



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Livia Cristina de Melo Pino Machado

**Estudo da microcirculação na hanseníase usando videomicroscopia  
(Microscan®) e laser-Doppler associado à iontoforese: um modelo de  
disautonomia vascular por denervação**

Rio de Janeiro

2013

Livia Cristina de Melo Pino Machado

**Estudo da microcirculação na hanseníase usando videomicroscopia (Microscan®) e laser-Doppler associado à iontoforese: um modelo de disautonomia vascular por denervação**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliete Bouskela

Coorientador: Prof. Dr. Omar Lupi da Rosa Santos

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M149 Machado, Livia Cristina de Melo Pino.  
Estudo da microcirculação na hanseníase usando videomicroscopia (Microscan®) e laser-Doppler associado à iontoforese: um modelo de disautonomia vascular por denervação. 2013. / Livia Cristina de Melo Pino Machado. – 2013.

113 f. : il.

Orientadora: Eliete Bouskela.

Coorientador: Omar Lupi da Rosa Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Microcirculação – Teses. 2. Hanseníase tuberculóide – Teses. 3. Sistema nervoso – Teses. 4. Fluxometria por laser-Doppler. 5. Iontoforese - Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Santos, Omar Lupi da Rosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 612.1:616-002.73

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Livia Cristina de Melo Pino Machado

**Estudo da microcirculação na hanseníase usando videomicroscopia (Microscan®) e laser-Doppler associado à iontoforese: um modelo de disautonomia vascular por denervação**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de agosto de 2013.

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliete Bouskela  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Omar Lupi da Rosa Santos  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Alex Christian Manhães  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. José Augusto da Costa Nery  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Dr. Fernando Raphael de Almeida Ferry  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wilson e Vera. Nenhuma dedicatória e agradecimento serão suficientes. Exemplos de dedicação incondicional e renúncia de tudo por seus filhos. Sempre foram meus maiores e melhores incentivadores.

Ao meu marido e amigo Felipe. Pelo companheirismo e por todo amor e força sempre dispensados a mim.

Ao meu irmão, eterno amigo.

A toda minha família e amigos por estarem sempre me apoiando e entendendo minhas ausências.

A Deus por me proporcionar a vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliete Bouskela, que me acolheu e sempre confiou em meu trabalho, mesmo nos momentos de desânimo, sempre me apoiou. Sem sombra de dúvidas, foi o maior exemplo de profissional e de inspiração acadêmica que já tive o privilégio de conhecer. Agradeço toda a paciência e confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Omar Lupi, que sempre foi minha ligação, desde os meus primeiros passos na dermatologia, com o mundo acadêmico. Quem me deu e continua me dando muitas oportunidades. Meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. José Augusto Nery, para mim um dos maiores exemplos de profissional que já conheci. Sempre disposto a ensinar, com quem aprendi hanseníase. A minha eterna gratidão e reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Alex C. Manhães, meu revisor, pelos ensinamentos e paciência.

À Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno, pelo incentivo e oportunidade concedida há alguns anos.

Aos professores Fernando Ferry, Antônio D'Acri e Penha Santos por participarem da banca da defesa.

À nutricionista e querida amiga Priscila Alves Maranhão, pela paciência e grande ajuda em todos os meus momentos durante estes 2 anos.

À Dra. Ingrid Bárbara Ferreira Dias pela enorme ajuda em várias etapas do meu aprendizado.

À amiga Amanda e Beatriz que conheci no mestrado e me ajudaram sempre.

Ao Dr. Vitor Perez por ter ajudado imensamente na captação dos pacientes, sem ele não conseguiria.

À Dra. e querida aluna Julyana Calegari por me ajudar nas pesquisas bibliográficas e em diversas etapas nestes dois anos.

Ao Dr. Curt Treu, o primeiro a realizar estudo semelhante e pela ajuda e apoio imprescindível ao trabalho.

A todos do BioVasc, Eliza, Caroline, Graça, Prof. Daniel, Richard, Bernardo, Fernanda, Diogo, Fátima, Ana Olimpia e demais colegas de laboratório, por toda ajuda e apoio ao longo destes anos de convívio no laboratório.

A quem roubei, de alguma forma, o tempo.

A todos que contribuíram com este trabalho.

Aos pacientes, pelo aprendizado que me proporcionaram. Meu sincero agradecimento.

Knowledge has to be improved, challenged, and increased constantly, or it vanishes.

*Peter Drucker*

## RESUMO

MACHADO, Livia Cristina de Melo Pino. *Estudo da microcirculação na hanseníase usando videomicroscopia (MicroScan®) e laser-Doppler associado à iontoforese: um modelo de disautonomia vascular por denervação*. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A hanseníase é uma doença infecciosa com características únicas, dentre elas o fato de atingir intensamente a inervação da pele e seus anexos. Entremeando estes anexos, está a microcirculação cutânea, que a princípio também tem sua inervação comprometida. Vários artigos apontam para alterações de disautonomiamicrocirculatória. O presente estudo se propõe a avaliar a microcirculação cutânea na hanseníase tuberculóide. Utilizamos a videomicroscopia de campo escuro (Microscan®), a análise de Fourier do sinal do laser Doppler para estudo da vasomotricidade e o laser Doppler fluxometria associado à iontoforese de substâncias vasoativas (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) para avaliação da reatividade vascular. Sete pacientes portadores de hanseníase tuberculóide, sem outras co-morbididades que pudessem alterar os parâmetros microcirculatórios, foram avaliados pelos métodos descritos e seus resultados foram comparados, com controles realizados nos próprios pacientes em área contralateral com pele sã. Em relação à vasomotricidade foi observada alteração estatisticamente significativa entre os grupos, apenas no componente endotelial. Em relação à iontoforese de substâncias vasoativas não se constatou diferenças entre as manchas e os controles. No Microscan®, observamos as maiores alterações. Os resultados apresentados sugerem que, provavelmente devido à alteração inervatória decorrente da hanseníase tuberculóide, estes pacientes apresentam uma alteração quantitativa de vasos e também da reatividade vascular da microcirculação cutânea.

Palavras-chave: Microcirculação. Hanseníase. Sistema nervoso. SDF. Laser Doppler. Iontoforeses.



## ABSTRACT

MACHADO, Livia Cristina de Melo Pino. *Leprosymicrocirculation study using video microscopy (MicroScan ®) and laser-Doppler associated with iontophoresis: a model of vascular dysautonome by denervation*. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Leprosy is an infectious disease with unique features, among them the fact that it compromises not only the cutaneous and anaxial innervation, but also the innervation of the cutaneous microcirculation. Several articles indicate the impact of disautonomy on the microcirculatory level, citing the example of changes in vasomotor level. The present study proposes to evaluate the microvascular reactivity of the cutaneous microcirculation of tuberculoid leprosy. Methods employed in the study were: the sidestream dark field imaging (Microscan®), the Fourier analysis of the laser Doppler signal to study vasomotion, and the laser Doppler flowmetry associated to iontophoresis of vasoactive substances (acetylcholine and sodium nitroprusside). Seven patients with tuberculoid leprosy, without any other comorbidity that could modify the microvascular parameters were evaluated and their results were compared with contralateral areas of healthy skin from the same patients. Regarding the vasomotion, statistical significant difference was noticed only in endothelial component, between groups. In the iontophoresis of vasoactive substances, it was not found differences between areas with and without lesions and controls. In the results obtained with the Microscan ® we have observed the greatest changes. The results suggest that, probably due to changes resulting from denervation of tuberculoid leprosy, these patients have significant quantitative change on vessels and also in the vascular reactivity of the cutaneous microcirculation.

Keywords: Microcirculatory evaluation. Leprosy. Nervous system. SDF. Laser Doppler. Iontophoresis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Espectro clínico da hanseníase segundo classificação de Ridley & Jopling.....	18
Figura 2-	Hanseníase tuberculóide infantil. Nota-se placa única com borda eritematosa elevada e centro claro.....	23
Figura 3-	Paciente com hanseníase virchowiana apresentando infiltração de todo tegumento mais lesões tipo eritema nodoso lepromatoso característicos de reação tipo II.....	24
Figura 4-	Paciente com hanseníase virchowiana apresentando lesões nodulares tipo tubérculos e infiltração de pavilhão auricular e nariz.....	24
Figura 5-	Lesões tipo queijo suíço na hanseníase borderline. Nota-se placas eritemato-infiltradas com bordas mais elevadas.....	25
Figura 6-	Cartela PQT-PB – esquema de tratamento para hanseníase paucibacilar preconizada pelo Ministério da Saúde.....	32
Figura 7-	Cartela PQT MB - esquema de tratamento para hanseníase multibacilar preconizada pelo Ministério da Saúde.....	33
Figura 8-	Esquema do aparelho e técnica SDF. A luz refletida ortogonalmente na superfície do tecido atravessa o campo escuro e é capturada pela câmera para construir a imagem da microcirculação.....	37
Figura 9-	Aparelho SDF- Microscan e seus componentes.....	47
Figura 10-	Detalhe da faixa guia e do apoio de braço.....	47
Figura 11-	Transparência com 3 linhas horizontais e 3 verticais equidistantes colocada sobre tela de leitura da imagem do Microscan.....	48
Figura 12-	Aparelho de Laser Doppler fluxometria e iontoforese.....	50
Figura 13-	Exame LDF – Iontoforese sendo realizado em paciente.....	52
Figura 14-	Análise comparativa da fase endotelial da vasomotricidade caso (mancha) X controle.....	57
Figura 15-	Análise comparativa da fase cardíaca da vasomotricidade caso (mancha) X controle.....	58
Figura 16-	Análise comparativa da fase simpática da vasomotricidade caso (mancha) X controle.....	59
Figura 17-	Análise comparativa da fase miogênica da vasomotricidade caso (mancha) X controle.....	59

Figura 18-	Análise comparativa da fase respiratória da vasomotricidade caso (mancha) X controle.....	60
Figura 19-	Comparação Mancha x controle - Componente Normalizada endotelial da vasomotricidade.....	62
Figura 20-	Comparação Mancha x controle - Componente Normalizada miogênica da vasomotricidade.....	62
Figura 21-	Comparação Mancha x controle - Componente Normalizada respiratória da vasomotricidade.....	63
Figura 22-	Comparação Mancha x controle - Componente Normalizada cardíaca da vasomotricidade.....	63
Figura 23-	Comparação Mancha x controle - Componente Normalizada simpático da vasomotricidade.....	64
Figura 24-	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese Ach – basal (média UP).....	67
Figura 25-	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese Ach – platô (média PU).....	67
Figura 26-:	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese Ach – aumento basal ao platô (PU).....	68
Figura 27-:	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese Ach – % aumento basal ao platô (média PU).....	68
Figura 28-	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese NPS – basal (média PU).....	69
Figura 29-	Comparação Controle x Mancha – Iontoforese NPS – % aumento basal ao platô (média PU).....	69
Figura 30-	Análise da comparação da variável platô (dose) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.....	70
Figura 31-	Análise da comparação da variável platô (dose) na iontoforese acetilcolina no controle e caso.....	71
Figura 32-	Análise da comparação da variável platô (média PU) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.....	71
Figura 33-	Análise da comparação da variável aumento basal ao platô (PU) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.....	72
Figura 34-	Comparação entre a variável basal (média PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	73
Figura 35-	Comparação entre a variável platô (média PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	74
Figura 36-	Comparação entre a variável aumento basal ao platô (PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	74

Figura 37-	Comparação entre a variável % aumento basal ao platô (PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	75
Figura 38-	Comparação entre a variável platô (dose) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	76
Figura 39-	Comparação entre a variável basal (média PU) entre os grupos caso (mancha) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	78
Figura 40-	Comparação entre a variável platô (dose) entre os grupos caso (mancha) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	79
Figura 41-	Comparação entre a variável % aumento basal-platô (média PU) entre os grupos caso (mancha) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	78
Figura 42-	Comparação entre a variável platô (média PU) entre os grupos caso (mancha) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	79
Figura 43-	Comparação entre a variável aumento basal-platô (PU) entre os grupos caso (mancha) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.....	80
Figura 44-	Curva de iontoforese com acetilcolina. 1PU é a curva da mancha e 3PU é a curva do controle.....	80
Figura 45-	Curva de iontoforese com nitroprussiato de sódio. 1 PU é a curva da mancha e 3 PU curva do controle.....	81
Figura 46-	Comparação da variável Vasos Totais (VT) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	83
Figura 47-	Comparação da variável Vasos Grandes (VG) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	84
Figura 48-	Comparação da variável Vasos Pequenos (VP) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	84
Figura 49-	Comparação da variável vasos grandes sem fluxo (VG sem fluxo) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	85
Figura 50-	Comparação da variável vasos pequenos sem fluxo (VP sem fluxo) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	86
Figura 51-	Comparação da variável vasos grandes com fluxo (VG com fluxo) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	86
Figura 52-	Comparação da variável Vasos pequenos com fluxo (VP com fluxo) entre os grupos caso (mancha) e controle no Microscan.....	87
Figura 53-	Comparação da variável DCT entre os grupos caso (mancha) e controle.....	89
Figura 54-	Comparação da variável DCF entre os grupos caso (mancha) e controle.....	90
Figura 55-	Comparação da variável MFI entre os grupos caso (mancha) e controle.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios da classificação de Madri. A hanseníase é classificada segundo quatro grandes critérios: clínico, bacteriológico, histológico e imunológico .....	18
Tabela 2 -	Correlação entre baciloscopia e reação de Mitsuda, na classificação de Madri.....	18
Tabela 3 -	Tabela de correlação entre as classificações de Madri (1953), Ridley & Jopling (1966) e OMS (1982) para hanseníase.....	19
Tabela 4 -	Tipos de mecanismos de lesão de nervos periféricos na hanseníase.....	26
Tabela 5 -	Classificação e características clínicas, imunológicas e sistêmicas dos estados reacionais hanseníase.....	28
Tabela 6 -	Comparação entre as técnicas de avaliação da microcirculação.....	35
Tabela 7 -	Estatística descritiva e teste de normalidade da vasomotricidade.....	56
Tabela 8 -	Teste t para amostras independentes da vasomotricidade.....	57
Tabela 9 -	Teste U de Mann-Whitney para a variável “cardíaca”.....	58
Tabela 10 -	Estatística descritiva e teste de normalidade de vasomotricidade normalizada	61
Tabela 11 -	Teste t para amostras independentes componentes da vasomotricidade....	61
Tabela 12 -	Teste U de Mann-Whitney na variável N simpática.....	64
Tabela 13 -	Estatística descritiva e teste de normalidade dados iontoforese.....	65
Tabela 14 -	Teste t para amostras independentes dados da iontoforese.....	66
Tabela 15 -	Teste U de Mann-Whitney das variáveis da iontoforese.....	70
Tabela 16 -	Teste t para amostras pareadas, comparação dos controles das variáveis da iontoforese ACh X NPS.....	73
Tabela 17 -	Teste de Wilcoxon, comparação dos controles na iontoforese.....	75
Tabela 18 -	Teste t para amostras pareadas, comparação dos casos na iontoforese.....	77
Tabela 19 -	Teste de Wilcoxon, comparação dos casos iontoforese.....	79
Tabela 20 -	Comparação das variáveis analisadas no Microscan.....	82
Tabela 21 -	Estatística descritiva e teste de normalidade das variáveis do Microscan..	88
Tabela 22 -	Teste t para amostras independentes nas variáveis Microscan.....	88
Tabela 23 -	Teste U de Mann-Whitney para variáveis Microscan.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenil Ciclase
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BB	Borderline borderline
BL	Borderline lepromatoso
BT	Borderline Tuberculóide
COX	Ciclooxigenase
CL	Células de Langerhans
DCF	Densidade capilar funcional
Cpm	Ciclo por minuto
IB	Índice baciloscópio
IL	Interleucina
IFN	Interferon
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ENL	Eritema nodoso Leproso
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
LDPM	Laser Doppler monitor
LDPI	Laser Doppler imagem
LEDs	Luzes emissoras de diodo
LL	Lepromatoso-lepromatoso
MB	Multibacilar
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico
OPS	Luz ortogonal polarizada
ONGs	Organizações não governamentais
NPS	Nitroprussiato de sódio
PB	Paucibacilar
PGI-2	Prostaciclina2

PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
PQT	Poliqumioterapia
PU	Unidade de perfusão
RBCV	Velocidade da hemácia
SDF	SidestreamDark Field – Videomicroscopia de campo escuro
Th	Linfócitos T helper
TT	Tuberculóide

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
1.1	<b>Objetivos geral</b> .....	44
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	44
1.2.1	<u>Objetivo específico 1</u> .....	44
1.2.2	<u>Objetivo específico 2</u> .....	44
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
2.1	<b>Critério de inclusão</b> .....	45
2.2	<b>Critério de exclusão</b> .....	46
2.3	<b>Avaliação com Microscan e com LDF</b> .....	46
2.4	<b>Análise estatística</b> .....	53
3	<b>RESULTADOS</b> .....	56
3.1	<b>Vasomotricidade</b> .....	56
3.2	<b>Iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato de sódio</b> .....	65
3.3	<b>Comparação da iontoforese entre Ach e NPS</b> .....	72
3.4	<b>Microscan</b> .....	82
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	91
4.1	<b>SDF(Microscan)</b> .....	91
4.2	<b>Vasomotricidade</b> .....	94
4.3	<b>Iontoforese</b> .....	96
4.4	<b>Resumo dos achados</b> .....	100
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	101
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102



## INTRODUÇÃO

A hanseníase, conhecida na história como lepra (do grego lepros, descamação), é uma das doenças mais antigas da humanidade, havendo evidências do acometimento nas múmias do Egito (2000 a.c.), na Grécia antiga e descrita na Bíblia. É uma doença infecciosa crônica, granulomatosa, causada por um agente bacteriano, *Mycobacterium leprae* e acomete pele, sistema nervoso periférico e ocasionalmente outros órgãos e sistemas (SOUZA, 1997).

A enfermidade sempre foi marcada pelo grande estigma social, desde as suas primeiras descrições. E infelizmente, este estigma social perdura até os dias de hoje (ROOSTA *ET AL.*, 2013). Um recente estudo, em uma comunidade rural na Índia (THILAKAVATHI *ET AL.*, 2012), mostra como este repúdio, isolamento e rejeição social afeta a vida social dos pacientes e até mesmo a própria aceitação do diagnóstico e consequentemente seu tratamento.

Desde as primeiras descrições, a hanseníase é relacionada com conceitos tais como pecado, impureza, punição e castigo divino (Bíblia). Isto era observado com o confinamento à margem da sociedade a que estes doentes eram submetidos nos leprosários, locais que serviam mais para afastar os doentes das pessoas do que para tratá-los e oferecer conforto (GOMES, 2001). A ideia levantada de hereditariedade da doença, na era pré-microbiológica, foi derrubada com a descoberta do agente causador da doença no século XVII por Gerhard Armauer Hansen (PREVEDELLO, 2007).

No Brasil os primeiros relatos da doença são de 1600, porém somente em 1935 tiveram início as primeiras ideias para resolução desta marginalização em leprosários com a criação de ligas para auxílio da família. Oswaldo Cruz, Emílio Ribas e Alfredo da Matta reconheceram a hanseníase como problema de saúde pública e em 1941 foi então criado o serviço Nacional de Lepra com a finalidade de organizar e estabelecer condutas de controle da doença. A hanseníase ainda é nos dias de hoje um problema de saúde pública importante no mundo persistindo como endemia em 15 países ao final de 2000. Em 1989, o Brasil ocupava a quarta posição mundial em número de casos, perdendo apenas para Índia, Birmânia e Nigéria. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989).

Pela Organização Mundial de Saúde (OMS), considera-se endêmico todo o país em que a incidência se encontra na faixa acima de 1,0/100.000 habitantes. No mundo existiam

597.232 casos registrados, e foram diagnosticados 719.330 casos novos. O Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo, perdendo apenas para a Índia (SAÚDE., 2002).

Nas últimas duas décadas, a prevalência global da infecção lepra ativa caiu quase 90% pelos esforços combinados da Organização Mundial de Saúde (OMS), governos locais, profissionais de saúde e organizações não governamentais (ONGs), no entanto, uma queda em paralelo na incidência ou taxa de detecção de novos casos não ocorreu. De 1994 a 2011, mais de 100 mil novos casos foram detectados ao ano, sendo a Índia o país com maior número de casos (DOGRA *et al.*, 2013).

No Brasil, apenas em 2005 no Rio de Janeiro foram diagnosticados 2497 novos casos, com índice de detecção de 1.9 para cada 100.000 habitantes (NERY *ET AL.*, 2009). Apesar da baixa infectividade do *M. leprae*, a doença sempre foi de difícil controle em países subdesenvolvidos. Sendo o homem a única fonte de infecção conhecida, a doença depende, provavelmente, para sua disseminação de grandes aglomerações populacionais junto a condições precárias de saneamento básico e de saúde e, desta forma, os países subdesenvolvidos são mais afetados (TREU, 2010). A enfermidade não se apresenta de forma única, havendo diversos espectros de evolução. Para facilitar o diagnóstico e tratamento em país onde a doença é endêmica, o Ministério da Saúde (MS)(SAÚDE., 2002) definiu o caso de hanseníase quando uma pessoa apresenta uma ou mais de uma das seguintes características e requer quimioterapia: lesões de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo(s) com espessamento neural e baciloscopia positiva.

Como já descrito, dependendo da interação entre agente e hospedeiro, ocorrerá diferentes formas clínicas da hanseníase. A diversidade destas formas clínicas já era observada desde as primeiras descrições da doença em 1947 por Danielssen e Boeck, que propunham 2 formas polares e distintas. E em 1977, Degos propôs que existiam formas mistas e que havia possibilidade de transformação de uma forma clínica em outra.

Em decorrências destas múltiplas formas clínicas, algumas classificações foram criadas na tentativa de sistematizar a nomenclatura para melhorar o reconhecimento, diagnóstico e tratamento da doença.

A classificação de Madri (1953), que adota critérios de polaridade, é a mais acurada para descrição clínica da doença (SAÚDE., 2002). Baseia-se nas características clínicas e nos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculóide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma *borderline* (B) ou

dimorfa (D). Muito discutida no 6th International Congress of Leprosy em 1953, ainda é hoje uma das classificações mais utilizadas.

A classificação da doença se baseia em quatro grandes critérios: clínico, bacteriológico, histológico e imunológico (tabela 1).

Tabela 1 - Critérios da classificação de Madri. A hanseníase é classificada segundo quatro grandes critérios: clínico, bacteriológico, histológico e imunológico.

<b>Critérios</b>	<b>Características</b>
<b>Clínico</b>	Aspectos das lesões cutâneas, variando em número, extensão, definição demargens e simetria de distribuição
<b>Imunológico</b>	Teste da lepromina – reação de Mitsuda, com leitura após 21 a 28 dias. Atualmente considera-se positiva a intradermorreação quando há formação de pápula maior ou igual a 6 mm e negativa de 0 a 5 mm de diâmetro.
<b>Histológicos</b>	Aspectos histopatológicos das lesões, variando de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário.
<b>Bacteriológico</b>	Presença ou ausência do <i>M. leprae</i> , e seus aspectos morfológicos, variando de numerosos, íntegros e agrupados, formando globias, a raros, fragmentados e ausentes.

