEN, 2000].

2.6.2.4 - Força muscular: Tem por finalidade verificar se existe comprometimento funcional, ou seja, diminuição (paresia) ou perda de força (paralisia) dos músculos

palpebrais, membros superiores (1º interósseo, abdutores do 5º dígito e curto do polegar, lumbricóide e interósseos, extensores e flexores do punho), membros inferiores (extensor próprio do hálux, tibial anterior, abductor do hálux, gastrocnêmio). A força muscular é classificada em **normal** (o movimento realizado é mantido mesmo com resistência), **diminuída** (o movimento realizado não é mantido contra aplicação de uma resistência) e **ausência** (o movimento não pode ser realizado)

[BACCARELLI, 1997; ECHEVARRÍA & CERVERA, 2002; BRANDSMA., 2000].

2.6.2.5 - Avaliação dos reflexos ósteo-tendinosos: São testados os reflexos bicipital, tricipital, estiloradial, patelares, flexor plantar, aquileo, patelares, masseteriano e orbicular das pálpebras [ECHEVARRÍA & CERVERA, 2002].

2.6.2.6 - Avaliação dos reflexos cutâneos: córneo-palpebral e plantar [ECHEVARRÍA & CERVERA, 2002].

2.6.2.7 - Trofismo e mobilidade articular das mãos e pés: Verificação da existência de limitações na amplitude dos movimentos articulares. Podem ser classificados em **normal** (mobilidade ampla com movimento ativo), **móvel** (mobilidade total ou parcial com movimento passivo - “garra móvel”) e **rígida** (ausência ou discreta mobilidade com movimento passivo – “garra rígida”) [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA, 2001; BRANDSMA et al., 2001].

2.6.2.8 - Acuidade visual: A verificação do comprometimento visual é útil para a classificação do grau de incapacidade física do doente. O teste é feito utilizando o Cartão de Snellen fixado numa parede e o paciente colocado a uma distância de 5 m a 6 m, ficando as linhas 0,8 a 1,0 à altura dos seus olhos. Cada olho é avaliado individualmente. Caso o paciente não consiga ler o optótipo maior (0,05 ou 0,1) procede-se a contagem dos dedos. Não conseguindo, verificar a percepção que ele tem dos movimentos dos dedos da mão. Finalmente, se necessário, utilizar um foco luminoso. O paciente adulto deverá ser encaminhado ao oftalmologista, caso a

acuidade visual seja inferior a 0,6. Nos casos de crianças ou adolescentes, se inferior a 0,8 [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA , 2001].

Todos os dados do paciente devem ser anotados na ficha padrão do Ministério da Saúde (Apêndice 2).

2.6.3 - Investigação complementar

Deve ser procedida quando necessária, destacando-se:

2.6.3.1 – Pesquisa de BAAR na linfa do esfregaço dérmico: É um exame laboratorial que pesquisa a presença do *Mycobacterium leprae* nos pacientes com suspeita de hanseníase em esfregaços contendo linfa de determinados locais do corpo. A baciloscopia positiva ou negativa é um apoio para o diagnóstico e classificação da hanseníase, também nos casos de suspeita de casos recidivantes [WHO, 1998].

2.6.3.2 - Testes cutâneos:

2.6.3.2.1 - Reação de Mitsuda: Descrito anteriormente, não tem valor diagnóstico, mas prognóstico [KROTOSKI et al., 1993; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1996].

2.6.3.2.2 - Teste da histamina: Utilizado como apoio diagnóstico precoce da hanseníase em casos onde a pesquisa de sensibilidade é difícil ou duvidosa. As: crianças; adultos com algum tipo de deficiência mental em que seja difícil obter informações conclusivas; máculas hipocrômicas ou áreas de pele com leve alteração de sensibilidade. Os resultado do teste é melhor avaliado nos pacientes de pele leucocrômica. Não raramente o teste da histamina pode contribuir para definir os locais de coleta de material para baciloscopia e histopatologia. O teste de histamina avalia a integridade das ramificações neurais dérmicas. Quando essas ramificações estão íntegras, a aplicação da histamina provoca uma dilatação dos capilares sanguíneos, caracterizando a tríplice reação de Lewis: aparecimento do eritema

primário, do eritema reflexo secundário e de uma pápula. Caso exista lesão, a exemplo da hanseníase, não se observa a segunda fase do teste, isto é não ocorre o aparecimento do eritema reflexo secundário. Portanto, a prova incompleta de histamina pode ser um indicador de hanseníase [TALHARI & NEVES, 1997].

2.6.3.3 - Biópsia de pele: São realizadas nos casos que persistem indefinidos após a aplicada a investigação clínica e laboratorial de rotina.

2.6.3.4 - Classificação do grau de incapacidade física do doente: A partir da avaliação neurológica, o doente é classificado em três graus, segundo os critérios:

Grau 0: não são observadas incapacidades neural nos olhos, nas mãos e nos pés;

Grau 1: há incapacidade caracterizada pela diminuição ou perda de sensibilidade nos olhos, nas mãos e nos pés;

Grau 2: quando se registra incapacidade e deformidade nos olhos (lagofalmo e/ou ectrópio, triquíase, opacidade corneana, acuidade visual menor que 0.1 ou o quando o paciente não conta os dedos a 6 m de distância); alterações nas mãos e nos pés (lesões tróficas e/ou traumáticas, garras, reabsorção óssea, “mão ou pé caídos” ou contratura do tornozelo).

Essas informações podem refletir a precocidade ou não do diagnóstico e são um parâmetro de comparação do grau de incapacidade física do doente no momento do diagnóstico da doença e da alta ambulatorial [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE – ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA , 2001; WHO, 1998; VAN BRANKEL, 2000].

2.7 - NEUROPATIA HANSÊNICA

Destaca-se que a hanseníase nos seres humanos é, essencialmente, uma doença dos nervos periféricos, constituindo a causa mais freqüente de

neuropatia periférica tratável [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; JOPLING & McDOUGALL, 1991; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; NATIONS et al., 1998; NOORDEEN, 1972; SAUDERSON, 2000; CHAROSKY et al., 1983].

Segundo Job, o *M. leprae* pode penetrar no nervo por quatro vias diferentes [JOB, 1989]:

A- pelos filetes nervosos na epiderme, disseminando-se de forma centrípeta ao longo do axônio;

B- por fagocitose do bacilo na epiderme pelas células de Schwann;

C- na derme superior, os macrófagos podem fagocitar os bacilos, os quais seriam liberados e englobados nas células perineurais, chegando às células de Schwann;

D- possivelmente, a via de entrada mais comum é pela corrente sangüínea, atingindo os nervos pelos capilares intraneurais.

A conseqüente destruição dos nervos em todas as formas de hanseníase parece ocorrer devido aos seguintes aspectos [JOB, 1989]:

A- presença do *M. leprae* ou seus antígenos nas partes mais frias do corpo, permitindo a localização e a multiplicação bacteriana nos nervos subcutâneos;

B- existe uma relação entre trauma e infecção neural na hanseníase nos nervos mais superficiais;;

C- pressão intraneural aumentada por edema e infiltrado inflamatório com conseqüente isquemia, lesão do nervo com formação de um granuloma;

D- alterações vasculares intraneurais resultam em oclusão da luz dos vasos e isquemia.

O dano do nervo pode persistir sem a presença direta do bacilo, a partir de enzimas citotóxicas produzidas na resposta imunológica [JOB, 1989; WATERS & JACOBS, 1996].

Os nervos comprometidos na hanseníase são de dois tipos:

A- numa fase inicial, os nervos dérmicos ou superficiais acham-se invadidos levando à diminuição da sensibilidade térmica, tátil, dolorosa e alterações autonômicas com perda da sudorese e dos pêlos. A extensão e o grau da perda de sensibilidade e paralisia dependem da forma da doença, da quantidade e duração das estruturas envolvidas e dos episódios reacionais [JAIN et al., 2000; DASTUR, 1991; JOB, 1989; FACER et al., 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION STUDY GROUP, 1980];

B- nos estágios mais avançados, um ou mais troncos nervosos com fibras nervosas mistas são infectados e danificados, produzindo perda da sensibilidade superficial e profunda, bem como paralisia muscular [JOB et al., 1997c; JOB, 2001; SOLOMON et al., 1998].

Nos diferentes tipos de hanseníase o comprometimento dos nervos ocorre mais freqüentemente em determinados segmentos. O nervo ulnar na goteira epitrocleana, o nervo mediano, antes do túnel do carpo, o fibular na cabeça da fíbula e na porção anterior do tornozelo, o tibial posterior na região retromaleolar interna, o radial superficial no punho, o sural na região retromaleolar externa, o grande auricular na margem posterior do esternocleido-mastóideo, o facial nos ramos supra-orbitários [JULIÃO, 1963; SABIN et al., 1993; DUERKSEN, 1997; VIRMOND, 1998; CHACO et al., 1968; DHARMENDRA, 1980; FERNÁNDEZ-DOMINGUEZ et al., 1999]. O espessamento neural é o achado clínico mais comum [DHARMENDRA, 1989; JACOB & MATTHAI, 1988; TALHARI & NEVES, 1997]. Os doentes podem ter queixas de dor e/ou parestesias nas suas áreas correspondentes. Nos casos com processo inflamatório intenso, o déficit motor e o sensitivo podem evoluir rapidamente. Lesões de pele com alterações sensitivas nas proximidades do nervo comprometido podem definir o diagnóstico [REPORT OF THE INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM PARIS, FRANCE, 2002; SAUNDERSON & GROENEN, 2000; SAUNDERSON et al., 1997]. Em pacientes tratados previamente, a neuropatia muitas vezes evolui sem dor,

de forma dolente, com déficit motor, sensitivo, autonômico e trófico. É a “neurite silenciosa” sem dor [VAN BRANKEL & KHAWAS, 1994; SAUDERSON et al., 2000a; SAUDERSON, 2000]. A perda isolada da função muscular não é relatada na hanseníase. A paralisia dos músculos sempre coexiste com a perda da sensibilidade cutânea [DHOPLÉ 1970; WERNECK et al., 1999].

Do ponto de vista patológico, a neurite hanseniana depende da imunidade e da competência da barreira neuro-sangüínea do paciente [JOB et al., 1997b]. O nervo pode ser comprometido isoladamente (*hanseníase neural pura*) ou pode ser o local de infecção inicial (*hanseníase primariamente neural*). Em suma, a infecção pelo *Mycobacterium leprae* não pode ser entendida sem o comprometimento neural, caracterizado como uma neurite. São vários os mecanismos que contribuem na patogênese da reação inflamatória no nervo [NEGESSE, 1999].

Na tentativa de encontrar um manejo terapêutico na prevenção da neurite clínica, Negesse (1999) propôs quatro fases imunopatológicas na lesão neural:

A- Subclínica: Fase I – ocorre uma reação inflamatória no nervo (*neurite*), mas não apresenta expressão clínica; Fase II – dano neural com clínica subjetiva de dor e/ou dormência, sem perda de função. É uma “*neurite silenciosa crescente*”;

B- Clínica: Fase I – destruição parcial do nervo com dor e/ou dormência, perda da função, mas prognóstico favorável em termos de recuperação; Fase II – destruição total do nervo, perda funcional grave sem possibilidades de recuperação.

Na fase subclínica da doença, precedendo os sinais e/ou sintomas, com ou sem déficit funcional, 30% das fibras neurais já foram destruídas [PERSON & ROSS, 1975].

Nos indivíduos com forma indeterminada, apenas os ramos superficiais dos nervos são comprometidos, poupando os troncos [WATERS & JACOBS, 1996].

Na forma tuberculóide, os pacientes têm bastante resistência para localizar a doença, mas não para se ver livre dela. Ocorre uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio a antígenos do *M. leprae*, produzindo intensa reação granulomatosa e necrose dos nervos superficiais e profundos, isolados ou múltiplos [BRITTON, 1993; CHOUDHURI, 1995]. Neste caso ocorre uma complicação comum, a necrose caseosa com formação de abscesso [NATIONS et al., 1998].

Na hanseníase lepromatosa, os pacientes são anérgicos ao *M. leprae*, ocorrendo grande disseminação bacilar, via corrente sangüínea para todos os tecidos. A lesão do parênquima é mínima nas fases iniciais, embora as células de Schwann contenham grande número de bacilos. O dano neural evolui silencioso e gradualmente até uma polineuropatia mista, distal e simétrica [FLEURY, 1997; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; NATIONS et al., 1998].

Na forma borderline, a instabilidade imunológica ao *M. leprae* não impede que a doença se dissemine. Muitos são os troncos nervosos afetados, inclusive com as deformidades mais graves [BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; DASTUR, 1991; FLEURY, 1997; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; NATIONS et al., 1998; NEGESSE et al., 1993; JOB, 1989; SABIN et al., 1993; SAUNDERSON et al., 2000b; VAN BRANKEL, 2000; WEINSTEIN, 2000].

A hanseníase é uma doença silenciosa na maior parte do tempo, tendo destaque episódios reacionais em que ocorre o comprometimento agudo dos nervos periféricos por reações do tipo 1 e 2. Na reação do tipo 1 tem-se uma reação de hipersensibilidade celular tardia que ocorre principalmente na forma borderline com tendência tuberculóide. Na reação tipo 2 verifica-se uma reação mediada por imunocomplexos, formando o eritema nodoso leprótico. Ocorre, quase exclusivamente, na forma lepromatosa [BRITTON, 1993; CHOUDHURI, 1995; FOSS, 1997; GOULART et al., 2002; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; NATIONS et al., 1998; SAUNDERSON et al., 2000a; WHO, 1998; VAN BRANKEL, 2000; WATERS & JACOBS, 1996; WHO, 1998; FERNÁNDEZ-DOMINGUEZ et al., 1999; CHAROSKY et al., 1983; SOLOMON et al., 1998].

2.8 - HANSENÍASE NEURAL PURA

A caracterização de formas de hanseníase com comprometimento de um ou mais nervos periféricos, mas sem lesões cutâneas, tem sido feita especialmente por pesquisadores indianos [DHARMENDRA, 1989; NOORDEEN, 1972; KAUR et al., 1991; MAHAJAN et al., 1996; SRINIVASAN et al., 1982; SUNEETHA et al., 1998].

Na Classificação Indiana as definições das formas indeterminada, máculo-anestésica; tuberculóide, lepromotosa e borderline não divergem daquelas aceitas mundialmente, mas coloca a como um grupo [DHARMENDRA, 1989]. Na Classificação de Ridley e Jopling, essa forma não está incluída, embora esteja descrita como subtipo das formas tuberculóide e borderline [RIDLEY & JOPLING, 1966].

A Classificação de Madri não faz referências à forma neural pura da hanseníase [INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, MADRID, 1953].

Por razões operacionais, a OMS classifica a hanseníase em Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB), tendo por base lesões de pele e índice bacteriológico. Nesse caso, os pacientes com forma Neural Pura que tiverem apenas um tronco nervoso comprometido, serão classificados como *Paucibacilares* e com dois ou mais troncos envolvidos, *Multibacilares* [WHO, 1998].

Na literatura, as referências são escassas para a hanseníase neural pura [NOORDEEN, 1972; MAHAJAN et al., 1996; SUNEETHA et al., 1998; DHAMENDRA et al., 1966; PANNIKAR et al., 1983].

Entre as muitas razões para tal, destacam-se: 1- nos países subdesenvolvidos, os pacientes tendem a ignorar os sintomas precoces da lesão neural periférica; 2- os profissionais da área de saúde não compreendem a hanseníase como uma condição primariamente neurológica, sendo esse diagnóstico subestimado; 3- quando a hanseníase neural pura é suspeita clínica, a biópsia de nervo é geralmente difícil.

Esses pacientes não têm sido identificados, mesmo constituindo uma proporção significativa, com índices que variam de 1% [MAFOYANE et al., 1992], 3% [DONGRE et al., 1976]; 3,9% (CUNHA, 1990), 4,6% [MAHAJAN et al., 1996], 10,7% [TALWAR et al., 1992], 13,6% [NOORDEEN et al., 1972] a 16,0% [GIDHAR, 1996]. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados não sugerem um protocolo para investigar a doença em nível ambulatorial nas unidades de ações básicas de saúde [FREITAS et al., 1998; MISHRA et al., 1993; RAMADAN et al., 2001; SHETTY & ANTIA, 1988; SKACEL et al., 2000; WATERS & JACOBS, 1996; WEINSTEIN, 2000; JACOB & MATHAI, 1983].

No Brasil, as citações são poucas, mas existem trabalhos importantes que enfocam aspectos clínicos, eletrofisiológicos e histopatológicos, destacando a lesão neural dentro do espectro da hanseníase em suas formas clássicas [SENA, 1976; BRASIL-NETO, 1992; CHIMELLI et al., 1997; DeFARIA & SILVA, 1990; JULIÃO, 1963; MARQUES, 1994; MARQUES et al., 2003; WERNECK et al., 1999]. Nos últimos anos surgiram publicações que destacam informações dirigidas para a hanseníase neural pura [CUNHA, 1990; FREITAS et al., 1998; JARDIM et al., 2002; SKACEL, 2000].

Estudos eletrofisiológicos da velocidade de condução sensitivo-motora, respostas tardias (onda F e reflexo H), potenciais de ação do nervo com eletrodos de agulhas justapostas ao nervo ("*near nerve potential*") e potencial evocado somato-sensorial (PSSE) foram anormais em percentuais significativos em pacientes com diferentes formas de hanseníase, independente de apresentarem ou não evidências clínicas de neuropatia, inclusive neuropatias de fibras finas. Nos pacientes apresentando hanseníase tuberculóide (TT), esses achados são ainda mais proeminentes. Na detecção de lesões neurais precoces, o estudo das latências tardias e os potenciais de ação do nervo com eletrodos de agulhas justapostas ao nervo são mais informativos que os métodos convencionais de condução nervosa. A avaliação pelo PSSE demonstra o envolvimento do sistema nervoso periférico, poupando o sistema nervoso central [GUPTA & KOCHAR, 1994; ANTIA et al., 1970; HACKETT et al., 1968;

McLEOD et al., 1975; SWIFT et al., 1973; VERGHESE et al., 1970; DASH, 1967; WILDER-SMITH & WILDER-SMITH, 1997; WILDER-SMITH & WILDER-SMITH, 1996; WILDER-SMITH et al., 2000; SAMANT et al., 1999; MARQUES et al., 2003].

Outros estudos confirmam a presença do padrão de neuropatia dos tipos mononeuropatia sensitiva ou sensitiva-motora e mononeuropatia sensitiva ou sensitivo-motora múltipla com caráter axonal, desmielinizante e misto [NATIONS et al., 1998; SABIN et al., 1993; RAMADAN et al., 2001; FERNÁNDEZ-DOMINGUEZ et al., 1999] A neurocondução pode evidenciar bloqueio de condução e dispersão temporal em locais dos nervos com maior suscetibilidade [SABIN et al., 1993; RAMADAN et al., 2001]. Essas alterações podem ser encontradas em nervos lesionados, mas sem expressão clínica, e nervos com espessamentos focais. É freqüente o nervo ulnar apresentar uma condução lenta na goteira epitrocleana, mas não incomum apenas no segmento proximal do úmero. O nervo mediano pode ter alterações no canal carpeano. O nervo fibular evidencia, na maioria das vezes, bloqueio ou condução lenta entre o cavo poplíteo e a cabeça da fíbula. O tibial posterior, na região retromaleolar interna do túnel do tarso [BRANSDMA, 2000; BRASIL-NETO, 1992; DeFARIA & SILVA, 1990; DHOPLÉ, 1970; GARBINO, 1997; JOB, 2001; BROWN et al., 1996]. É freqüente o comprometimento sensitivo demonstrado na ausência de captação de potenciais utilizando a neurocondução convencional [MARQUES, 1994; MARQUES et al., 2003].

A presença de fibrilações, ondas positivas e polifásicos longos sugerem envolvimento axonal. Muitos nervos com lesão axonal sem evidências de desmielinização podem sugerir degeneração axonal primária, mais do que secundária [BRANSDMA, 2000; BRASIL-NETO, 1992; DeFARIA & SILVA, 1990; DHOPLÉ, 1970; GARBINO, 1997; McLEOD et al., 1975; SABIN et al., 1993; RAMADAN et al., 2001; SKACEL et al., 2000; TZOURIO et al., 1992; WATERS & JACOBS, 1996.

Os exames eletrofisiológicos são utilizados no estudo da neuropatia periférica. Na neurite hansênica, essas técnicas podem fornecer informações para diagnóstico e manejo clínico da doença [BRASIL-NETO, 1992; HACKETT et al., 1968; JAIN et al., 2000; MARQUES, 1994; McLEOD et al., 1975; RAMAKRISHNAN & SRINIVASAN, 1995; VERGHESE et al., 1970; BROWN et al,

1996; EBENEZER et al, 1996; ENNA et al, 1970; WILDER-SMITH & WILDER-SMITH, 1997; MARQUES, 1994; MARQUES et al., 2003.

A biópsia de nervo tem sido descrita como um método valioso no diagnóstico da hanseníase neural pura. Um infiltrado inflamatório compromete o endoneuro, o perineuro e o epineuro. A presença de granuloma bem definido com necrose caseosa, a destruição fascicular do nervo, a ausência ou raros bacilos são vistos nos casos TT. Na hanseníase BT, o granuloma pode estar pouco definido e sem necrose caseosa, presença de bacilos em quantidades variáveis [CHIMELLI et al., 1997; CHIMELLI et al., 1989; DYCK et al., 1993; FLEURY, 1989; FLEURY & ARANDA, 1995; FLEURY, 1997; NATIONS et al., 1998; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; NADKARNI & REGE, 1999; RAMADAN et al., 2001; REPORT OF THE INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHINCAL FORUM PARIS, 2002; RIDLEY & JOPLING, 1966; SABIN et al., 1993; SAID, 1999; SEHGAL et al., 1977; SEHGAL et al., 1980; SPIERINGS et al., 2000; SUNEETHA et al., 1998; WERNECK, 1988; PANNIKAR et al., 1983; NADKARNI & REGE, 1999; LIU & QUI, 1984].