Na tabela 2 observamos a correlação entre a reação de Mitsuda e a baciloscopia com as formas clínicas pela classificação de Madri.

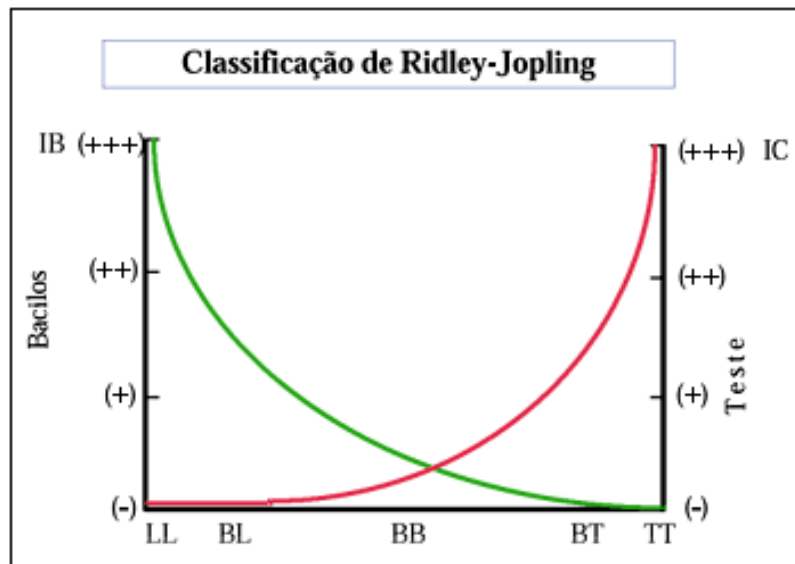
Tabela 2 - Correlação entre baciloscopia e reação de Mitsuda, na classificação de Madri.

	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchowiana (V)
<b>Reação de Mitsuda</b>	Acima de 6mm = Positiva 0 a 5mm = Negativa	Acima de 6mm = Positiva	0 a 5mm = Negativa	0 a 5mm = Negativa
<b>Baciloscopia</b>	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

Outra classificação bastante conhecida, e aceita internacionalmente, é a classificação de Ridley & Jopling (RIDLEY E JOPLING, 1966). Nesta classificação existem as formas polares do espectro que são consideradas estáveis e subgrupos dentro do espectro. Baseia-se em critérios clínicos e bacteriológicos enfatizando os aspectos histológicos e imunológicos.

Nesta classificação observamos as 2 formas polares: tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL). E três subgrupos: *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline*-*borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL). Na figura 1 podemos observar a relação entre o espectro clínico e a resposta imune celular (GOULART, 2002).

Figura 1 - Espectro clínico da hanseníase segundo classificação de Ridley & Jopling



Fonte: adaptado de (GOULART, I. M. *et al.*, 2002).

A imunidade celular (IC), medida pelo teste de Mitsuda, é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice bacilos cópico (IB). LL: lepra lepromatosa (forma polar estável); TT: tuberculóide tuberculóide (forma polar estável) e BL, BB e BT: formas borderlines, instáveis.

Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação para facilitar o reconhecimento, diagnóstico e tratamento da doença baseada na provável população bacilar, que, por sua vez, relaciona-se às formas clínicas. Esta classificação é indicada para trabalho de campo. Nesta classificação os pacientes são divididos em dois grupos: paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Na classificação

operacional da OMS são classificados como PB aqueles doentes que apresentam cinco ou menos lesões de pele, já os MB quando apresentam um número de lesões cutâneas maiores que cinco. Contudo, se o exame baciloscópico estiver disponível, os pacientes que apresentarem baciloscopia (pesquisa de bacilos no esfregaço de linfa) positiva são classificados como MB, independente do número de lesões cutâneas (NORMAN *ET AL.*, 2004). A baciloscopia (raspado intradérmico) é realizada em pontos definidos, como lóbulos de orelhas, cotovelos, joelhos e nas lesões cutâneas. Na tabela 3 podemos ver a correta correlação entre as classificações citadas.

Tabela 3 - Tabela de correlação entre as classificações de Madri (1953), Ridley & Jopling (1966) e OMS (1982) para hanseníase. Adaptado de (Saúde., 2002).

CLASSIFICAÇÃO		TIPOS	CLÍNICOS	
<b>Madri</b>	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchowiana(V)
<b>Ridley &amp; Jopling</b>		Tuberculóide-tuberculóide (TT)	Borderline Tuberculóide (BT), Borderline-borderline (BB) e Borderline-lepromatoso (BL)	Lepromatoso-lepromatoso (LL)
<b>OMS</b>	Paucibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Multibacilar

O *Mycobacterium leprae*, ou bacilo de Hansen, foi descrito em 1873 pelo norueguês Gerhard Armauer Hansen, razão pela qual é chamado de bacilo de Hansen (SAÚDE., 2002).

É um parasita intracelular obrigatório que infecta principalmente macrófagos teciduais, e com predileção pelas células de Schwann (que envolve axônios de nervos periféricos) e células endoteliais (KAPLAN E COHN, 1986) que possui membrana plasmática e parede celular rica em lipídeos complexos (peptideoglicanos e lipopolissacarídeos) (Burchard e Bierther, 1985) e se apresenta como bastonete álcool-ácido resistente, corado pelo método Ziehl-Neelsen, onde aparece como estrutura vermelha ao exame microscópico, com características de formação de globias, grupamentos bacterianos, geralmente arredondados.

O bacilo é termossensível, acometendo principalmente áreas mais frias como extremidades, lóbulos das orelhas e ponta do nariz, porém podendo chegar a atingir todo o tegumento (RAMOS-E-SILVA E REBELLO, 2001) e tem a característica clássica de ter elevado tropismo pela pele e nervos periféricos, provavelmente devido à sua origem embriológica comum.

O *M. leprae* tem características muito peculiares que o difere do restante das micobactérias, tais como: não crescer em meios de cultura de forma eficaz, seu tempo de duplicação avaliado pela inoculação no coxim plantar do camundongo é de 11 a 13 dias (KRUSHAT *ET AL.*, 1976; WHEELER E GREGORY, 1980), precisa de condições de temperatura necessárias ao crescimento: 27° a 30°C (LEVY E MURRAY, 1976), possui pobreza metabólica em especial referente às enzimas que se contrapõem aos efeitos tóxicos dos metabólitos reativos de oxigênio. Apenas a superóxido-dismutase é detectada, não se identificando catalase ou peroxidase (WHEELER E GREGORY, 1980; TREU, 2010).

A dificuldade de cultivo do bacilo e de sua inoculação em animais dificulta as pesquisas e identificação de seus diversos componentes. Somente em 1960 houve sucesso na inoculação desta micobactéria no coxim plantar do camundongo Balb\C (local de menor temperatura corporal) e em uma espécie de tatu (*Dasypus novemcintus*, Linn.), que é um dos mamíferos de menor temperatura basal (KIRCHHEIMER E STORRS, 1971).

Acredita-se que a deficiência metabólica do *M. leprae* seja a causa de sua proliferação lenta, que limita seu crescimento na pata do camundongo (SHEPARD, 1960) e faz com que um indivíduo virchowiano sem resistência tenha, na ocasião em que a doença é detectada e na ausência de tratamento, apenas cerca de 10% de bacilos morfologicamente viáveis (SHEPARD E MCRAE, 1965).

Devido a essas características intrínsecas do bacilo quanto à necessidade de temperatura ideal de sobrevivência e proliferação, a preferência do desenvolvimento das lesões hansênicas humanas se dá na pele, nervos periféricos, mucosa nasal, e em menor importância, do ponto de vista de intensidade das lesões e viabilidade bacilar, da Hanseníase nas vísceras, excetuando-se a laringe e os testículos (TRIFILIO, 1991).

A forma como o *M. leprae* penetra no sistema nervoso periférico sempre foi alvo de discussão. Em 1964, foi sugerido que esta penetração não se fazia ao nível dos troncos nervosos, uma vez que o padrão do capilar endoneural dificultaria a penetração bacilar por esta via. Na membrana perineural, caracterizada pelas suas múltiplas capas de células meningoteliais modificadas alternadas com capas de membranas basais contínuas, o *M. leprae* teria dificuldade de penetração por contiguidade. Assim foi sugerido que esta penetração se

faça em nível terminal dos ramos nervosos sensitivos cutâneos, local onde os axônios são desprovidos de perinervo e de bainha de mielina (KHANOLKAR, 1964; BODDINGIUS, 1982) acreditando-se em um esquema de envolvimento progressivo das terminações nervosas pelos bacilos e conseqüente agressão inflamatória nos tipos polares.

Apenas 5% das pessoas expostas ao *M. leprae* desenvolvem a doença. Isto configura sua baixa antigenicidade que também pode explicar o longo período de incubação do bacilo que pode chegar aos 30 anos (média de 8,4 anos) (TRINDADE, M. A. B., 1996). Depois de sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, acredita-se que o *M. leprae*, durante este longo período de incubação, se proteja dentro no sistema nervoso periférico em especial no interior das células de Schwann, onde podem se proliferar (BIRDI E ANTIA, 2003). Estas células são macrófagos não profissionais que, embora fagocitem o bacilo, não conseguem processá-lo nem tampouco apresentar seus componentes antigênicos aos linfócitos ou, estimulados por estes, desenvolverem a ação lítica sobre os bacilos. Porém, no momento em que a proliferação bacilar provoca a rotura dos limites dos compartimentos axônicos ou das células de Schwann e os bacilos entram em contato com o interstício endoneural ou com a derme adjacente, inicia-se a reação inflamatória. O desenvolvimento posterior da doença vai depender da reatividade imunocelular do hospedeiro.

Além disso, destes 5% que desenvolvem a doença, cerca de 70% apresentará a forma tuberculóide caracterizada pela presença de resposta imune (REA, 1999). Sua disseminação para outros tecidos (linfonodos, olhos, testículos, fígado) pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação (MANHÃES, 2011).

Nas formas paucibacilares observa-se resposta imune com presença, principalmente, de linfócitos T helper CD4+ (MODLIN *ET AL.*, 1983), responsáveis pela produção de IL-2, que formam um anel ao redor dos macrófagos e das células epitelióides (SALGAME *ET AL.*, 1983). Estas formas apresentam teste da tuberculina positiva (hipersensibilidade tardia). Já nos multibacilares se observa um menor número de linfócitos T com predomínio do CD8+ (VAN VOORHIS *ET AL.*, 1982).

Salgame e Yamamura e colaboradores (SALGAME *ET AL.*, 1983; YAMAMURA *ET AL.*, 1991) mostraram que os pacientes tuberculóides apresentam padrão preferencialmente Th1 (IL-2 e INF gama) e os virchowianos padrão de citocinas Th2 (IL4, 5 e 10).

Foi proposto que a resposta dos linfócitos T nos pacientes virchowianos pode ser explicada, em parte, pelo fato de que nas lesões cutâneas existe infiltrado de células que produzem IL-4 e IL-10 (padrão Th2) caracterizando suscetibilidade à infecção e os

tuberculóides com lesões infiltradas por linfócitos produtores de IFN gama (Th1) que se correlaciona à resistência (YAMAMURA *ET AL.*, 1991; SIELING *ET AL.*, 1993).

Recentemente foi mostrado em ensaios *in vitro*, com células mononucleares de sangue periférico, que o glicolípido fenólico-I (PGL-1) inibe a produção de IL-2 e a expressão de várias moléculas associadas à ativação de linfócitos T humanos (ALVIM, 1998; MACHADO, 2000). Este estudo corroborou o estudo de Prasad e colaboradores que sugeriam que o PGL1 seria o componente do *M. leprae* responsável por induzir a anergia dos pacientes virchowianos, interferindo com a ativação dos linfócitos T (PRASAD *ET AL.*, 1987).

Sabemos que a epiderme constitui o maior órgão periférico do sistema imunológico. Neste sistema destacam-se as células de Langerhans (CL) que são células dendríticas que se diferenciam no epitélio e localizam-se na camada mais basal entre as células epiteliais que são células que migram para linfonodos onde apresentam antígenos para linfócitos T e são capazes de realizar pinocitose. Essas células modulam reações de hipersensibilidade por contato na pele e são identificadas pela expressão de CD1 e expressam moléculas MHC classe II (KATZ *ET AL.*, 1979; CZERNIELEWSKI E BAGOT, 1986).

Na hanseníase, o número de CLs parece estar relacionado com a existência de resposta imune mediada por células. Nos virchowianos, as CLs estão presentes em número igual ou menor em relação à pele normal (MACHADO, 1992). Já nas formas tuberculóides, as CLs se encontram aumentadas em relação às formas multibacilares (MACHADO, 1993).

De uma forma geral, podemos dizer que a resposta imune do hospedeiro ao bacilo constitui um espectro, que se expressa nas diferentes formas clínicas da doença. Ou seja, quando o indivíduo possui resposta imunológica competente, evolui para a forma clínica localizada e não contagiosa da doença; por outro lado se sua resposta imune não é efetiva, uma forma difusa e contagiosa é desenvolvida. Entre estes dois extremos, encontram-se as formas intermediárias, que refletem, também, graduais variações da resistência ao bacilo (SOUZA, 1997).

Como já visto, dependendo da imunidade do hospedeiro ao bacilo, diversas formas clínicas podem ser encontradas.

As lesões dermatológicas na hanseníase podem se manifestar através de diferentes tipos de lesões que se apresentam caracteristicamente como lesões parestésicas, hipoestésicas ou anestésicas. Dentre estes tipos de lesões cutâneas podemos encontrar: máculas (manchas que podem ser hipercrômicas, hipocrômicas ou mesmo quase acrômicas); placas (lesões que se estendem em superfície por vários centímetros, podendo ser únicas ou múltiplas e até mesmo confluir e formar placas); nódulo (lesão sólida, circunscrita, elevada ou não, de 1 a 3



cm de tamanho, em geral é um tipo de lesão mais palpável que visível, se localiza em qualquer região do corpo e se localiza com maior frequência, na face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas); infiltração (aumento da espessura e consistência da pele, com menor evidência dos sulcos, limites imprecisos, acompanhando-se, às vezes, de eritema discreto). Pela vitropressão, surge fundo de cor café com leite. Resulta da presença na derme de infiltrado celular, às vezes com edema e vasodilatação, muito característico de alguns pacientes multibacilares (TREU, 2010). De uma forma geral, os pacientes com hanseníase tuberculóide apresentam máculas ou placas hipo ou anestésicas, algumas com bordas elevadas e centro mais claro (figura 2). Já os pacientes virchowianos, em geral, apresentam manifestações clínicas mais exuberantes com infiltração, nódulos, tubérculos, placas, madarose, dentre outras (figura 3 e 4). E entre estes dois pólos, encontramos as formas borderlines, que podem apresentar lesões tipo queijo suíço (figura 5).

Figura 2 - Hanseníase tuberculóide infantil. Nota-se placa única com borda eritematosa elevada e centro claro.



Fonte: A autora, 2010

Figura 3 - Paciente com hanseníase virchowiana apresentando infiltração de todo tegumento mais lesões tipo eritema nodoso lepromatoso característicos de reação tipo II.



Fonte: A autora, 2010.

Figura 4 - Paciente com hanseníase virchowiana apresentando lesões nodulares tipo tubérculos e infiltração de pavilhões auriculares e nariz.



Fonte: A autora, 2010.

Figura 5- lesões tipo queijo suíço na hanseníase borderline. Notam-se placas eritemato-infiltradas com bordas mais elevadas.



Fonte: A autora, 2010

Além do acometimento cutâneo a hanseníase é caracterizada também pelo acometimento dos nervos periféricos. De uma forma geral, no nervo destaca-se o acometimento de fibras autonômicas, sensitivas e motoras. O acometimento das fibras cutâneas resulta na perda da sensibilidade à dor, ao frio, ao calor e, mais tardiamente, também ao tato (KAJIHARA *ET AL.*, 2000). Já as manifestações autonômicas são caracterizadas pela perda da sudorese, resultando em pele ressecada.

Se houver acometimento do tronco dos nervos periféricos, há acometimento sensitivo, autonômico e motor no território do(s) nervo(s) afetado(s), resultando em perda de todas as formas de sensibilidade (dor, frio, calor, tato, parestesia e posição segmentar) e de paresia, paralisia e até atrofia muscular (ABBOT *ET AL.*, 1996; VAN BRAKEL E KHAWAS, 1996). Estas alterações neurológicas, quando diagnosticadas tardiamente e tratadas erroneamente, podem gerar incapacidades físicas que podem evoluir para deformidades, muitas vezes responsáveis pelos estigmas sociais (SAÚDE., 2002).

As neurites tão características da hanseníase ocorrem em consequência dos processos inflamatórios dos nervos. Esta neurite resulta, principalmente, de um processo inflamatório

dos nervos periféricos, cuja intensidade, extensão e distribuição dependem da forma clínica, da fase evolutiva da doença e dos fenômenos de agudização durante os episódios reacionais, ou seja, a reação tipo 1 e 2, podendo acometer ramos cutâneos ou tronco do nervo de maneira isolada (mononeuropatia) ou múltipla (mononeuropatia múltipla). O acometimento nervoso aumenta com a evolução da doença, com a idade do paciente e é maior nas formas multibacilares (MANHÃES, 2011).

Atualmente, acredita-se na possibilidade de três mecanismos causadores da neurite: ação do bacilo nos nervos, reação do organismo ao bacilo ou por ambas. Na tabela 4 estão expostos os três tipos de mecanismos de lesão dos neurônios periféricos que podem estar presentes durante as diferentes fases da doença (SHETTY *ET AL.*, 2000).

Tabela 4 - Tipos de mecanismos de lesão de nervos periféricos na hanseníase.

<b>Mecanismos de lesão dos nervos periféricos na hanseníase</b>	
1)	Danos neurais devidos à persistência de antígenos bacterianos na célula de Schwann ou axônios, que podem justificar lesões silenciosas e progressivas dos nervos periféricos, após tratamento quimioterápico
2)	Alterações metabólicas nas células dos nervos periféricos, tais como as células de Schwann, células endoteliais e fibroblastos, como efeito direto ou indireto da presença de um bacilo viável;
3)	Alterações causadas pelo influxo de células inflamatórias e seus mediadores. Podem resultar em uma reação contra componentes do nervo e, dependendo de fatores anatômicos, pode resultar em compressão do mesmo. Uma forma de lesão aguda do nervo é geralmente vista nas reações reversas. No entanto, o gatilho da precipitação dessas reações ainda não é bem conhecido.

Na clínica observamos dor e espessamento dos nervos periféricos, perda de sensibilidade nas áreas inervadas (principalmente nos olhos, mãos e pés) e perda de força nos músculos inervados por esses nervos (principalmente nas pálpebras e nos membros superiores e inferiores). A neuropatia inflamatória pode ser aguda, crônica, silenciosa ou recorrente (SABIN TD, 2005), com quadro objetivo de hipersensibilidade à palpação, dor intensa, espontânea ou desencadeada pela palpação (NEGESSE, 1988).

A neurite aguda se apresenta de forma abrupta e é caracterizada por dor intensa e edema. Em geral, inicialmente não há evidência de disfunção do nervo, mas, frequentemente, a neurite torna-se crônica e passa a evidenciar esse comprometimento, inicialmente através da perda da capacidade de suar (JOB, 1996), causando ressecamento na pele, e posteriormente perda de sensibilidade e força muscular, com dormência e paralisia nas áreas inervadas pelos nervos comprometidos.

Com frequência, as estruturas neurais desenvolvem edema, resultando em espessamento dos nervos, com alteração da função sensitiva ou sensitivo-motora, que podem ser reversíveis se houver controle do edema. Nesta forma de neurite a duração dos sintomas tem no máximo 6 meses de evolução e responde aos corticosteróides (MANHÃES, 2011)(GARBINO JA, 2003).

Por outro lado a neurite crônica é marcada por um início insidioso e lentamente progressivo, apresentando, primeiramente, leves alterações sensitivas, progredindo para alterações sensitivo-motoras e com sintomatologia dolorosa variável, com duração de mais de seis meses dos sintomas. Em geral não respondem a corticoterapia. Os sinais e sintomas de inflamação, edema e dor, geralmente reaparecem dentro do período de três meses após o término da terapêutica (GARBINO JA, 2003).

A neurite silenciosa, em geral, não é dolorosa. Decorre da alteração da função sensitiva ou sensitivo-motora que não é percebida pelo paciente. Em 1994 foi descrita a neurite silenciosa com os seguintes sinais clínicos e sintomas: comprometimento sensitivo ou motor sem sinais cutâneos de reação reversa, eritema nodoso lepromatoso (ENL), sem espessamento de nervo que tenha sido notado pelo paciente e sem queixa de dor neuropática (dor tipo choque, queimação ou shooting pain) ou parestesia que tenha sido mencionada pelo paciente sem ser especificamente questionado. Esta neuropatia também responde aos corticosteroides (GARBINO JA, 2003)(VAN BRAKEL *ET AL.*, 1994).

Existe ainda a neuropatia recorrente que se caracteriza por episódio de acometimento agudo de nervo periférico em período maior de três meses após a interrupção da terapêutica, durante o qual nenhum sinal ou sintoma de neurite tenha ficado evidente (SHETTY E ANTIA, 1997).

A hanseníase teria uma evolução monomórfica se não fossem os estados reacionais. Em qualquer momento da evolução da doença, ou seja, antes, durante ou após a PQT, os doentes podem apresentar os chamados estados reacionais que são eventos inflamatórios agudos súbitos, que dependem da produção e liberação de mediadores imunes causadas pela ativação transitória da resposta imune celular e que muitas vezes pode chamar mais atenção do que as próprias lesões primárias da hanseníase, pela riqueza de sinais e sintomas.

Alguns fatores desencadeantes estão relacionados, tais como: infecção intercorrente, vacinação, gravidez, puerpério, medicamentos iodados, estresse físico e emocional (MANHÃES, 2011).

Na tabela 5 podemos observar a classificação e as características destes estados reacionais (JAC., 1995).

Tabela 5 - Classificação e características clínicas, imunológicas e sistêmicas dos estados reacionais hansênicos. (TRINDADE, M. A. B. (1996). , 1996; FOSS NT, 2003).

<b>Tipo de Reação</b>	<b>Tipo 1 ou Reação reversa (RR)</b>	<b>Tipo 2 ou Eritema Nodoso Lepromatoso (ENL) ou Eritema Multiforme (EM)</b>
Imunidade	Mediada pela imunidade celular, este tipo de reação em geral surge nos primeiros meses do tratamento (2° e o 6°meses)	Síndrome desencadeada por imunocomplexos, mas a imunidade celular possui importância em etapas iniciais do processo. Observa-se aumento de citocinas séricas (TNFalfa e o interferon gama).
Tipo clínico de hanseníase	Classicamente se apresenta nas formas intermediárias (BT, BB e BL)	Formas multibacilares exclusivamente
Tipo de lesão cutânea	Exacerbação de lesões pré-existentes, que se tornam edemaciadas, eritematosas e brilhantes	Nódulos eritematosos dolorosos, isolados ou disseminados surgem de forma abrupta na pele e tecido subcutâneo.
Neurite	As neurites mostram-se frequentes e graves, podendo ser a única manifestação clínica. Se não tratadas precocemente, deixam sequelas. Os nervos mais comprometidos são os ulnares e medianos nos membros superiores, fibular comum e tibial posterior nos membros inferiores e facial e grande auricular no segmento cefálico	Pode ocorrer
Manifestações sistêmicas	Podem vir acompanhados de febre baixa e edema facial	Febre e linfadenopatia, uveíte, orquite, glomerulonefrite, artralgia, mialgia, congestão nasal, epistaxe, conjutivite, rash cutâneo, perda de peso e/ou edema

Outra forma também considerada como episódios reacional são as neurites, já descritas anteriormente, que podem ocorrer de forma isolada ou associada à reação tipo 1 ou tipo 2.