Pesquisadores sugerem a biópsia fasciculada, e não do nervo em toda a sua extensão, com o intuito de minimizar as seqüelas sensitivas e/ou dolorosas [DYCK & LOFGREN, 1968; FLANCHENERCKER et al., 1999]. Em contrapartida, estudos prospectivos, por mais de cinco anos, em pacientes biopsiados concluíram que a biópsia de toda a espessura do nervo era mais simples, e do ponto de vista histológico oferecia maiores informações. Em relação à perda sensitiva residual não ocorreram diferenças nas duas situações [POLLOCK et al., 1983]. A biópsia de nervo tem sido utilizada para investigar as neuropatias periféricas, contribuindo para aumentar nossos conhecimentos sobre doenças do nervo periférico, entre elas a hanseníase [SAID, 1999; EBENEZER et al., 1996].

Os critérios usados para a classificação atual da hanseníase têm por base as lesões de pele, não refletindo sobre as lesões de nervo [NILSEN et al., 1989]. Quando são correlacionadas lesões de pele e nervo podem ser encontrados três padrões histopatológicos (n=44 pacientes): diagnóstico confirmado na pele e nervo em

63,6%; negativo na pele e positivo no nervo em 31,8%, e negativo em ambos em, 4,5% [NILSEN et al., 1989]. Autores descrevem que 15 a 52,7% de pacientes com hanseníase com alta carga bacilar ($IB \geq 2$) nos nervos sem correspondência de lesões dermatológicas [ANTIA et al., 1970; ANTIA & PANDYA, 1976; SRINIVASAN et al., 1982; NEGESSE, 1988].

Sabe-se que é difícil o diagnóstico de hanseníase nos pacientes apenas com envolvimento neurológico, mesmo quando submetidos a uma investigação criteriosa para diagnóstico diferencial das várias neuropatias [PÖNNINGHAUS, 1996]. Atualmente, com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüência repetitiva do DNA do *M. leprae*, eventualmente presente em pêlo, muco nasal, linfa, sangue e nervo biopsiado, pode-se chegar ao diagnóstico para instituir um tratamento com maior efetividade [GOULART et al., 2002; GUERRERO et al., 2002; Job et al., 1997a; JOB et al., 1997b; LOCWOOD & BRYCESON, 1998; SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999; SHI et al., 2000; SMITH, 2000; WILSON, 1993; WOODS & COLE, 1989; GUPTE, 1996; HACKEL, 1990; HARTSKEERL et al., 1989; LOSEKE et al., 2001].

2.9 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase, conhecida pela sigla PCR - “Polimerase Chain Reaction”, é um método que vem revolucionando a prática da Biologia Molecular. Foi inicialmente descrito por Saiki, Mullis e cols., em 1985, na revista Science.[SAIKI et al., 1985].

A PCR pode ampliar seletivamente uma única molécula de DNA ou RNA milhões de vezes em algumas horas. Com isso permite a detecção e a análise de seqüências de genes específicos na amostra de um paciente, animal ou organismo sem a clonagem e sem a necessidade de hibridizações (“*Southern ou northern blotting*”). As análises podem ser realizadas até mesmo a partir de uma única célula obtida de uma raiz

de cabelo, das poucas células presentes em lavagens da boca, de uma gota de sangue seco, de pele ou de nervo, eliminando, assim, a necessidade de preparar grandes quantidades de DNA ou RNA de amostras teciduais [BLACKWELL, 2001; COLE et al, 2000; DE WIT et al, 1993; DE WIT et al, 1991; KURABACHEW et al., 1998; SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999; WICHITWECHKARAN et al., 1995; WOODS & COLE, 1989; CURTISS III et al., 2000; HACKEL, 1990; HARTSEKEERL et al., 1989; ZHANG & ISHAQUE, 1997].

O método baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, que ladeado por dois iniciadores (*primers*), oligonucleotídeos curtos que se hibridizam com os filamentos opostos da seqüência-alvo e desencadeiam a síntese da seqüência de DNA-complementar pela enzima DNA-polimerase. Portanto, partes de um gene (em geral os *éxons*) do DNA podem ser ampliadas rapidamente pelo uso de iniciadores específicos conhecidos [SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999; WILSON, 1993; WOODS & COLE, 1989; HACKEL, 1990]. A reação compreende três etapas [SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999 WOODS & COLE, 1989; HACKEL, 1990]:

A- Desnaturação térmica da dupla fita de DNA da amostra que servirá como molde, o que é obtido por incubação rápida (de 30 segundos a 1 minuto) a 95^o C.

B- Hibridização dos iniciadores (*primers*) ou anelamento com a seqüência-alvo do DNA, o que é obtido a uma temperatura com valores ideais entre 55^o7^o C a 65^o C, com tempo de aproximadamente um minuto. Para o cálculo dessa temperatura consideram-se o tamanho e a composição de bases dos oligonucleotídeos (*primers*).

C- A amplificação ou alongamento dos oligonucleotídeos com o auxílio da enzima polimerase DNA, realizados a uma temperatura de 70^o C a 72^o C, durante um intervalo de tempo de um a três minutos [SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999 WOODS & COLE, 1989; HACKEL, 1990].

Em suma, por meio da síntese repetida de uma região do DNA localizada entre dois iniciadores (*primers*) uma região do DNA, é amplificada específica e seletivamente de maneira exponencial. Assim, após 30 ciclos de amplificação, são criados mais de um bilhão de cópias da seqüência alvo , ou seja, partindo-se de uma

amostra que contenha 1 pg de DNA pode-se obter cerca de 200 ng de DNA amplificado. Essa quantidade de DNA submetida a uma eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida é corada e pode ser visualizada diretamente ou pela luz, se usado o corante brometo de etideo [SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999; WOODS & COLE, 1989; YOON et al., 1993; DE WIT et al., 1991].

Pelo exposto, a hanseníase neural pura é reconhecidamente de difícil diagnóstico, e, a fim de aprimorar a detecção dessa doença, se faz importante estudar seus aspectos clínicos e correlacionar os métodos de investigação clássicos com a reação da polimerase em cadeia (PCR), visto ser este um método rápido, sensível e capaz de fornecer resultados com quantidades mínimas de amostras [SANTOS et al., 1993; SANTOS et al., 1999; CHEMOULLI et al., 1996; JOB et al., 1997a; GUERRERO et al., 2002; GUPTE, 1996; HACKEL, 1990; HARTSKEERL et al., 1989; LOSEKE et al., 2001; PULST, 2000; RAFI et al., 1995; TALHARI, 1996; GELBER & REA, 2000; GILLIS, 1998].

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

A- Estudar o valor diagnóstico da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na hanseníase neural pura.

B- Correlacionar a Reação em Cadeia da Polimerase com a histopatologia dos nervos na hanseníase neural pura.

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1- CASUÍSTICA

Foram estudados 58 pacientes com suspeita diagnóstica de hanseníase neural pura do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPR (n=26; BT 23 e TT 3) e do Centro de Saúde Dona Libânia, unidade de referência em hanseníase no Estado do Ceará (n=32; BT 17 e TT 15).

Os casos de Hanseníase neural pura (HNP) foram definidos por sinais e sintomas neurais caracterizados por alterações sensitivas, do tipo parestesias, e/ou déficit sensitivo correspondente à área de um nervo espessado, associado ou não a déficit motor e/ou tróficos e/ou autonômicos, sem lesão de pele [NOORDEEN, 1972].

4.2- MÉTODOS

4.2.1- Critérios para classificação dos pacientes

4.2.1.1- Seleção de doentes

Todos os doentes foram submetidos a um protocolo pré-determinado constando de anamnese, exame dermatoneurológico, rotina laboratorial simples, pesquisa baciloscópica, eletroneuromiografia, histopatologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) de nervo previamente biopsiado.

Os doentes foram classificados, de acordo com Ridley e Jopling (1966), em TT (tuberculóide polar) e BT (borderline-tuberculóide), sendo definidos, segundo critérios da Organização Mundial de Saúde, como TT quando apresentavam um único tronco nervoso comprometido e BT com dois ou mais

troncos envolvidos [WHO, 1998]. A distribuição dos doentes por formas clínicas e sexo constam na tabela 1.

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE NEURAL PURA, SEGUNDO FORMAS CLÍNICAS E SEXO

| SEXO | FORMAS CLÍNICAS | |
|--------------|-----------------|-----------|
| | BT | TT |
| Masculino | 28 | 13 |
| Feminino | 12 | 5 |
| Total | 40 | 18 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide polar; Total = Total de pacientes

Nenhum dos pacientes incluídos no protocolo apresentava outras doenças que pudessem envolver o sistema nervoso periférico como o alcoolismo crônico, diabetes melito, tireoideopatias, desnutrição grave, neuropatia hereditária e história de lesões de pele prévias sugerindo hanseníase.

4.2.1.2 - Seleção de controles

Foi utilizado um grupo de comparação com 21 pacientes com diagnóstico de outras neuropatias para se estudar aspectos como sensibilidade, especificidade do teste. Os dados destes pacientes estão na (Tabela 2).

4.2.1.3- Aspectos éticos

Todos os pacientes incluídos na pesquisa assinaram um termo de consentimento, após esclarecimento verbal sobre a investigação, suas razões e importância, e os riscos de eventuais complicações. O projeto teve aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com o

parecer CEP-HC de nº 380.090/2001/07, de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

4.2.2- Anamnese

Do ponto de vista clínico geral foram destacados:

A idade média dos pacientes BT foi de 45,0 (\pm 18,2) anos, variando de 15 a 77 anos, com uma mediana de 44,5. Nos doentes TT a idade média foi 36,2 (\pm 9,2) anos, variando de 17 a 53 anos, com uma mediana de 35,0 anos.

O tempo de evolução da doença até o diagnóstico dos pacientes variou de 2,3 (\pm 2,2) anos, mediana de 1,5 anos na forma BT. Na forma TT foi observada uma evolução de 2,0 (\pm 2,9) anos, mediana 1,0 ano Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Os principais sinais e sintomas observados com maior frequência na hanseníase neural pura tanto, BT quanto TT, foram as alterações sensitivas como hipoestesia/anestesia associada ou não a parestesias, nos dois grupos. A parestesia como queixa isolada não foi observada em nenhum doente. O espessamento neural foi acompanhado de dor na maioria dos casos. Quanto aos outros sinais e sintomas, destacaram-se: fraqueza muscular, hipotrofia muscular e anormalidades autonômicas como mal-perfurante plantar, e abscessos de nervos, fistulizados ou não (Tabela 2).

TABELA 2: DADOS CLÍNICOS NA HANSENÍASE NEURAL PURA POR FORMAS CLÍNICAS

| Dados Clínicos | FORMAS CLÍNICAS | | | |
|------------------------|-----------------|------|--------|------|
| | BT | | TT | |
| | Número | % | Número | % |
| Hipoestesia/Anestessia | 40 | 100 | 18 | 100 |
| Parestesias | 28 | 70,0 | 12 | 66,7 |
| Espessamento | 35 | 87,5 | 16 | 88,9 |
| Dor | 29 | 72,5 | 14 | 77,8 |
| Fraqueza muscular | 21 | 52,5 | 10 | 55,5 |
| Hipotrofia | 13 | 32,5 | 5 | 27,8 |
| Alterações autonômicas | 4 | 10,0 | 0 | 0 |
| Mal-perfurante plantar | 3 | 7,5 | 0 | 0 |
| Abscesso | 3 | 7,5 | 3 | 16,7 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT= Tuberculóide polar.

4.2.3- Exame dermatoneurológico

Foram considerados os seguintes sinais:

4.2.3.1- Ausência de lesão de pele: caracterizando a hanseníase neural pura.

4.2.3.2- Palpação de nervos: realizada sempre com uma orientação prévia sobre o teste, para se obter a máxima cooperação do paciente e boa avaliação. A palpação do nervo seguia o sentido proximal-distal, observando-se a consistência, a uniformidade, a dor espontânea e a pressão, a presença de abscessos e/ou fístulas, sempre comparando com o lado contra-lateral. Levou-se em consideração o nervo na sua porção mais superficial, inclusive seus ramúsculos, avaliados nas proximidades de áreas suspeitas. Os nervos, avaliados de rotina: foram o supra-orbitário (fossa frontal lateral), retroauricular (pescoço), ramo cervical do facial (pescoço), supraclaviculares (ao cruzarem a clavícula no 1/3 médio), ulnar (no canal

epitrócleo-olecraniano e acima deste, com o cotovelo semi-fletido), cutâneo-lateral e medial do antebraço (face médio-lateral do antebraço), mediano (face palmar do punho, entre os tendões do músculo palmar longo e do flexor radial do carpo), radial (a em nível do braço, atrás do deltóide), radial superficial (a nível da tabaqueira anatômica do punho), cutâneo-laterais da coxa, fibular comum (na fossa poplíteia e face posterior da cabeça da fíbula), tibial posterior (fossa retromaleolar interna), fibular superficial (face anterior do tornozelo e dorsal do pé) e o nervo safeno (face superior do maléolo interno).

4.2.3.3 - Avaliação sensitiva: foi estudada apenas a sensibilidade superficial. Por razões práticas, excluímos a sensibilidade profunda, do tipo discriminação da distância entre dois pontos. Para avaliar a sensibilidade superficial (térmica, táctil e dolorosa) foram utilizados os testes clássicos: a sensibilidade térmica foi explorada com dois tubos de ensaio contendo água, um à temperatura ambiente e outro a 45° C, aplicados alternadamente na pele do doente. A duração dos estímulos limitou-se a dois segundos, estando o paciente com os olhos fechados, e acusando a sensação de quente ou frio. O teste de sensibilidade dolorosa consistiu na estimulação da pele com um alfinete de ponta fina e romba em áreas nitidamente sadias e em áreas suspeitas. O paciente respondia se estava sentindo uma picada ou apenas tocando. A sensibilidade táctil, da na mão foi pesquisada em áreas resumidas a sete pontos: três para o nervo mediano (1, 2, 3), três para o ulnar (4, 5, 6) e um para o radial (7). No pé foram 10 pontos, assim distribuídos: ramo plantar medial (1, 2, 4, 5); plantar lateral (3, 6); safeno (7); sural (8); ramo calcâneo (9) e fibular superficial (10) (Figura 5).

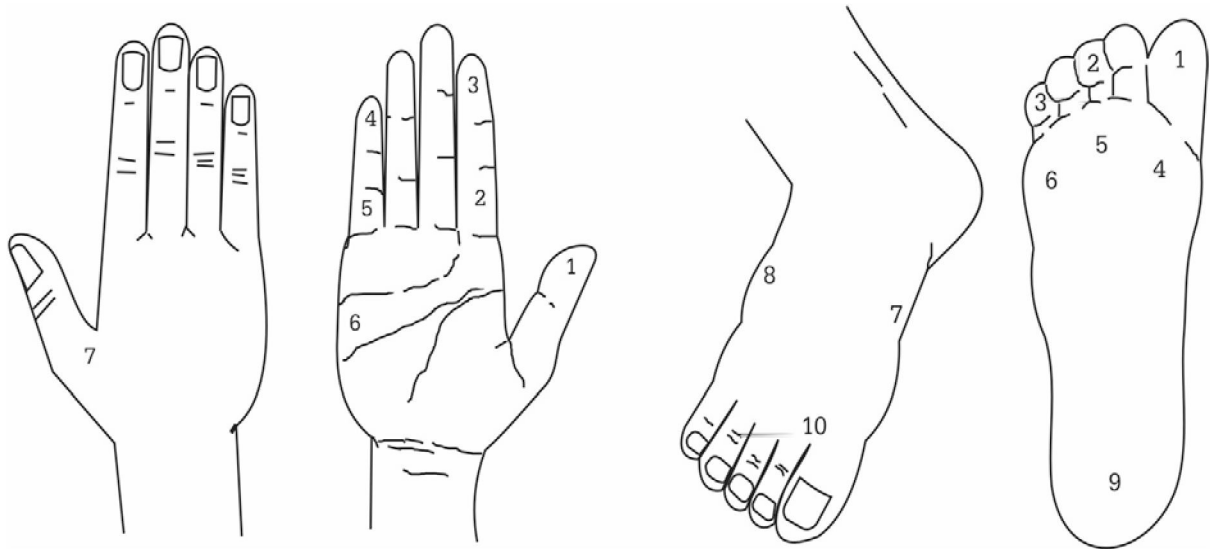


Figura 5- Representação esquemática dos pontos sensitivos padronizados das mãos (nervos mediano 1, 2 e 3; ulnar 4, 5 e 6; radial superficial 7) e dos pés (nervos tibial posterior: ramos plantar medial 1,2,4 e 5; plantar lateral 3 e 6 e calcâneo 9; nervo safeno 7; sural 8 e fibular superficial 10).

Nas mãos foi utilizado o monofilamento lilás de 2,0g e nos pés 10g. Ocasionalmente, as mãos foram testadas com o monofilamento de 10g (laranja), numa tentativa de padronização a partir de pontos correspondentes aos nervos testados. A sensibilidade táctil pode ser testada utilizando-se o teste do algodão ou monofilamentos de Semmes-Weinstein, sendo este o preferido por possibilitar uma monitorização quantitativa [BIRKE et al., 2000]. O teste de Semmes-Weinstein é empregado desde 1962 e consiste em um conjunto de 20 monofilamentos de nylon com diâmetros diferentes e comprimentos iguais. aplicados perpendicularmente à pele. No momento em que se curvam levemente os filamentos exercem uma força de pressão na área testada correspondente à sua espessura específica. Na doença hansênica utiliza-se apenas um conjunto de seis monofilamentos com força de pressão de 0.05g, 0.2g, 2g, 4g, 10g e 300g. O teste sempre é iniciado com o monofilamento 0.05g e, na ausência de resposta, 0.2g, confirmando-se progressivamente até 300 g [CAMARGO & BACCARELLI, 1997; DORAIJAJ et al., 1988; PREMKUMAR et al., 1998; VAN BRAKEL et al., 1994a; VAN BRAKEL et al., 1994b; FACER et al., 2000; SAUDERSON et al., 1997; BIRKE et al., 2000; TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1996].

O uso desses monofilamentos tem sido sugerido em vários estudos, considerando a sensibilidade e a reprodutibilidade do teste para os limites dos indivíduos normais [SAUDERSON et al., 1997; VAN BRANKEL et al., 1994a; VAN BRANKEL & KHAWAS, 1994, 1994; SAUDENSON et al., 2000b].

A interpretação funcional desses testes foi caracterizada normal, hipoestesia ou anestesia. Os dados obtidos no exame são registrados em formulário próprio para mapeamento de sensibilidade, inclusive com interpretação funcional do teste (Apêndice 2).

4.2.3.4 - Avaliação da força muscular: foi utilizada a escala de graduação da força muscular proposta pelo *Medical Research Council (1976)*, para avaliar cada músculo isoladamente, e adaptada por Omer (1981), sendo usada nas Ações Básicas de Prevenção de Incapacidades na Hanseníase [BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE - ÁREA TÉCNICA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA, 2001] (Tabela 3).

TABELA 3 - GRAU DE FORÇA MUSCULAR ADAPTADA PARA AS AÇÕES BÁSICAS DE PREVENÇÃO DE INCAPACIDADES NA HANSENÍASE

| GRAU DE FORÇA MUSCULAR | OBSERVAÇÃO CLÍNICA | CONDIÇÃO FUNCIONAL |
|------------------------|--|--------------------|
| 5 | Movimento completo contra a gravidade com resistência máxima | Normal |
| 4 | Movimento completo contra a gravidade com resistência moderada | Paresia |
| 3 | Movimento completo contra a gravidade sem resistência | Paresia |
| 2 | Movimento incompleto | Paresia |
| 1 | Contração muscular sem movimento articular | Paresia |
| 0 | Sem evidência de contração muscular | Paralisia |

Os principais músculos testados relativos aos seus respectivos nervos foram os seguintes:

A) Nervo ulnar:

Abdutor do 5º dígito: avaliado com a porção palmar da mão em pronação, do 2º ao 4º dígitos, dedos fixos, o paciente separava o 5º dígito no sentido horizontal com resistência ao nível falange média;

1º interósseo dorsal: à semelhança do anterior, solicitava-se a separação do 2º dígito;

Interósseo e lumbricóides do 3º e 4º dígitos: o dorso da mão e o antebraço eram apoiados sobre uma mesa; com os metacarpos fixos, pedia-se que o paciente levantasse os dígitos em extensão, enquanto se aplicava uma força contrária na falange proximal da porção palmar do 2º ao 5º dígitos;

B) Nervo mediano:

Abdutor curto do polegar: o dorso da mão sobre uma mesa, com o 2º ao 4º dígitos fixos. Pedia-se ao paciente que elevasse o polegar perpendicularmente ao plano da palma da mão, com aplicação de resistência na face lateral da falange proximal do polegar;.

C) Nervo radial:

Extensor comum dos dígitos: palma da mão em pronação e extensão das articulações metacarpo-falangeanas, com aplicação de resistência no dorso dos dedos, sobre a falange proximal;

Extensores do carpo: palma da mão em pronação, com o punho apoiado, o paciente flexionava os dedos com uma resistência aplicada no dorso da mão;.

D) Nervo fibular comum:

Tibial anterior: doente sentado, porção plantar do pé apoiada no chão; solicita-se ao paciente para realizar uma dorso-flexão do pé mantendo o calcanhar no chão. Aplica-se resistência contrária ao movimento;

Extensor longo do hálux: paciente em posição semelhante ao teste anterior, tornozelo em posição neutra, resistência aplicada no dorso do hálux;

Extensor comum dos dígitos: como no item anterior mas aplicando resistência no dorso de todos os dedos;

Fibular longo e curto (inervados pelo ramo superficial do fibular comum): paciente com a parte posterior da perna apoiada e com o joelho em extensão, tornozelo em posição neutra, movimento em eversão do pé, resistência ao nível do 5º metatarsiano;.

E) Nervo tibial posterior (inerva a musculatura intrínseca do pé):

Flexor curto do hálux: pé apoiado no chão, flexão do hálux, resistência na sua falange plantar proximal;

Abdutor do hálux: abdução do hálux com resistência na sua na sua porção media;.

F) Nervo facial:

Frontal: elevação das sobrancelhas até formação de pregas horizontais na testa;

Orbicular dos olhos: oclusão dos olhos, resistência com o dedo mínimo no sentido de impedir a elevação da pálpebra;

Bucinador: insuflação das bochechas com os lábios fechados;

Orbicular dos lábios: lábios fechados, fazer a boca “em bico”;

Zigomático maior: elevação das comissuras labiais para cima e para fora com os lábios abertos (“mímica do sorriso”).

4.2.3.5- Avaliação dos reflexos ósteo-tendinosos: bicipital, tricipital, estiloradial, patelar, flexor plantar, aquileu, masseterino e orbicular das pálpebras.