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico e pode ser corroborado por exames complementares (SAÚDE., 2002). A fim de facilitar o reconhecimento e diagnóstico de um caso de hanseníase, o MS reconhece o diagnóstico de hanseníase quando apresenta

uma ou mais de uma das seguintes características: lesão de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo(s) com espessamento neural ou baciloscopia positiva.

Apesar de a clínica ter grande valor diagnóstico, outras avaliações e exames podem auxiliar na confirmação diagnóstica e na correta classificação. Dentre eles destacam-se: pesquisa da sensibilidade, baciloscopia e histopatologia.

A recomendação do MS para a abordagem do paciente com suspeita de hanseníase inclui: anamnese, exame físico acurado e exames complementares.

É de suma importância a investigação e abordagem da história epidemiológica do paciente e seus contatos, para se descobrir a origem da doença e para o diagnóstico precoce de novos casos de hanseníase. Do exame físico deve constar o exame dermatológico e neurológico criterioso, avaliando as lesões de pele características da hanseníase e suas possíveis alterações de sensibilidade. As alterações de sensibilidade, típicas da hanseníase, ocorrem em progressão, havendo inicialmente alteração na sensibilidade térmica, seguida pela dolorosa e, por último, tátil (PIMENTEL *ET AL.*, 2004).

Para avaliação da sensibilidade térmica é indicado o uso de dois tubos de vidro, um contendo água fria e no outro, água aquecida (abaixo de 45°C). Toca-se a pele sã e a área suspeita com a extremidade dos tubos frio e quente, alternadamente, solicitando-se ao indivíduo que identifique as sensações de frio e de calor. Infelizmente, muitas vezes este teste é impossibilitado na prática diária dos ambulatórios, e assim fazemos a pesquisa de sensibilidade utilizando um algodão embebido em éter. Pequenas variações de temperatura também devem ser valorizadas.

Para avaliar a sensibilidade dolorosa, utilizamos a ponta de uma caneta esferográfica. Essa pesquisa é a mais importante para prevenir incapacidades, pois detecta precocemente diminuição ou ausência de sensibilidade protetora do paciente.

Para a pesquisa da sensibilidade tátil utiliza-se o estesiômetro que consiste em um kit com um conjunto de monofilamentos de nylon, em seis diâmetros calibrados para exercer forças específicas, entre 0,05g e 300g, quando aplicados sobre a pele e que, de acordo com sua cor, corresponde a uma graduação. Muitas vezes, quando o estesiômetro não se encontra disponível, esta avaliação pode ser feita com uma mecha fina de algodão seco. Após a comparação dos resultados dos toques, pode-se concluir sobre a alteração de sensibilidade tátil nas lesões ou nas áreas suspeitas (TREU, 2010)(SAÚDE., 2002).

O exame neurológico nestes casos deve ser criterioso. Vale lembrar que em estágio inicial de doença, a neurite hanseniana não apresenta um dano neural demonstrável. Porém este diagnóstico precoce se faz necessário, uma vez que sem o tratamento adequado, a neurite

pode cronificar e passar a evidenciar o comprometimento dos nervos periféricos, caracterizado pela perda da capacidade de suar (anidrose), perda de pelos (alopecia), terço distal das sobrancelhas (madarose), a perda das sensibilidades térmica, dolorosa e tátil, e até a paralisia muscular. Nesta avaliação deve-se avaliar o espessamento e a dor espontânea ou não, sempre comparando com o lado contralateral.

É de suma importância conhecer quais nervos periféricos e suas respectivas áreas inervadas são mais comumente acometidos na hanseníase. Dentre eles destacam-se (ORSINI, 1952):

- Face - trigêmeo e facial, que podem causar alterações na face, nos olhos e no nariz;
- Braços - radial, ulnar e mediano, que podem causar alterações nos braços e mãos;
- Pernas - fibular comum e tibial posterior. Podem causar alterações nas pernas e pés.

Alguns exames complementares podem ser usados no diagnóstico da hanseníase. Entre eles se destacam:

a) Prova da histamina: Neste exame deposita-se gotas de cloridrato ou fosfato de histamina a 1/1.000 na lesão maculosa suspeita e na pele circunvizinha, livre de lesões e, em seguida, fazem-se pequenas escarificações superficiais através das gotas, sem causar sangramento. Este teste é muito útil em caso de lesões hipocrômicas.

O que se espera na pele normal é a chamada “tríplice reação de Lewis” completa, que se caracteriza pela formação de um eritema primário cerca de 20 segundos após a escarificação através da histamina, seguido por um eritema reflexo ou secundário em até 40 segundos e finalmente, surge uma pápula urticariforme ou edematosa após um a dois minutos. Nos casos de lesões suspeitas de hanseníase, esperamos encontrar a falta do eritema secundário ou reflexo, devido às alterações das terminações nervosas autonômicas nos vasos sanguíneos, e desta forma dizemos que a reação de Lewis é incompleta (ORSINI, 1952).

Este exame é muito útil nos pacientes de fototipos baixos, no qual é mais fácil a visualização do eritema. Em indivíduos melanodérmicos, a avaliação do exame pode ser comprometida uma vez que a visualização do eritema não é tão nítida.

b) Prova da pilocarpina: técnica usada em pacientes melanodérmicos e/ou nas lesões eritematopigmentadas, para avaliar a integridade das fibras autonômicas. O teste consiste em pincelar tintura de iodo (ou lugol) na pele lesada e circunvizinha, seguido da injeção intradérmica de 0.1 mL de pilocarpina a 0,5% ou 1% em ambas as áreas. Deve-se enxugar imediatamente as gotículas que reflúem; pulverizar amido e por fim, aguardar alguns minutos. A avaliação nas peles normais consiste no surgimento de grandes quantidades de pontos de cor azul-escura, que corresponde à mistura de amido, suor e iodo.



Em contrapartida, na lesão hansênica, não ocorre sudorese, devido a lesão das terminações nervosas autônomas nas glândulas sudoríparas, e desta forma, o amido não muda a cor ou surgem apenas raros pontos azul-escuros (JOSHI, 1976).

c) Teste de Mitsudina: Também conhecida como teste de imunorreatividade à lepromina. É realizado através da injeção de uma suspensão de bacilos mortos em área de pele normal na face anterior do antebraço. A primeira leitura deve ser realizada após 48 horas (reação de Fernandez), a fim de avaliar o eritema. Já a segunda leitura, deve ser realizada após 21-30 dias quando se desenvolve a reação de Mitsuda (HASTINGS *ET AL.*, 1988). O teste é considerado Mitsuda positivo quando a infiltração nodular formada for maior que 5 mm de diâmetro ou quando ocorre ulceração. Este teste positivo indica certo grau de resistência à hanseníase, tanto mais pronunciado quanto mais intensa a resposta. O teste é Mitsuda negativo quando há ausência de reação ou endurecimento até 5mm, indicando resistência deficiente. Muitas vezes este teste é utilizado como avaliador de prognóstico da doença uma vez que pessoas com Mitsuda positivo tendem a desenvolver as formas benignas da doença e pessoas com Mitsuda negativo têm maior probabilidade de desenvolver a hanseníase virchowiana.

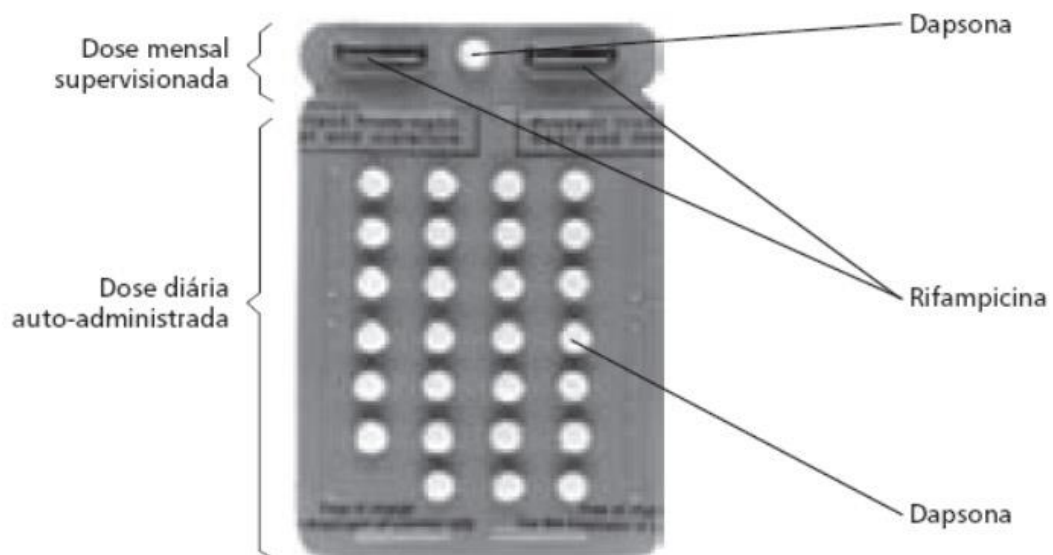
O controle da hanseníase começou com o uso de óleo chaulmoogra (SANTOS *ET AL.*, 2008), porém nas últimas três décadas a organização mundial da saúde (OMS) instituiu em 1994 o tratamento com esquema de múltiplas drogas, chamado de poliquimioterapia, na tentativa de erradicar a hanseníase.

Este tratamento é utilizado até os dias de hoje e é dividido em esquemas infantis e adultos e cada um destes subdividido em esquema para paucibacilar (PB) e para multibacilar (MB).

A poliquimioterapia paucibacilar (PQT-PB) consiste na combinação de rifampicina (dose mensal) e dapsona 100mg/dia e a PQT-MB na combinação tripla de rifampicina, dapsona e clofazimina, sendo rifampicina 600mg e clofazimina 300mg e dapsona 100mg na dose supervisionada-mensal mais dapsona 100mg e clofazimina 50mg nas doses domiciliares. Estes esquemas são distribuídos gratuitamente pelo MS e devem ser administrados seguindo algumas orientações para que o tratamento seja considerado satisfatório. Entre estas três drogas, a rifampicina é considerada a mais importante contra hanseníase, sendo incluída nas duas PQTs, a pauci e multibacilar (DEPS *ET AL.*, 2007). Os efeitos adversos desta droga incluem erupções cutâneas, púrpura trombocitopênica, hepatite, síndrome “flu-like”, anemia hemolítica, choque, insuficiência respiratória e insuficiência renal aguda (GOULART, I. M. B. *ET AL.*, 2002). A clofazamina é mais ativa quando administrada diariamente, ela é bem

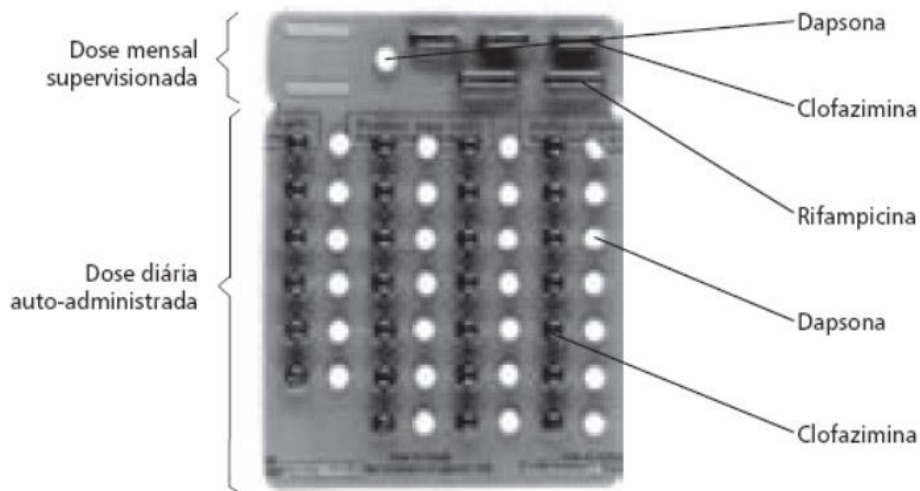
tolerada e virtualmente não tóxica na dose usual. A dapsona é muito segura na dose usada na PQT e de acordo com a OMS os efeitos colaterais são raros. O principal efeito colateral é reação alérgica cutânea, embora anemia hemolítica, metahemoglobinemia, agranulocitose, reações psicóticas e “síndrome dapsona” tenham sido reportadas (GOULART, I. M. B. *ET AL.*, 2002). A PQT-PB consiste em 6 cartelas-doses (1 por mês) que podem ser administradas em até 9 meses. Já a PQT-MB consiste em 12 doses com duração de até 18 meses. O paciente recebe em cada consulta mensal a cartela correspondente a dose do mês e no próprio consultório sob supervisão do profissional de saúde deve consumir a dose supervisionada do mês e leva para casa o restante da cartela que deve ser consumida diariamente (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Cartela PQT-PB – esquema de tratamento para hanseníase paucibacilar preconizada pelo Ministério da Saúde



Fonte: MS, 2000

Figura 7 - Cartela PQT MB - esquema de tratamento para hanseníase multibacilar preconizada pelo Ministério da Saúde.



Fonte: MS,2000

As taxas de recidiva são baixas (equivalente a 0 a 2,04 pessoas em 100 anos de vida) com o esquema de PQT-PB de seis meses e o PQT-MB de 24 meses (SAÚDE., 2002).

A realidade atual é que há uma necessidade crescente de manter e criar serviços de hanseníase de qualidade, que sejam acessíveis à população. Além disso, uma abordagem integrada e multidisciplinar destes doentes (auto cuidado, fisioterapia, cirurgia reconstrutiva, entre outros) se faz necessária, a fim de detectar e tratar precocemente, e por consequência, diminuir as deformidades que são responsáveis pelo estigma social. Alguns grupos acreditam que se todos estes esforços forem realizados com empenho e vontade política forte, a doença poderá ser erradicada em um futuro próximo.

Como já descrito, na hanseníase, há o acometimento de fibras autonômicas, sensitivas e motoras. A diminuição ou perda da sudorese, com consequente desenvolvimento de xerose (pele ressecada), é a principal manifestação do acometimento dessas fibras. Por outro lado, a perda de sensibilidade à dor, ao frio, ao calor e, mais tardiamente, também ao tato são consequências do acometimento das fibras cutâneas (KAJIHARA *ET AL.*, 2000). Quando há lesão no tronco dos nervos periféricos, há acometimento sensitivo, autonômico e motor no território do nervo afetado, resultando em perda de todas as formas de sensibilidade (dor, frio, calor, tato, parestesia e posição segmentar) e de paresia, paralisia e atrofia muscular (ABBOT *ET AL.*, 1996; VAN BRAKEL E KHAWAS, 1996; TREU, 2010).

O reflexo autonômico é um mecanismo fundamental para o controle da vasomotricidade da microcirculação (MORITA *ET AL.*, 1995).

Um recente estudo (TREU, 2010) avaliou, pela primeira vez na literatura, a microcirculação de pacientes portadores de hanseníase virchowiana. Porém até a presente data não existe na literatura o estudo da microcirculação de pacientes portadores de hanseníase tuberculóide. Desta forma o presente estudo tem como objetivo avaliar a microcirculação de pacientes portadores de hanseníase tuberculóide, comparando com controles na pele sã, através do uso da tecnologia de MicroScan® e laser-Doppler. Além disso, avaliamos a reatividade da microcirculação cutânea usando a hanseníase tuberculóide como um modelo de disautonomia vascular por denervação, através do uso de laser- Doppler associado à iontoforese.

Sabemos que várias doenças e até mesmo o envelhecimento apresentam alterações microvasculares importantes. Desta forma, a pesquisa pelo desenvolvimento e descoberta de novas técnicas que auxiliem na avaliação da rede microvascular se faz cada vez mais necessária.

Como a pele é o órgão mais facilmente acessível no homem, ela fornece o local adequado para avaliação da reatividade microvascular periférica. Além disso, os recentes avanços tecnológicos têm proporcionado métodos cada vez mais simples e não invasivos para avaliar a microcirculação cutânea. A extensão e variação de espessura da pele faz com que algumas áreas em particular como a face, tórax, dorso e membros se constituam em topografias de fácil aplicação da OPS (imagem espectral com luz ortogonal polarizada)/ SDF (videomicroscopia de campo escuro), visto ser a pele pouco espessa e bastante vascularizada nestas regiões. As superfícies palmo-plantares, pela grande espessura da camada córnea e a presença do estrato lúcido, oferecem maior dificuldade técnica à visualização transcutânea. Da mesma forma, as superfícies mucosas são áreas de eleição para o método por serem desprovidas de camada córnea ou granulosa e serem ricamente vascularizadas.

Assim, a microcirculação cutânea humana poderia ser usada como um marcador de substituição da função microvascular sistêmica em várias doenças. No entanto, isso levanta a questão da como representante da microcirculação da pele é a microcirculação em outros órgãos. Até a presente data, a pele tem sido usada como um modelo de microcirculação para investigar mecanismos vasculares em diversas doenças, incluindo a hipertensão e outros fatores de risco cardiovascular (FEIHL *ET AL.*, 2006; LEVY *ET AL.*, 2008), diabetes (LEVY *ET AL.*, 2008), sepse (ENGELBERGER *ET AL.*, 2011), por exemplo. Por mais de duas décadas, a avaliação não-invasiva da microcirculação cutânea foi baseada principalmente na

microscopia óptica e técnicas de laser Doppler. Embora, as técnicas derivadas da microscopia óptica, como a videocapilaroscopia ungueal, tenham encontrado aplicações clínicas, estas oferecem, principalmente, informações morfológicas sobre os microvasos (CUTOLO *ET AL.*, 2006). Recentemente, novas técnicas de avaliação da microcirculação têm sido desenvolvidas, incluindo OPS imagem (GRONER *ET AL.*, 1999) e, mais recentemente, a imagem SDF (GOEDHART *ET AL.*, 2007).

Considerando as técnicas empregadas no estudo da microcirculação cutânea podemos didaticamente dividi-las em técnicas para visualização de microvasos, chamadas microscopias intravitais (técnica OPS e SDF); e métodos para quantificar o fluxo sanguíneo e a vasomotricidade, cujo grande exemplo é o laser Doppler. Um resumo e comparação entre as diferentes técnicas disponíveis de avaliação da microcirculação estão resumidas na tabela 6:

Tabela 6 - Comparação entre as técnicas de avaliação da microcirculação (adaptada de TREU 2011)

	<b>NVC</b>	<b>OPS</b>	<b>SDF</b>	<b>LDF</b>
Técnica	Epiluminação	Imagem espectral com luz ortogonal polarizada	Microscopia de campo escuro	Laser doppler fluxometria
Visualização da Microcirculação	Sim	Sim	Sim	Não
Contraste	+	++	+++	Não Aplicável
Portabilidade	+	++	++++	++
Custo	++++	++	++	++++

NVC - videocapilaroscopia ungueal, OPS- imagem espectral com luz ortogonal polarizada, SDF – *Sidestream dark field* (videomicroscopia de campo escuro), LDF- laser Doppler fluxometria.

A microscopia intravital, tem sido há anos o padrão-ouro no estudo da microcirculação *in vivo*. Com esta técnica consegue-se obter uma avaliação acurada da morfologia capilar e vascular e também medidas da fisiologia vascular tais como a velocidade do fluxo sanguíneo, a densidade funcional capilar e a dinâmica da adesão dos leucócitos à parede vascular. Seu espectro de ação pode ser consideravelmente ampliado pelo uso concomitante de marcadores

plasmáticos fluorescentes e programas de captação e análise de imagens. A microscopia intravital apresenta, no entanto, alguns fatores restritivos, pois para ser utilizada pressupõe a introdução cirúrgica de uma prótese transparente intracutânea, localizada no dorso de animais previamente imobilizados, de modo a permitir a visualização direta da microcirculação. Tal procedimento inviabiliza seu uso rotineiro na avaliação da microcirculação cutânea humana por motivos óbvios (LINDBOM *ET AL.*, 1982).

Em 1999 Groner (GRONER *ET AL.*, 1999) desenvolveu uma técnica bastante similar à descrita por Slaaf e colaboradores (SLAAF *ET AL.*, 1987). Trata-se de uma técnica de microscopia intravital com dois polarizadores ortogonais e a sua utilização clínica com um pequeno aparelho manual permitiu a avaliação da microcirculação em órgãos expostos e tecidos. Desde então diversos estudos foram conduzidos para avaliação de diferentes doenças e condições clínicas (LUPI *ET AL.*, 2007; SEMENOVITCH, 2008; TREU, 2010).

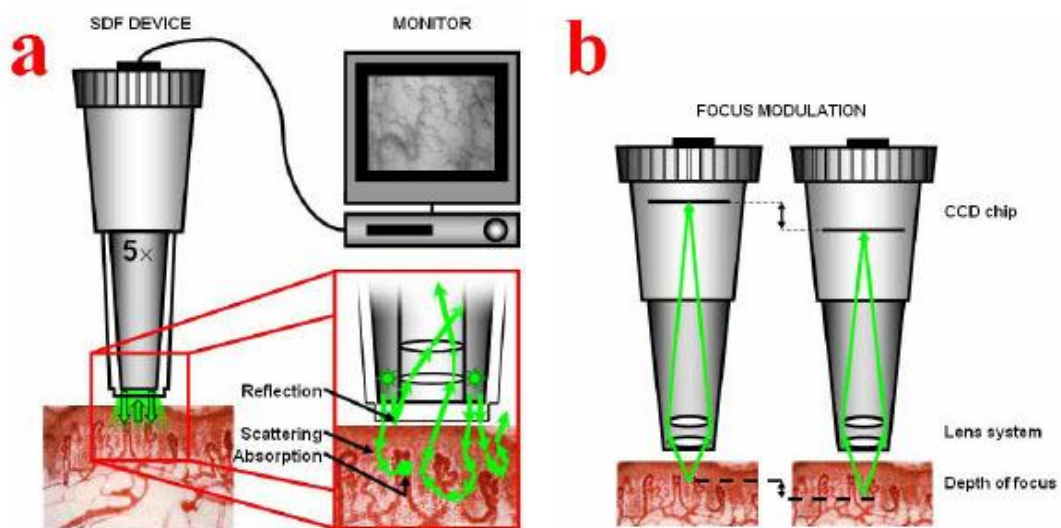
No OPS o tecido é iluminado com uma luz polarizada que garante a absorção das células vermelhas ricas em oxihemoglobinas. A luz despolarizada refletida do tecido é projetada em uma câmera mostrando as células sanguíneas vermelhas em preto em um fundo branco. Este é um método não invasivo e pode ser utilizado em qualquer órgão, mucosa ou na superfície cutânea. Apesar desta técnica ter sido muito bem sucedida, ainda apresenta uma desvantagem como a visualização sub-ótima do capilar e a imagem borrada das hemácias em movimento (CERNY *ET AL.*, 2007; GOEDHART *ET AL.*, 2007).