4.2.3.6- Avaliação dos reflexos cutâneos: córneo-palpebral e plantar.

4.2.3.7- Avaliação das alterações tróficas: decorrentes do comprometimento das funções sensitivas e/ou motora na pele, músculos, osteoarticulares e vasomotoras. Foram pesquisadas anomalias de pigmentações cutâneas, ictiose, esclerodermia, fissuras, unhas quebradiças com estrias ou espessadas e panarícios; perda de pêlos (alopécias), com destaque nas áreas suspeitas; mal-perfurante plantar nas suas diversas apresentações; úlceras plantares; hipotrofias ou atrofia; encurtamento de dedos com ou sem reabsorção de falanges, mutilações, luxações ou subluxações.

Os dados clínicos e eletrofisiológicos dos pacientes estão mostrados na tabela 4.

**TABELA 4 CASUÍSTICA DOS DADOS, CLÍNICOS E ELETROFISIOLÓGICOS
DA HANSENÍASE NEURAL PURA**

| Caso | Sexo | Idade (anos) | Forma | Tempo Doença (anos) | Principais nervos | Alterações sensitivas | Espessamento | Padrão neuropatia | Biópsia Nervo |
|------|------|--------------|-------|---------------------|---|-----------------------|--------------|-------------------|----------------|
| 1 | F | 34 | BT | 8 | 1, 3, 3A 4 5 6 | + | + | SMM | 3 ^A |
| 2 | M | 15 | BT | 2 | 1 3 4 5A 9 | + | + | SMM | 6 |
| 3 | M | 69 | BT | 8 | 1A 3A 4A 5A | + | + | SMM | 5A |
| 4 | M | 45 | BT | 2 | 1 1A 3A 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 5 | F | 31 | BT | 0,4 | 1 1A 3A 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 6 | M | 48 | BT | 1 | 1 1 1A 3A 4 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 7 | M | 46 | BT | 2 | 3A 3A 5A | + | - | SM | 5A |
| 8 | M | 41 | BT | 0,4 | 1 4 5A | + | + | SM | 5A |
| 9 | F | 44 | BT | 0,5 | 1 1A 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 10 | M | 63 | BT | 2 | 1 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 11 | F | 25 | BT | 1 | 3A 5A 5A | + | - | SM | 5A |
| 12 | F | 56 | BT | 0,6 | 1 1A 3A 3A 4 5A 6 | + | + | SMM | 5A |
| 13 | F | 35 | TT | 1 | 5A 8 | + | + | SM | 5A |
| 14 | F | 77 | BT | 1 | 1 4 | + | + | MSM | 1 |
| 15 | M | 20 | BT | 1 | 1 2A 2A 4 4A 4A 8A | + | + | SMM | 3A |
| 16 | F | 68 | BT | 1 | 1 1A 2A 3A 3A 4 5A 6 | + | - | SMM | 5A |
| 17 | M | 69 | BT | 5 | 1 1A 2A 3A 3A 4 5A 6 | + | + | SMM | 5A |
| 18 | M | 75 | BT | 5 | 1 2A 3 4 4A 5A 5A | + | + | SMM | 5A |
| 19 | M | 47 | TT | 2 | 6 9 | + | + | SM | 6 |
| 20 | F | 23 | BT | 2 | 1 1 4 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 21 | M | 57 | BT | 6 | 1 1A 1A 3A 3A 4 5A 8 | + | + | MSM | 5A |
| 22 | M | 53 | TT | 3 | 6 | + | + | MS | 6 |
| 23 | M | 43 | BT | 1 | 1 1 4 4 5A 7A | + | + | SMM | 5A |
| 24 | F | 45 | BT | 2 | 1 1A 3A 4 5 6 | + | + | SMM | 5A |
| 25 | F | 56 | BT | 0,5 | 1 1A 1A 3A 3A 4 5A 8A | + | + | SMM | 5A |
| 26 | M | 62 | BT | 4 | 1A 3A 4 5A 5A | + | + | SMM | 5A |
| 27 | M | 76 | BT | 0,5 | 1 1 1A 3A 4 4 5A 6 | + | + | SMM | 5A |
| 28 | M | 35 | TT | 13 | 1 3 4 6 | + | + | MSM | 1 |
| 29 | F | 30 | TT | 0,6 | 1 3 4 | + | + | MSM | 1 |
| 30 | M | 21 | BT | 2 | 1A 2A 3A 4A 5A 6 | + | + | SMM | 5A |
| 31 | M | 38 | BT | 3 | 1A 3A 4A 5A | + | + | SMM | 5A |
| 32 | M | 53 | BT | 6 | 1 2 3A 3A 4 | + | + | SMM | 6 |
| 33 | F | 46 | TT | 1 | 5A | + | - | MS | 5A |
| 34 | F | 42 | TT | 1 | 1A 3A | + | + | MSM | 3A |
| 35 | F | 44 | BT | 4 | 3A 5A | + | - | SM | 5A |
| 36 | M | 38 | BT | 1 | 1 1 1A 1A 2 2A 2A 3 3A | + | + | SMM | 5A |
| 37 | M | 26 | BT | 1 | 1 1 1A 1A 3A 3A 4 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 38 | M | 64 | BT | 1 | 1 1 1A 1A 2 2A 2A 3 3A 3A 4 4 5A 5A 6 6 6A | + | + | SMM | 5A |
| 39 | M | 38 | TT | 1 | 1 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |
| 40 | M | 35 | TT | 0,16 | 7A | + | + | MS | 7A |
| 41 | M | 28 | TT | 2 | 1A 3A | + | + | MSM | 3A |
| 42 | M | 32 | TT | 2 | 1A 3A 5A | + | + | MSM | 5A |
| 43 | M | 51 | TT | 1 | 1 4 | + | + | SMM | 1 |
| 44 | M | 28 | BT | 1 | 1 1 1A 3A 4 4 5A 5A | + | - | SMM | 5A |
| 45 | M | 31 | TT | 2 | 1 | + | + | MSM | 1 |
| 46 | M | 20 | BT | 2 | 1 1A 1A 3A 3A 2A 4 5A | + | + | SMM | 3A |
| 47 | M | 18 | BT | 2 | 1 1 1A 3 4 4 5A 5A 6 | + | + | SMM | 5A |
| 48 | F | 30 | BT | 0,41 | 1 1 1A 3A 4 4 5A 5A | + | + | SMM | 5A |
| 49 | M | 34 | TT | 2 | 1 4 | + | + | MSM | 1 |
| 50 | M | 73 | BT | 8 | 1 3A 4 5A | + | - | SMM | 5A |
| 51 | M | 37 | TT | 1 | 1 4 | + | + | MSM | 1 |
| 52 | M | 26 | BT | 0,41 | 4 4 5 6 7 | + | + | SM | 7 |
| 53 | F | 36 | TT | 3 | 5A | + | + | MS | 5A |
| 54 | M | 51 | BT | 1 | 1 3A 4 5A 6 | + | + | MSM | 5A |
| 55 | M | 49 | BT | 4 | 1 1A 2A 2A 3A 4 4A 4A 5A 5A 6 6 8A 9A | + | + | SMM | 5A |
| 56 | M | 24 | TT | 0,5 | 1 4 5A 6A | + | -0 | SMM | 6A |
| 57 | M | 17 | TT | 0,25 | 1A 3A 5A | + | + | SMM | 3A |
| 58 | M | 33 | BT | 0,8 | 1 3A 3A 4 5A | + | + | SMM | 5A |

CONTINUAÇÃO:

F = Feminino; M = Masculino; Pos = Positivo; Neg = Negativo; BT = Borderline-Tuberculóide; TT = Tuberculóide polar; SMM = Sensitiva-motora múltipla; SM = Sensitiva múltipla; MSM = Mononeuroptia sensitiva-motora; MS = Mononeuropatia sensitiva; Padrão neuropático = Estudo eletroneuromiográfico; + = Presença; - = Ausente.

Nervos:

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1- Ulnar sensitivo-motor | 1 A- Fibular profundo |
| 2- Mediano sensitive-motor | 2 A- Tibial posterior |
| 3- Radial motor | 3 A- Fibular superficial |
| 4- Ulnar sensitivo | 4 A- Plantares medial e lateral |
| 5- Mediano sensitivo | 5 A- Sural |
| 6- Radial superficial | 6 A- Safeno |
| 7- Ulnar dorsal superficial | 7 A- Cutâneo lateral da coxa |
| 8- Cutâneo lateral antebraço | 8 A- Retroauricular |
| 9- Cutâneo anterior antebraço | 9 A- Outros |

Foram comprometidos nos pacientes com hanseníase neural pura 307 nervos, predominando nos membros inferiores. No total, os nervos sensitivos (Figuras 10 e 11) foram mais comprometidos do que os sensitivo-motores.(Figura 8). Foram incluídos no grupo de outros nervos: o retroauricular (1.0%) (Figura 7), cutâneo lateral do antebraço (0.6%), cutâneo anterior do antebraço (0.6%), safeno (0.6%) (Figura 11), cutâneo lateral da coxa (0.6%) (Figura 9), ulnar dorsal superficial (0.6%) e o facial (0.3%) (Figura 6). (Tabela 05)

TABELA 5: RESULTADOS DISTRIBUIÇÃO DOS NERVOS COMPROMETIDOS NA HANSENIASE NEURAL PURA

| Nervos comprometidos | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|--------|---------------|-----------------|----------------|---------------------|------------------------|--------------------------|-------|------------------|----|---|----|---|---|
| FORMAS | CASOS | Lado* | Nervos | Ulnar SM S | Mediano SM S | Radial SM S | Fibular profundo | Fibular superficial | Tibial posterior SM S | Sural | Outros** SM S | | | | | |
| BT | 40 | Uni | 145 | 22 | 23 | 3 | 2 | 6 | 13 | 17 | 18 | 4 | 4 | 24 | 4 | 5 |
| | | Bil | 61 | 10 | 11 | - | - | - | 2 | 6 | 14 | 5 | 2 | 11 | - | - |
| TT | 18 | Uni | 40 | 8 | 7 | - | - | 2 | 3 | 4 | 5 | - | - | 7 | - | 4 |
| | | Bil | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | 58 | | 307 | 50 | 52 | 3 | 2 | 8 | 20 | 33 | 51 | 14 | 8 | 53 | 4 | 9 |

* Os nervos comprometidos bilateralmente são contados em duplicidade na totalização.

** Outros nervos: retroauricular, facial, cutâneo-lateral do antebraço, cutâneo-anterior do antebraço, ulnar dorsal, radial superficial, cutâneo-lateral da coxa e o safeno.

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide polar; Uni = Unilateral; Bil = Bilateral; SM = Sensitivo-motor; S = Sensitivo.

HANSENIASE NEURAL PURA CASOS CLÍNICOS

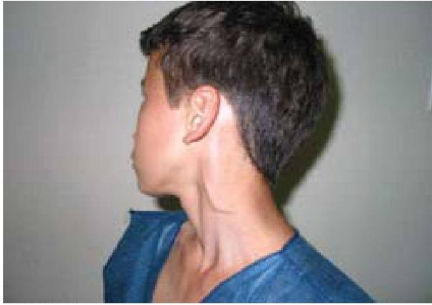


Fig. 06: Ramo cervical do facial
(Paciente 2)



Fig. 07: Nervo retroauricular
(Paciente 55)



Fig. 8: Nervo Ulnar com abscesso
e fístula (Paciente 57)



Fig. 9: Nervo cutâneo lateral
da coxa espessado (Paciente
35)



Fig.10: Nervo fibular superficial
espessado (Paciente 28)



Fig. 11: Nervo safeno espessado
(Paciente 56)



Fig. 12: Nervo sural
espessado (Paciente 44)

4.2.4- Exames complementares

4.2.4.1- Rotina laboratorial simples foi realizada em todos os pacientes, e constou de hemograma, VHS, uréia, creatinina, eletrólitos, glicemia de jejum, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), função tireoideana (TSH, T3 e T4), parcial de urina e parasitológico de fezes. Estes exames tem por objetivo avaliar possibilidades de doenças básicas como causas freqüentes de neuropatias intercorrentes e como seguimento clínico. Nesses exames não foram encontradas anormalidades.

4.2.4.2- Pesquisa baciloscópica: foi realizada em todos os pacientes com a finalidade de diagnosticar possível presença de bacilos na pele, o que excluiria hanseníase neural pura. A pesquisa de baciloscopia no esfregaço dérmico foi realizada nos lóbulos de orelhas, cotovelos, joelhos e, pelo menos, em quatro pontos coincidentes nas áreas com alterações sensitivas e/ou motoras. A técnica empregada constou de limpeza da área com álcool ou éter, pinçamento da pele com o dedo polegar e o indicador, sob forte pressão, para se obter isquemia, caracterizada por branqueamento do local após alguns segundos. A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15 foi feito um pequeno corte, de mais ou menos 2 mm de comprimento por 2 mm de largura, com a borda não cortante da lâmina, e escarificação dos lados do corte, duas a três vezes, até obter-se pequena quantidade de material proveniente da subepiderme, sendo o material espalhado em espiral numa lâmina de vidro para secar, fixado pelo calor, corado pelo Fite-Faraco com a técnica padrão caracterizada: lâmina coberta pela fucsina fenicada; aquecimento da lâmina durante cinco minutos, evitando fervura para não alterar as propriedades tintoriais e a morfologia dos bacilos; tratamento da amostra com solução de álcool-ácido clorídico, deixando-a gotejar sobre a lâmina inclinada, até

que desaparecesse a remoção de corante; lavagem em água corrente; coloração pelo azul de metileno durante cinco minutos; lavagem em água e deixada para secar ao ar livre; examinada com objetiva de imersão. Foi destacado que o bacilo é intracelular obrigatório, portanto a amostra obtida deve conter histiócitos na lâmina.

A leitura da lâmina foi efetuada a partir da escala logarítmica Ridley ou Índice bacteriológico, obtido pela soma do número de cruces (+) encontradas em, no mínimo, quatro esfregaços de diferentes áreas [RIDLEY, 1974].

A pesquisa de bacilos na linfa dos esfregaços de pele foi negativa em todos os casos

4.2.4.3- Eletroneuromiografia: todos os exames foram realizados em aparelho Nihon-Kodhen – Neuropack 2, com dois canais, sendo alguns resultados e laudos discutidos com mais de um neurofisiologista. Os pacientes tiveram os nervos dos quatro segmentos explorados: mediano, ulnar e radial sensitiva-motor; fibulares profundo e superficial, tibial posterior e sural, e, quando necessário, facial, ulnar dorsal superficial, cutâneo lateral e medial do antebraço, femoral, cutâneo lateral da coxa, safeno, plantares medial e lateral. Na pesquisa de alguns nervos sensitivos foi utilizado eletrodo de agulha com inserção subepidérmica. Os músculos examinados foram escolhidos de acordo com os resultados da neurocondução, associados ou não à avaliação clínica, e explorados com eletrodos de agulha coaxiais.

No estudo eletroneuromiográfico por formas clínicas foram encontrados quatro padrões de mononeuropatias: sensitiva-motora múltipla, sensitiva múltipla; sensitiva-motora e sensitiva. O padrão de mononeuropatia sensitiva-motora múltipla foi o mais presente com 62,0% do total do casos, sendo 80% dos casos BT (Tabela 6).

TABELA 6 - PADRÕES ELETROFISIOLÓGICOS DE NEUROPATIA HANSENÍASE NEURAL PURA POR FORMAS CLÍNICAS

| PADRÃO | CASOS | FORMAS CLÍNICAS | |
|---------------------------|-------|-----------------|----|
| | | BT | TT |
| Sensitiva-motora múltipla | 36 | 32 | 4 |
| Sensitiva-múltipla | 7 | 5 | 2 |
| Sensitiva-motora | 11 | 3 | 8 |
| Sensitiva | 4 | 0 | 4 |
| Total | 58 | 40 | 18 |

BT= Borderline-tuberculóide; TT=Tuberculóide polar; Total = Total de casos

Os principais padrões eletrofisiológicos encontrados foram avaliados conforme a duração da doença até o diagnóstico, no intuito de sugerir uma definição para o dano neural no espectro tempo. Os quatro padrões principais já referidos foram subdivididos em desmielinizante, axonal e misto (desmielinizante e axonal), segundo critérios descritos [AD HOC SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY AIDS TASK FORCE, 1991].

Na forma tuberculóide ocorreu a única lesão puramente desmielinizante (5,5%) em um doente com mononeurite sensitiva nos primeiros seis meses de doença. O padrão axonal somou 8 casos, dos quais 5 (27,8%) nos primeiros seis meses e 3 doentes (16,7%) (Figura 13) após esse período (Figura 13). O padrão misto foi o mais encontrado, 9 doentes (50,0%), todos nos primeiros 24 meses. (Figura 14) (Tabela 07).

TABELA 07 – PADRÕES ELETROFISIOLÓGICOS DE NEUROPATIA NA FORMA TUBERCULÓIDE DA HANSENÍASE NEURAL PURA POR TEMPO DE DOENÇA

| Formas clínicas | Tempo Doença (meses) | DADOS ELETROFISIOLÓGICOS | | | | | | | | | | | | Total (Doentes) |
|-----------------|----------------------|---------------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----------------|
| | | Sensitiva-motora múltipla | | | Sensitiva-múltipla | | | Mononeuropatia sensitiva-motora | | | Mononeuropatia sensitiva | | | |
| | | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | |
| TT | < 24 | 0 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 6 | 1 | 1 | 0 | 15 |
| | > 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 03 |
| Total (Doentes) | | 0 | 1 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 6 | 1 | 3 | 0 | 18 |

Des = Desmielinizante; Axo = Axonal; Mis = Misto

Na forma de hanseníase borderline-tuberculóide as lesões desmielinizantes foram encontradas em 12,5%, todos nos primeiros 24 meses de evolução da doença, predominando na forma sensitiva-motora múltipla (10,0%). O padrão axonal somou 32,5%, sendo 27,5% nas apresentações sensitiva-motora e mononeuropatia sensitiva múltipla.com distribuição aproximada nos dois períodos de tempo. O padrão misto ocorreu em 55,0% do total, sendo 45,0% desses nos primeiros 24 meses e 52,5% do tipo sensitiva-motora múltipla. (Tabela 08).

TABELA 08 – PADRÕES ELETROFISIOLÓGICOS DE NEUROPATIA NA FORMA BORDERLINE-TUBERCULÓIDE DA HANSENÍASE NEURAL PURA POR TEMPO DE DOENÇA

| Formas clínicas | Tempo Doença (meses) | DADOS ELETROFISIOLÓGICOS | | | | | | | | | | | | Total (tempo) |
|-----------------|----------------------|---------------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|---------------|
| | | Sensitiva-motora múltipla | | | Sensitiva-múltipla | | | Mononeuropatia sensitiva-motora | | | Mononeuropatia sensitiva | | | |
| | | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | Des | Axo | Mis | |
| BT | < 24 | 4 | 2 | 17 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| | > 24 | 0 | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| TOTAL | | 4 | 7 | 21 | 0 | 4 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 40 |

Des = Desmielinizante; Axo = Axonal; Mis = Misto

ESTUDOS ELETRONEUROMIOGRÁFICOS

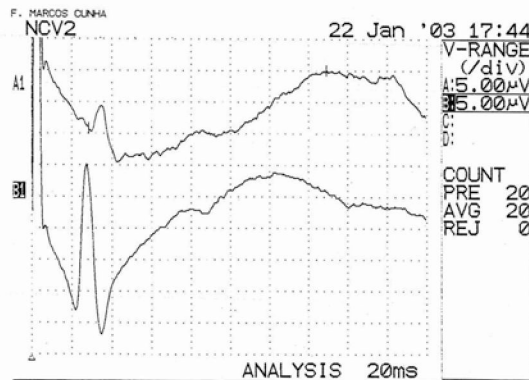


Fig. 13: Nervo radial superficial com diferença de amplitude entre os lados. (Paciente 19).

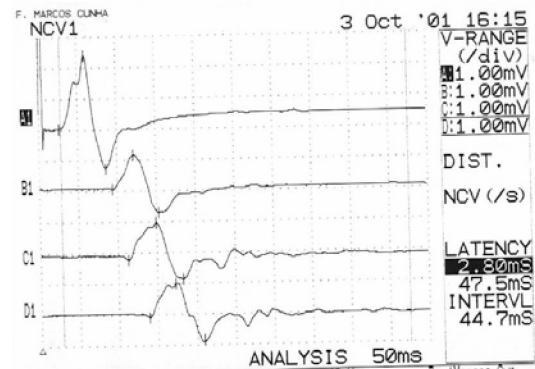


Fig. 14: Nervo ulnar com bloqueio de condução e dispersão temporal (Paciente 51).

4.2.5- Coleta de amostras do nervo periférico

Os nervos foram escolhidos de acordo com a área correspondente de anestesia ou hipoestesia, espessamento nítido ou duvidoso e alterações eletrofisiológicas definidas. Preferencialmente, foram biopsiados os nervos em toda a sua espessura. Na maioria dos casos foram biopsiados nervos sensitivos (Figura 15). Nos casos das mononeuropatias de nervos mistos, como ulnar e fibular profundo, esses nervos foram poupados, retirando apenas um fragmento do epineuro (Figura 16). No caso do nervo radial superficial, as biópsias foram fasciculadas. Os nervos foram biopsiados e divididos em dois fragmentos: um fixado em goma de “*adragath*” para histopatologia e outro colocado em um tubo “*ependorf*” para PCR, ambos congelados com nitrogênio líquido. A análise histopatológica das amostras de nervos e a PCR foram realizadas nos Laboratórios de Histoquímica e Biologia Molecular do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPR.

Para biópsia foram escolhidos, preferencialmente, o nervo sural em 38 casos (Figura 15); o ulnar sensitivo-motor em 7 casos (Figura 16); o fibular superficial em 6 casos; o radial superficial em 4 casos; o ulnar dorsal, safeno e cutâneo-lateral da coxa um nervo de cada doente. Nenhum nervo foi escolhido sem espessamento nítido e/ou anormalidade eletrofisiológica (Gráfico 01).

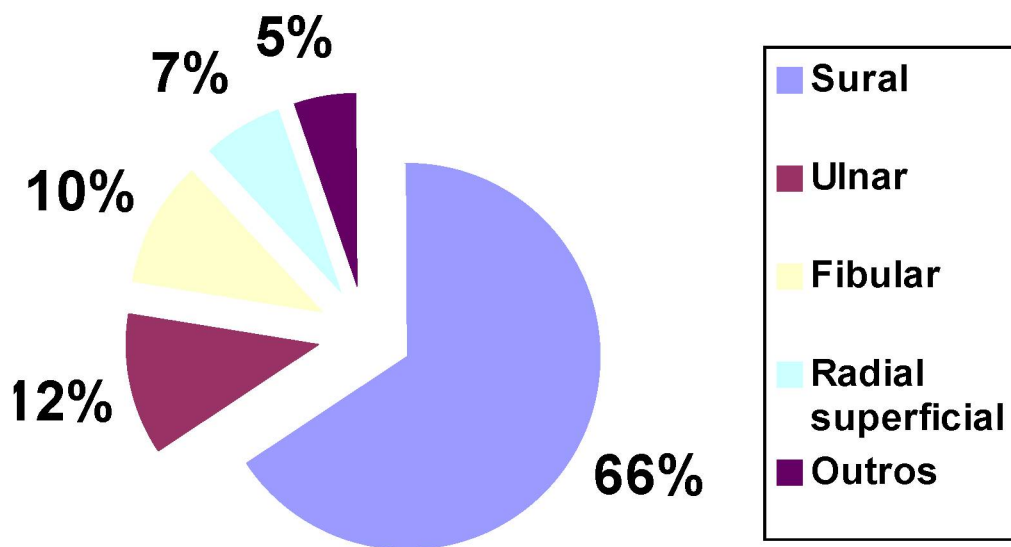


Gráfico 1- Distribuição dos nervos biopsiados na hanseníase neural pura

BIÓPSIAS DE NERVOS



Fig.15: Biópsia de nervo sural (Paciente 30)

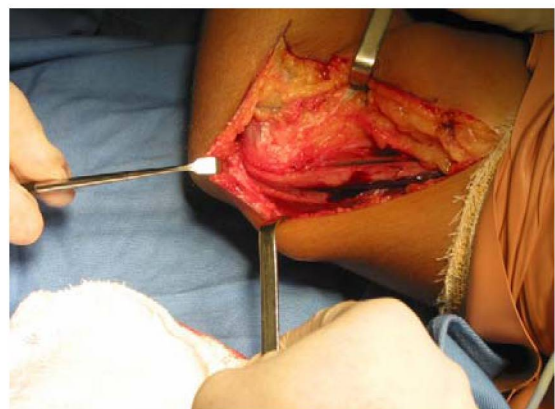


Fig 16: Epineurotomia e biópsia do nervo ulnar (Paciente 29)

4.2.6- Técnicas de histopatologia do nervo periférico

Foram efetuados cortes finos (4 e 8 μ) das amostras de nervo fixadas em goma de “adragath”, sendo então estes fragmentos colocados em lamínulas e mantidos em temperatura ambiente por 30 min. A seguir eram colocados num suporte e corados pelas técnicas de Hematoloxina-Eosina (HE), Gomori e Fite-Faraco modificados.

A) Hematoxilina-Eosina: os fragmentos eram corados com hematoxilina durante dez minutos; lavados com água destilada, tendo o excesso de hematoxilina; corados com eosina por 20 min; desidratados em álcool a 80% e nos demais álcoois graduados. Por fim, limpeza com xilol graduado de 5 a 10 vezes, sendo os cortes montados em meio sintético (Bálsamo do Canadá) (Figuras 17 e 18).

B) Gomori modificado por Engel & Cunningham (1963): os fragmentos eram colocados na hematoxilina por 10 min; lavados com água destilada para remover o excesso de hematoxilina; corados em solução de tricromo por 20 min; desidratados em álcool graduado. A seguir, fazia-se a limpeza com xilol graduado e as lamínulas montadas em meio sintético (Bálsamo do Canadá) (Figuras 19 e 20).

C) Fite-Faraco modificado: os fragmentos foram corados com fucsina de Ziehl por 20 min; lavados em água corrente e-descolorados com a solução de ácido sulfúrico a 2%, contrastando com álcool puro até aparecer um tom róseo desejado e lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante. Após secados, os cortes eram montados em meio sintético (Bálsamo do Canadá) (Figura 21).

HISTOPATOLOGIA

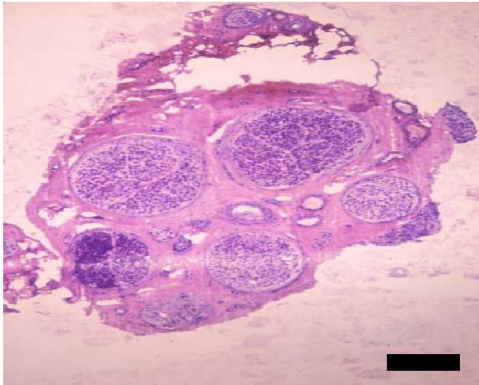


Fig. 17: Nervo normal. Coloração HE.
Barra 200 μ . (Paciente 8)

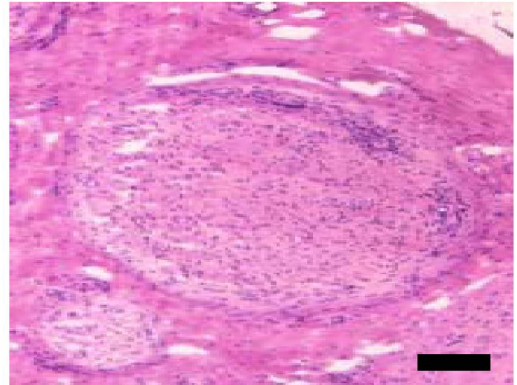


Fig. 18: Granuloma. Coloração HE.
Barra 90 μ . (Paciente 13)

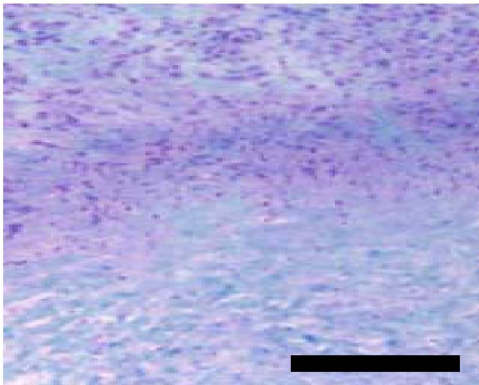


Fig 19: Granuloma com necrose
caseosa. Coloração Tricomo de Gomori.
Barra 100 μ . (Paciente 33)

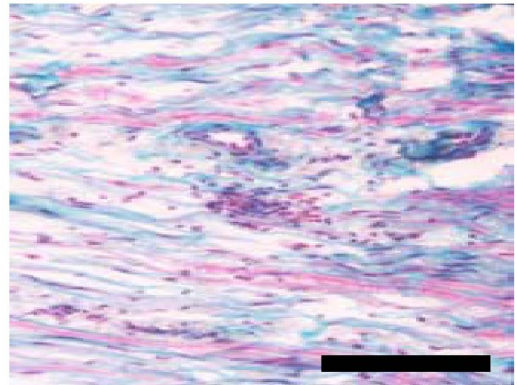


Fig 20: Infiltrado inflamatório intersticial
inespecífico. Coloração-Gomori tricromo.
Barra 50 μ . (Paciente 43)

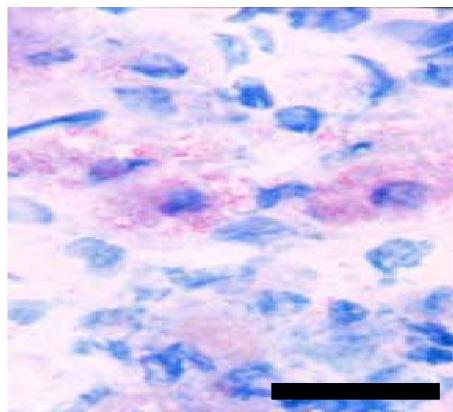


Fig 21: Célula de Virchow com BAAR
Coloração Fite-Faraco. Barra 20 μ .
(Paciente 37)

4.2.7- Extração do DNA de amostras do nervo periférico

A extração do DNA foi realizado com base no protocolo aplicado na FioCruz [Santos, 1993], sendo algumas etapas modificadas: Ao fragmento de nervo biopsiado e congelado foram adicionados 50 µl de NaOH 0,5 M (Hidróxido de sódio), seguindo com incubação a 54° por 10 min com agitação ocasional. Após, foram adicionados de NaH₂PO₄ 1M (Difosfato de sódio) para neutralizar a solução, centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, sendo descartado o sobrenadante. A amostra era ressuspensa em 100 µl de 60 mM Tris-HCl pH 8,8 (Tris-ácido clorídico). A seguir procedia-se à lise celular com 60 µg proteinase K a 50° C por 30 min, seguindo-se inativação da proteinase por 5 min a 95° C. Nova lise celular era realizada por meio de choques térmicos (seis ciclos de congelamento rápido por imersão em nitrogênio líquido durante 3 min, intercalados por fervura da amostra por 10 min. Finalmente, uma centrifugação por 30 seg para precipitar o líquido evaporado que ficava na tampa do tubinho.

Após esses procedimentos de extração do DNA realizava-se a amplificação pela técnica da PCR.

4.2.8- Técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase para detecção de DNA do *Mycobacterium leprae*

Foram amplificadas seqüências específicas do DNA do *M. leprae* utilizando-se os *primers* ML1 (2322 – 2341) GCACGTAAGCCTGTCGGTGG e ML2 (2674 – 2693) CGGCCGGATCCTCGATGCAC, conforme descrito por Woods & Cole (1989). Em um microtubo de 0,5 ml era preparado o “*Supermix PCR*” constituído por uma solução tampão de PCR 1x.: 19 mM Tris-HCl (pH 7,8) + 2,75 mM KCl + 1,42mM

MgCl₂ + 190 µM de cada dNTPs (A,T,C,G) + 0,50 U Taq polimerase. Em seguida adicionava-se primers, sendo ML1 20,4 pmoles (0,68 µl) do *primer* ML1e ML2 22,8 pmoles (0,76 µl) do primer ML2, ambos retirados de uma solução estoque de 30 pmoles/µl. A esse “*Supermix*” adicionava-se então 2,5 µl da amostra de DNA extraído da biópsia de nervo. Após uma rápida centrifugação (Microcentrífuga modelo 5460 C-Eppendorf) por 5 segundos, para baixar os resíduos nas paredes do tubo. Os microtubos com os reagentes eram colocados no termociclador modelo PTC-200 (“*Peltier Thermal Cycler*” da MJ Research para um esfriamento a 2° C por 1:30 min e um aquecimento até 80° C por 1 min, momento no qual se adicionava 1 µl de Taq DNA polimerase (Centro de Biotecnologia-UFRGS). A seguir, eram repetidos 44 ciclos nas seguintes temperaturas e tempo:

- desnaturação a 92° C (1:30 min);
- hibridização ou anelamento a 55° C (2:30 min);
- extensão a 72° C(2:00 min);

No final desses ciclos de amplificação, era feita uma extensão final a 72° C durante 7:00 minutos. Quando necessário, o material amplificado era estocado em geladeira de 2 a 5° C.

4.2.9- Eletroforese em gel de poli(acrilamida)

Após amplificado procedia-se as seguintes etapas: Preparo das placas de vidro em cuba de eletroforese, separadas por espaçadores de 0,8 mm e fixadas com grampos metálicos. Uma solução gel de acrilamida a 7%, antes da polimerização, era despejada, colocando-se um pente na porção superior e aguardando-se a polimerização do gel. Em cada dos “pocinhos” formados no gel adicionav-se 10 µl de

cada amostra amplificada acrescida de 5 µl dos corantes xileno cianol e azul de bromofenol. No 1º e no último “pocinho” de cada gel era colocado o marcador de peso molecular de 100 pb. Em todos os experimentos foram amplificados um controle positivo de DNA *M. leprae* (DNA purificado a partir de *M. Leprae* extraídos do fígado de tatus fornecido pela FioCruz) e um controle negativo que correspondia a DNA extraído de biópsias de nervo de neuropatia não hansêncas. Fazia-se uma corrida eletroforética vertical de gel em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 5x, com uma fonte ligada a 200 V (Aparato de eletroforese da Gibco BRL) por aproximadamente, duas horas, ou seja, até que a solução corada atingisse a parte inferior da placa, quando era retirada para coloração.

4.2.10- Colaração e fixação

A placa de gel era lavada com ácido nítrico (HN03) a 1% por 3 minutos, seguido de duas lavagens rápidas com água destilada. O gel era coberto com solução de nitrato de prata (AgN03) por 30 minutos. Após retirada a solução de nitrato de prata, a placa era novamente lavada duas vezes com água destilada e adicionados 50 ml de bicarbonato de sódio (Na2C03) e 1/3 (60 ml) de solução preparada de formaldeído. Após o escurecimento dessa solução, adicionavam-se os 2/3 restantes (120 ml). Após o aparecimento das bandas no gel, a solução era retirada e a placa de gel lavada por duas vezes com água destilada. Esta coloração era fixada com uma solução de ácido acético a 10% por 5 min, seguida de lavagem com água destilada por duas vezes. A placa de gel corada e fixada era colocada entre duas folhas de transparência com as laterais vedadas com uma fita adesiva.

Desse modo, podia-se fazer a visualização no gel das bandas que correspondiam a fragmentos de DNA de *M. leprae* de 372 pb. (Figura 22).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

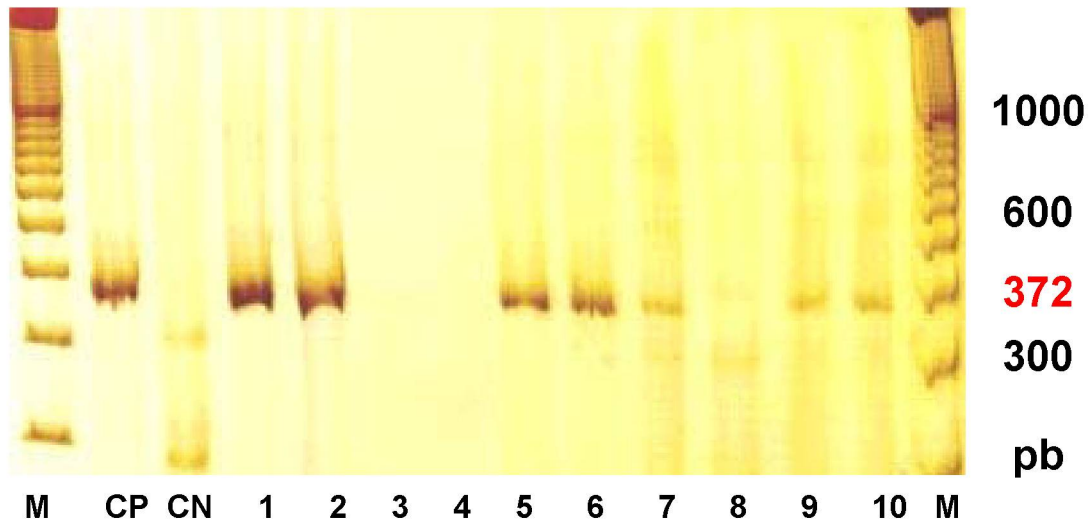


Fig 22: Placa de gel de poliacrilamida corada com prata e visualização das bandas que correspondem a fragmentos de DNA de *M. leprae* com 372 pb. (M = Marcador; CP = Controle positivo; CN = Controle negativo; pb = Pares de bases; 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 = Pacientes 57, 37, 13, 22, 10, 16, 25, 27, 35, 40, respectivamente).

4.3 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Foram realizados testes estatísticos para avaliar a sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase na hanseníase neural pura

Foi definido como SENSIBILIDADE a proporção de indivíduos com a doença que tem um teste positivo. A caracterização de ESPECIFICIDADE foi baseada na proporção dos indivíduos sem a doença que tem um teste negativo. Em

suma, a *Sensibilidade* de um teste é a ausência de resultados falsos negativos e a *Especificidade* é a ausência de falsos positivos (MOTTA & WAGNER, 2003)

A fórmula utilizada para o cálculo da sensibilidade foi:

Sensibilidade = número de doentes com teste positivo (a) divididos pela soma dos doentes com teste positivo (a) e doentes com o teste negativo (b)

$$Se = \frac{a}{a + b} \times 100$$

Para o cálculo da especificidade, a fórmula é a seguinte:

Especificidade = número de indivíduos sem doença e com teste negativo (c) divididos pela soma dos indivíduos sem doença com teste positivo (d) mais os indivíduos sem doença e com teste negativo.

$$Es = \frac{c}{c + d} \times 100$$

Os dados estatísticos obtidos nesse estudo foram apresentados dentro de tabelas e gráficos, recorrendo-se a análise descritiva e comparativa utilizando-se de testes não paramétricos como o qui-quadrado para amostras independentes.

O nível de significância adotado foi igual ou menor do que 5% (0,05).

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Os resultados da histopatologia e da reação em cadeia da polimerase dos nervos de cada paciente estão na Tabela 9.

Os 40 doentes com forma BT apresentavam índice baciloscópio (IB) = 0 ou inferior a 3, sendo 19 casos IB = 0 (47,5%); 7 casos IB = 1 (17,5%); 10 casos IB = 2 (25,0%) e 4 casos IB = 3 (10,0%). Nesse grupo três pacientes (casos 37, 47 e 54) apresentavam mononeuropatia sensitivo-motora múltipla, cujas biópsias do nervo sural apresentaram alterações inflamatórias inespecíficas no paciente 37 e presença de granuloma pouco definido nos outros dois (casos 47 e 54). Os três pacientes apresentaram Índice baciloscópio (IB=3), células de Virchow na histopatologia e PCR positiva.

Dois exames histopatológicos (casos 7 e 8), considerados normais e classificados clinicamente como formas BT, e apresentam PCR positivas.

Os dados histopatológicos mais freqüentes foram granuloma com necrose caseosa e fibrose na forma TT, e granuloma pouco definido com fibrose e presença de BAAR na BT. Nos dados encontrados, a presença do granuloma com necrose caseosa ($p = 0,003$) e granuloma pouco definido ($p = 0,011$) têm significância estatística na relação com as formas clínicas da doença (Tabela 10).

O BAAR foi positivo em 34.5% do total de 58 casos de hanseníase neural pura, e somente nos doentes BT, nenhum TT. Foi encontrada relação estatística significativa entre a positividade do BAAR nos nervos e as formas clínicas da doença ($p = 0,001$) (Tabela 11).

**TABELA 9 - RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS E DA PCR
NA HANSENÍASE NEURAL PURA**

| Caso | Forma | Granuloma com necrose caseosa | Granuloma pouco definido | Fibrose | Inespecífico | BAAR | IB | PCR |
|------|-------|--|--------------------------------|---------|--------------|------|----|-----|
| 1 | BT | + | - | - | - | + | 1 | + |
| 2 | BT | + | - | - | - | - | 0 | + |
| 3 | BT | - | + | - | - | - | 0 | + |
| 4 | BT | - | + | + | - | + | 1 | + |
| 5 | BT | - | + | - | - | + | 2 | + |
| 6 | BT | - | + | - | - | + | 1 | - |
| 7 | BT | - | - | - | - | - | 0 | + |
| 8 | BT | - | - | - | - | - | 0 | + |
| 9 | BT | - | + | - | - | - | 0 | + |
| 10 | BT | - | - | - | - | + | 2 | + |
| 11 | BT | - | - | + | - | + | 2 | - |
| 12 | BT | - | + | - | - | + | 1 | + |
| 13 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 14 | BT | + | - | - | - | + | 2 | + |
| 15 | BT | + | - | + | - | - | 0 | + |
| 16 | BT | - | - | + | - | + | 2 | + |
| 17 | BT | - | - | + | + | - | 0 | + |
| 18 | BT | - | + | - | - | - | 0 | + |
| 19 | TT | + | - | + | - | - | 0 | - |
| 20 | BT | - | - | - | + | - | 0 | - |
| 21 | BT | - | - | + | - | - | 0 | - |
| 22 | TT | - | + | - | - | - | 0 | - |
| 23 | BT | - | + | - | - | + | 1 | + |
| 24 | BT | - | + | - | - | + | 2 | + |
| 25 | BT | - | + | - | - | + | 2 | + |
| 26 | BT | - | - | - | + | + | 1 | + |
| 27 | BT | - | + | - | - | + | 2 | - |
| 28 | TT | - | - | + | - | - | 0 | - |
| 29 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 30 | BT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 31 | BT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 32 | BT | - | + | - | - | - | 0 | - |
| 33 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 34 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 35 | BT | - | - | + | - | - | 0 | + |
| 36 | BT | - | + | - | - | - | 0 | - |
| 37 | BT | - | - | - | + | + | 3 | + |
| 38 | BT | - | + | - | - | + | 2 | - |
| 39 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 40 | TT | + | - | - | - | - | 0 | + |
| 41 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 42 | TT | - | - | + | + | - | 0 | - |
| 43 | TT | - | - | - | + | - | 0 | - |
| 44 | BT | - | - | - | + | - | 0 | + |
| 45 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 46 | BT | - | + | - | - | + | 2 | - |
| 47 | BT | - | + | - | - | + | 3 | + |
| 48 | BT | - | + | - | - | + | 3 | + |
| 49 | TT | - | - | + | - | - | 0 | + |
| 50 | BT | - | - | + | - | - | 0 | + |
| 51 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 52 | BT | - | + | - | - | - | 0 | - |
| 53 | TT | - | - | + | - | - | 0 | - |
| 54 | BT | - | + | - | - | + | 3 | + |
| 55 | BT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 56 | TT | + | - | - | - | - | 0 | - |
| 57 | TT | - | + | - | - | - | 0 | - |
| 58 | BT | - | + | - | - | + | 1 | + |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide; BAAR = Bacilo álcool-ácido-resistente; IB = Índice bacilos cópico; PCR = Reação em cadeia da polimerase; + = Positivo; - = Ausência.

TABELA 10 : DADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS NERVOS NA HANSENÍASE NEURAL PURA POR FORMAS CLÍNICAS*

| | FORMAS CLÍNICAS | | | | χ^{2**} |
|-------------------------------|-----------------|------|--------|------|--------------|
| | BT | | TT | | |
| | Número | % | Número | % | |
| | 40 | | 18 | | |
| Granuloma com Necrose caseosa | 7 | 17,5 | 11 | 61,1 | 0,003 |
| Granuloma pouco definido | 20 | 50,0 | 2 | 11,1 | 0,011 |
| Fibrose | 8 | 20,0 | 5 | 27,7 | 0,363 |
| Inespecífico*** | 4 | 12,5 | 3 | 11,1 | 0,374 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide

* Alguns doentes apresentaram mais de uma alteração histopatológica

** χ^2 Qui-quadrado com correção de Yates < 0,05.

*** Alterações inespecíficas caracterizadas por um infiltrado linfo-mononuclear difuso, sem a presença de granuloma e/ou BAAR.

TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DO BAAR NOS NERVOS NA HANSENÍASE NEURAL PURA POR FORMAS CLÍNICAS

| | | FORMAS CLÍNICAS | | |
|-------|----------|-----------------|----|-------|
| | | BT | TT | Total |
| BAAR | Negativo | 20 | 18 | 38 |
| | Positivo | 20 | 0 | 20 |
| Total | | 40 | 18 | 58 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide; BAAR = Bacilo álcool ácido resistente

$\chi^2 = 11,613$; $p = 0,001$

A PCR foi positivo em 50.0% do total dos pacientes, sendo 67,5% na forma BT e 11,1% na TT com nítida significância estatística entre o teste e as formas clínicas da doença ($p < 0,001$) (Tabela 12).

TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR (*M. LEPRAE*) NOS NERVOS NA HANSENÍASE NEURAL PURA POR FORMAS CLÍNICAS

| | | FORMAS CLÍNICAS | | |
|-------|----------|-----------------|----|-------|
| | | BT | TT | Total |
| PCR | Negativo | 13 | 16 | 29 |
| | Positivo | 27 | 2 | 29 |
| Total | | 40 | 18 | 58 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide; PCR = Reação em cadeia da polimerase
 $\chi^2 = 13,614$; $p = 0,001$

A PCR foi positiva em 14 (36,8%) dos 38 casos com BAAR negativo, dos quais 12 (31,6%) eram da forma BT e 2 (5,2%) da forma TT. Foram encontrados 5 casos (25,0%) BAAR positivo e PCR negativa, mas foi estatisticamente significativa a relação entre PCR e BAAR ($p = 0,013$) (Tabela 13).

TABELA 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR (*M. LEPRAE*) E BAAR NOS NERVOS NA HANSENÍASE NEURAL PURA

| | | PCR | | |
|-------|----------|----------|----------|-------|
| | | Negativa | Positiva | Total |
| BAAR | Negativo | 24 | 14 | 38 |
| | Positivo | 5 | 15 | 20 |
| Total | | 29 | 29 | 58 |

PCR = Reação em cadeia da polimerase; BAAR = Bacilo álcool ácido resistente
 $\chi^2 = 6,182$; $P = 0,013$

Os pacientes tiveram um tempo de evolução da doença até o diagnóstico de 28,3 meses na forma clínica BT e 24,3 meses na TT. Considerando esse tempo dividimos o tempo de evolução da doença até 24 meses e com período superior a

esse tempo. Com tempo inferior a 24 meses, inclusive, foram 44 casos (75,9%) divididos nas formas clínicas BT, 29 (65,9%) e TT, 15 (34,1%). Com um período superior a 24 meses, 14 (24,1%) casos (BT, 11 (78,6%) e TT, 3 (21,4%). Não foram significantes as relações estatísticas entre tempo de doença e formas clínicas ($p = 0,575$) (Tabela 14).

TABELA 14: PACIENTES COM HANSENÍASE NEURAL PURA DISTRIBUÍDOS SEGUNDO FORMA CLÍNICA E TEMPO DE DOENÇA ATÉ O DIAGNÓSTICO

| Tempo de doença (meses) | FORMAS CLÍNICAS | | |
|----------------------------|-----------------|----|-------|
| | BT | TT | Total |
| < 24 | 29 | 15 | 44 |
| > 24 | 11 | 3 | 14 |
| Total | 40 | 18 | 58 |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide

$\chi^2 = 0,314$; $p = 0.575$

Nos primeiros 24 meses de doença (n=44 casos; BT, 29 e TT, 15), os principais achados histopatológicos foram o granuloma com necrose caseosa na forma TT, a presença do BAAR e granuloma pouco definido na forma BT. A positividade da PCR foi encontrada em toda evolução da doença na forma BT e na TT apenas nos primeiros 24 meses. Observa-se nítida significância estatística quanto a uma maior presença do BAAR nos primeiros 24 meses da doença. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os diversos achados histopatológicos e a PCR em relação ao tempo de doença sem diagnóstico. A positividade do BAAR é significativa, do ponto de vista estatístico nos primeiros 24 meses (Tabela 15).

TABELA 15- PRINCIPAIS DADOS HISTOPATOLÓGICOS, BAAR E DAPCR (*M LEPRAE*) NAS FORMAS TUBERCULÓIDE E BORDERLINE-TUBERCULÓIDE DA HANSENÍASE NEURAL PURA POR TEMPO DE DOENÇA

| DADOS HISTOPATOLÓGICOS, BAAR E DA PCR | TUBERCULÓIDE | | Significância (<i>p</i>) | BORDERLINE- TUBERCULÓIDE | | Significância (<i>p</i>) |
|---|--------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|----------|-------------------------------|
| | < 24 meses | > 24 meses | | < 24 meses | > 24 | |
| | Nº Casos | Nº Casos | | Nº Casos | Nº Casos | |
| Granuloma com necrose caseosa | 11 | 1 | 0,347 | 4 | 3 | 0,592 |
| Granuloma pouco definido | 2 | 0 | 0,084 | 15 | 6 | 0,484 |
| Fibrose | 3 | 1 | 0,347 | 4 | 4 | 0,250 |
| Inespecíficos | 2 | 0 | 1,000 | 3 | 3 | 0,894 |
| BAAR positivo | 0 | 0 | - | 18 | 2 | 0,034 |
| PCR (<i>M. leprae</i>) | 2 | 0 | 1,000 | 20 | 7 | 1,000 |

PCR = Reação em cadeia da polimerase; BAAR = Bacilo álcool ácido resistente; Nº = Número de casos

Os sinais cardinais como espessamento neural com alterações sensitivas e positividade do BAAR no nervo puderam ser relacionados com os achados histopatológicos, BAAR e PCR positivos. O espessamento de nervos com alterações sensitivas foi encontrado em 87.7% dos casos, sendo 87.5% BT e 88.8% TT. Não foram estatisticamente significantes as relações entre os achados clínicos, histopatológicos e PCR, exceto para o espessamento neural e a presença de granuloma pouco definido. ($p = 0,047$).

Nos pacientes com diagnóstico de neuropatias não hansênicas estudados os diagnósticos clínico, o eletrofisiológico e os histopatológicos foram assim

distribuídos: vasculite, 8 (38,1%); neuropatia sensitivo-motora hereditária, 7 (33.3%); amiloidose, 3 (14.3%); panarterite nodosa, 2 (9.5%); distrofia neuroaxonal, 1 (4.8%); vasculite, 1 (4.8%). Todos os doentes apresentaram alterações sensitivas no exame clínico e eletrofisiológico. O espessamento neural evidente foi encontrado em 4 (19.0%) doentes, sendo 3 (14.3%) com neuropatia sensitivo-motora hereditária e 1 (4.8%) com amiloidose. Todas as biópsias foram do nervo sural. Em nenhum dos doentes foram encontrados granuloma com necrose caseosa, granuloma pouco definidos, fibrose de nervo, alterações inespecíficas ou, positividade na pesquisa do BAAR e PCR (Tabela 16).

Os testes de sensibilidade e especificidade dos sinais cardinais clínicos da neurite hansênica pura (alterações sensitivas, espessamento neural e presença do BAAR), dados histopatológicos e da PCR foram variáveis.

O teste de sensibilidade apresentou alto percentual no espessamento do nervo nas formas TT da hanseníase. O granuloma com necrose caseosa e presença do BAAR foi de médio percentual na forma BT. O valor do teste da PCR foi elevado na forma BT . O valor do teste da PCR foi elevado na forma BT e baixo na TT (Tabela 17).

TABELA 16 RELAÇÃO DOS DADOS GERAIS, HISTOPATOLÓGICOS, BAAR E DA PCR NOS PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE NEUROPATIAS NÃO HANSÊNICAS

| Caso | Sexo | Idade | Nº Biópsia | Diagnóstico | Alterações sensitivas | Espessamento nervos | Biópsia Nervo | Granuloma com Necrose caseosa | Granuloma pouco definido | Fibrose | Inespecífico | BAAR presente | PCR positivo |
|------|------|-------|------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|--------------------------|---------|--------------|---------------|--------------|
| 01 | F | 13 | 3355 | NSMH | + | + | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 02 | M | 35 | 2145 | NSMH | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 03 | M | 30 | 3375 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 04 | M | 38 | 1738 | NSMH | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 05 | M | 56 | 1792 | Amiloidose | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 06 | M | 26 | 3424 | Distrofia neuroaxal | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 07 | F | 59 | 3113 | Panarterite nodosa | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 08 | M | 60 | 3122 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 09 | F | 32 | 2985 | Vasculite - LES | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 10 | M | 30 | 3402 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 11 | F | 61 | 3405 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 12 | M | 30 | 3437 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 13 | M | 57 | 3499 | NSMH | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 14 | F | 10 | 2372 | NSMH | + | + | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 15 | F | 41 | 2418 | Panarterite nodosa | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 16 | F | 45 | 3495 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 17 | F | 18 | 3384 | NSMH | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 18 | F | 46 | 3391 | NSMH | + | + | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 19 | M | 20 | 1897 | Vasculite | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 20 | F | 14 | 1448 | Amiloidose | + | - | Sural | - | - | - | - | - | - |
| 21 | M | 30 | 2196 | Amiloidose | + | + | Sural | - | - | - | - | - | - |

F = Feminino; M = Masculino; NSMH = Neuropatia sensitivo-motora hereditária; LES = Lupus eritematoso sistêmico; PCR = Reação em cadeia da polimerase; BAAR = Bacilo álcool-ácido-resistente; + = Presença; - = Ausente.

TABELA 17 – CÁLCULO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS DADOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E DA PCR NA HANSENÍASE NEURAL PURA

| Dados clínicos, histopatológicos e da PCR | | Hanseníase neural pura N=58 | Outras neuropatias (N=21) | Sensibilidade % | Especificidade % |
|---|-------|--------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|
| Espessamento e Alterações sensitivas | Total | 50 | 4 | 86,2 | 80,9 |
| | TT | 16 | | 88,8 | |
| | BT | 34 | | 85,0 | |
| Granuloma com Necrose | Total | 18 | 0 | 31,0 | 100 |
| | TT | 11 | | 61,1 | |
| | BT | 7 | | 17,5 | |
| Granuloma pouco indefinido | Total | 22 | 0 | 37,9 | 100 |
| | TT | 2 | | 11,1 | |
| | BT | 20 | | 50,0 | |
| Fibrose | Total | 12 | 0 | 20,6 | 100 |
| | TT | 4 | | 22,2 | |
| | BT | 8 | | 20,0 | |
| Inespecíficos | Total | 8 | 0 | 13,7 | 100 |
| | TT | 2 | | 11,1 | |
| | BT | 6 | | 15,0 | |
| BAAR | Total | 20 | 0 | 34,5 | 100 |
| | TT | 0 | | 0 | |
| | BT | 20 | | 50,0 | |
| PCR (M. leprae) | Total | 29 | 0 | 50,0 | 100 |
| | TT | 2 | | 11,1 | |
| | BT | 27 | | 67,5 | |

BT = Borderline-tuberculóide; TT = Tuberculóide; N^o = Número; % = Percentuais; BAAR = Bacilo álcool-ácido resistente; PCR = Reação em cadeia da polimerase

DISCUSSÃO

6 – DISCUSSÃO

6.1-Generalidades

O diagnóstico da hanseníase neural pura é difícil. Contribui para tal o desconhecimento dos sinais e sintomas precoces decorrentes do comprometimento do sistema nervoso periférico, pois a maioria dos profissionais não atentam para o fato da hanseníase ser uma doença primariamente neurológica. Somam-se a isso o fato de que hanseníase neural pura nem existe nas classificações utilizadas habitualmente e as dificuldades para realizar exames como eletroneuromiografia, biópsia de nervo ou mesmo técnicas como a PCR que podem auxiliar na investigação da doença. Do ponto de vista clínico, o diagnóstico da hanseníase neural pura depende do espessamento e déficit neural sensitivo e/ou motor, nem sempre convincentes.

6.2-Histopatologia e o diagnóstico

A presença do BAAR foi encontrada em mais de 1/3 do total dos casos estudados ou seja, com diferente cargas bacilares, na metade dos pacientes BT, e nenhum TT. Apresentaram células de Virchow três doentes, apesar do diagnóstico de forma BT. Do ponto de vista da classificação de Ridley & Jopling, dois desses pacientes seriam HBB ou HBL. Portanto, pode-se observar que há uma discrepância entre a classificação clínica e histopatológica dos doentes, mesmo nas apresentações de hanseníase neural pura.

Os critérios usados para a classificação atual da hanseníase, tendo por base as lesões de pele, não refletem as lesões de nervo [NILSEN et al., 1989; ANTIA & PANDYA, 1970; SRINIVASAN et al., 1982].

Um estudo na Etiópia, 8 pacientes, cujo diagnóstico foi de hanseníase através de biópsia de pele e nervo, constatou três padrões histopatológicos em 44 casos (55,5%): diagnóstico confirmado na pele e nervo, 28 casos (64,0%); negativo na pele e positivo no nervo, 14 casos (32,0%) e negativos em ambos, 2 casos (4,5%). Foi definido nesse estudo que as biópsias de pele seriam classificadas histologicamente de acordo com Ridley & Jopling (1966) e as biópsias de nervo com $IB \geq 2$ como multibacilares e $IB \leq 1$ paucibacilares. Dentre 11 doentes (25,0%) com diagnóstico de hanseníase multibacilar em nervo ou pele, havia 8 doentes (73,0%) com hanseníase multibacilar no nervo e paucibacilar na pele, enquanto em apenas 3 (27,2%) foram coincidentes as quantidades de bacilo em pele e nervos [NILSEN et al., 1989]. Contudo, autores descrevem pacientes com hanseníase, tendo altas cargas bacilares ($IB \geq 2$) nos nervos sem correspondência com lesões dermatológicas [ANTIA et al., 1970; ANTIA & PANDYA, 1976; SRINIVASAN et al., 1982; FLEURY, 1995; NEGESSE, 1988].

No presente estudo, do ponto de vista clínico, 10% dos pacientes classificados como BT seriam BB ou BL ou seja, multibacilares com tendência ao pólo llepromatoso da doença. Estes dados não diferem daqueles encontrados na literatura consultada [RIDLEY & JOPLING, 1966; NILSEN et al., 1989; ANTIA et al., 1970; ANTIA & PANDYA, 1976; SRINIVASAN et al., 1982; FLEURY, 1995; NEGESSE, 1988].

O estudo histopatológico da amostra do presente estudo teve como dados mais freqüentes a presença de granuloma com necrose caseosa, o granuloma pouco definido, a presença de BAAR e a fibrose neural. O granuloma com necrose caseosa foi mais encontrado nos casos TT e o granuloma pouco definido nos doentes BT. A presença de BAAR foi vista apenas nos casos BT. Portanto,

evidencia-se há uma dificuldade para classificar a doença de acordo com os dados histopatológicos e a positividade bacilar na pele e nervo.

Para Ridley e Jopling, no trabalho original da classificação imuno-histopatológica, a histologia dos nervos é essencialmente a mesma da pele, exceto a necrose caseosa que é considerada muito precoce no tecido neural, ocorrendo apenas nos grupos TT e BT [RIDLEY & JOPLING, 1966]. Nesses casos, os bacilos são mais numerosos e encontrados com mais facilidade no nervo do que no granuloma da pele. A lesão neural depende da resposta imunológica do indivíduo e, possivelmente, a hanseníase neural pura tenha relação com particularidades imunológicas [RIDLEY et al., 1994]. Um estudo de 53 biópsias de pele e nervo encontrou lesões dérmicas discretas, histologicamente definidas e classificáveis, quando ainda não existiam lesões clínicas. Esse estudo sugeriu um papel importante da biópsia de nervo na hanseníase neural pura, determinando o diagnóstico em 28,3% [CHIMELLI et al., 1997]. Uma avaliação de 77 pacientes com biópsia de nervo cutâneo na hanseníase neural pura demonstrou que quase a metade dos pacientes (49,4%) tiveram seu diagnóstico confirmado pela histopatologia [JACOB & MATHAI, 1988]. Nesse estudo todo o espectro da hanseníase estava representado, devendo ser destacado que BAAR foi encontrados nas formas TT (n=8) em 25,0% e das formas BT (n=21) em 100%. Nessa pesquisa, os pacientes de hanseníase neural pura correspondiam a 36,6% (n=30) [PANNIKAR et al., 1983].

Os resultados da amostra aqui estudada são coincidentes com outros que avaliaram somente pacientes com forma neural pura [PANNIKAR et al., 1983] ou doentes PB e MB [Shi L et al., 2000], mas são discordantes de outros estudos que incluíram tanto doentes multibacilares (HL, HBL, HBT) quanto paucibacilares (HT, Hanseníase Indeterminada) e sem diagnóstico definido [JACOB & MATHAI, 1988]. Portanto, amostras

contendo pacientes com com diferentes formas clínicas apresentaram resultados diversos daqueles que estudaram apenas a forma neural pura.

6.3-Reação em cadeia da polimerase e o diagnóstico

No presente estudo a PCR foi positiva na metade dos doentes analisados, seis vezes mais nas formas classificadas como BT. Indicativos da presença do *Mycobacterium leprae* no nervo foi ampliado de 34,5% (20 casos) na histopatologia para 58,6% (34 casos) na PCR, considerando os doentes PCR positiva pesquisa de BAAR negativo.

Na literatura, a positividade do BAAR na microscopia óptica limita-se a 10^4 bacilos/ml da amostra [SHEPARD & McRAE, 1968]. Portanto, o diagnóstico da infecção pelo *M. leprae* não é fácil. A utilização da biologia molecular, com técnicas baseadas na PCR, têm aumentado a sensibilidade e a especificidade de detecção do *M. leprae* [HARTSKEERL et al, 1989; WOODS & COLE, 1989; WILLIAMS et al, 1990; PLIKAYTIS et al, 1990; SANTOS et al., 1993; SCOLARD et al.,1998]. Atualmente, a PCR baseada em detecção de seqüências específica-repetidas no DNA do *M. leprae*, após extração e otimização do DNA em diferentes amostras (pêlo, linfa, sangue e biópsia), aliada a técnica da hibridização, pode detectar 100 ag (1 ag = 10^{-18} g) do DNA alvo, equivalente a 10% do genoma bacteriano [SANTOS et al, 1993]. Do ponto de vista prático, a PCR poderia detectar o DNA do *M. leprae* em 73% dos pacientes apresentando IB = 0 [YOON et al, 1993].

De forma geral os relatos avaliando neurite hansênica sem lesão de pele são escassos. Todavia, é imperiosa uma avaliação comparativa de estudos nas lesões neurais na hanseníase neural pura com as lesões de pele na hanseníase. Job e cols. (1997), estudaram 39 pacientes, com lesões de pele suspeitas de

hanseníase. diagnosticando do ponto de vista clínico 14 (35.8%) casos, histopatológico 26 (66.6%), sendo desses, apenas 2 (5.1%) com BAAR positivos e 11 (28,2%) com PCR positiva. Portanto, a PCR aumentou cinco a seis vezes a positividade da presença do *M. leprae* nas amostras [JOB et al., 1997b]. Isso foi confirmado por outros estudos que demonstram a alta sensibilidade e especificidade da PCR na detecção do *M. leprae* [DE WIT et al., 1991; RAFI et al., 1995; SANTOS et al., 1993; YOON et al., 1993].

Tem sido demonstrado que a positividade de detecção do *M. leprae* pela histopatologia e PCR aumenta na medida que um número maior de amostras é examinado. Isto pode ser indicativo de que o *M. leprae* esteja presente em quase todas as lesões ativas da doença, porém em número variável e disperso nos tecidos, tendo uma natureza focal nas lesões, principalmente nas formas TT e BT. Portanto, a frequência de detecção é dependente de maior número de amostras [CHEMOUILLI et al., 1996; FLEURY & ARANDA, 1995; YOON et al., 1993]. Nas formas TT, BT e HI há uma correlação inversa entre a densidade do infiltrado celular (granuloma epiteloide e infiltrado linfocitário) e amplificação positiva para a PCR. Isto pode ser indicativo da positividade da PCR, refletindo a presença de bacilos viáveis na biópsia. Uma resposta imune vigorosa pode resultar na morte do *M. leprae* com redução dos níveis de DNA bacilar [De WIT et al, 1993; NADKARNI & REGE, 1999]. Woods e Cole também sugeriram que uma amplificação positiva reflete a presença de *M. leprae* potencialmente viáveis [WOODS & COLE, 1989].

Por outro lado, a reação inflamatória celular pode secretar alguns mediadores que inibam a PCR [WILLIAMS et al, 1990; DE WIT et al, 1991]. Foi descrito que a metade dos casos de hanseníase IB negativo não tratados são PCR positivas [LUCAS & RIDLEY, 1989]. Nesses estudos não há referências sobre as formas clínicas da

hanseníase, gerando dificuldades na avaliação comparativa e na aparente discordância das informações, inclusive com a amostra em estudo.

A histopatologia não deve ser considerada um exame “padrão ouro”. É grande a proporção de exames com resultados negativos ou duvidosos, em doentes sem dúvida clínica, realizados por patologistas experientes [EBENEZER et al, 1996]. A praticabilidade e a relação custo/efetividade da biópsia e da PCR na detecção do *M. leprae* devem ser avaliadas sobre as diferentes condições laboratoriais [REPORT OF THE INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM, 2002].

Acredita-se que o tempo de duração da doença possa interferir na sensibilidade dos métodos à medida que os BAAR são destruídos pelo organismo ou mesmo após tratamento regular ou não. Uma grande dificuldade para detecção do *M. leprae* nas biópsias de nervos consiste na extração do DNA, em decorrência da extensiva fibrose nas formas pauci e alguns multibacilares [CHEMOUILLI et al., 1996].