Em 2004 a técnica de videomicroscopia de campo escuro – “*Sidestream dark field*” (SDF) foi desenvolvida permitindo a avaliação da microcirculação de forma transcutânea em tempo real e de forma não invasiva (HARRIS *ET AL.*, 2000). Nesta técnica a iluminação é fornecida por uma luz central rodeada por luzes emissoras de diodo (LEDs) dispostas concêntricamente na tentativa de evitar a imagem borrada e melhorar o seu contraste. Os LEDs emitem a luz em um comprimento de onda de 548 nm que corresponde ao espectro de absorção da desoxi e oxihemoglobina. Para melhorar a imagem a luz é emitida em pulsos sincronizados com a captação dos quadros e formação da imagem menos borrada possível (NENCIONI *ET AL.*, 2009; TREU *ET AL.*, 2011).

A tecnologia SDF (figura 8) foi incorporada no Microscan® (Microvision Medical, Amsterdam, The Netherlands). O “probe” do SDF possui capa descartável que é posicionada diretamente na superfície de tecido a ser estudada. Existem 6 luzes tipo LEDs concêntricamente posicionadas com espectro de absorção de 548 nm que corresponde ao espectro de absorção da hemoglobina. Este comprimento de onda é escolhido para absorver igualmente a oxihemoglobina e desoxihemoglobina. O núcleo negro central da sonda tem uma

câmera de vídeo e nenhum contato com o anel externo, onde a luz impede reflexões de superfície de interferir com a coleta da imagem. Portanto, melhor qualidade de imagem é obtida permitindo melhor análise automática.

Figura 8 - Esquema do aparelho e técnica SDF. A luz refletida ortogonalmente na superfície do tecido atravessa o campo escuro e é capturada pela câmera para construir a imagem da microcirculação.



Fonte: Treu 2011.

O máximo de profundidade de imagem que o SDF penetra é 3 mm permitindo assim o estudo da microcirculação na epiderme e derme superior. O SDF mostra as células sanguíneas vermelhas em preto cercadas por fundo branco acinzentado (DOBBE *ET AL.*, 2008). O "probe" do SDF usa um aumento de 5X de lente objetiva (magnificação de 380x) e pode ser posicionada em qualquer tecido ou órgão. Goedhart e colaboradores descreveram importante comparação entre as tecnologias OPS e o SDF (GOEDHART *ET AL.*, 2007). A evolução da qualidade da imagem do OPS para o SDF contribuiu para o desenvolvimento de um software utilizando diagramas de espaço-tempo para calcular automaticamente a velocidade das hemácias. Um Software de Análise da microcirculação (MAS, Academic medical Centre, University of Amsterdam, Holanda) é exemplo deste tipo de software.

Outra melhora é o "probe" portátil do SDF que pode ser conectado a qualquer computador, através de um conversor de sinal (Canopus, ADVC110) para gravar digitalmente

imagens microcirculatórias num disco rígido, tais como DV-AVI Wles. Além disso, a imagem produzida pelo SDF consome menos energia da bateria do notebook com consequente melhora da aplicabilidade clínica. Prevenção de alterações da microcirculação causada pela maior pressão sobre a área com imagem é obtida puxando a sonda até que o contato seja perdido, seguido de um lento avançar novamente para o ponto de foco da microcirculação com pressão de mão mínima. Entretanto a imagem SDF ainda é falha na estimativa automática da velocidade da hemácia maior de 1 mm /s. Uma substituição de padrão de fonte de luz foi proposto para o sistema OPS (LINDERT *ET AL.*, 2002), modificação esta que tornou possível a medição da velocidade da hemácia superior a 20 mm / s. Embora a imagem produzida tenha muitas características superiores em relação à OPS (portabilidade, contraste, diminuição das despesas de energia), este sistema vem apenas com lente objetiva de 5X, enquanto OPS oferece lentes de 5 e 10X. Esta pode ser uma limitação, pois alguns centros de pesquisa ainda usam sistemas de computador que calculam a velocidade da hemácia semi-automática e imagens maiores microcirculatórias podem ajudar o usuário a escolher o movimento correto de células vermelhas do sangue a ser processado pelo computador. Idealmente, a melhor solução seria a adição de lentes objetivas com aumento de 10x no sistema SDF (TREU *ET AL.*, 2011).

Observamos então que o estudo da microcirculação pode ser avaliado morfolologicamente através do formato e diâmetros dos microvasos e a função microcirculatória pode ser avaliada por pela velocidade da hemácia (RBCV) e a densidade capilar funcional (DCF) usando OPS ou SDF. Vale lembrar que ambas as técnicas têm algumas limitações, isto é, elas não avaliam tipos diferentes de células como as células brancas do sangue, tais como os polimorfonucleares ou plaquetas. O estudo da microcirculação da pele em indivíduos com fototipos IV, V e VI de acordo com a classificação de Fitzpatrick não é possível, porque a melanina absorve luz de um comprimento de onda similar em relação à hemoglobina e não podemos identificar corretamente diâmetros microvasos neste tipo de paciente.

Estes métodos descritos avaliam a morfologia da microcirculação, mas não a função microvascular. O método já muito utilizado em diversos estudos para avaliação da microcirculação e sua vasomotricidade é a Laser Doppler Fluxometria associada a iontoforese de substâncias vasoativas. A técnica de LDF foi usada no presente estudo sobre hanseníase baseando-se na primeira descrição em 1988 (AGUSNI *ET AL.*, 1988) onde foi demonstrado que o laser Doppler é um instrumento fiel para avaliar aspectos circulatórios em lesões de hanseníase e corroborado na tese de Treu (TREU, 2010). Além disso, as medidas são simples



de serem feitas, não doem e seus resultados são reprodutíveis. O procedimento pode ser repetido quantas vezes sejam necessárias sem que isto traga inconvenientes ao paciente. Diante destes fatos optamos por utilizar o LDF no presente estudo.

No estado basal, a vasomotricidade, que corresponde à variação rítmica e espontânea do diâmetro de arteríolas, arteríolas terminais, meta-arteríolas e esfíncteres pré-capilares resultando em fluxo sanguíneo intermitente nos capilares, parece ser responsável pela regulação do fluxo no leito capilar. Uma das formas de investigação da vasomotricidade é a laser Doppler fluxometria (LDF) (RIVA *ET AL.*, 1972).

Há mais de 30 anos, a LDF é um método empregado exclusivamente para o estudo da dinâmica microvascular (medida do fluxo sanguíneo microvascular) (Leahy *et al.*, 1999). Esta medida foi inicialmente usada em tecido retiniano e estendidas para vários outros tecidos, É um método para aferição dados de forma contínua e não-invasiva da perfusão microvascular. Na LDF, um laser de baixa potência (Perimed 5000, um laser de diodo de 780nm) que incide na superfície do tecido pesquisado e fótons migram através do tecido de forma randômica. Cada tecido tem sua propriedade e padrão específico, determinado pelas suas propriedades óticas (BUSS, 2010).

Baseia-se no princípio *Doppler*, onde um feixe de raios *laser* emitido perpendicularmente por uma fonte justaposta à pele é desviado pelo fluxo sanguíneo subcutâneo, permitindo sua mensuração ao ser refletido. A técnica permite informações sobre a velocidade das hemácias no campo e a perfusão, definida como o número de hemácias multiplicado pela velocidade média dessas células em determinado espaço (campo). O sinal recebido pelo laser carrega informações a respeito tanto da velocidade de deslocamento das células quanto de sua concentração. A intensidade da luz recebida de volta no fotodetector constitui um padrão de dispersão, determinado principalmente pela perfusão tecidual, definida como o número de células sanguíneas multiplicadas pela velocidade média das células. O valor de perfusão é geralmente expresso em volts (V) ou em unidades de perfusão (PU).

A interação com um ou mais objetos em movimento, tais como, as células do sangue que se movem no sítio pesquisado, produzem um sinal de frequência de dispersão dos fótons determinado pelo ângulo de dispersão, comprimento de onda do laser e velocidade de dispersão. O sinal Doppler é o nome dado a esta frequência devido ao pesquisador austríaco Johann Christian Andres Doppler (WARDELL *ET AL.*, 1994).

O equipamento de LDF é constituído pelo monitor de perfusão por laser Doppler (laser Doppler perfusion monitor – LDPM) e a representação de perfusão por Imagem por Laser Doppler (laser Doppler perfusion image – LDPI). O LDPM é um “probe” que contém

uma fibra ótica iluminadora, conectada a um laser externo, e uma ou várias fibras óticas que transportam de volta a luz do laser refletida-dispersada pelo tecido para um fotodetector. O probe é colocado no tecido e uma área de 2-3 mm de diâmetro é continuamente medida.

No LDPI, um scanner é posicionado geralmente a 15 cm de distância do tecido estudado, e uma fonte de laser escaneia a área, resultando em um mapa de valores de perfusão. O LDPM apresenta como vantagem sua alta resolução temporal na mensuração da perfusão. E desta forma a resposta do fluxo circulatório pode ser acessada em tempo real.

Porém, sabendo que a microcirculação é heterogênea e o fluxo sanguíneo varia consideravelmente em diferentes sítios da pele (STEFANOVSKA *ET AL.*, 1999), o LDPI oferece uma vantagem sobre o LDPM, tendo em vista que apesar da quantificação estática, ele avalia uma área de superfície mais extensa. Por outro lado, o escaneamento leva de vários segundos a alguns minutos, dependendo da taxa de resolução espacial e das propriedades do sistema, o que pode ser um problema, dependendo da dinâmica do fluxo sanguíneo que se está estudando.

Os diferentes mecanismos de vasomotilidade podem ser medidos pelo estudo da vasomotricidade através do LDF. As ondas de vasodilatação e vasoconstrição são medidas em unidades de perfusão (PU) convencionais, e, pela análise espectral, é possível identificar variações na amplitude destas ondas dentro de diferentes intervalos de frequências relacionados a fatores envolvidos na vasomotricidade. Dentre estas atividades evidenciamos a atividade endotelial (0,01–0,02 Hz), neurogênica (0,02–0,06 Hz), miogênica (0,06–0,15 Hz), respiratória (0,15–0,4 Hz), e cardíaca (0,4–1,6 Hz)(119,120).

A iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato de sódio apesar da sua vasta utilização como testes específicos para avaliar função dependente do endotélio e independente do endotélio, respectivamente, apresenta limitações.

Frankenhäuser perto de 1908 introduziu o termo Iontoforese. O estímulo iontoforético baseia-se no conceito de que uma droga, usualmente, carrega moléculas contendo carga elétrica. Desta forma, a introdução de substâncias, via transdérmica, acontece devido a uma pequena carga elétrica e uma diferença de potencial que gera uma corrente por onde a substância é carregada aproveitando-se a carga intrínseca desta substância (SLOAN E SOLTANI, 1986). Ou seja, a droga escolhida para o estímulo iontoforético é disposta sob um dos eletrodos colocados na superfície cutânea. Sob a influência de forças eletro-repulsivas, as moléculas da droga são desviadas em direção oposta ao eletrodo, para o interior da pele. Tal fato implica que uma droga que, sabidamente, carrega carga positiva, deverá ser disposta sob um eletrodo positivo (catodo); opostamente, uma droga de carga negativa deve estar sob um

eletrodo negativo (anodo). Este é o princípio básico da Iontoforese (SINGH E MAIBACH, 1994). Consequentemente, a taxa de penetração de drogas é bastante aumentada através do estrato córneo impermeável quando comparada à difusão passiva.

Em 2002, Barry e colaboradores descreveram as 3 possíveis rotas da introdução de drogas através da pele em direção ao tecido subcutâneo: folículo piloso e suas glândulas sebáceas associadas, os ductos sudoríparos (principais vias de acesso) e através do próprio estrato córneo, entre seus apêndices e falhas (rota intercelular) (BARRY, 2002).

Depois de penetrar pelos dutos sudoríparos, os íons transferidos chegam à circulação capilar através das arteríolas que irrigam a base da glândula. Desta forma o íon ou substância medicamentosa penetra cerca de 1 mm com subsequente absorção capilar e transporte transmembrana (NOLAN *ET AL.*, 2003).

Na literatura encontramos diversas descrições de uso da iontoforese como terapêutica, entre eles: opióides, insulina, antiinflamatórios não-esteroidais, produtos dermatológicos dentre outros (PRAUSNITZ E LANGER, 2008). Além disso, diversos estudos experimentais utilizam algumas substâncias, sendo as mais bem estudadas a insulina (Rossi *et al.*, 2005), a acetilcolina e o nitroprussiato de sódio (MORRIS E SHORE, 1996).

No presente estudo utilizamos a acetilcolina (Ach) e o nitroprussiato de sódio (NPS). A acetilcolina (agonista do receptor muscarínico) tem ação vasodilatadora com relaxamento da musculatura lisa vascular. Este efeito é dependente da integridade do endotélio vascular, isto é, é endotélio dependente. Em 1987 foi identificado o óxido nítrico (NO) como o responsável direto pelo relaxamento da musculatura lisa vascular. Considerando-se os principais agentes vasoativos, o NO é sintetizado a partir da oxidação do radical guanidino da L-arginina pela ação da NO-sintase, gerando L-citrulina e NO. A liberação do NO, por sua vez, acarreta relaxamento do músculo liso vascular. Além disto, a acetilcolina ativa os receptores muscarínicos na membrana da célula endotelial e estimula a proteína G e a fosfolipase C, formando o trifosfato de inositol. Este elemento libera cálcio do retículo endoplasmático, com conseqüente reação com a calmodulina. Após a formação do complexo cálcio-calmodulina, a NO-sintase é estimulada, formando NO a partir da L-arginina.

Na célula muscular lisa, o NO ativa a guanilil-ciclase e aumenta a concentração de Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc), gerando redução da concentração de cálcio na célula muscular lisa e relaxamento vascular. A via da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), sintetizada pela ciclooxigenase (COX), ativa a adenil ciclase (AC) e aumenta a concentração de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc), que leva à redução da concentração de cálcio intracelular nas células dos músculos lisos vasculares. Outra via de ativação do relaxamento muscular parece

ser mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que ativado por subprodutos do citocromo P450 lipoxigenase, gera uma hiperpolarização da musculatura lisa vascular, com conseqüente relaxamento desta (BUSSE *ET AL.*, 2002).

O nitroprussiato de sódio (NPS) é um potente vasodilatador, endotélio independente, muito utilizado no tratamento de crises hipertensivas. O relaxamento da musculatura lisa vascular se faz porque o NPS é uma molécula constituída por um radical nitroprussiato, que reage em condições fisiológicas com grupamentos sulfidríla teciduais, liberando NO ativamente e causando relaxamento da musculatura lisa do vaso (BOUSKELA *ET AL.*, 2007).

Partindo do conhecimento que estes métodos de visualização da microcirculação não são invasivos, são portáteis e de fácil execução e acreditando que nas placas da hanseníase tuberculóide encontraremos alterações microcirculatórias, podemos acreditar que seriam métodos diagnósticos ideais para pesquisa de campo em áreas longínquas de países onde a hanseníase ainda é endêmica. Evitando assim, dificuldades diagnósticas pela falta de material e condições para realização dos exames complementares utilizados atualmente no diagnóstico da hanseníase. Além disso, poderíamos detectar nas manchas ou área da pele com alteração de sensibilidade as alterações microcirculatórias precocemente e com isso fazendo o diagnóstico e evitando as sequelas.

Tendo em vista a importância do sistema nervoso autônomo na manutenção do tônus vascular, esperamos ver a diminuição global do tônus vascular nas medições basais. Provavelmente o componente neurogênico na visualização do sinal do laser Doppler deva ser o mais afetado, devido ao dano neural pela hanseníase. Porém é esperado que esta alteração também repercutam, de forma menos intensa, nos outros componentes da vasomotricidade. Devido à ausência de tônus simpático, achamos provável que o vaso já esteja dilatado; com isto provavelmente veremos menor variação de tônus com a administração de vasodilatadores endotélio-dependente (acetilcolina) e independente (nitroprussiato de sódio), comparados aos controles, bem como parcial recuperação do tônus com o uso de norepinefrina, que simularia a recuperação do sistema simpático. Também esperamos pouca diferença entre os resultados com acetilcolina e nitroprussiato de sódio, tendo em vista que a provável alteração é no sistema nervoso e não à nível endotelial. Caso haja dano endotelial é esperada uma resposta vasodilatadora mais evidente com nitroprussiato de sódio do que com acetilcolina. Sabe-se que na hanseníase tuberculóide, classicamente, o dano neurológico é maior devido à resposta mais intensa contra o nervo e, conseqüentemente, esperamos resultados ainda mais expressivos. Pretendemos corroborar que o laser Doppler associado à iontoforese constitui uma técnica extremamente útil para o estudo da reatividade vascular na hanseníase. No

MicroScan® esperamos observar maior número de vasos e estes mais dilatados do que nos pacientes controles. Novamente isto seria devido à vasodilatação mediada pela perda do tônus simpático.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo geral**

Avaliar e testar a hipótese de que a microcirculação da mancha de pacientes portadores de hanseníase tuberculóide pode estar alterada.

### **1.2 Objetivos específicos**

#### **1.2.1 Objetivo específico 1**

Avaliar a reatividade da microcirculação cutânea num modelo de disautonomia vascular por denervação, através do uso de laser Doppler associado à iontoforese de substâncias vasoativas.

#### **1.2.2 Objetivo específico 2**

Avaliar a quantidade de vasos e fluxo através do uso do MicroScan®.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado integralmente na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), especificamente no laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (**BioVasc**). As principais fontes de seleção da amostra foram o ambulatório de hanseníase da FIOCRUZ – Ambulatório Souza Araújo. Deste local foram selecionados inicialmente 22 pacientes com hanseníase tuberculóide em vigência de tratamento.

Esta pesquisa se caracteriza por um estudo transversal, controlado, em aberto.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (077/2011 – CEP/HUPE número: 060.3.2011) e atendeu às normas sobre pesquisa envolvendo seres humanos, que constam na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996. Antes do estudo todos os voluntários concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - contendo o objetivo da pesquisa, procedimentos de avaliação, caráter de voluntariedade).

A amostragem do presente estudo respeitou os critérios de inclusão e exclusão listados a seguir.

### 2.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão do presente estudo incluem:

- Sexo masculino;
- Ser portador de Hanseníase tuberculóide em tratamento;
- Apresentar placa em membros superiores ou inferiores
- Faixa etária entre os 20 e 60 anos;
- Não possuir nenhuma doença de base que possa alterar parâmetros microcirculatórios como Diabetes, hipertensão, colagenose, entre outras;
- Não fumar ou ter história pregressa de tabagismo
- Não apresentar no momento do exame estado reacional hansênico;
- Capacidade de seguir as orientações dadas e comparecer as avaliações;
- Fototipo I-IV de Fitzpatrick e
- Assinar o termo de consentimento pré-informado.

## 2.2 Critérios de exclusão

Dentre os critérios de exclusão citamos:

- Lesão única de MHT de tamanho pequeno com biópsia recente ocupando quase toda a lesão;
- Obesidade (IMC>35);
- Placa presente em outra região anatômica que não seja membros superiores e inferiores.

Inicialmente foram selecionados 22 pacientes, por dados colhidos nos prontuários do ambulatório Souza Araújo da Fiocruz, que obedeciam aos critérios de inclusão. Destes 8 pacientes não compareceram aos exames, apesar das inúmeras remarcações e 2 foram excluídos por apresentar fototipo V. Sendo assim, apenas 12 foram submetidos ao protocolo de exames proposto no estudo.

Após avaliação dos resultados, tivemos perda de 2 pacientes por erro no programa de gravação do exame e 3 foram excluídos por apresentarem resultados muito distintos dos demais. Estes 3 pacientes excluídos apresentavam em comum, manchas pequenas com cicatriz de biópsia recente ocupando quase que toda a totalidade da mancha. Acreditamos que a neovascularização e fibrose da cicatriz cirúrgica possam ter influenciado no resultado do exame. O nosso n final foi de 7 pacientes.

## 2.3 Avaliação com Microscan e com LDF

Todos os pacientes foram, orientados a ficar 2h em jejum antes do exame e não usar cafeína e álcool desde a noite anterior ao exame. Assim que chegavam ao laboratório, estes pacientes permaneciam em repouso numa maca elétrica acolchoada por um período de 20 minutos para aclimatização antes do teste em sala refrigerada com temperatura controlada (entre 22e 24°C). Todos os indivíduos foram medidos, pesados e tiveram sua pressão arterial aferida previamente, a fim de assegurar que preenchiam os pré-requisitos.

O primeiro exame realizado foi a avaliação da microcirculação com o uso do Mycroscan® (SDF), em 5 pontos diferentes, conforme critérios preconizados por De Backer e colaboradores (DE BACKER *ET AL.*, 2007). As imagens obtidas foram gravadas por 10 segundos em cada ponto e, em seguida, avaliadas com software próprio (AVA 3.0).



Este exame foi realizado na placa e na área contralateral sadia do próprio paciente que foi usada como controle. Este protocolo foi criado pois esperamos que o paciente apresente alterações na placa e não na área sadia, uma vez que na MHT a lesão do nervo é aguda e local.

Na realização do exame utilizamos uma faixa confeccionada por um grupo do laboratório que nos guiava para o exame de campos diferentes e em sequência (figuras9 e 10)

Figura 9 - Aparelho SDF- Microscan e seus componentes.



Fonte: A autora, 2013.

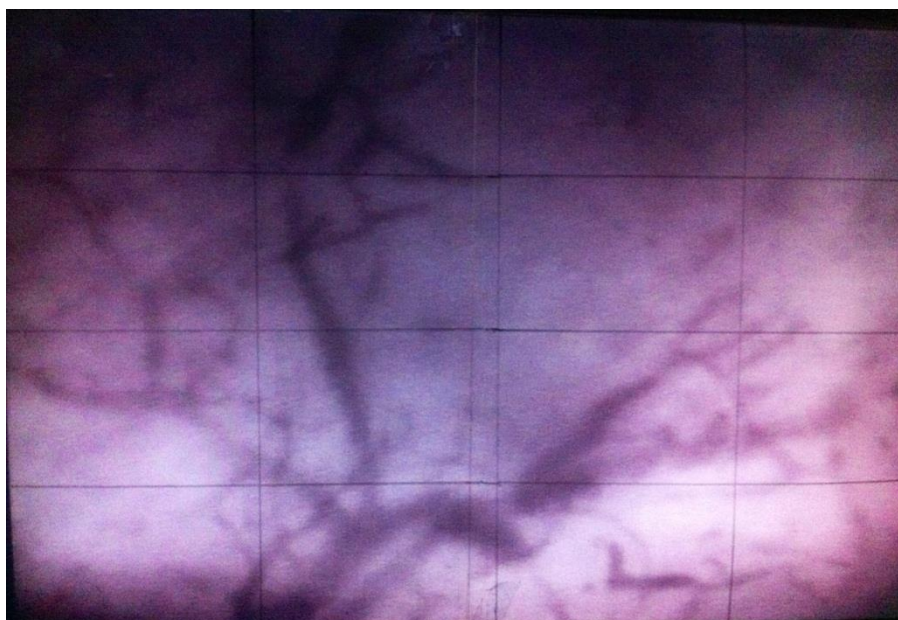
Figura10 - detalhe da faixa guia e do apoio de braço.