6.4-Relação entre a histopatologia e a reação em cadeia da polimerase

Os dados histopatológicos por formas clínicas e tempo de duração da doença até o diagnóstico nos primeiros 24 meses encontraram uma significativa presença de granulomas com necrose caseosa nas formas TT e o granuloma pouco definido nos BT. É expressiva a identificação do BAAR na histopatologia e PCR, nos doentes BT. Nos TT não foram observados bacilos na histopatologia, porém a PCR foi positiva em pequeno número de casos. São importantes a presença de granuloma com necrose caseosa nos casos TT e granuloma pouco definido nos BT, bem como a positividade de bacilos na histopatologia e na PCR. Nos doentes com o

diagnóstico feito após 24 meses, a presença do granuloma pouco definido foi relevante nos doentes BT e a fibrose neural duas vezes mais do que o granuloma com necrose caseosa. O único doente TT nesse período apresentou intensa fibrose do nervo.

A positividade da PCR foi quase o dobro daquela encontrada para a pesquisa do BAAR na histopatologia do nervo nos casos BT. Nos doentes TT não foram observados BAAR positivos.

Relatos descrevem a pesquisa da PCR positiva em biópsias de pele, revelando 87.1% de doentes MB (27 de 31) e 36.4% em casos PB (8 de 22). Esses resultados caem de forma significativa quando repetidos a cada três meses, durante a poliquimioterapia [WICHITWECHKARN et al., 1995]. Na República Democrática do Congo, foram estudados 110 doentes, tendo a histopatologia confirmado a suspeita clínica de hanseníase em 31 casos (28,1%), sendo 23 (85%), MB e 8 (24%), PB. Comparando o exame histopatológico e a PCR para o *Mycobacterium leprae* foram obtidas uma sensibilidade de 51% e uma especificidade de 96% [LOSEKE et al, 2001]. Resultados semelhantes foram obtidos com a positividade do BAAR [WICHITWECHKAM et al., 1995]. Recentemente, um trabalho analisou 90 amostras de 38 pacientes com hanseníase indeterminada, após poliquimioterapia (MDT) pauci e multibacilar. A PCR para o *M. leprae* foi realizada em 18 casos (54,5%) após um período de seguimento clínico variando entre 4 a 6 anos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os MB ou PB. Nesses pacientes não existia nenhuma manifestação clínica de doença ativa. Para esses autores, os achados da PCR positiva associados ao fato de que apenas um pequeno número de indivíduos infectados desenvolvem a doença hanseníase, sugerem que a PCR deve ser correlacionada à avaliação clínica nos casos de difícil diagnóstico com as técnicas

convencionais [SANTOS et al., 2001]. Esses achados trouxeram novas informações, principalmente no que diz respeito aos casos PB, bem como observação sobre aspectos da positividade da PCR após longo período de tratamento poliquimioterápico. Esses dados não coincidem com a literatura [JAMIL et al, 1993; RAFI et al, 1995], mas também foram observados na amostra estudada em questão. Acredita-se que uma diferença na seleção, mesmo sendo feita criteriosamente, pode interferir nas análises, no que diz respeito ao tempo de doença sem diagnóstico, às formas clínicas, possibilidades de tratamento paucibacilares em pacientes multibacilares, persistência bacilar e reinfecção. Deve ser destacado ainda, que a PCR positiva é indicativo da presença do DNA do bacilo, não indicando que o *M. leprae* ainda esteja vivo [CHERMOUILLI et al, 1996; De WIT et al, 1991; IZUMI, 1999]. Nesse aspecto, pode-se pensar que a resposta imunológica dentro do espectro da doença deva ser considerada, principalmente na forma neural pura, com particularidades que ainda não foram conhecidas na sua totalidade.

A sensibilidade e a especificidade dos sinais cardinais clínicos da neurite hansênica pura (alterações sensitivas, espessamento neural presença do BAAR), dos achados histopatológicos e da PCR, têm sido descritos na literatura [GROENEN et al., 1995; SAUNDERSON & GROENEN, 2000; PONNIGHAUS et al., 1987; CROFT et al, 1998; LeMASTER et al., 1995]. Quaisquer desses sinais isolados são insuficientes como teste para diagnóstico. Poucos estudos contêm dados suficientes para permitir os cálculos necessários para esses testes.

No trabalho de Saunderson & Groenen (2000), os três sinais cardinais foram pesquisados em doentes na Etiópia. A sensibilidade foi de 97%, mas a especificidade não foi determinada. A pesquisa do BAAR no esfregaço de pele não aumentou a sensibilidade do diagnóstico, porque o diagnóstico clínico emprega dois sinais na hanseníase (lesão de pele anestésica e espessamento neural). A avaliação

da especificidade é limitada pela necessidade de informações detalhadas nos indivíduos que não têm a doença. Isto dificulta a determinação da especificidade dos testes diagnósticos na hanseníase [SAUDERSON & GROENEN, 2000; SAUDERSON et al., 2000^a].

Ponnighäus et al. (1987), na Malásia, estudaram a hanseníase paucibacilar e defenderam a alta especificidade dos sinais cardinais quando usados corretamente. O estudo sugeriu que o diagnóstico é facilitado se quaisquer dos sinais forem encontrados.

No caso da hanseníase neural pura, a ausência de lesão de pele com aspecto típico não é incomum. O espessamento evidente de nervo exige investigação complementar com métodos pouco usuais, como biópsia de nervo. O nervo biopsiado pode ser utilizado para diferentes estudos, como histopatologia, imunohistoquímica, cultura do *M. leprae* no coxim plantar de camundongo, sorologia e PCR [CHEMOUILLI et al., 1996; CHIMELLI et al., 1997].

O estudo histopatológico não pode ser considerado como “padrão ouro”. Leva-se em conta que uma grande proporção de casos clinicamente sem dúvidas, tem aspecto histológico negativo ou duvidoso, mesmo em mãos de profissionais experientes. É uma boa prática a associação de dados clínicos e histopatológicos. A especificidade da histopatologia é alta, apesar das dificuldades de distinguir entre os casos de reincidência e reacionais nos doentes tratados [BECX-BLEUMINK, 1992].

Os testes de biologia molecular pela PCR são altamente sensíveis e específicos, mas existem grandes possibilidades de falsos negativos [KURABACHEW et al., 1998].

Na amostra estudada, os cálculos de especificidade e valor preditivo foram prejudicados, considerando um viés de amostra nos grupos selecionados e no controle. Na seleção dos doentes, os pacientes foram estudados já com o

diagnóstico clínico definido. Os pacientes do grupo controle (n=21 casos) com diagnóstico de outras neuropatias também já tinham padrão histopatológico com aspecto diagnóstico pré-definido e aspectos específicos nas neuropatias estudadas.

A sensibilidade do espessamento neural de 86,2% no total da amostra estudada foi semelhante aos estudos de Groenen et al (1995), (PB, 86,0% e MB, 96,0%); Sauderson & Groenen (2000) (PB, 76,0% e MB, 91,0%) [GROENEN et al., 1995; SAUDERSON & GROENEN, 2000]

A sensibilidade da positividade do BAAR encontrada foi menor no total dos casos e predominou nos doentes BT. Estudos referem uma variação de 36,0% a 45,0% nos esfregaços de pele, cujos resultados não foram significativamente diferentes nas pesquisas histopatológicas dos nervos dos pacientes estudados na amostra [GROENEN et al, 1995; SAUDERSON & GROENEN, 2000]

6.5-Comentários finais

Para os diversos dados histopatológicos nos nervos da amostra avaliada observou-se uma maior e nítida sensibilidade para a presença de granuloma com necrose caseosa nos casos TT e a presença do granuloma pouco definido na metade dos casos BT. Os demais achados não foram relevantes.

A PCR apresentou uma sensibilidade elevada nos casos BT e baixa nos TT. Quando comparada com a sensibilidade diagnóstica do granuloma com necrose caseosa nos casos TT é baixa, sendo média nos casos BT com granuloma pouco definido.

A PCR é importante para a hanseníase neural pura porque aumenta a sensibilidade em relação a presença do *M. leprae* na histopatologia convencional nas formas BT, auxiliando no diagnóstico de certeza das formas paucibacilares em menores percentuais. Com uma padronização da técnica como rotina em centros de

referência e o aprimoramento desse método altamente específico, a sensibilidade tenderá a aumentar. Sem dúvida, a PCR é uma técnica recente, mas promissora como recurso a ser utilizado pelos hansenologistas em muitos casos que ficariam sem diagnóstico. Uma otimização da técnica com redução de custos pode ser viável em laboratórios de referência para diagnóstico. A associação dos aspectos clínicos à biópsia e à PCR pode ter efetiva resolatividade nos casos de difícil diagnóstico

[REPORT OF THE INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM, 2002].

É uma boa prática sistematizar a investigação dos casos de hanseníase neural pura que podem ser classificados, TT ou paucibacilar (envolvimento de apenas um tronco nervoso) e BT ou multibacilar (envolvimento de dois ou mais troncos nervosos). Todos os pacientes deverão ser submetidos à investigação na ausência da ausência de lesão de pele, exame dermatoneurológico, pesquisa do BAAR nos locais de rotina e em até cinco pontos em torno da área de déficit sensitivo com ou sem espessamento de nervo, eletroneuromiografia, biópsia de nervo com histopatologia pelas colorações de rotina e pesquisa de BAAR. A neurite hanseníase está associada a um infiltrado linfo-histiocitário com variada carga bacilar, podendo ser classificada como paucibacilares $IB \leq 1$ e multibacilar $IB \geq 2$ [NEGESSE, 1988]. Caso a histopatologia não esclareça o diagnóstico deve ser feita a PCR. Após essa investigação rever o diagnóstico TT (paucibacilar), com sugestão de tratamento com 6 doses de poliquimioterapia. Nos casos BT (multibacilar), estender para o espectro com tendência lepromatosa BT, BB e BL, tratamento com 12 doses de poliquimioterapia. Não deve ser esquecido que a lesão de nervo na hanseníase pode ser apenas uma manifestação inicial de uma doença na qual as lesões de pele aparecerão futuramente. Um estudo com 17 pacientes, após dois anos de

seguimento, foram encontradas lesões de pele [PANNIKAR, et al, 1983; UPLEKAR & ANTIA, 1986; GIDHAR, 1996].

A PCR não deve ser considerada um teste diagnóstico isolado porque sua positividade pode não representar hanseníase como doença ativa, mas apenas infecção hansênica. Portanto, se faz necessário a correlação clínica e com outros métodos diagnósticos.

CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

A-Confirmatórias:

1- A positividade da reação em cadeia da polimerase para segmentos do DNA do *Mycobacterium leprae* é indicativo de sua presença no nervo.

2- A positividade do *Mycobacterium leprae* na histopatologia e na reação em cadeia da polimerase é destacada em todo o curso evolutivo da doença nos pacientes borderline-tuberculóide

3- Nos doentes tuberculóide polar são obtidos baixos percentuais de positividade, na histopatologia e na reação em cadeia da polimerase, logo nos primeiros 24 meses.

B-Originais:

1- Os pacientes suspeitos de hanseníase neural pura com pesquisa de *Mycobacterium leprae* negativo na histopatologia têm indicação de fazer a pesquisa do DNA para o *Mycobacterium leprae* através da reação em cadeia da polimerase

2- A reação em cadeia da polimerase é um método útil para detectar o *Mycobacterium leprae* no nervo com histopatologia negativa na hanseníase neural pura.

3- A reação da polimerase em cadeia tem sensibilidade média e alta especificidade na hanseníase neural pura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahm S, Mozhi NM, Joseph GA, Kurian N, Rao PSSS, Job CK. Epidemiological significance of first skin lesion in leprosy. *Int J Lepr* 1998; 131-139.
- Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinated polyneuropathy (CIDP). *Neurology* 1991; 41:617-618.
- Agis F, Schlich P, Cartel J-L, Guidi C, Bach M-A. Use of anti-*M. leprae* phenolic glycolipid-1 antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. *Int J Lepr* 1988; 56:S27-S36
- Antia NH, Pandya NJ. Quantitative histology and quantitative bacteriology in various tissues of 50 leprosy patients. *Lepr Rev* 1976; 47:175-183.
- Antia NH, Pandya SS, Dastur DK. Nerves in the arm in leprosy. Clinical, electrodiagnostic and operative aspects. *Int J Lepr* 1970; 38:12-28.
- Azulay RD. Imunologia (Parte I). In: Talhari S & Neves RG. Hanseníase. 3a. ed. Manaus: Funcomiz; 1997, p.93-96.
- Baccarelli R. Avaliação motora na neuropatia. IN Duerksen F, Virmond M. Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 1997; p.85-92.
- Baumgart KW, Britton WJ, Mullins RJ, Basten A, Barnetson RS. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae*-a problem for leprosy control strategies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:412-415.
- Bechelli LM, Haddad N, Pagnano PMG, Neves RG, Melchior R Jr, Fregnan RC. Double blind trials to determine the late reactivity of leprosy patients and unaffected persons to different concentration of armadillo lepromin in comparison to human lepromin. *Int J Lepr* 1980; 48:126-134.
- Becx-Bleumink. Relapses among leprosy patients treated with multidrug therapy: experience in the leprosy control program of the all Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) In Ethiopia: practical difficulties with diagnosing relapses; operational procedures and criteria for diagnosing relapses. *Int J Lepr* 1992; 60:421-435.
- Beiguelman B. Genética e hanseníase. *Ciênc Saúde Coletiva*, 2002; 7:117-128.
- Birdi TJ, Antia NH. The macrophage in leprosy: a review on the current status. *Int J Lepr* 1989; 57: 511-525.

- Birke JA, Brandsma JW, Schreuders TAR, Piefer A. Sensory testing with monofilaments in Hansen's Disease and normal control subjects. *Int J Lepr* 2000; 68:291-298.
- Blackwell JM. Modern genetics and leprosy susceptibility. *Lepr Rev* 2001; 72:352-356.
- Brandsma JW, Macdonald MRC, Warren AG, Cross H, Schwarz RJ, Solomon S, Kazen R, Gravem PE, Shrinivasan H. Reports from the workshop on the neurologically impaired foot: 5-9 June 2000, Green Pastures Hospital, Pokhara, Nepal. *Lepr Rev* 2001; 72:254-262.
- Brandsma JW. Monitoring motor nerve function in leprosy patients. *Lepr Rev* 2000; 71:258-267.
- Brasil Ministério da Saúde – Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Hanseníase: atividades de controle e manual de procedimentos. Brasília – Distrito Federal: Ministério da Saúde; 2001.
- Brasil Ministério da Saúde. Portaria nº 814, de 26 de julho de 2000. *Diário Oficial*. 2000; 144-E:26-30.
- Brasil MTLRF, Oliveira LR, Melo CS, Nakamura PM, Rimoli NS, Cavalari F. S, Oliveira MB, Gattás VL, Gonçalves OSJ, Rotta. Aplicação do Teste Elisa anti-PGL-1 em localidade com alta endemicidade de hanseníase, na região norte do estado de São Paulo. *Hans Int* 1998; 23:35-48.
- Brasil Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Boletim Epidemiológico Operacional da Hanseníase. Fortaleza: Secretaria da Saúde do Ceará 2002; V2 nº 2.
- Brasil-Neto JP. Electrophysiologic studies in leprosy. *Arq Neuropsiquiatr* 1992; 50:313-318.
- Brennan PJ, Vissa VD. Genomic evidence for the retention of the essential mucobacterial cell wall in the otherwise defective *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2001; 72:415-428.
- Brennan PJ. Carbohydrate containing antigens of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 1986; 57 (Suppl 2):39-51.
- Brennan PJ. The microbiology of *Mycobacterium leprae*, Part II. Reflections on major developments and those responsible for them. *Int J Lepr* 1994; 62:594-598.
- Britton WJ. Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87 (5): 508-514.
- Brown TR, Kovindha A, Wathanadilokkol U, Piefer A, Smith T, Kraft GH. Leprosy neuropathy: correlation of clinical and electrophysiological tests. *Int J Lepr*, 1996; 68:1-14.

- Browne SG. Leprosy: clinical aspects of nerve involvement. In: Topics on tropical neurology. Hornabrook RW edit. Philadelphia: FA Davies C., 1989a; p. 1-16.
- Browne SG. The history of leprosy. IN Hastings RC. Leprosy. London: Churchill Livingstone; 1989b; pp.1-14.
- Bryceson A, Pfaltzgraff RE. Leprosy. 3 th ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.
- Camargo LHS, Baccarelli R. Avaliação sensitiva na neuropatia hansênica. IN Duerksen F, Virmond M. Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 1997; p.75-83.
- Chaco J, Magora H, Landau Y. An electromyographic study of lagophtalmos in leprosy. Int J Lepr 1968; 36:288-295.
- Charosky CB, Gatti JC, Cardama JE. Neuropathies in Hansen's disease. Int J Lepr 1983;51:576-586.
- Chemouilli P, Woods S, Said G, Cole ST. Detection of Mycobacterium leprae in nerve lesions by the polymerase chain reaction. Int J lepr 1996; 64:1-5.
- Chimelli L, Freitas M, Nascimento O. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of studies in the detection of persistent bacilli. J Neurol 1997; 244: 318 – 323.
- Chimelli L, Nascimento O, Freitas MRG. Correlação clínico-patológica em 78 biópsias de nervo sural. Arq Neuro-Psiquiatr 1989; 47: 413-422.
- Cho S-N, Gormus BJ, Xu K, Bohm, Jr. RP, Walsh GP, Meyne WM, Kim J-D. Serological responses to nerve antigens in sooty mangabev monkeys with experimental leprosy. Int J Lepr 1993; 61:236-244.
- Choudhuri K. The Immunology of Leprosy: unraveling an Enigma. Int J Lepr 1995; 63: 430-447.
- Clark-Curtiss JE, Jacobs WR, Docherty MA, Ritchie LR, Curtiss RIII. Molecular anlysis of DNA and construction of genomic libraries of Mycobacterium lepra. J Bacteriol 1985; 161:1093-1102.
- Cole ST, Honore N, Eiglemeier K. Preliminary analysis of the genome sequence of Mycobacterium leprae. Lepr Rev 2000; 71(Suppl.):S162-167.
- Colston MJ, Hilson GRF. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. murinum* in congenitally athymic (nude) mice. Nature 1976; 262:399-401.
- Colston MJ. The Microbiology of *Mycobacterium leprae*: progress in the last 30 years (1962-1992). Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1993a; 87: 504-507.

- Colston MJ. The molecular biology of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 1993b; 64: 289-294.
- Cree IA, Smith WCS. Leprosy transmission and mucosal immunity: toward eradication. *Lepr Rev* 1998; 69:112-121.
- Croft RP, Smith W, Nicholls P, Richardus JH. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smears examination. *Int J Lepr* 1998; 66:445-450.
- Cunha AZS. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. *Ciênc Saúde Coletiva* 2002; 7:235-242.
- Cunha FMB. Aspectos gerais da hanseníase no município de Crato – Ceará. *Hans Int* 1985: 72 – 79.
- Cunha FMB. Forma neural pura na hanseníase. *Arq Neuropsiquiatr* 1990; 48 (Supl): 134.
- Curtiss R,III, Blower S, Cooper K, Russel D, Silverstein S, Young L. Leprosy research in the Post-Genome Era. *Int J Lepr* 2000; 68:492-503.
- Dash MS. A study of the conduction velocity of sensory fibers of the ulnar nerve in leprosy. *Int J Lepr* 1967; 38:460-469.
- Dastur DK, Antia NH, Divekar SC. The facial nerve in leprosy. 2-Pathology, pathogenesis, electromyography and clinical correlations. *Int J Lepr* 1966; 34:118-138.
- Dastur DK, Pandya SS, Antia NH. Nerves in the arm in leprosy. 2- Pathology, pathogenesis and clinical correlations. *Int J Lepr* 1970; 38:30-48.
- Dastur DK. Therapeutic implications of morphological study of nerves from treated or untreated tuberculoid or lepromatous leprosy. *Int J Lepr* 1991; 59:122-124.
- De Wit MYL, Douglas JT, Mcfadden J, Klastser PR. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microb* 1993; 31:502-506.
- De Wit MYL, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Asuwat NM, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeerl RA, Klastser PR. Application of PCR for detection of *M. leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol* 1991; 29:906-910.
- DeFaria CR, Silva IM. Electromyographic diagnosis of leprosy. *Arq Neuropsiquiatr* 1990; 48:403-413.
- Devasundaram JK. Leprosy: another possible source of transmission. *Int J Lepr* 1993; 61:296-297.
- Dhar S, Sarama VJ, Kaur S. Facial, glossopharyngeal, vagus and hypoglossal nerve palsy in a case of lepromatous leprosy. *Indian J Lepr* 1993; 65:333-336.

- Dharmendra, Ramanujam K, Ramu G. Pure polyneuritic leprosy of tuberculoid type. *Lepr India* 1966; 38:152-158.
- Dharmendra. Classification of Leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy*. Hong Kong: Churchill Livingstone; 1989, p.88-99.
- Dharmendra. Thickened nerve in diagnosis of leprosy. *Lepr India* 1980; 52:1-2.
- Dhople AM. Muscle damage in leprosy. *Int J Lepr* 1970; 38:282-285.
- Dockrell HM, Brahmabhatt S, Robertson BD, Britton S, Fruth U, Gebre N, Hunegnaw M, Hussain R, Nanadhar R, Murrillo L, Pessolani MCV, Roche P, Salgado JL, Sampaio E, Shahid F, Thole JER, Young DB. Diagnostic assays for leprosy based on T-cell epitopes. *Lepr Rev* 2000; 71 (Suppl.):S55-S59.
- Dongre VV, Ganapati R, Chulawala RG. A study of mono-neuritic lesions in a leprosy clinic. *Leprosy in India* 1976;48:132-137.
- Dorairaj A, Reddy R, Jesudasan K. An evaluation of the Semmes-Winstein 6.10 monofilament as compared with 6 nylon in leprosy patients. *Indian J Lepr* 1988; 60:413-417.
- Draper P. Structure of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 1986; 52 (Suppl 2):15-20.
- Duerksen F. Comprometimento neural em hanseníase. In: Duerksen F, Virmond M. *Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase*. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 1997; p.59-67.
- Dyck PJ, Giannini C, Lais A. Pathologic alterations of nerves. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin J, Low P, Poduslo J. editors. Philadelphia: Saunders 1993. *Peripheral neuropathy*, vol 1: p 514-595.
- Dyck PJ, Lofgren EP. Nerve biopsy: choice of nerve, method, symptoms and usefulness. *Med Clin N Amer* 1968; 52:885-889.
- Dyck PJ, O'Brien PC. Quantitative sensation testing in epidemiological and therapeutic studies of peripheral neuropathy. *Muscle Nerve* 1999; 22:659-662.
- Ebenezer GJ, Suneetha S, Mohandas, Arunthathi S. Multibacillary nerve histology in clinically diagnosed borderline tuberculoid leprosy patients. *Int J Lepr* 1996; 64:311-315.
- Ebenezer GJ; Arumugam S; Job CK. Infection by *M. leprae* is governed by the temperature at the entry point: a preliminary note. *Int J Lepr* 1999; 67: 162-164.
- Echevarría JRG, Cervera FM. Complete neurological assesment in Hansen's disease. *Lepr Rev + Fontill Rev Leprol – Special Issue* 2002; 28-39.