Fonte: A autora, 2013.

No próprio computador onde realizamos a captura da imagem através do software AVA 3,0, confeccionamos uma transparência do tamanho da imagem em tela cheia e dividimos esta transparência com 3 retas equidistantes tanto na vertical quanto na horizontal (figura 11). Todos os exames foram realizados pelo mesmo investigador, e em seguida analisadas, cegamente e aleatoriamente, utilizando métodos quantitativos. Cada área (mancha e controle) eram avaliadas e gravadas em 5 filmes de 10 segundos cada.

Figura 11 - Transparência com 3 linhas horizontais e 3 verticais equidistantes colocada sobre tela de leitura da imagem do Microscan.



Fonte: A autora, 2013.

A análise das imagens nos oferecem as seguintes informações: número de vasos grandes (vasos maiores do que  $20\mu\text{m}$ ) e pequenos (capilares), índice de fluxo microvascular (MFI) e a densidade capilar funcional (DCF) e a densidade capilar total (DCT).

Para determinar a MFI, a imagem é dividida em 4 quadrantes de mesmo tamanho, e o tipo de fluxo predominante em cada quadrante foi avaliado, caracterizado e recebeu uma nota. A classificação usada foi: fluxo ausente = 0, intermitente = 1, lento = 2 e normal = 3. A média dos valores dos quatro quadrantes corresponde ao MFI.

Para determinar o número total de vasos grandes e pequenos, contamos todos os vasos que cruzam as 3 linhas verticais e as 3 horizontais equidistantes da transparência colocada

sobre a tela da imagem analisada (figura 11). Estes vasos também eram classificados como perfundidos (com fluxo) ou não perfundidos (sem fluxo ou fluxo intermitente; este se caracteriza pela ausência de fluxo em pelo menos 50% do tempo avaliado).

A DCF foi calculada pela divisão do número total de vasos perfundidos pelo comprimento total das linhas da transparência, em milímetros (mm). Já a DCT foi calculada pela divisão do número total de vasos pelo comprimento total das linhas da transparência em mm. Vasos grandes e pequenos foram analisados separadamente. Para o cálculo da DCF e DCT usamos os vasos pequenos. O fluxo dos vasos grandes são importantes marcadores de correta utilização do aparelho (sem excesso de pressão sobre o dispositivo do SDF, aplicado pelo investigador), uma vez que o fluxo nos vasos grandes em geral está presente até mesmo em pacientes moribundos (DE BACKER *ET AL.*, 2002; DE BACKER *ET AL.*, 2007).

A perfusão pode ser avaliada visualmente como presente (10 s de perfusão), ausente (10 s sem perfusão) ou intermitente (ao menos 50% do tempo sem fluxo)

Após este exame foi realizado a avaliação com o laser Doppler e a iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Estes foram realizados da seguinte forma:

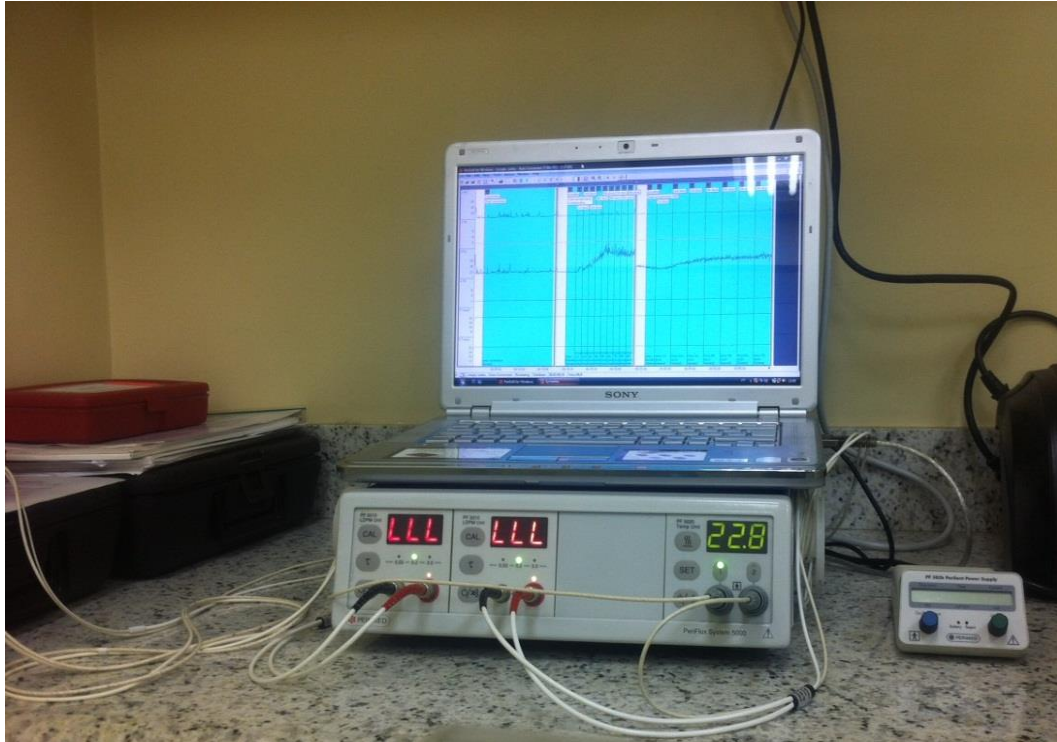
O fluxo sanguíneo do local da placa e da área controle foram medidos através de aparato de laser Doppler (Periflux PF5000, Perimed, Järfälla, Suécia) com as seguintes características: laser de diodo com comprimento de onda 780 nm, largura de banda (bandwidth) de 10–19 kHz, constante de tempo 0.2 s, amostra de frequência 32 Hz e potência de 10 mW. A calibração foi realizada usando partículas de látex coloidal, simulando hemácias, na qual o movimento Browniano provia o valor basal. O sinal do laser Doppler foi gravado continuamente em um computador com interface (Sony VaioVGN-CR160A) equipado com um software Perisoft dedicado (figura 12). Este software permite a mensuração do sinal do LDF em unidades de perfusão (PU). Os exames foram realizados em uma sala tranquila, com temperatura controlada (22–24°C).

Foram avaliados os intervalos de frequência relativos a cada um dos componentes da vasomotricidade, em seu comportamento basal e foi mensurada a perfusão antes e após a iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato, respectivamente. Estas medições foram gravadas para cada paciente e, posteriormente, fizemos a média do valor para cada intervalo de frequência da vasomotricidade e comparamos com a média encontrada na área controle do próprio paciente para cada intervalo.

Esta forma de avaliação já foi eficientemente usada em estudos não relacionados à hanseníase (LANDSVERK *ET AL.*, 2006), bem como o próprio laser Doppler já foi usado para avaliação de fluxo e reflexo vasomotor na hanseníase (ILLARRAMENDI *ET AL.*, 2005;

TREU, 2010).

Figura12 - Aparelho de Laser Doppler fluxometria e iontoforese



Fonte: A autora, 2013.

Tanto o local da placa quanto a região controle (região sadia contralateral à mancha) foram medidas consecutivamente. Tais locais distam um do outro em ao menos 5 cm. Isto é fundamental para que não haja interferência da substância previamente administrada por iontoforese sobre determinado ponto em relação ao ponto seguinte. Seguindo algumas das orientações de De Backer e colaboradores (DE BACKER *ET AL.*, 2007) em trabalho de revisão de 2007, evitamos áreas com soluções de continuidade, traumatizadas ou sobre vasos de grande calibre, devido à possibilidade de interferência no laser Doppler.

Em cada um destes locais foram feitas duas etapas:

Inicialmente um transdutor foi acoplado a um adesivo de fixação específico e este foi colado no centro da placa hipoestésica e/ou anestésica e outro na região controle ao mesmo tempo. Cada transdutor ficou ligado a um canal diferente do laser Doppler. Estabeleceu-se a regra: Mancha ligada sempre ao canal 1(1pu) e controle ligada sempre ao canal 3 (3pu). Este transdutor (Probe 481-1: Single Iontophoresis Probe - Perimed) é utilizado tanto para laser

Doppler quanto para iontoforese e tem a capacidade de esquentar, mantendo a temperatura cutânea constante a 33°C. Com os transdutores posicionados, realizamos a medição da motilidade vascular por 20 minutos. Isto foi realizado para obtermos a análise da vasomotricidade destes pacientes.

Após a realização da medição de vasomotricidade, foi feita avaliação com Laser Doppler associado à iontoforese. Inicialmente foi utilizada a acetilcolina e 15 minutos após o término da iontoforese desta droga foi realizada a iontoforese com nitroprussiato de sódio. Este protocolo foi criado pelos autores, uma vez que na literatura científica nenhum trabalho utiliza a iontoforese de diferentes substâncias no mesmo local. Em geral, se utiliza cada quirodáctilo para cada substância vasoativa diferente. Porém no nosso caso temos que avaliar o mesmo local, que é área hipostésica ou anestésica, local onde achamos que encontraremos as alterações procuradas. Sabemos que a acetilcolina tem uma meia vida curta, desta forma a utilizamos primeiro e esperamos um tempo maior que sua meia vida, a fim de evitar possíveis interferências na medição da iontoforese com nitroprussiato feito posteriormente a esta primeira substância.

Para a realização da iontoforese, acoplamos o transdutor a um adesivo especial para iontoforese. Tal adesivo é um eletrodo (PF 383): *disposable drug delivery electrodes* - Perimed e consiste de uma face não-aderente, onde há um encaixe para o transdutor, e uma face aderente com uma esponja central para a colocação da substância para iontoforese.

Um segundo eletrodo é posicionado fixamente (com adesivo próprio e micropore®) a cerca de 10 a 15 cm para o outro eletrodo posicionado na mancha ou na região controle. Esta distância entre os eletrodos é essencial para a diferença de potencial e correta formação da corrente.

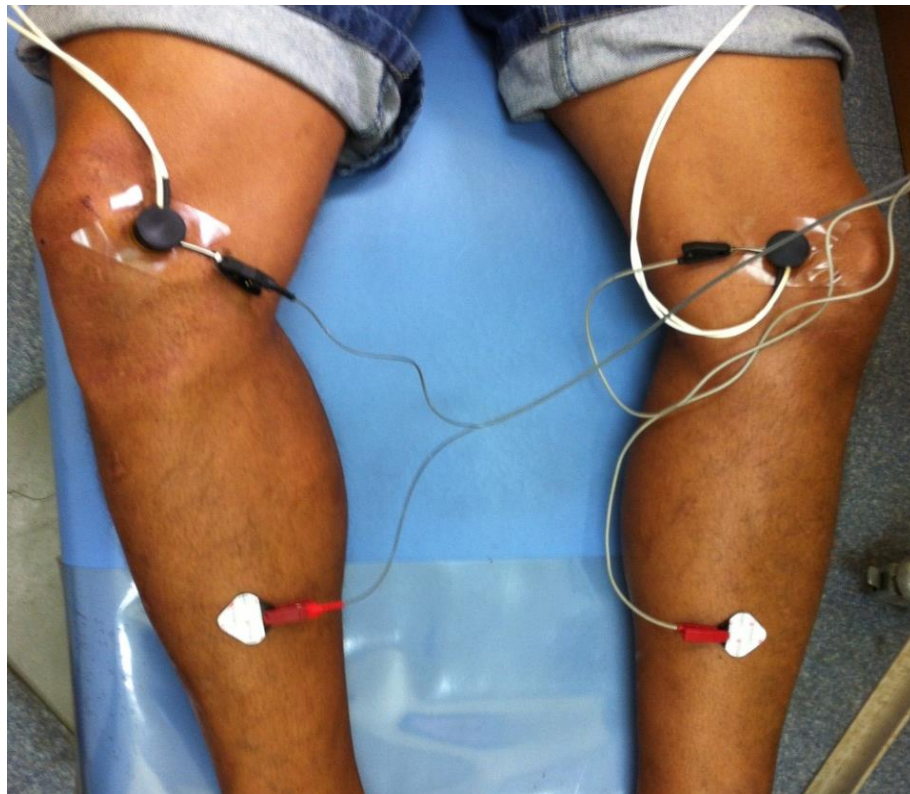
Após o transdutor estar acoplado ao eletrodo administra-se a substância para iontoforese na esponja do transdutor e o conjunto é posicionado novamente no local da placa e o na região controle (figura 13).

Depois de posicionada a sonda com a substância, um eletrodo de polo positivo foi fixado ao eletrodo, tendo em vista que a acetilcolina tem carga positiva, e outro negativo era fixado na pele a uma distância de 15 cm do “probe”, para gerar uma diferença potencial para o funcionamento da iontoforese. Após os eletrodos estarem posicionados uma corrente de 0,1 mA era aplicada nove vezes por 20 s, com intervalos de 60s entre os pulsos.

Após o fim do protocolo da iontoforese com a acetilcolina, o local era limpo com álcool 70% e aguardamos 15 minutos para dar início ao protocolo do nitroprussiato de sódio, apesar da meia vida da Ach ser rápida, preferimos esperar mais algum tempo a fim de evitar

alterações. Nesta etapa iniciamos a iontoforese com 0,2 ml de nitroprussiato de sódio (Niprid 10mg/ml – Biolab, São Paulo, Brazil) a 0,01%, seguindo o mesmo protocolo anterior, a fim de avaliarmos o relaxamento vascular endotélio-independente. Depois de posicionada a sonda com a substância, um eletrodo de polo negativo era fixado ao eletrodo, tendo em vista que o nitroprussiato de sódio tem carga negativa, e outro positivo era fixado na pele a uma distância de 15 cm da sonda. Isto gerava a diferença de potencial para o funcionamento da iontoforese. Após os eletrodos estarem posicionados uma corrente de 0,2 mA era aplicada sete vezes por 20 s, com intervalos de 180 s entre os pulsos.

Figura 13 - Exame LDF – Iontoforese sendo realizado em paciente



Fonte: A autora, 2013.

Vale lembrar que simultaneamente eram realizados os dois exames, o da placa no canal 1 do aparelho e o exame do local controle no canal 3 do laser Doppler.

## 2.4 Análise estatística

As variáveis utilizadas no estudo são divididas em variáveis contínuas e variáveis discretas.

Na análise de Vasomotricidade todas as variáveis são classificadas como contínuas, a saber:

- Endotelial,
- Simpática,
- Mio gênica,
- Respiratória,
- Cardíaca.

Na análise de Iontoforese todas as variáveis também são classificadas como contínuas, a saber:

- Basal (média PU) - Ac
- platô (dose) - Ac
- platô (média PU) - Ac
- aumento basal-platô (PU) - Ac
- % aumento basal-platô - Ac
- Basal (média PU) - Nitro
- platô (dose) – Nitro
- platô (média PU) - Nitro
- aumento basal- Platô (PU) - Nitro
- % aumento basal-platô - Nitro

Já na análise de Microscan apenas as variáveis a seguir são classificadas como contínuas:

- DCF
- DCT
- MFI

As demais variáveis na análise de Microscan são classificadas como discretas, a saber:

- VT

- VG
- VP
- VG\_sem\_fluxo
- VP\_sem\_fluxo
- VG\_com\_fluxo
- VP\_com\_fluxo

Para a análise estatística das variáveis discretas (aquelas oriundas de contagens) utilizou-se testes estatísticos para a comparação de proporções, como o teste qui-quadrado e o teste exato de *Fisher*. O objetivo é comparar se as proporções de casos e controles encontradas na amostra diferem significativamente entre si, ou seja, são desiguais. Quando as proporções estão em uma tabela 2x2 utiliza-se a correção de *Yates* para uma melhor precisão do teste qui-quadrado. Quando a contagem em alguma casela (célula da tabela 2x2) for menor que 5 observações utiliza-se o teste exato de *Fisher*.

Nesse sentido o teste qui-quadrado com correção de *Yates* foi utilizado para comparar as proporções de casos e controles nas variáveis VT, VG, VP, VP\_sem\_fluxo, VG\_com\_fluxo, VP\_com\_fluxo (todas variáveis da análise de Microscan). Já o teste exato de *Fisher* foi utilizado para comparar as proporções de casos e controles na variável VG\_sem\_fluxo (variável da análise de Microscan).

Para a análise das variáveis contínuas inicialmente avaliou-se a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Trata-se de um teste que avalia se os dados na amostra seguem a distribuição normal. A hipótese nula ( $H_0$ ) é que os dados seguem a distribuição normal, nesse sentido, se a hipótese nula não for rejeitada ( $p \geq 0.05$ ) poderemos utilizar testes paramétricos. Caso a hipótese nula seja rejeitada ( $p < 0.05$ ) serão utilizados testes não-paramétricos.

O teste paramétrico “Teste t para amostras independentes” foi utilizado na comparação dos casos com os controles especificamente nas variáveis da análise de Vasomotricidade “Endotelial” e “Cardíaca”, nas variáveis da análise de Iontoforese “Basal (média PU) – AC”, “platô (média PU) – AC”, “aumento basal-platô (PU) – AC”, “%aumento basal-platô – AC”, “Basal (média PU) – Nitro” e “% aumento basal-platô – Nitro”, e na variável de Microscan “DCT”.

Já o teste paramétrico “Teste t para amostras pareadas” foi utilizado na comparação dos mesmos indivíduos em duas mensurações diferentes como nas situações de comparação da avaliação da Iontoforese Acetilcolina com os resultados da Iontoforese Nitroprussiato de



Sódio, especificamente nas variáveis “Basal (média PU)”, “platô (média PU)”, “aumento basal-platô (PU)” e “% aumento basal-platô”.

O teste não-paramétrico “Teste U de Mann-Whitney” foi utilizado na comparação dos casos com os controles especificamente nas variáveis da análise de Vasomotricidade “Simpática”, “Miogênica” e “Respiratória”, nas variáveis da análise de Iontoforese “platô (dose) – Ac”, “platô (dose) – Nitro”, “platô (média PU) – Nitro” e “aumento basal-platô (PU) – Nitro”, e nas variáveis de Microscan “DCF” e “MFI”.

O teste não-paramétrico “Teste de Wilcoxon”, para amostras pareadas, foi utilizado na comparação dos mesmos indivíduos em duas mensurações diferentes como nas situações de comparação da avaliação da Iontoforese Acetilcolina com os resultados da Iontoforese Nitroprussiato de Sódio, especificamente na variável “platô (dose)”.

Além das tabelas com os resultados descritivos e inferenciais, para os testes paramétricos foram utilizadas representações gráficas dos resultados com gráficos de colunas (representando a média) e barras representando o erro padrão. Para os testes não paramétricos, além das tabelas, os resultados são apresentados em gráficos boxplot com mediana e intervalo interquartil.

Em todos os casos adotou-se o nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Vasomotricidade

Antes de iniciar as análises verificou-se a normalidade das variáveis para avaliar qual o melhor teste estatístico deve ser utilizado.

Na tabela 7 são apresentados os valores de média, desvio padrão, mediana e o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para os controles e casos nas variáveis de vasomotricidade.

Tabela 7 -Estatística descritiva e teste de normalidade da vasomotricidade

Variáveis	Grupo	Estatística Descritiva			Shapiro-Wilk		
		Média	Desvio Padrão	Mediana	W	Graus de Liberdade	P
Endotelial	Controle	0,63	0,12	0,64	0,942	7	0,657
	Caso	0,35	0,15	0,37	0,958	7	0,799
Simpática	Controle	0,45	0,14	0,52	0,802	7	0,043
	Caso	0,29	0,17	0,30	0,874	7	0,199
Miogênica	Controle	0,37	0,19	0,34	0,885	7	0,251
	Caso	0,28	0,25	0,18	0,769	7	0,020
Respiratória	Controle	0,27	0,19	0,23	0,888	7	0,262
	Caso	0,22	0,21	0,10	0,751	7	0,013
Cardíaca	Controle	0,16	0,10	0,16	0,950	7	0,734
	Caso	0,19	0,18	0,10	0,822	7	0,067

Os resultados indicam que o grupo controle da variável “Simpática”, o grupo caso da variável “Miogênica” e o grupo caso da variável “Respiratória” não apresentaram normalidade na distribuição.

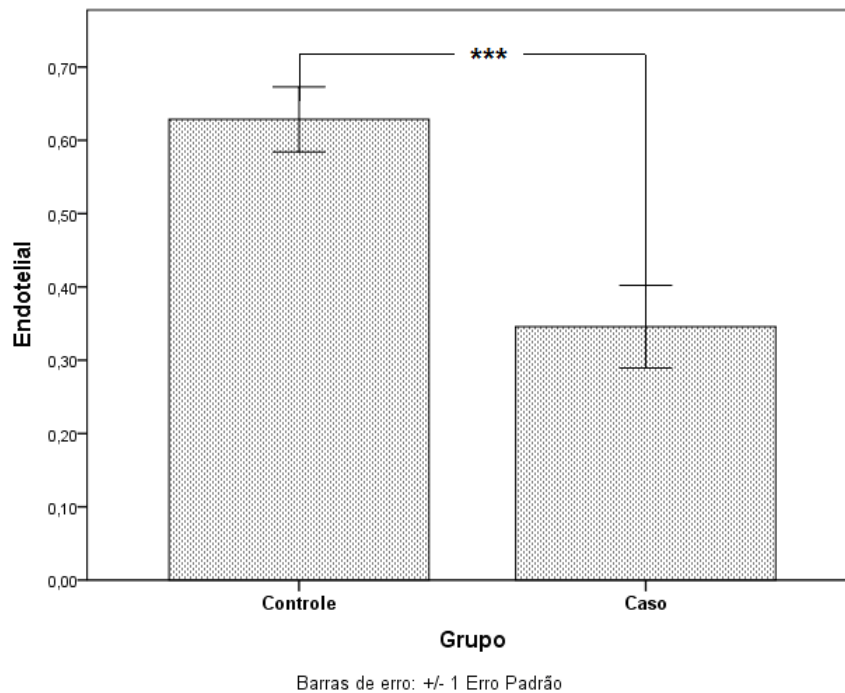
Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste t para amostras independentes nas situações em que as variáveis apresentaram distribuição normal (tabela 8), e teste U de Mann-Whitney nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela 9). Em ambos os casos adota-se o nível de significância 5%.

Tabela 8 - Teste t para amostras independentes da vasomotricidade

Variáveis	T	P
Endotelial	3,944	0,002
Cardíaca	-0,416	0,685

As diferenças encontradas foram significativas ao nível de 5% apenas para variável “Endotelial” ( $t = 3,944$  ;  $p = 0,002$ ), com o grupo caso (mancha) obtendo pontuação média ( $\mu = 0,35$ ) inferior ao grupo controle ( $\mu = 0,63$ ) (Figura 14).