- Eiglmeier K, Simon S, Garnier T, Cole ST. The integrated genome map of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2001; 72:462-469.
- Engel WK & Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue: An improved trichome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963;13:919-923.
- Enna CD, Jacobson RR, Mansfield RE. An evaluation of sural nerve biopsy in leprosy. *Int J Lepr* 1970; 38:278-281.
- Facer P, Mann D, Mathur R, Pandya S, Ladiwala U, Singhal B, Hongo J-A, Sinicropi VD, Terenghi G, Anand P. Do nerve growth factor-related mechanisms contribute to loss of cutaneous nociception in leprosy. *Pain* 2000; 85:231-238.
- Feliciano KV, Kovacs MH, Alzate A. Diagnósticos precoce da hanseníase: o caso dos services de saúde no Recife (Pernambuco), Brasil. *Rev Panam Salud/Pan Am J Public Health* 1998; 4: 6-13.
- Fernández-Dominguez AP, Estrada R, Galarraga. Neuropatia leprosa: caracterización de la casuística entre 1962 y 1995. *Rev Neurol* 1999;28:232-236.
- Flanchenecker P, Janka M, Goldbrunner R, Toyka KV. Clinical outcome of sural nerve biopsy: a retrospective study. *J Neurol* 1999; 246:93-96.
- Fleury RF & Aranda CM. Detection of AFB in tuberculoid biopsies. *Int J Lepr* 1995; 63:103.
- Fleury RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling – uma análise morfológica. *Hans Int* 1989; 14: 101-106.
- Fleury RN. Patologia da neurite hansênica. In: Duerksen F, Virmond M. *Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase*. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 1997; p.69-74.
- Foss NT. Imunologia (Parte II). In: Talhari S, Neves RG. *Hanseníase*. 3^a. Ed. Manaus: Funcomiz; 1997, p.97-102.
- Freedman VH, Weinstein DE, Kaplan G. How *Mycobacterium leprae* infects peripheral nerves. *Lepr Rev* 1999; 70:136-139.
- Freitas RG, Nascimento O, Drago MJ, Freitas AR, Hahn MD. Paralisia do nervo ulnar na lepra sem alterações cutâneas: biópsia do ramo superficial do nervo ulnar na mão.. *Arq Neuropsiquiatr* 1998; 56: 585 – 594.
- Garbino JA. Eletroneuromiografia em hanseníase. In: Duerksen F, Virmond M. *Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase*. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 1997; p.93-104.

- Gelber RH, Rea TH. *Mycobacterium leprae* (Leprosy, Hansen's Disease). In Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. Eds. Principles and Practice of Infectious Disease, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2000;2608-2612.
- Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction and leprosy 1991; 59:311-316.
- Gillis TP. Potential application of molecular biology to leprosy research. Int J Lepr 1998;66:591-592.
- Girdhar BK. Neuritic leprosy. Ind J Lepr 1996;68:35-42.
- Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:365-375.
- Groenen G, Saha NG, Rashid MA, Hamid MA, Pattyn SR. Classification of leprosy cases under field conditions in Bangladesh. II Reliability of clinical criteria. Lepr Rev 1995; 66:134-143.
- Guerrero MI, Arias MT, Garcés MT. Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. Rev Panm Salud Publica/Pan Am J Publ Health 2002; 11:228-234.
- Gupta BK, Kochar DK. Study of nerve conduction velocity, somatosensory-evoked potential and late responses (H-Reflexe and F-Wave) of posterior tibial nerve in leprosy. Int J Lepr 1994; 62:586-593.
- Gupte MD. Research needs related to epidemiology and control: subclinical infection. Int J Lepr 1996; 64:S29-S37.
- Hackel C. Identificação específica do *M. leprae* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Hansen Int 1990;15:67-75.
- Hackett ER, Shiplely DE, Livengood R. Motor nerve conduction velocity studies of the ulnar nerve in patients with leprosy. Int J Lepr 1968; 36:282-287.
- Harboe M. The immunology of leprosy. In: Hastings RC. Leprosy. London: Churchill Livingstone; 1989, p.53-87.
- Hartskeerl RA, De Wit MYL, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. Journal of General Microbiology 1989;135:2357-2364.
- International Congress of Leprosy, Madrid 1953. Report of the sub-committee on classification. Int J Lepr 1953; 21:504-516.
- Izumi S. Subclinical infection by *Mycobacterium leprae*. Int J Lepr 1999; 67:S67-S71.
- Jacob M, Mathai R. Diagnóstico efficacy of cutaneous nerve biopsy in primary neuritic leprosy. Int J Lepr 1988; 56:56-60.

- Jain M, Singh N, Bhatia A, Arora VK. Histological assessment of dermal nerve damage occurring during multidrug therapy for leprosy. *Int J Lepr* 2000; 68:167-171.
- Jardim MR, Nascimento OJM, Antunes A, Santos AR, Sampaio Elizabeth P, Sarno EN. Critérios diagnósticos da forma neural pura da hanseníase. *Anais da XIII Jornada Brasileira de Doenças Neuromusculares e VI Jornada Brasileira de Neuropatias Periféricas 2002; Tema livre 5.*
- Job CK, Baskaran B, Jayakumar J, Aschhoff M. Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease. *Int J Lepr* 1997b; 65:443-449.
- Job CK, Baskaran B, Jayakumar J, Aschhoff M. Pathologic changes in a tibial nerve with surviving *M. leprae* in a healed tuberculoide leprosy patient. *Int J Lepr* 1997c; 65:90-94.
- Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr* 1997a; 65:461-464.
- Job CK. O comprometimento neural na hanseníase. *Hans Int* 1989; 14: 45-66.
- Job CK. Pathology and pathogenesis of leprosy neuritis; a preventable and treatable complication. *Int J Lepr* 2001; 69 (2 Suppl):S19-29.
- Joppling WH, McDougall AC. *Manual de hanseníase*. Rio de Janeiro: Atheneu; 1991.
- Julião OF. As manifestações neurológicas da lepra. *Rev Med* 1963; 47:63-71.
- Kaur G, Girdhar BK, Dirdhar A, Malaeiya GN, Mukherjee A, Sengupta U, Desikan KV. A clinical study of neuritic leprosy patients. *Int J Lepr* 1991; 59:385-389.
- Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr* 1971; 39:692-701.
- Klatser PR, Cho SN, Brennan PJ. The contribution of serological tests to leprosy control. *Int J Lepr* 1996; 64: S63-S67.
- Krotoski WA, Mroczkowski TF, Rea TH, Almodovar PI, Clements BC, Neimes RAE, Kahkonen MK, Job CK, Hastings RC. Lepromin skin testing in the classification of Hansen's disease in the United States. *Am J Med Sci* 1993; 305:18-24.
- Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1352-1356.
- Lechat MF. The Paleoepidemiology of Leprosy: an Overview. *Int J Lepr* 1999; 67: 460-470.

- LeMaster JW, Shwe T, Butlin CR, Roche PW. Prediction of highly skin smear positive cases among MB leprosy patients using clinical parameters. *Lepr Rev* 2000; 72:23-28.
- Lima JJA. A lepra no Brasil. *Gaz Med Bahia* 1897; 29: 263-272.
- Liu TC, Qui JS. Pathological findings on peripheral nerves, lymph nodes and visceral organs of leprosy. *Int J Lepr* 1984;52:377-383.
- Locwood DNJ & Brycesson ADM. Leprosy. In: Champion RH, Burton JL, Burns M, Reathnack SM. *Textbook of Dermatology*. Sh ed. London: Blackwell Science; 1998, p.1215-1235.
- Lombardi C, Suárez REG. Epidemiologia da hanseníase. In: Talhari S, Neves RG. *Hanseníase*. 3^a. Ed. Manaus: Funcomiz; 1997, p.127-136.
- Lombardi C. *Hanseníase: Epidemiologia e Controle*. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado - Editora Arquivo do Estado de São Paulo; 1990.
- Loseke T, Pattyn SR, Mulumba MP, Aseke C, Portaels F, Fonteyne PA. Evaluation of nested PCR for detection of *Mycobacterium leprae* in early stage of leprosy neuropathies in the Democratic Republic of Congo. *J Neur Sci* 2001; 187 (Suppl 1):S12.
- Lucas SB, Ridley DS. The use of histopathology in leprosy diagnosis and research. *Lepr Rev* 1989; 60:257-262.
- Mafoyané NA, Jacyk WK, Lotz BP. Primary neuritic leprosy in a black South African. *Lepr Rev* 1992;63:177-182.
- Mahajan PM, Jogaikar DG, Mehta JM. A study of pure neuritic leprosy: clinical experience. *Indian Lepr* 1996; 68:137-141.
- Marques MAM, Mahapatra S, Sarno EN, Santos S, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MCV. Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:463-470.
- Marques WJr, Foss NT, Arruda APM, Barreira AA. Near-nerve potential in lepromatous leprosy. *Muscle Nerve* 2003; 28:460-463.
- Marques WJr. O potencial de ação sensitivo do nervo mediano com eletrodos de agulha justapostos ao nervo na hanseníase virchowiana e dimorfo-virchowiana. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1994.
- Matsumara K, Chiba A, Yamada H, Fukuta-Ohi H, Fujita S, Endo T, Kobata A, Anderson LVB, Shimizu T. A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 1997; 272: 13904-13910.
- McLeod JG, Hargrave JC, Walsh JC, Booth GC, Gye RS. Nerve conduction studies in leprosy. *Int J Lepr* 1975; 43:21-31.

- Melson R, Ducan ME, Harboe M, Bjune G. Antibodies against *Mycobacterium leprae* antigen 7 form birth to 18 months of age: an indicator of intra-uterine infection in leprosy. *Clin Exp Immunol* 1980; 42:107-113.
- Melson R, Harboe M, Duncan ME. IgA, IgM and IgG anti-M *leprae* antibodies in babies of leprosy mothers during the first two years of life. *Clin Exp Immunol* 1982; 49:532-542.
- Meyers WM, Marty AM. Current concepts in the pathogenesis of leprosy: clinical, pathological, immunological and chemotherapeutic aspects. *Drugs* 1991; 41:832-856.
- Milep2 Study Group. Approaches to studying the transmission of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2000; 71(Suppl.):S26-S29.
- Mishra B, Mukherjee A, Girdhar A, Hussain S, Malaviya GN, Girdhar BK. Evolution of early lesions in leprosy. *Lepr Rev* 1993; 64:259-266.
- Mitchell PD. Leprosy and the case of King Baldwin IV of Jerusalem: *Mycobacterium disease* in the Crusader States of the 12th and 13th centuries. *Int J Lepr* 1993; 61:283-291.
- Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *Int J Lepr* 1953; 21:347-358.
- Modlin RL, Bloom BR. Immune regulation: learning from leprosy. *Hosp Pract* 1993; 28:71-84.
- Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:182-189.
- Modlin RL. Cytokine response in leprosy lesions. *Nippon Rai Gakkai Zasshi* 1995; 64:85-88.
- Motta VT, Wagner MB. *Bioestatística*. Caxias do Sul: Educ, São Paulo: Robe Editorial 2003.
- Naafs B, Dagne T. Sensory testing: a sensitive method in the follow-up of nerve involvement. *Int J Lepr* 1977; 45:364-368.
- Naafs B. Leprosy Reactions. *Tropical and Geographical Medicine* 1994; 46:80-84.
- Nadkarni NS, Rege VL. Significance of histopathological classification in leprosy. *Indian J Lepr* 1999; 71:325-332.
- Nakamura C, Fukumoto Y, Kashiwabara Y. Dharmendra antigen but not integral *M. leprae* is an efficient inducer of immunostimulant cytokine production by human monocytes, and *M. leprae* lipids inhibit the cytokine production. *Int J Lepr* 1997; 65:63-72.

- Nations SP, Katz SJ, Lyde CB, Baronh RJ. Leprous neuropathy: an American perspective. *Sem Neurol* 1998; 18: 113-124.
- Negesse Y, Beimnet K, Miko T, Wondimus A, Berhan TY. In leprosy the presence of mycobacteria in the nerve is an essential factor in the cycle and spectrum of *Mycobacterium leprae* infection. *Lepr Rev* 1993; 64:104-109.
- Negesse Y. Leprous neuritis, classification of leprosy, and multidrug therapy. *Int J Lepr* 1988; 56:329-330.
- Negesse Y. Staging nerve involvement in *M. Leprae* infection. *Int J Lepr* 1999; 67:167-168.
- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cee* 2000; 103:511-514.
- Nilsen R, Mengistu G, Reddy BB. The role of nerve biopsies in the diagnosis and management of leprosy. *Lepr Rev* 1989; 60:28-32.
- Noordeen SK, Lopez-Bravo L, Sundaresan TK. Estimated number of leprosy cases in the world. *WHO* 1992; 70 (1): 7-10.
- Noordeen SK. Epidemiology and control of leprosy: a review of progress over the last 30 years (1962-1992). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 515-517.
- Noordeen SK. Epidemiology of (poly) neuritic type of leprosy. *Lepr India* 1972; 44:90-96.
- Omer GE. Physical diagnosis of peripheral nerve injurie. *Orthop Clin N Amer* 1981; 12:207-217.
- Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. *Hans Hoje* 1998; 6: 1-4.
- Ottenhoff THM. Immunoly of leprosy: lessons from and for leprosy. *Int J Lepr* 1994; 62: 109-121.
- Pallen MJ, McDermott RD. How might *Mycobacterium leprae* enter the body? *Lepr Rev* 1986; 57:289-297.
- Pannikar VK, Arunthathi S, Chacko CJ, Fritschi EP. A clinico-pathological study of primary neuritic leprosy. *Lepr India* 1983; 55:212-221.
- Pattyn SR, Ursi D, Leven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 1993;61:389-393.
- Pearson JMH, Ross WF. Nerve involvement in leprosy: pathology, diferencial diagnosis and principles of management. *Lepr Rev* 1975; 46:199-212.

- Pedley JC. The presence of *M. leprae* in human milk. *Lepr Rev* 1967; 38:239-242.
- Plikayatis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primet gner amplification assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1913-1927.
- Pollock M, Nukada H, Taylor P, Donaldson I, Carroll G. Comparison between fascicular and whole sural nerve biopsy. *Ann neurol* 1983; 13:65-68.
- Pönnighaus JM. Diagnosis and manegement of single lesions in leprosy. *Lepr Rev* 1996; 67:89-94.
- Premkumar R, Daniel E, Suneetha S, Yovan P. Quantitative assessment of facial sensation in leprosy. *Int J Lepr* 1998; 66:348-355.
- Pulst SM. Ethical issues in DNA testing. *Muscle Nerve* 2000;23:1503-1507.
- Rabelo FE. A clínico-epidemiological classification of the formas of leprosy. *Int J Lepr* 1937; 5:343-356.
- Rabelo FE. A doutrina da hanseníase na concepção dos hansenólogos de formação latina (1938-1974). *Méd Cut Iber Lat Ame* 1976;3:217-226.
- Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL. Application of PCR for detection of *M. leprae* DNA in specimens form treated patients. *Int J Lepr* 1995; 63:42-45.
- Ramadan W, Mourad B, Fadel W, Ghoraba E. Clinical, electrofisiological and immunopathological study of peripheral nerves in Hansen's disease. *Lepr Rev* 2001; 72:35-49.
- Ramakrishnnan AG, Srinivasan TM. Electrophysiological correlates of hanseniasis. *Int J Lepr* 1995; 63: 395-408.
- Rambukkana A, Salzeer JL, Yurchenco PD, Tuomanem EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminina-alfa-2 chain. *Cell* 1997; 88: 811-821.
- Rambukkana A, Yamada H, Zannazi G, Mathus T, Salzeer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-distroglican as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1998; 282:2076-2079.
- Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* 2002; 296:927-931.
- Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends in Mycrobiology* 2000a;8:23-28.

- Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4:21-27.
- Rambukkana A. Molecular basis of the interaction of *Mycobacterium leprae* with peripheral nerve: implications for therapeutic strategies. *Lepr Rev* 2000b; 71 (Supl.):S168-S175.
- Rees RFW. The microbiology of leprosy. IN Hastings RC. *Leprosy*. London: Churchill Livingstone; 1989, p.31-52.
- Rees RJW, Waters MFR, Weddell AGM, Palmer E. Experimental lepromatous leprosy 1967; *Nature* 1967; 599-602.
- Rees RJW. Enhanced susceptibility of thymectomy and irradiated mice to injection with *Mycobacterium leprae*. *Nature* 1966; 211:657-658.
- Report of the International Leprosy Association Technical Fórum Paris, France. Diagnosis and classification of leprosy. *Lepr Rev* 2002; 73:S17-S26.
- Richard BM, Corry PR. Cervical branch of the facial nerve in leprosy. *Int J Lepr* 1997; 65:170-177.
- Ridley DS, Job CK. The pathology of leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy*. London: Churchill Livingstone; 1989, p.100-133.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity (A five-group system) 1966; 34:255-273.
- Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Org* 1974; 51: 451-465.
- Ridley MJ, Waters MF, Ridley DS. Events surrounding the recognition of *Mycobacterium leprae* in nerves. *Int J Lepr* 1987; 55:99-108.
- Ridley MJ, Waters MFR, Ridley DS. Effect of *Mycobacterium leprae* in peripheral nerve trunk on the evolution of skin lesions. *Int J Lepr* 1994; 62:99-107.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; 168 (9): 4620-4627.
- Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Theuvenet WJ, Lavender M, Adiga RB. Serological responses in primary neuritic leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85:299-302.
- Sabin TD, Swift TR, Jacobsen RR. Leprosy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Low PA, Podusco JF. Editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Saunders 1993; 2:1354-1372.
- Said G. Indications and value of nerve biopsy. *Muscle Nerve* 1999; 22:1617-1619.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350.
- Saito F, Masaki T, Damakura K, Anderson LVB, Fujita Sachiko, Fujuta H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumara K. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann Cells. *J Biol Chem* 1999; 74:840-8246.
- Samant G, Shetty VP, Uplekar MW, Antia NH. Clinical and electrophysiological evaluation of nerve function impairment following cessation of multidrug therapy in leprosy. *Lepr Rev* 1999; 70:10-20.
- Santos AR, Balassiana V, Oliveira MLW, Pereira MAS, Santos PB, Degraive WM, Suffys PN. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase chain in the blood of individual, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:1129-1133.
- Santos AR, De Miranda AB; Sarno EM; Suffys PN; Degraive WN. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1993; 39: 298-304.
- Santos AR, Degraive WM, Suffys PN. Use of polymerase chain reaction (PCR) in leprosy research. *Indian J lepr* 1999; 71: 101-110.
- Santos AR, Goes Filho JT, Nery JAC, Duppre NC, Gallo MEN, Suffys PN, Degraive WM. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 11:113-120.
- Sarno EM, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int J lepr* 1996; 64: S69-S74.
- Sarno EN, Santos AR, Jardim MR, Suffys PN, Almeida AS, Nery JAC, Vieira LMM, Sampaio EP. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF α . *Lepr Rev* 2000; 71 (Suppl.): S154-S160.
- Saunderson P, Currie H, Shibru G, Byass P. Sensory testing of the hands in leprosy. *Lepr Rev* 1997; 68:252-257.
- Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, Lockwood DNJ. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. *Lepr Rev* 2000a; 71:285-308.
- Saunderson P, Gebre S, Ketsela D, Byass P. The ALERT MDT Field Evaluation Study (AMFES): a descriptive study of leprosy in Ethiopia. Patients, methods and baseline characteristics. *Lepr Rev* 2000b; 71:273-284.

- Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. *Lepr Rev* 2000; 71:34-42.
- Saunderson P. The epidemiology of reaction and nerve damage. *Lepr Rev* 2000; 71(Suppl.):S106-114.
- Save MP, Shetty VP. A critique on commentary "How *Mycobacterium leprae* infects peripheral nerves" by Freedman et al. *Lep Rev* 2001; 72:102-105.
- Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:642-646.
- Sehgal VN, Koranne RV, Nayyar M, Saxena HMK. Application of clinical and histopathological classification of leprosy. *Dermatologica* 1980; 93:93-96.
- Sehgal VN, Rege VL, Reys M. Correlation between clinical histopathologic classification in leprosy. *Int J Lepr* 1977; 45:278-280.
- Sena PG. Electromyographic and neurological aspects of leprosy: study of 100 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1976;34:1-17.
- Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr* 1968; 36:78-82.
- Shepard CC. The first decade in experimental leprosy. *Bull J World Health Org* 1971; 44:821-827.
- Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into footpads of mice. *J Exp Med* 1960; 112: 445-454.
- Shetty VP, Antia NH. Nerve damage in leprosy. *Int J Lepr* 1988; 56:619-621.
- Shi L, Yajima M, Kawats K, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Endoh M. Comparison of polymerase chain reaction, immunohistochemistry and conventional histopathological in the diagnosis of early leprosy in Sichuan Province of China. *Hihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 2000; 69:147-155.
- Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 1994; 191:378-387.
- Sinha S, Vinita C, Mishra B, Sengupta U. Analysis of circulating immune complexes from leprosy patients for *Mycobacterium leprae* antigens. *Int J Lepr* 1992; 60:396-403.
- Skacel M, Antunes SLG, Rodrigues MAJ, Nery JAC, Valentim VC, Morais RPB, Sarno EN. The diagnosis of leprosy among patients with symptoms of peripheral neuropathy without cutaneous lesions – A follow-up study. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58:800-807.

- Skinsnes OK, Olvove RM. Leprosy in Society. V. "Leprosy in Occidental Literature. Int J Lepr 1970; 38:294-307.
- Skinsnes OK. Leprosy and the New English Bible. Int J Lepr 1970; 38:310-312.
- Smith WCS. Review of current research in the prevention of nerve damage in leprosy. Lepr Rev 2000; 71(Suppl.):S138-106-114.
- Solomon S, Kurian N, Ramadas P, Rao PSSS. Incidence of nerve damage in leprosy patients treated with MDT. Int J Lepr 1998; 66:451-456.
- Spiegel RA, Bradley AP. Leprosy. Bull World Health Org 1998; 76 (Suppl 2): 133-134.
- Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff THM. The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. Lepr Rev 2000; 71 (Suppl.): S121-S129.
- Srinivasan H, Ra KS, Iyer CGS. Discrepancy in the histopathological features of leprosy lesions in the skin and peripheral nerve. Lepr India 1982; 54:275-286.
- Stoner GL. Importance of the neural predilection of *Mycobacterium leprae* in leprosy. Lancet 1979; 2:994-996.
- Suneetha LM, Vardhini D, Suneetha S, Balasubramanian AS, Job CK, Scollard D. Biochemical aspects of *Mycobacterium leprae* binding proteins: a review of their role in pathogenesis. Int J Lepr 2001; 69:341-348.
- Suneetha S, Arunthathi S, Chandi S, Kurian N, Chacko CJG. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the apparently normal skin. Lepr Rev 1998; 69:351-357.
- Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T, Oomoto Y, Onozaki. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, Tumor Necrosis Factor, and IL-1 receptor antagonist by Human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. Int J Lepr 1993; 61:609-617.
- Swift TR, Hackett ER, Shipley DE, Miner KM. The peroneal and tibial nerves in lepromatous leprosy: clinical and electrophysiologic observations. Int J Lepr 1973; 41:249-251.
- Talhari S, Neve RG, Oliveira SG. Manifestações nervosas e diagnóstico diferencial. In Talhari S & Neves RG. Hanseníase. 3a. Ed. Manaus: Funcomiz; 1997, p.41-61.
- Talhari S, Neves RG. Introdução, agente etiológico, transmissão, cultura, inoculação, aspectos laboratoriais, patogenia classificação e manifestações cutâneas. In Talhari S & Neves RG. Hanseníase. 3a. Ed. Manaus: Funcomiz; 1997, p.1-40.

- Talhari S. Diagnosis, Classification and Prognosis. *Int J Lepros* 1996, 64(Supp): S13-S15.
- Talwar S, Jha PK, Tiwaari VD. Neuritic leprosy: epidemiology and atherapeutic responsiveness. *Lepr Rev* 1992; 63:263-268.
- Theuvenet WJ, Finlay K, Roche P, Soares D, Kauer JMG. Neuritis of the lateral femoral cutaneous nerve in leprosy. *Int J Lepr* 1993; 61:592-596.
- Tomimori-Yamashita J, Maeda SM, Jabur R, Rotta O. Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. *An Bras Dermatol* 1996; 71: 343-349.
- Tzourio C, Said G, Millan J. Assintomatic nerve hypertrophy in lepromatous leprosy: a clinical, electrophysiological and morphological study. *J Neurol* 1992;239:367-374.
- Uplekar MW, Antia NH. Clinical and histopathological observations on pure neuritic leprosy 1986;58:513-521.
- Van Brakel WH, Khawas IB. Silent neuropathy in leprosy: an epidemiological description. *Lepr Rev* 1994; 65:350-360.
- Van Brakel WH, Shte J, Dixon JA, Arzet H. Evaluation of sensibility in leprosy – comparison of various clinical methods. *Lepr Rev* 1994; 65:106-121.
- Van Brakel WH. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. *Lepr Rev* 2000; 71(Suppl.):S146-153.
- Verghese M, Ittimani KV, Satyanarayan KR, Mathai R, Bhakthaviziam C. A study of the conduction velocity of the motor fibers of ulnar and median nerves in leprosy. *Int J Lepr* 1970; 38:271-277.
- Virmond M. Indications for surgery in leprosy. *Lepr Rev* 1998; 69:297-304.
- Vogelsang TM. Gerhard Henrik Armauer Hansen: 841-1912. *Int J Lepr* 1978; 46: 257-332.
- Waters MFR, Jacobs JM. Leprous neuropathies. *Ballieres Clin Neurol* 1996; 5:171-197.
- Waters MFR. Leprosy 1962-1992. *Trans Roy Trop Med Hyg* 1993; 87:499.
- Weinstein DE, Freedman VH, Kaplan G. Molecular mechanism of nerve infection in leprosy. *Trends Microbiol* 1999; 7:185-186.
- Weinstein DE. *Mycobacterium leprae* and neuropathies. *Trends Microbiol* 2000; 8:156-157.
- Weir R. Are Cytokines our key to immunity against mycobacterial diseases. *Lepr Rev* 2000; 71:268-269.

- Werneck LC, Teive HAG, Scola RH. Muscle involvement in Leprosy: Study of the anterior tibial muscle in 40 patients. *Arq Neuropsiquiatr* 1999; 57(3-B): 723-734.
- Werneck LC. Biópsias de nervo periféricos: análise de 80 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 1988; 46:22-28.
- Wheeler PR. The microbial physiologist's guide to the leprosy genome. *Lepr Rev* 2001; 72:399-407.
- Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisetee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33:45-49.
- Wilder-Smith A, Wilder-Smith E. Effect of steroid therapy on parameters of peripheral autonomic dysfunction in leprosy patients with acute neuritis. *Int J Lepr* 1997; 65:21-27.
- Wilder-Smith A, Wilder-Smith E. Eletrophysiological evaluation of peripheral autonomic function in leprosy patients, leprosy contacts and controls. *Int J Lepr* 1996; 64:433-440.
- Wilder-Smith EPV, Wilder-Smith AJ, Nirkko AC. Skin and muscle vasomotor reflexes in detecting autonomic dysfunction in leprosy. *Muscle Nerve* 2000; 23:1105-1112.
- Williams DL, Gillis TO, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1990; 162:193-200.
- Wilson SM. Application of nucleic acid-based technologies to the diagnosis and detection of disease. *Tras R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:609-611.
- Woods AS, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 65:305-310.
- World Health Organization - WHO. Expert Committee on Leprosy. World Health Organization Technical Report Series, 1998; 874:1-43.
- World Health Organization - WHO. Leprosy - Global situation. *Wkly Epidemiol Rec* 2002; 77:1-8.
- World Health Organization - WHO. Report of a study group: chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical Report Series 675 1982.
- World Health Organization study Group. Peripheral neuropathies. *Who Tech. Ser* 1980; 654:61-78
- Yamada H, Chiba A, Endo T, Kobata A, Anderson LVB, Hori H, Fukuta-Ohi H, Kanazawa KP, Shimizu T, Matsumara K. Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *J Neurochem* 1996; 66:1518-1524.

Yamamura M, Wang X-H, Ohmen JD, Uyemura TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992; 149:1470-1475.

Yoon K, Chao S, Lee SM, Abalos RM, cellona RV, Fajardo TTJr, Guido Ls, Dela Cruz ES, Walshj GP, KIM J. Evaluation of PCR amplification of M, leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31:895-899.

Zhang ZQ, Ishaque M. Evaluation of methods for isolation of DNA from Slowly and rapidly growing mycobacteria. *Int J Lepr* 1997; 65:469-476.

ANEXOS

9 - ANEXOS

ANEXO 1

I - PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DE SOLUÇÕES

A- HEMATOXILINA E EOSINA:

Solução de Eosina: Eosina 1 g + Água destilada 100 ml.

Solução de hematoxilina: Cristais de hematoxilina 5g + Álcool absoluto 50 ml + Alumen de potássio 100 g + Água destilada 1000 ml + Óxido vermelho de mercúrio 2,5 g.

Dissolver a hematoxilina no álcool e o alumen na água sob aquecimento. Misturar as duas soluções e aquecer até quase ebulição o mais rápido possível. Retirar do calor e juntar óxido de mercúrio lentamente, reaquecer até ficar púrpura escuro, esfriar em "banho maria" e filtrar para uso. Sempre que for usar a hematoxilina retirar uma possível camada superficial, como se fosse uma nata, com auxílio de um papel filtro. As soluções devem ser misturadas até completa dissolução.

B- GOMORI:

Solução do Tricômico: Fast green FCF 300 mg + Cromatópico RR 600 mg + Ácido fosfotúnic 600 mg + Ácido acético glacial 1 ml + Água destilada 100 ml.

Misturar bem até que os ingredientes estejam completamente dissolvidos, ajustando o ph para 3,4.

C- ZIEHL E NIEELSEN:

Solução de Ziehl: Fucsina básica 1% + Álcool absoluto 10 ml + Ácido fênico 5 g + Água destilada 100 ml.

Solução de azul de metileno a 1%.

ANEXO 2

FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES PARA PCR

TE para diluição do DNA (Tris-EDTA)

Tris HCl pH 7,6 10 mM
EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 1 mM

Tris HCl solução estoque pH 7,6

Tris 1 M
Ajuste de pH com HCl

EDTA solução estoque pH 8,0

EDTA 0,5 M
Ajuste de pH com NaOH 10 N

Solução de nitrato de prata

AgNO₃ 2,02 g
Água destilada 1000 ml

Solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃)

Na₂CO₃ 14,8 g
Água destilada 500 ml

Solução para o uso do Na₂CO₃ 170 ml

Solução estoque de Na₂CO₃ 170 ml
Formaldeído 92 µl

Solução para o uso do TBE (tampão borato) 0,5%

TBE 5x 280 ml
Água destilada 1120 ml

Tampão TBE 5x

TRis HCl 54 g
Ácido bórico 27,5 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0) 20 ml
Água destilada 1.000 ml

Solução de acrilamida 30%

Acrilamida 14,5 g
N,N'metilenobisacrilamida 500 mg
Água destilada 50 ml
TEMED 03 µl
Persulfato de amônia 250 µl

Gel de acrilamida a 10%

Acrilamida 30 % 7,5 ml
Tampão TBE 5x 6 ml
Água destilada 16,5 ml
Persulfato de amônio 10% 65 µl
TEMED 36 µl

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA APLICAÇÃO DE ESTUDO CLÍNICO, ELETRONEUROMIOGRÁFICO E BIÓPSIA DE NERVO PARA HISTOPATOLOGIA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

Nome:

Registro:

Endereço:

Fone:

Na sua condição de paciente, você tem o direito de saber sobre os procedimentos aos quais se submeterá. Como médico, tenho a obrigação de informá-lo suficientemente para que você tome a decisão consciente e possa optar ou não pela participação nesse estudo.

O objetivo do estudo é a avaliação das alterações nos nervos periféricos ocasionados pela hanseníase, sendo importante no diagnóstico e tratamento da hanseníase neural pura.

Você deverá ser investigado no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPR e Centro de Saúde Dona Libânia, unidade de referência no diagnóstico e tratamento da hanseníase no estado do Ceará, podendo, eventualmente, ser internado. No momento de sua inclusão no estudo será aberto um prontuário para você, onde serão anotadas todas as informações de sua história da doença, exames complementares, tais como, sangue, urina, fezes, baciloscopia, eletroneuromiografia, biópsia de nervo para histopatologia e reação em cadeia da polimerase – PCR. Para tal, será necessário colher seu sangue, colheita de linfa em lóbulos de orelha e cotovelo. Também, serão realizados testes de condução nervosa que implica na colocação de eletrodos (plaquinhas de metal) na superfície de seus membros (braços e pernas), seguindo de aplicação de estímulos, tipo pequenos choques, em vários pontos do trajeto de diferentes nervos sensitivos e motores, sendo um de cada vez. A eletromiografia consiste em colocar um eletrodo de agulha no músculo e avaliar os seus potenciais. Na biópsia de nervo será retirado um fragmento de nervo, após corte na pele, sob anestesia local, e subsequente sutura. Esses procedimentos são desprovidos de quaisquer riscos maiores.

COMPREENSÃO DOS PARTICIPANTES NO ESTUDO

Eu, abaixo assinado, tive a oportunidade de fazer todas as perguntas a respeito do estudo e dos procedimentos a serem realizados, sendo todas respondidas e compreendidas, tendo ficado claro que a minha participação nesse estudo é voluntária e a investigação proposta se faz necessária para o diagnóstico e tratamento correto da doença. Outrossim, ficou entendido que meu nome não será revelado em eventuais publicações ou estudos sobre esse programa.

Local e data:

Assinatura:

APÊNDICE 2

SUS - Sistema único de Saúde
Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
Centro de Dermatologia Dona Libânia
Prontuário de Atendimento de Hanseníase

Número:

Data da Abertura:

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

| | | | |
|---------------------|------------|-----------|------------|
| Nome: | | Sexo | |
| | | M | F |
| Nome da Mãe: | | | |
| Data de Nascimento: | Profissão: | Telefone: | Bairro: |
| Endereço: | | | Município: |

ANAMNESE

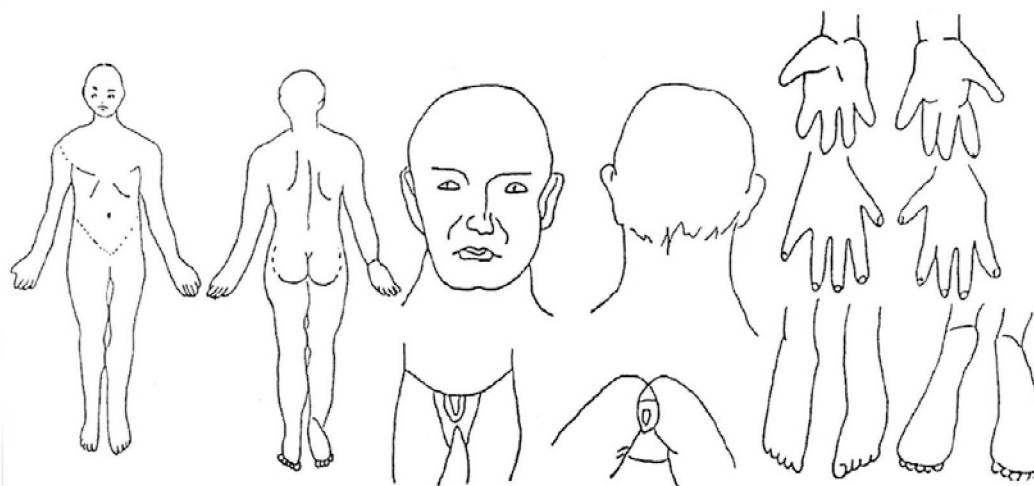
| |
|------|
| Q.P. |
| HDA |
| |
| |






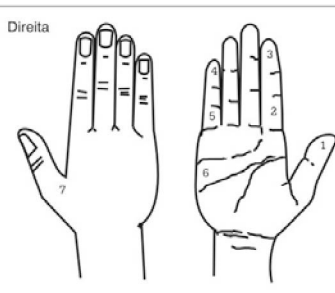
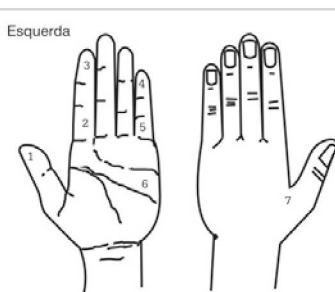


EXAME DERMATONEUROLÓGICO

| |
|--|
| |
| |
| |
| |

LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES

Assinale com um "X"



| SUS - Sistema único de Saúde Secretaria de Saúde do Estado do Ceará Centro de Dermatologia Dona Libânia Avaliação Neuro-Funcional | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---------|---------|-----------|-----------|----------|----------|------------|------------|--|--------------------|---|---|--------------------|---|---|--------------------|---|---|-------------------|---|---|--------------------|---|---|
| Nome: _____ Prontuário: _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1ª 2ª 3ª E Avaliação | Data ____ / ____ / ____ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nariz Q.P. _____ Ferida à Direita S N Ferida à Esquerd. S N Perfuração do septo à Direita S N Perfuração do septo à Esquerda S N Ressecamento à Direita S N Ressecamento à Esquerda S N | Face Olhos Q.P. _____ Lagofalmo sem força D S N Triquiase Direita S N Lagofalmo sem força E S N Triquiase Esquerda S N Lagofalmo com força D S N Ectrópio Direita S N Lagofalmo com força E S N Ectrópio Esquerda S N CONJUNTIVA Hiperemia (desenhar)  D E Secreção S N  D E CÔRNEA Úlceras/Opacidades (desenhar)  D E PUPILA Forma (desenhar)  D E Mobilidade Diminuída S N  D E Legenda Acuidade visual anotar o resultado de teste com escala de Snellen ou contagem dos dedos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Membros Superiores Q.P. _____ Articulações interfalangeanas <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Polegar Direito</td> <td>Polegar Esquerdo</td> </tr> <tr> <td>Prox. 2º dedo Direito</td> <td>Prox. 2º dedo Esquerdo</td> </tr> <tr> <td>Prox. 3º dedo Direito</td> <td>Prox. 3º dedo Esquerdo</td> </tr> <tr> <td>Prox. 4º dedo Direito</td> <td>Prox. 4º dedo Esquerdo</td> </tr> <tr> <td>Prox. 5º dedo Direito</td> <td>Prox. 5º dedo Esquerdo</td> </tr> </table> Legenda (-) Sem problemas (M) Garra móvel (R) Garra fixa Palpação de nervos <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Ulnar D</td> <td>Ulnar E</td> </tr> <tr> <td>Mediano D</td> <td>Mediano E</td> </tr> <tr> <td>Radial D</td> <td>Radial E</td> </tr> <tr> <td>Rad. cut D</td> <td>Rad. cut E</td> </tr> </table> Legenda (-) - Normal (D) - Dor (E) - Espessado (T) - Tinel / choque (F) - Fibroso (N) - Nódulo | Polegar Direito | Polegar Esquerdo | Prox. 2º dedo Direito | Prox. 2º dedo Esquerdo | Prox. 3º dedo Direito | Prox. 3º dedo Esquerdo | Prox. 4º dedo Direito | Prox. 4º dedo Esquerdo | Prox. 5º dedo Direito | Prox. 5º dedo Esquerdo | Ulnar D | Ulnar E | Mediano D | Mediano E | Radial D | Radial E | Rad. cut D | Rad. cut E | Inspeção e avaliação sensitiva Direita  Esquerda  Avaliação da Força Nervo Ulnar <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Abdução do 2º dedo</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>Abdução do 5º dedo</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> <tr> <td>Posição intrínseca</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table> Nervo Radial <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Extensão do punho</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table> Nervo Mediano <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Abdução do polegar</td> <td>D</td> <td>E</td> </tr> </table> Legenda Graduar de 0 a 5 (5) - Normal / (4-3-2) - Paresia (0-1) - Paralisia Atenção: seguir cores do monofilamento Garra móvel (M), Garra rígida (R) Reabsorção  Ferida  | Abdução do 2º dedo | D | E | Abdução do 5º dedo | D | E | Posição intrínseca | D | E | Extensão do punho | D | E | Abdução do polegar | D | E |
| Polegar Direito | Polegar Esquerdo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prox. 2º dedo Direito | Prox. 2º dedo Esquerdo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prox. 3º dedo Direito | Prox. 3º dedo Esquerdo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prox. 4º dedo Direito | Prox. 4º dedo Esquerdo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prox. 5º dedo Direito | Prox. 5º dedo Esquerdo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ulnar D | Ulnar E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mediano D | Mediano E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Radial D | Radial E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rad. cut D | Rad. cut E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Abdução do 2º dedo | D | E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Abdução do 5º dedo | D | E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Posição intrínseca | D | E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Extensão do punho | D | E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Abdução do polegar | D | E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Q.P.

Membros Inferiores

Articulações interfalangeanas

| | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Halux Direito | Halux Esquerdo |
| Prox. 2º Artelho Direito | Prox. 2º Artelho Esquerdo |
| Prox. 3º Artelho Direito | Prox. 3º Artelho Esquerdo |
| Prox. 4º Artelho Direito | Prox. 4º Artelho Esquerdo |
| Prox. 5º Artelho Direito | Prox. 5º Artelho Esquerdo |

Legenda
(-) Sem problemas
(M) Garra móvel
(R) Garra fixa

Palpação de nervos

| | |
|--------------------|--------------------|
| Fibular Comum D | Fibular Comum E |
| Tibial Posterior D | Tibial Posterior E |

Legenda
(-) - Normal (D) - Dor (E) - Espessado
(T) - Tinel / choque (F) - Fibroso
(N) - Nódulo

Articulações Tíbio-Társica

| | | |
|-----------|---|---|
| Tornozelo | D | E |
|-----------|---|---|

Legenda
(-) Sem problemas
(M) Garra móvel
(R) Garra fixa

Marcha

| | | |
|----------|---|---|
| Pé caído | D | E |
| | S | N |

Avaliação da Força

Nervo Fibular Comum

| | | |
|-----------------------|---|---|
| Extensão do Halux | D | E |
| Extensão dos Artelhos | D | E |
| Dorsiflexão | D | E |
| Eversão | D | E |

Legenda
Graduar de 0 a 5
(5) - Normal / (4-3-2) - Paresia
(0-1) - Paralisia

Inspeção e avaliação sensitiva

Direita

Esquerdo

Atenção: seguir cores do monofilamento
Garra móvel (M), Garra rígida (R) Reabsorção Ferida

LEGENDA DO ESTESIÔMETRO

Verde - 0,05g - sensibilidade normal na mão e no pé
Azul - 0,2g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé
Violeta - 0,2g - sensibilidade protetora diminuída na mão
Vermelho (fechado) - 4,0g - perda da sensibilidade protetora da mão e às vezes no pé
Vermelho (marcar c/x) - 10g - perda da sensibilidade protetora no pé
Vermelho (circular) - 300 - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
Preto - sem resposta. Perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

Resumo da Classificação do Grau de Incapacidade

| Graus | OLHOS | D | E | MÃOS | D | E | PÉ | D | E |
|-------|---|---|---|---|---|---|--|---|---|
| 0 | Nenhum problema com os olhos devido à hanseníase | | | Nenhum problema com os mãos devido à hanseníase | | | Nenhum problema com os pés devido à hanseníase | | |
| 1 | Diminuição da perda da sensibilidade | | | Diminuição da perda da sensibilidade | | | Diminuição da perda da sensibilidade | | |
| 2 | Lagofalmo e ou ectrópio | | | Lesões tróficas e ou lesões traumáticas | | | Lesões tróficas e ou lesões traumáticas | | |
| | Triquíase | | | Garras | | | Garras | | |
| | Opacidade corneana central | | | Reabsorção | | | Reabsorção | | |
| | Acuidade visual menor que 0.1 ou conta dedos à 6m | | | Mão caída | | | Pé caído Contratura do tornozelo | | |

Assinatura e Carimbo do Avaliador:

Maior grau atribuído

| | | | |
|---|---|---|--------------|
| 0 | 1 | 2 | Não Avaliado |
|---|---|---|--------------|