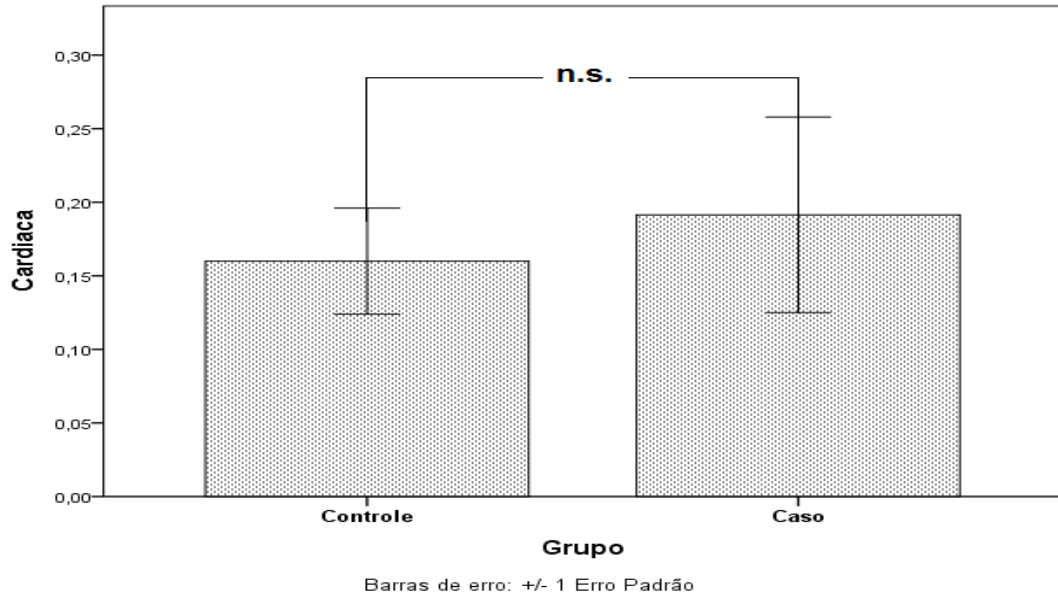
Figura 14 - Análise comparativa da fase endotelial da vasomotricidade caso (placa) X controle.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável “Cardíaca” a diferença encontrada não foi significativa ao nível de 5%, isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles na variável analisada (figura 15).

Figura 15 - Análise comparativa da fase cardíaca da vasomotricidade caso (placa) X controle.



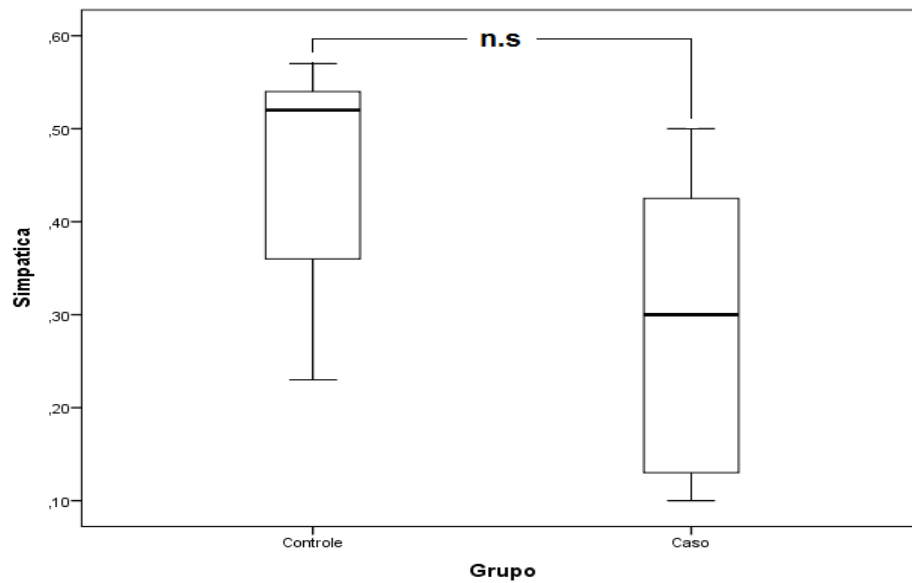
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

No caso da variável “Simpática”, “Miogênica” e “Respiratória”, as diferenças encontradas também não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles nas variáveis analisadas (figuras 16,17 e 18).

Tabela 9 - Teste U de Mann-Whitney para as variáveis “simpática, miogênica e respiratória”

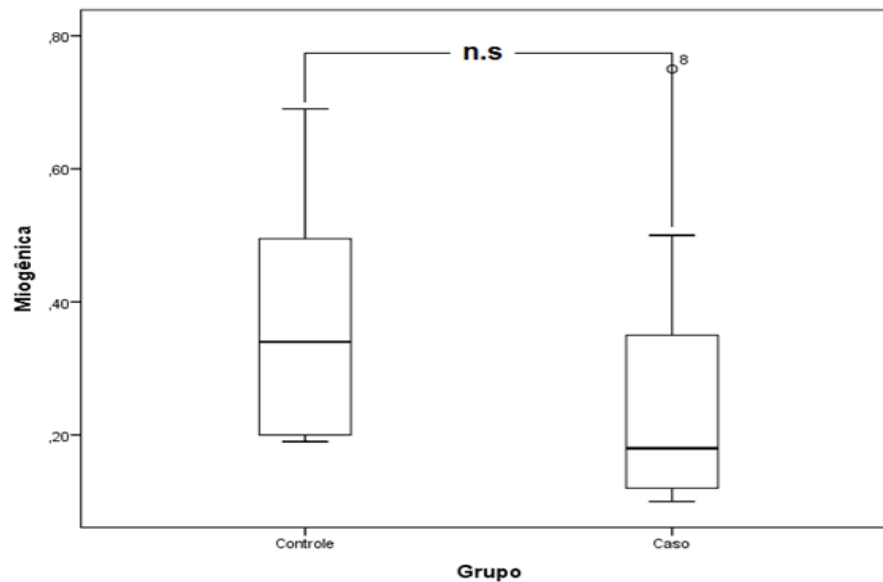
Variável	Grupo	Posto Médio	Soma dos Postos	U	Z	P
Simpática	Controle	9,57	67,00	10,00	-1,857	0,063
	Caso	5,43	38,00			
Miogênica	Controle	9,00	63,00	14,00	-1,343	0,179
	Caso	6,00	42,00			
Respiratória	Controle	8,29	58,00	19,000	-0,705	0,481
	Caso	6,71	47,00			

Figura 16 - Análise comparativa da fase simpática da vasomotricidade caso (placa) X controle.



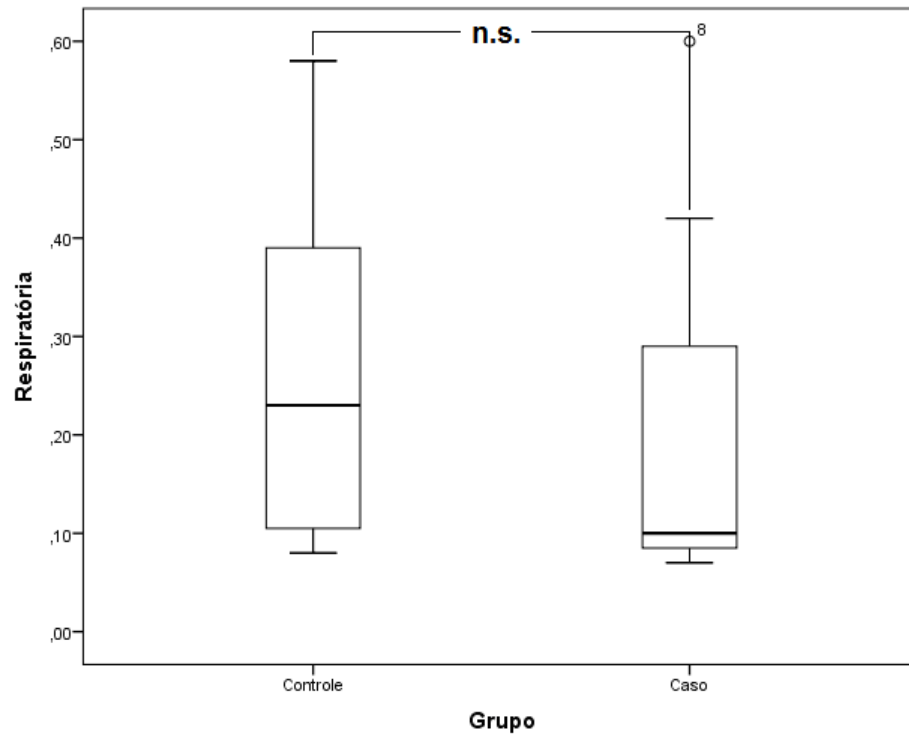
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 17 - Análise comparativa da fase miogênica da vasomotricidade caso (placa) X controle.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 18 - Análise comparativa da fase respiratória da vasomotricidade caso (placa) X controle.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Adicionalmente avaliou-se as variáveis relacionadas a vasomotricidade normalizadas. Antes de iniciar as análises verificou-se a normalidade das variáveis para avaliar qual o melhor teste estatístico deve ser utilizado.

Na tabela 10 são apresentados os valores de média, desvio padrão, mediana e o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para os controles e caso nas variáveis de vasomotricidade normalizada.

Tabela 10 -Estatística descritiva e teste de normalidade vasomotricidade normalizada

Variáveis	Grupo	Estatística Descritiva			Shapiro-Wilk		
		Média	Desvio Padrão	Mediana	W	Graus de Liberdade	P
NEndotelial	Controle	4,12	2,34	3,19	,910	7	,399
	Caso	3,13	1,73	2,55	,858	7	,146
NSimpática	Controle	2,91	2,05	1,92	,792	7	,034
	Caso	2,36	1,40	2,06	,738	7	,010
NMiogênica	Controle	2,02	,55	2,00	,928	7	,530
	Caso	1,86	,35	1,68	,899	7	,325
NRespiratória	Controle	1,26	,25	1,31	,924	7	,499
	Caso	1,33	,19	1,31	,967	7	,875
NCardíaca	Controle	,77	,09	,79	,920	7	,473
	Caso	,80	,07	,79	,966	7	,869

Os resultados indicam que apenas no grupo controle e caso da variável “NSimpática” não apresentaram normalidade na distribuição.

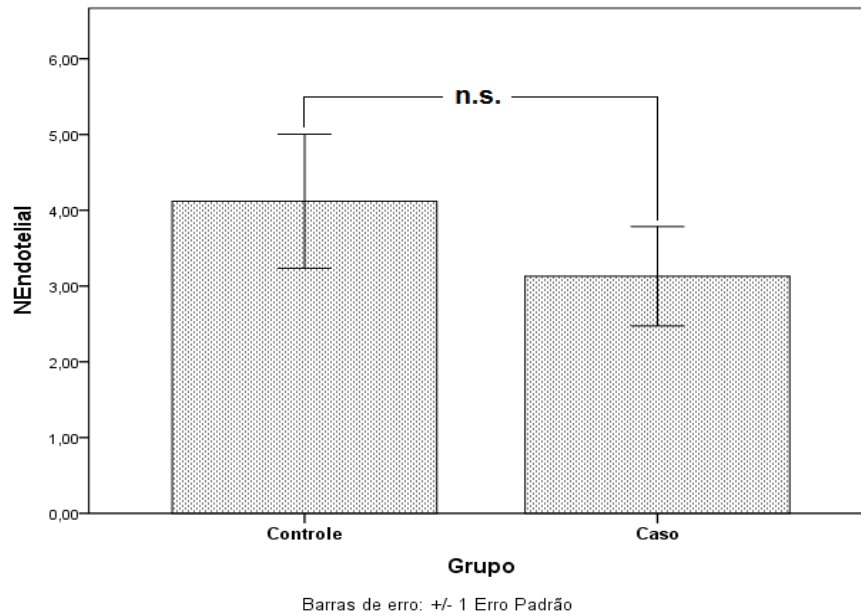
Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste t para amostras independentes nas situações em que as variáveis apresentaram distribuição normal (tabela 11), adotando-se o nível de significância 5%.

Tabela 11 - Teste t para amostras independentes componentes da vasomotricidade

	T	P
NEndotelial	0,898	0,387
NMiogênica	0,651	0,527
NRespiratória	-0,614	0,551
NCardíaca	-0,589	0,567

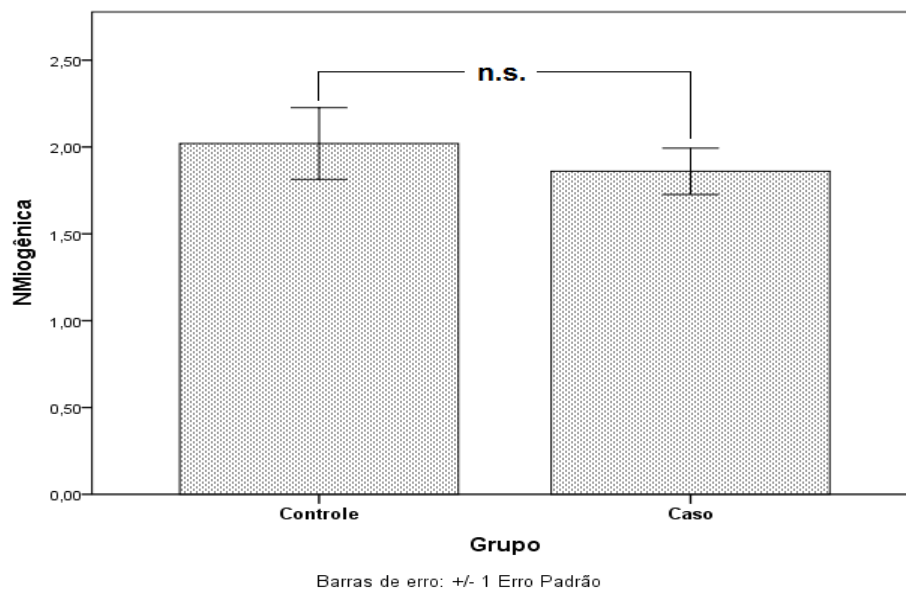
As diferenças encontradas nas variáveis normalizadas endotelial, miogênica, respiratória e cardíaca não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles nas variáveis analisadas (figuras 19, 20, 21 e 22).

Figura 19 - Comparação Placa x controle - Componente Normalizada endotelial da vasomotricidade



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

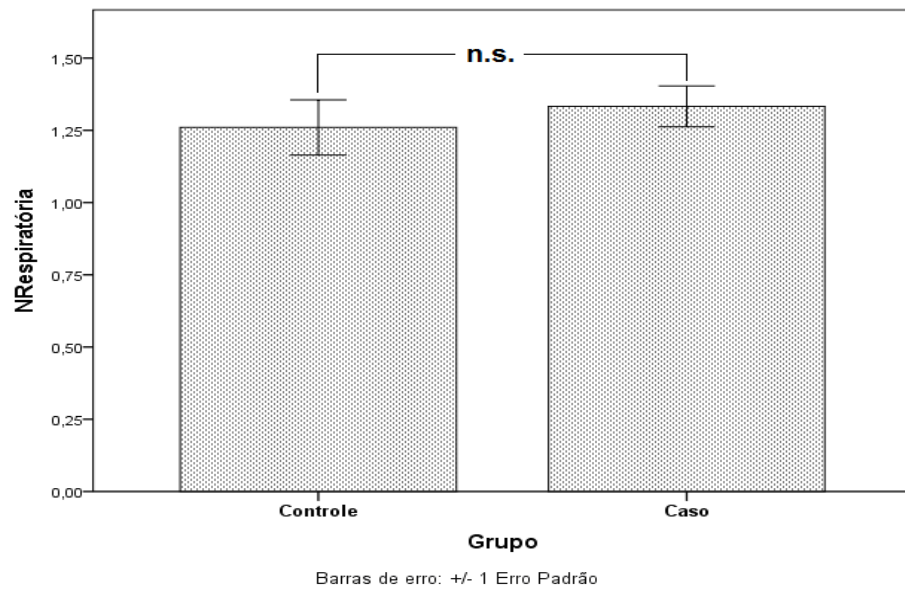
Figura 20 - Comparação Placa x controle - Componente Normalizada miogênica da vasomotricidade



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

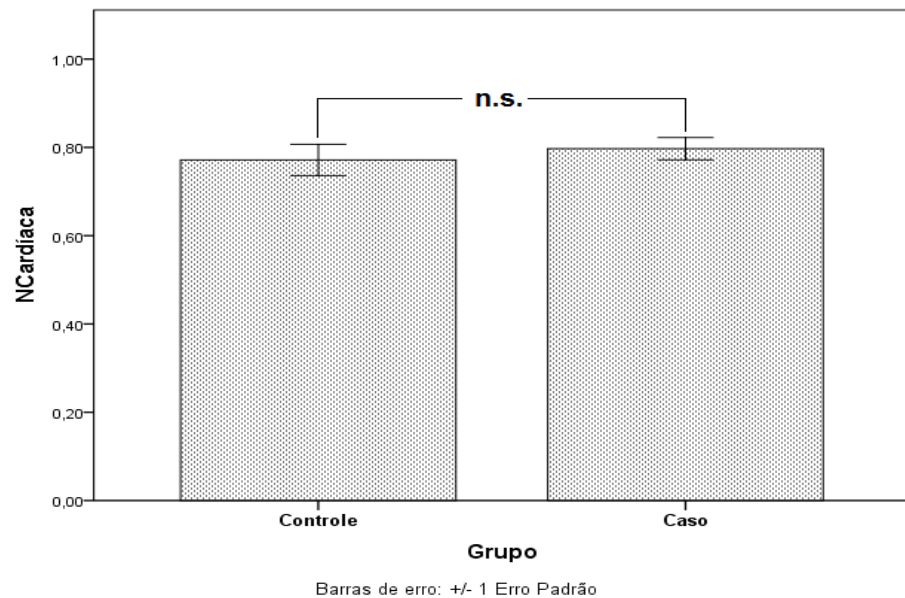


Figura 21 - Comparação Placa x controle - Componente Normalizada respiratória da vasomotricidade



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 22 - Comparação Placa x controle - Componente Normalizada cardíaca da vasomotricidade



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

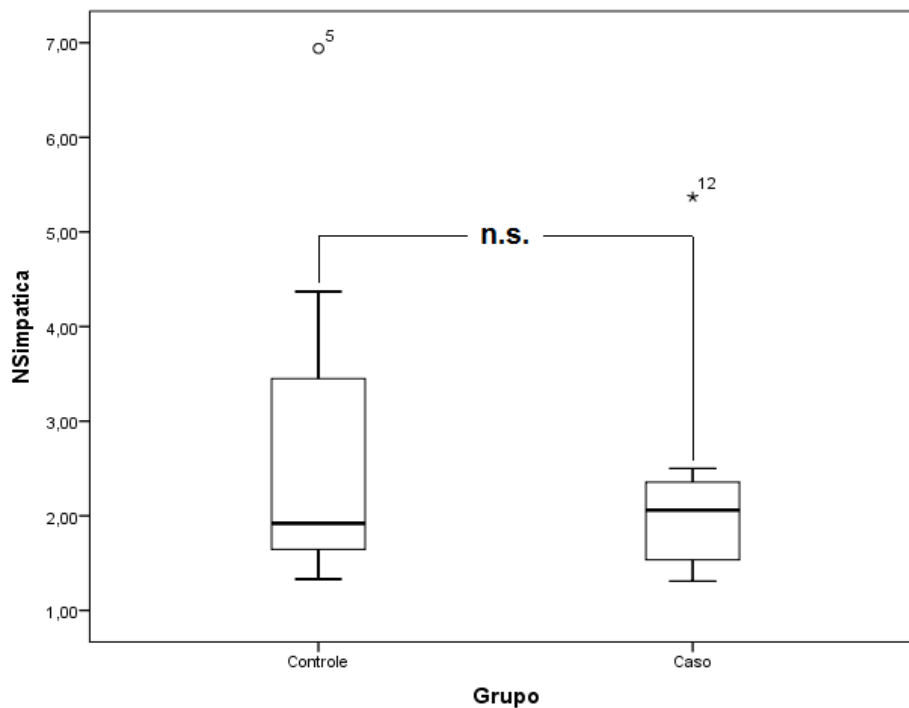
Utilizamos o teste U de Mann-Whitney nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela12). Adotou-se o nível de significância 5%.

Tabela 12 -Teste U de Mann-Whitney na variável NSimpática

Variável	Grupo	Posto Médio	Soma dos Postos	U	Z	P
NSimpática	Controle	8,00	56,00	21,000	-,447	,655
	Caso	7,00	49,00			

No caso da variável “NSimpática” as diferenças encontradas também não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles na variável analisada (figura 23).

Figura 23 - Comparação Placa x controle - Componente Normalizada simpático da vasomotricidade



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

### 3.2 Iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Antes de iniciar as análises verificou-se a normalidade das variáveis para avaliar qual o melhor teste estatístico deve ser utilizado.

Na tabela 13 são apresentados os valores de média, desvio padrão, mediana e o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para os controles e caso nas variáveis de iontoforese acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

Tabela 13 -Estatística descritiva e teste de normalidade dados iontoforese

Variáveis	Grupo	Estatística Descritiva			Shapiro-Wilk		
		Média	Desvio Padrão	Mediana	W	Graus de Liberdade	p
Basal (média PU) – Ach	Controle	12,96	9,00	14,77	0,904	7	0,356
	Caso	11,29	8,81	8,42	0,854	7	0,132
platô (dose) – Ach	Controle	7,86	1,68	9,00	0,744	7	0,011
	Caso	7,14	2,34	8,00	0,833	7	0,086
platô (média PU) - Ach	Controle	42,30	30,43	28,38	0,860	7	0,152
	Caso	42,87	39,63	36,20	0,896	7	0,305
Aumento basal-platô (PU) – Ach	Controle	29,34	23,59	16,18	0,886	7	0,255
	Caso	31,57	32,17	27,78	0,855	7	0,136
% Aumento basal-platô – Ach	Controle	248,29	149,60	190,64	0,886	7	0,253
	Caso	276,08	166,48	241,98	0,911	7	0,405
Basal (média PU) - NPS	Controle	11,69	6,59	11,16	0,886	7	0,255
	Caso	12,74	7,90	12,44	0,982	7	0,968
platô (dose) – NPS	Controle	7,00	0,00	7,00	-	-	-
	Caso	6,29	0,76	6,00	0,833	7	0,086
platô (média PU) - NPS	Controle	35,64	10,52	35,17	0,963	7	0,841
	Caso	70,72	71,62	61,90	0,802	7	0,043
Aumento basal-platô (PU) – NPS	Controle	23,95	6,02	26,24	0,906	7	0,368
	Caso	57,98	69,27	52,78	0,768	7	0,019
% Aumento basal-platô – NPS	Controle	264,88	154,03	258,52	0,897	7	0,314
	Caso	473,64	481,94	340,07	0,880	7	0,225

Os resultados indicam que as variáveis que não apresentaram normalidade ( $p < 0,05$ ) foram “platô (dose) – Ach” (grupo controle), “platô (dose) – NPS” (grupo controle), “platô (média PU) – Nitro” (grupo casos) e “aumento basal ao platô (PU) – NPS” (grupo casos).

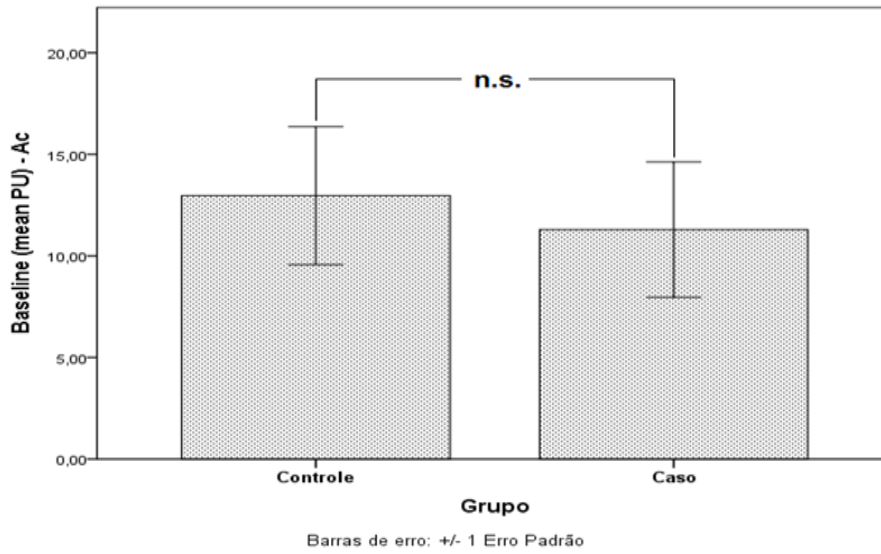
Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste t para amostras independentes nas situações em que as variáveis apresentaram distribuição normal. Adota-se o nível de significância 5%. (tabela 14)

Tabela 14 -Teste t para amostras independentes dados da iontoforese

<b>Variáveis</b>	<b>T</b>	<b>p</b>
Basal (média PU) – Ach	0,352	0,731
platô (média PU) – Ach	-0,030	0,977
Aumento basal-platô (PU) – Ach	-0,148	0,885
% Aumento basal-platô – Ach	-0,329	0,748
Basal (média PU) – NPS	-0,270	0,792
% Aumento basal-platô – NPS	-1,092	0,310

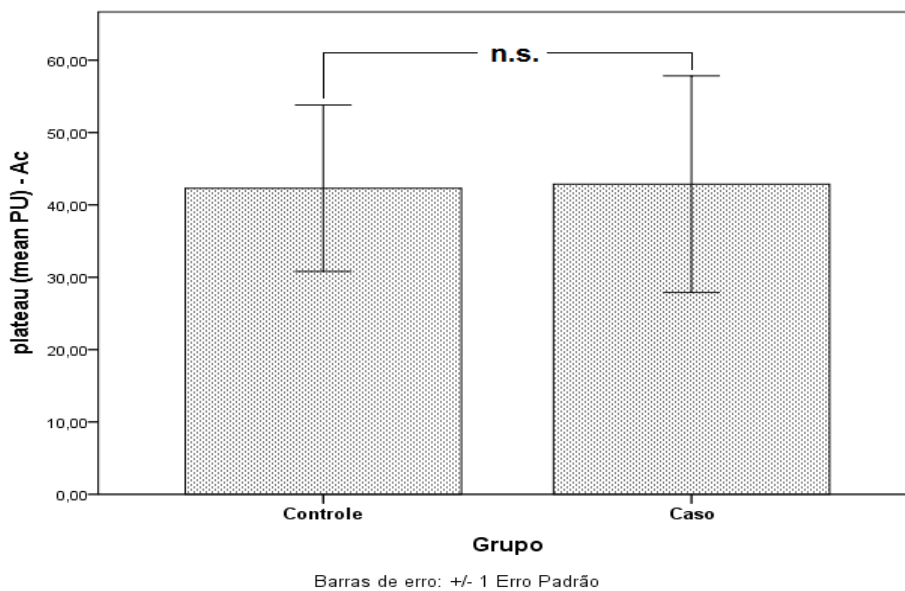
As diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles nas variáveis analisadas (figura 24 a 29).

Figura 24 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese Ach – basal (média UP)



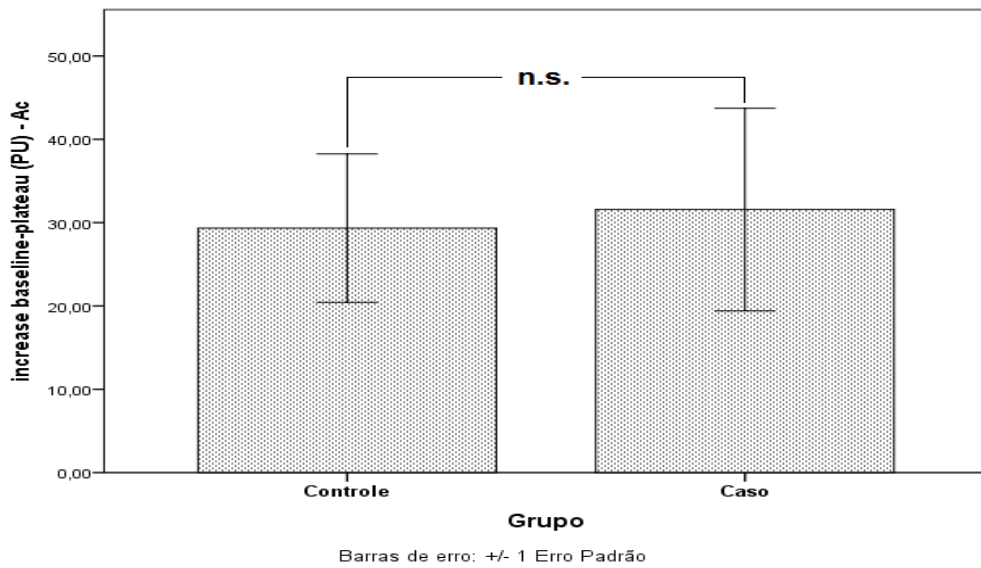
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 25 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese Ach – platô (média PU)



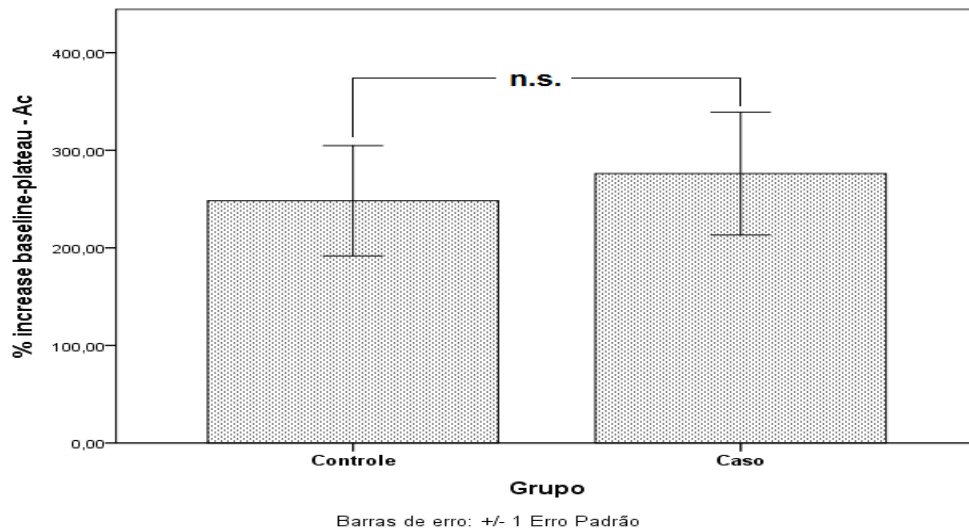
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 26 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese Ach – aumento basal ao platô (PU)



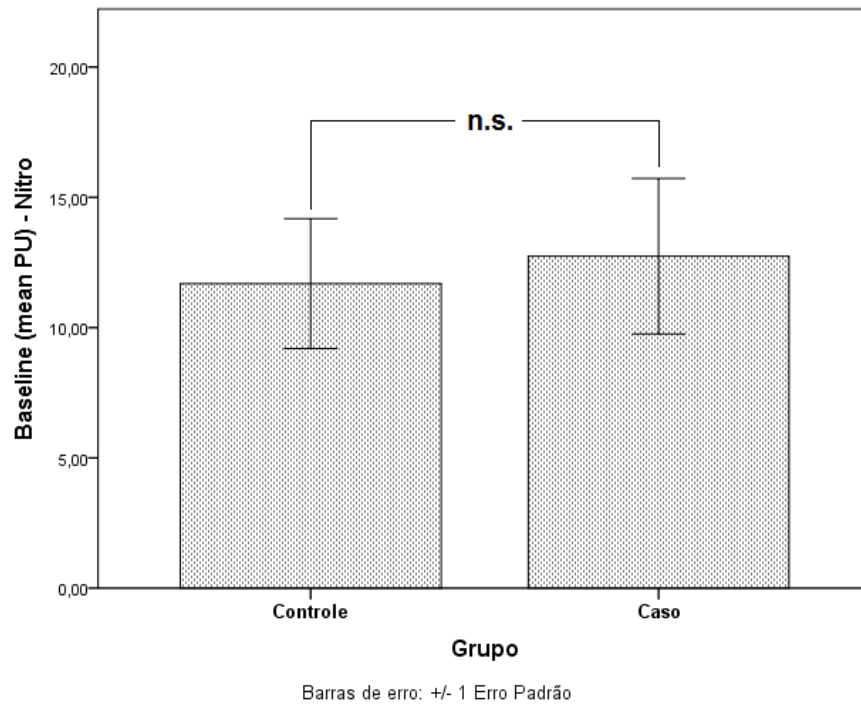
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 27 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese Ach – % aumento basal ao platô (média PU)



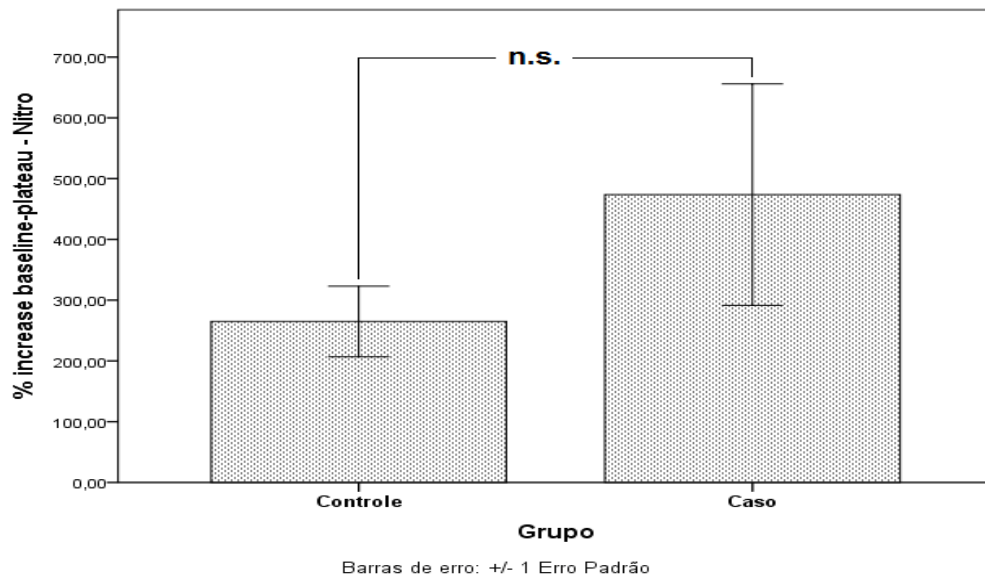
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 28 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese NPS – basal (média PU)



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 29 - Comparação Controle x Placa – Iontoforese NPS – % aumento basal ao platô (média PU)



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

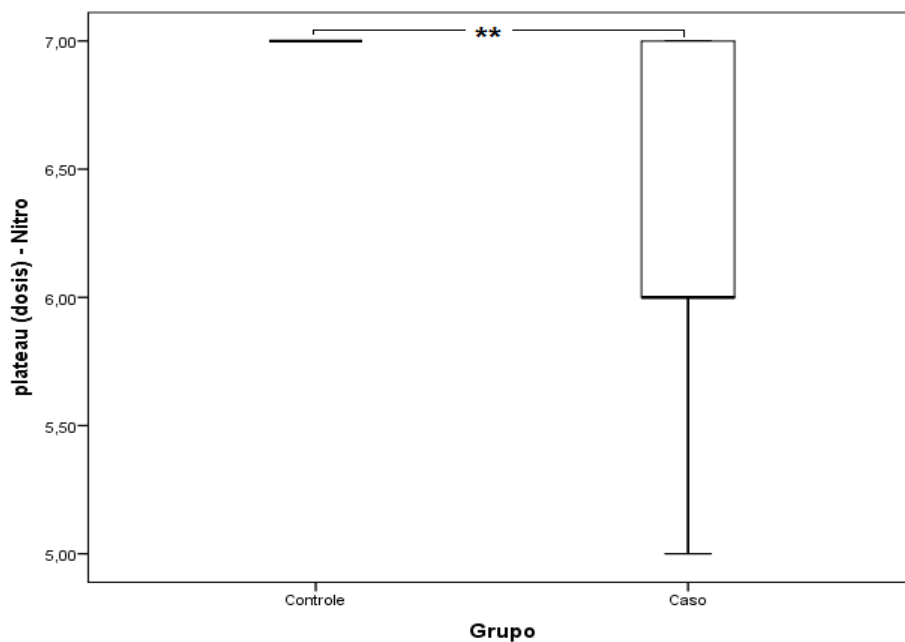
Foi utilizado teste U de Mann-Whitney nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela 15). Adota-se o nível de significância 5%.

Tabela 15 -Teste U de Mann- das variáveis da iontoforese

Variável	Grupo	Posto Médio	Soma dos Postos	U	Z	P
platô (dose) – Ach	Controle	8,14	57,00	20,000	-0,616	0,538
	Caso	6,86	48,00			
platô (dose) - NPS	Controle	9,50	66,50	10,500	-2,256	0,024
	Caso	5,50	38,50			
platô (média PU) - NPS	Controle	6,14	43,00	15,000	-1,214	0,225
	Caso	8,86	62,00			
Aumento basal-platô(PU) – NPS	Controle	6,86	48,00	20,000	-0,575	0,565
	Caso	8,14	57,00			

A variável “platô (dose) - NPS” a diferença foi significativa ( $U = 10,50$  ;  $p = 0,024$ ), com o grupo controle obtendo uma pontuação superior ao grupo dos casos. Esta análise é apresentada no gráfico *boxplots* abaixo (figura 30).

Figura 30 -Análise da comparação da variável platô (dose) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.

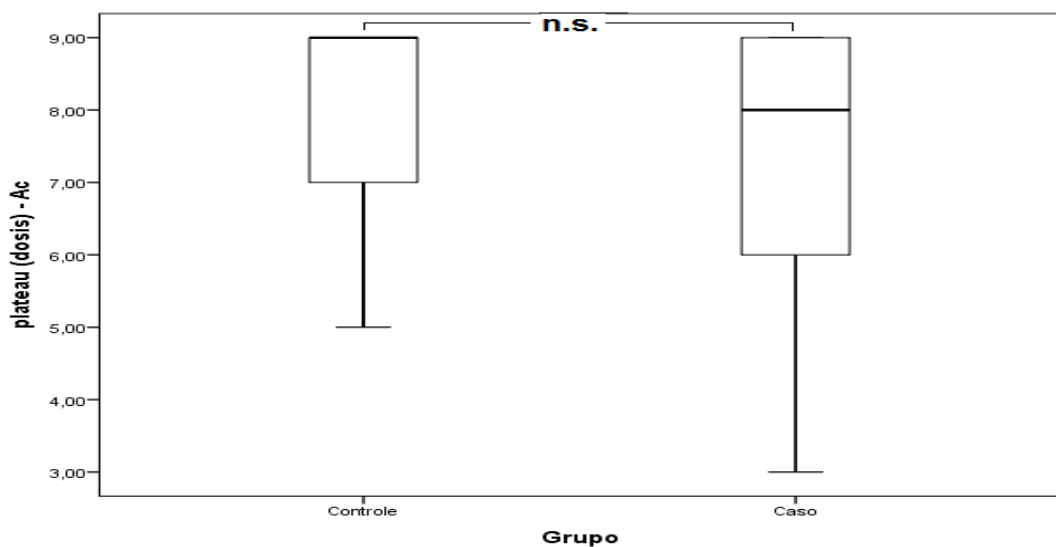


\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.



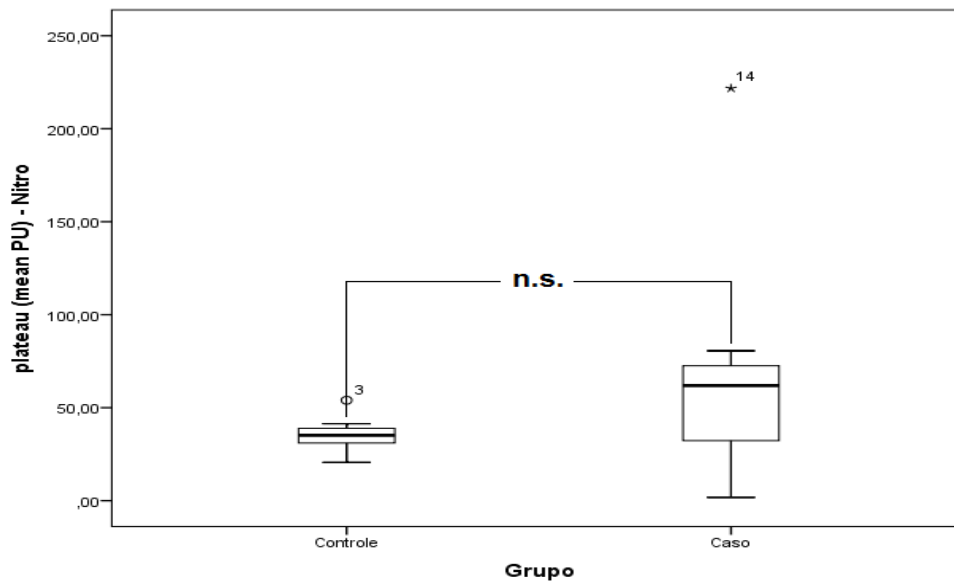
Com exceção da variável “platô (dose) - Nitro”, as diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos e controles nas variáveis analisadas tanto na iontoforese com acetilcolina quanto com nitroprussiato de sódio (figuras 31 a 33).

Figura 31 - Análise da comparação da variável platô (dose) na iontoforese acetilcolina no controle e caso.



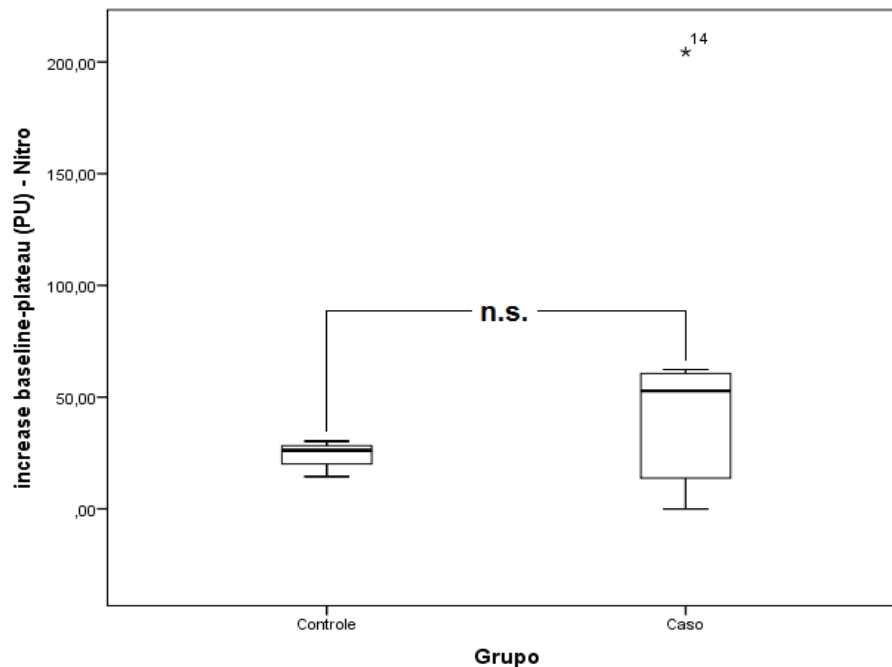
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 32 -Análise da comparação da variável platô (média PU) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 33 -Análise da comparação da variável aumento basal ao platô (PU) na iontoforese Nitroprussiato no controle e caso.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

### 3.3 Comparação da iontoforese entre acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Finalmente buscou-se comparar os resultados da Iontoforesse Acetilcolina com os resultados da Iontoforesse Nitroprussiato de Sódio.

Nesse sentido, os controles da Iontoforesse Acetilcolina foram comparados com os controles da Iontoforesse Nitroprussiato de Sódio, e os casos da Iontoforesse Acetilcolina foram comparados com os casos da Iontoforesse Nitroprussiato de Sódio.

Conforme os resultados apresentados na tabela 13, as variáveis que não apresentaram normalidade ( $p < 0,05$ ) foram “platô (dose) – Ach” (grupo controle), “platô (dose) – NPS” (grupo controle), “platô (média PU) – NPS” (grupo casos) e “aumento basal-platô (PU) – NPS” (grupo casos).

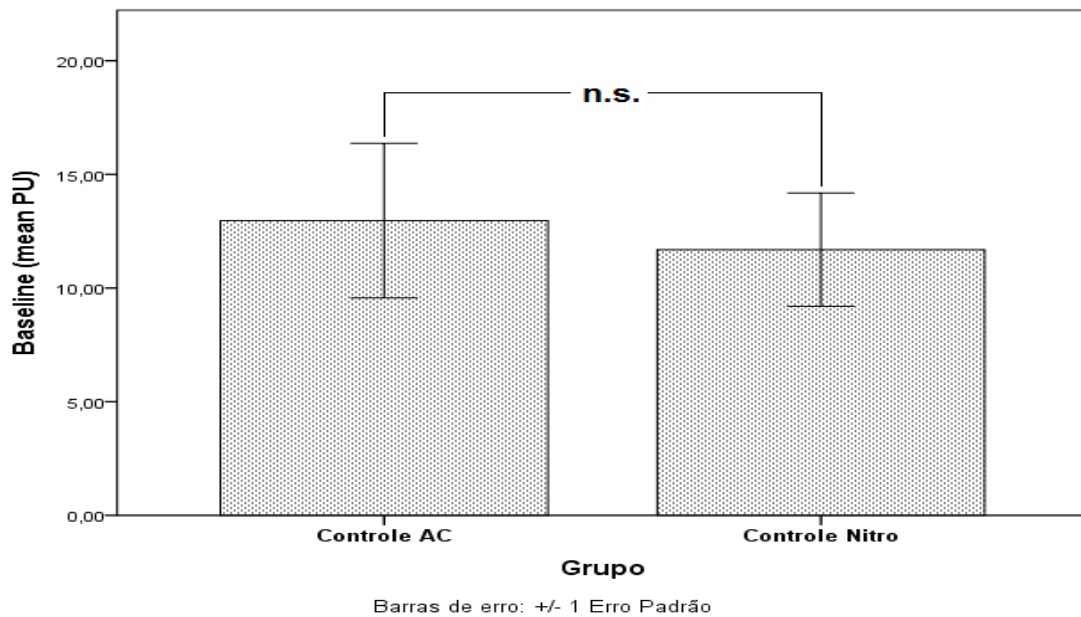
Para avaliar a diferença entre os resultados da Iontoforesse Acetilcolina e da Iontoforesse Nitroprussiato de Sódio utilizou-se o teste t para amostras pareadas nas situações em que as variáveis apresentaram distribuição normal (tabela 16). Adotou-se o nível de significância 5%.

Tabela 16 -Teste t para amostras pareadas, comparação dos controles das variáveis da iontoforesse ACh X NPS

<b>Variáveis (controles)</b>	<b>T</b>	<b>P</b>
Basal (média PU) (Ach x NPS)	0,277	0,791
Platô (média PU) (Ach x NPS)	0,565	0,593
Aumento basal-platô (PU) (Ach x NPS)	0,597	0,573
% aumento basal-platô (Ach x NPS)	-0,178	0,865

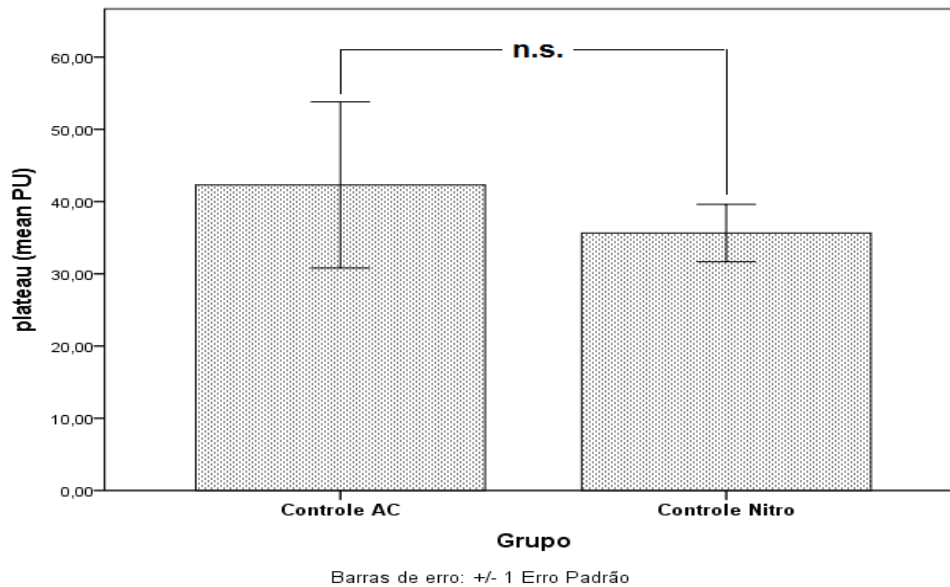
A seguir são apresentadas as comparações dos controles. As diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os controles nas variáveis analisadas (figuras 34 a 37).

Figura 34 - Comparação entre a variável basal (média PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.



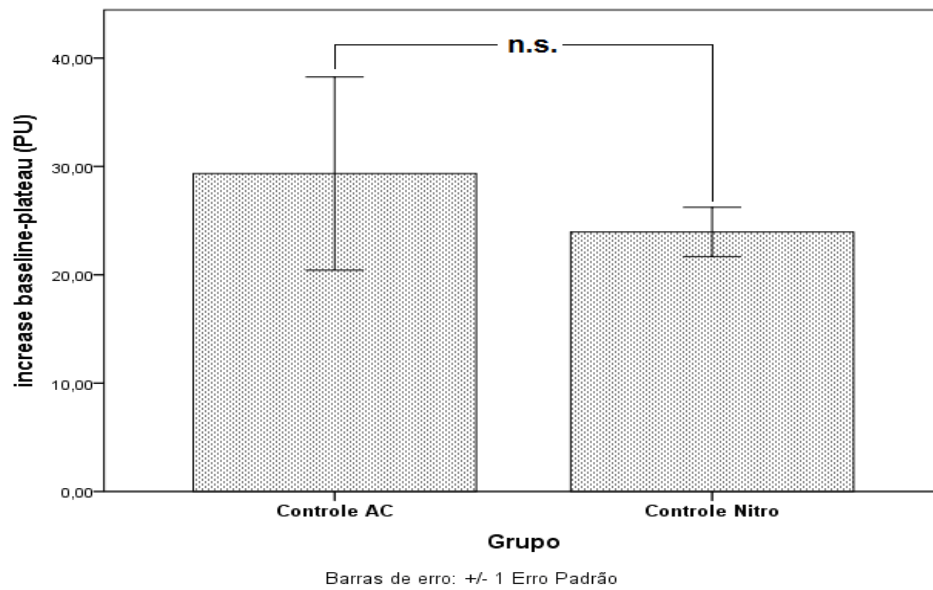
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 35 - Comparação entre a variável platô (média PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



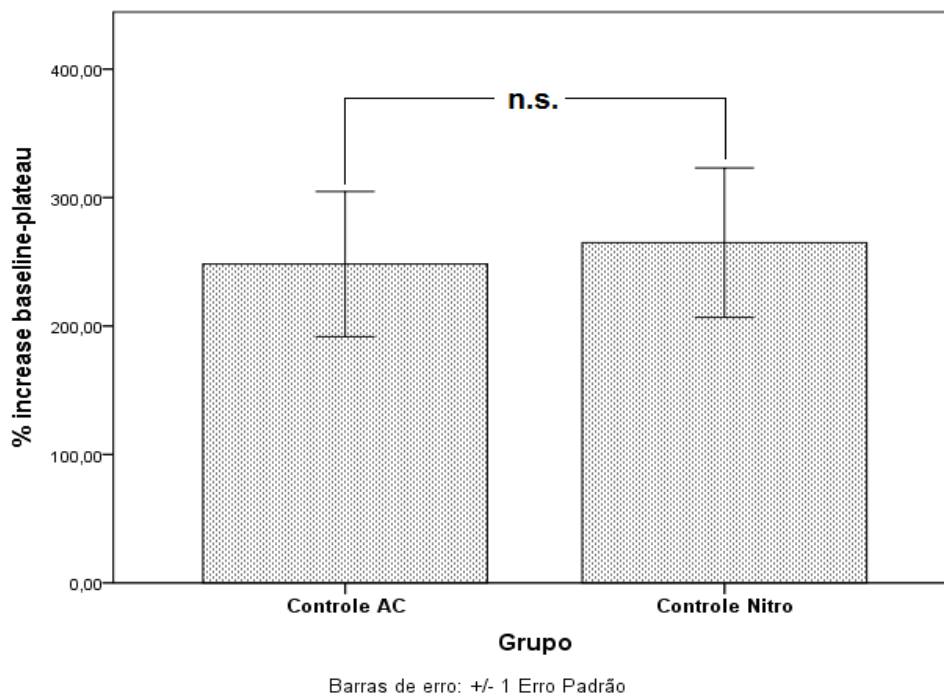
\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 36 - Comparação entre a variável aumento basal ao platô (PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 37 - Comparação entre a variável % aumento basal ao platô (PU) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Para avaliar a diferença entre os resultados da Iontoforese Acetilcolina e da Iontoforese Nitroprussiato de Sódio utilizou-se o teste de Wilcoxon nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela 17). Em ambos os casos adota-se o nível de significância 5%.

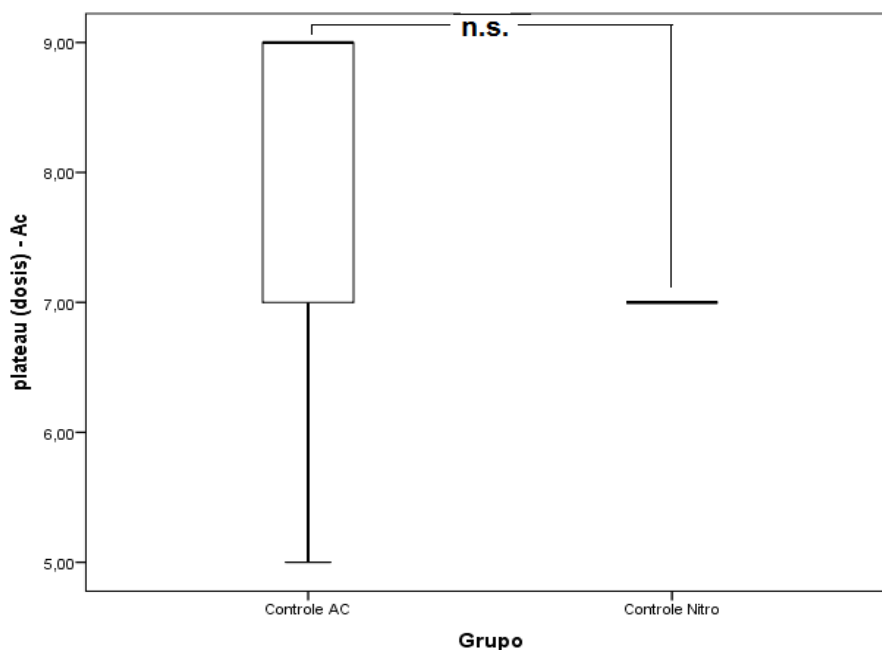
Tabela 17 -Teste de Wilcoxon, comparação dos controles na iontoforese

Variável (controles)	N	Posto Médio	Soma dos Postos	Z	P	
platô (dose) (Ach x NPS)	Postos Negativos <sup>(a)</sup>	5	4,30	21,50	-1,318	0,187
	Postos Positivos <sup>(b)</sup>	2	3,25	6,50		
	Empates <sup>(c)</sup>	0				
	Total	7				

Nitro < AC ; b. Nitro > AC ; c. Nitro = AC

As diferenças encontradas na variável platô (dose) quando comparado os grupos controles caso e controle da Ach e Nitroprussiato não foram significativas ao nível de 5% (figura 38).

Figura 38 -Comparação entre a variável platô (dose) entre os grupos controles de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

As diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os controles na variável analisada.

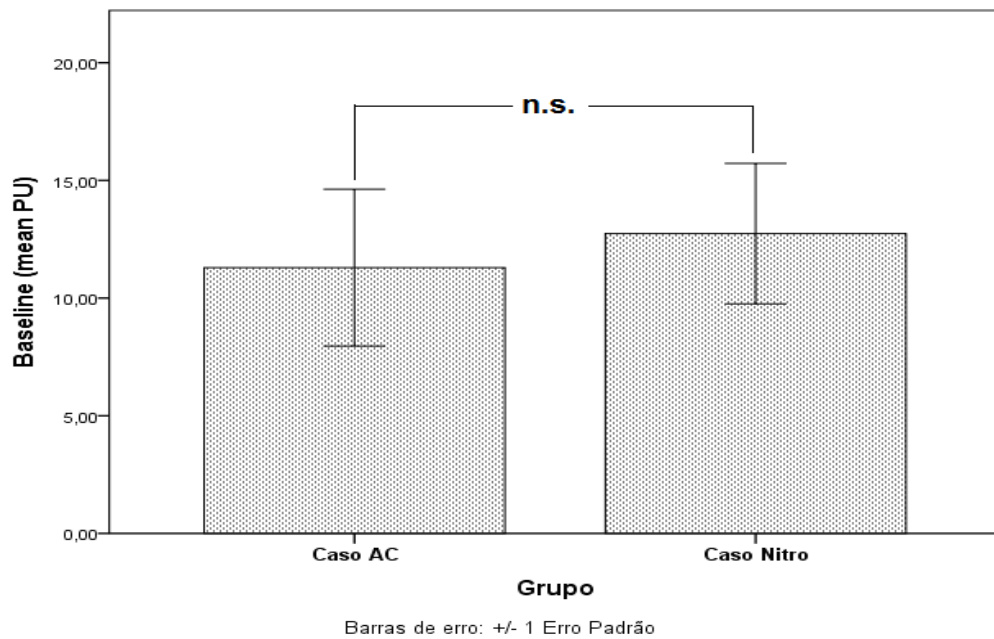
Conforme os resultados apresentados na tabela 7, as variáveis que não apresentaram normalidade ( $p < 0,05$ ) foram “platô (dose) – Ach” (grupo controle), “platô (dose) – NPS” (grupo controle), “platô (média PU) – NPS” (grupo casos) e “aumento basal-platô (PU) – NPS” (grupo casos). A seguir são apresentadas as comparações dos casos destas variáveis (tabela 18).

Tabela 18 - Teste t para amostras pareadas, comparação dos casos na iontoforese

Variáveis (casos)	T	P
Basal (média PU) (Ach x NPS)	-0,380	0,717
Platô (dose) (Ach x NPS)	0,969	0,370
% aumento basal-platô (Ach x NPS)	-1,378	0,217

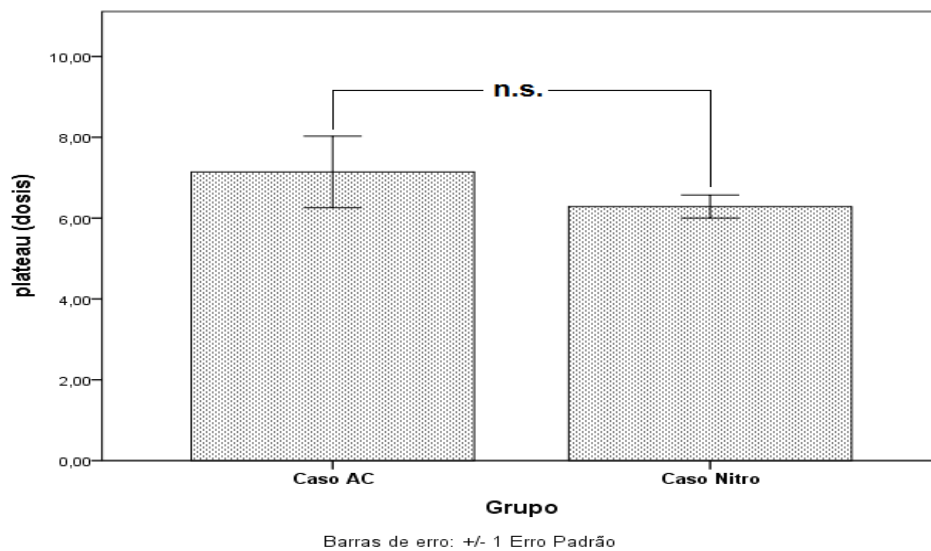
As diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos nas variáveis analisadas. (figuras 39 a 41).

Figura 39 - Comparação entre a variável basal (média PU) entre os grupos caso (placa) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

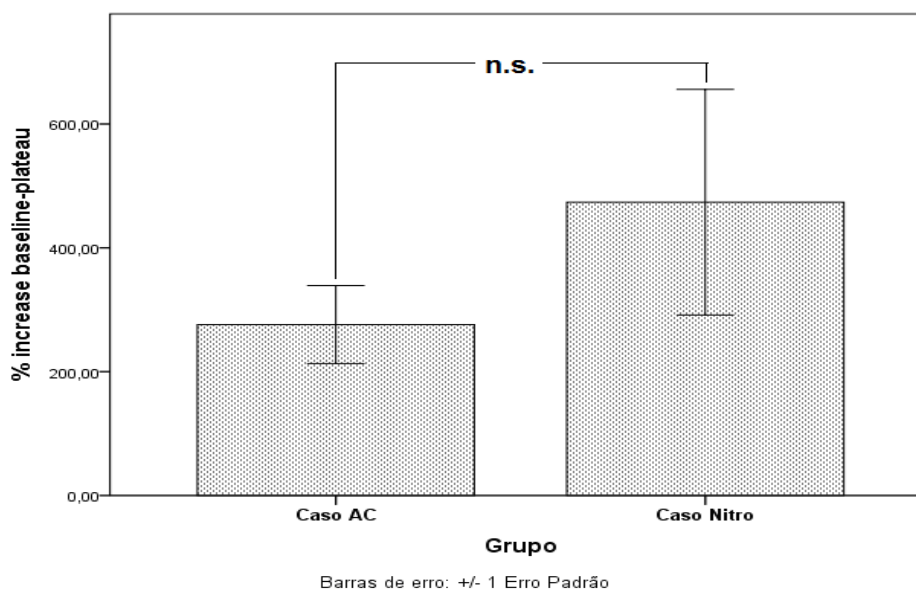
Figura 40: Comparação entre a variável platô (dose) entre os grupos caso (placa) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.



Figura 41 - Comparação entre a variável % aumento basal-plateau (média PU) entre os grupos caso (placa) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Para avaliar a diferença entre os resultados da Iontoforese Acetilcolina e da Iontoforese Nitroprussiato de Sódio utilizou-se o teste de Wilcoxon nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela 19). Em ambos os casos adota-se o nível de significância 5%.

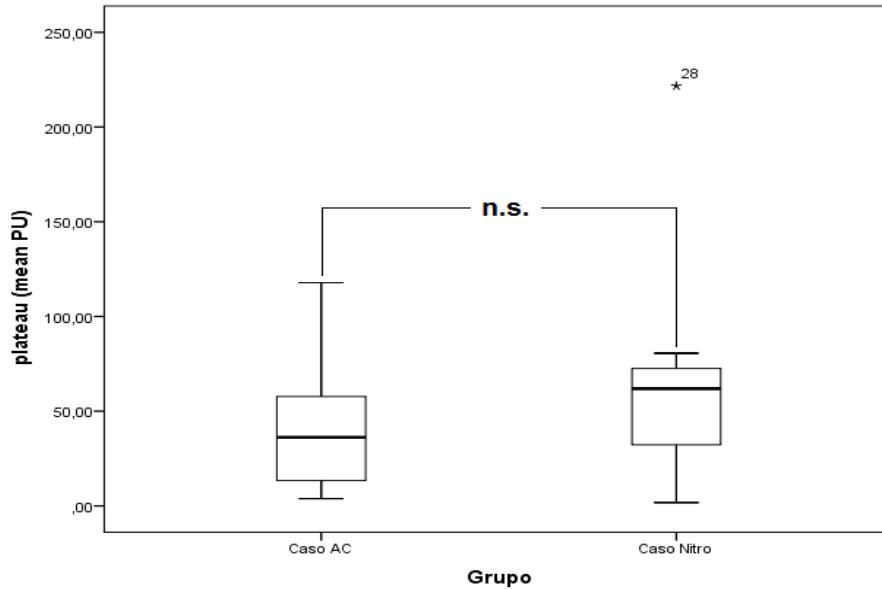
Tabela 19 - Teste de Wilcoxon, comparação dos casos iontoforese

Variável (casos)	N	Posto Médio	Soma dos Postos	Z	P	
platô (médiaPU) (Ach x NPS)	Postos Negativos <sup>(a)</sup>	4	2,75	11,00	-0,507	0,612
	Postos Positivos <sup>(b)</sup>	3	5,67	17,00		
	Empates <sup>(c)</sup>	0				
	Total	7				
Aumento basal- platô (PU) (Ach x NPS)	Postos Negativos <sup>(a)</sup>	3	3,33	10,00	-0,676	0,499
	Postos Positivos <sup>(b)</sup>	4	4,50	18,00		
	Empates <sup>(c)</sup>	0				
	Total	7				

a. NPS < Ach ; b. NPS > Ach ; c. NPS = Ach

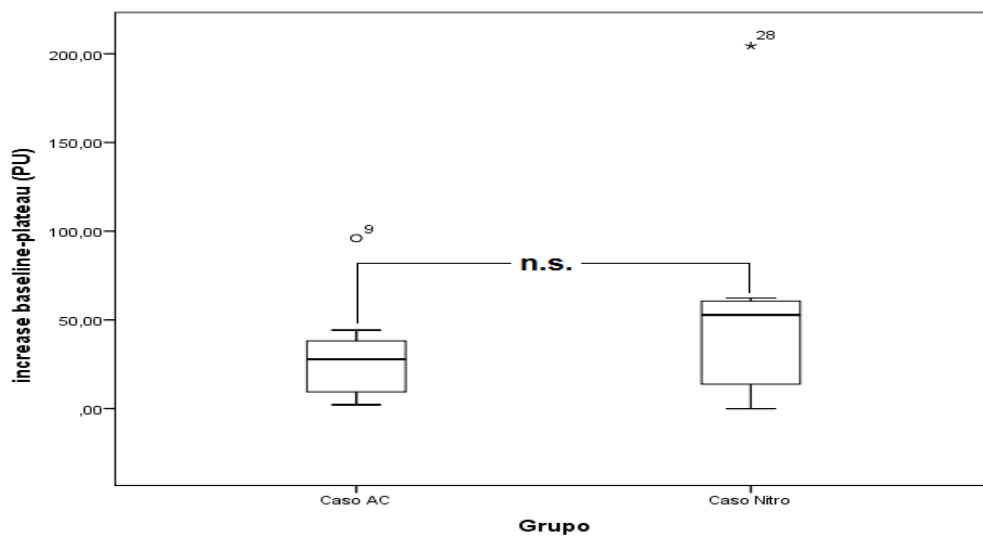
As diferenças encontradas não foram significativas ao nível de 5%. Isto é, não foram encontradas diferenças entre os casos nas variáveis analisadas (figuras 42e 43).

Figura 42 - Comparação entre a variável platô (média PU) entre os grupos caso (placa) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Figura 43 - Comparação entre a variável aumento basal-platô (PU) entre os grupos caso (placa) de iontoforese com acetilcolina e nitroprussiato



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Apesar do resultado não significativo, podemos ver na maior parte das análises dos nossos casos uma tendência a diferença entre a reatividade da placa e do controle a Ach e NPS. Podemos observar que o controle (3PU) responde muito mais rápido e alcança um platô também de forma mais rápida tanto para a Ach quanto para o NPS do que a mancha (1PU) (figura 44 e 45).

Figura 44 - Curva de iontoforese com acetilcolina. 1PU é a curva da mancha e 3PU é a curva do controle.

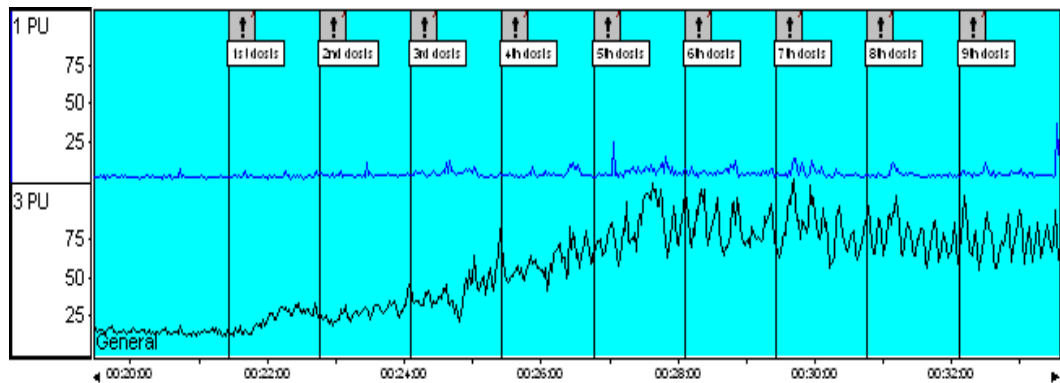
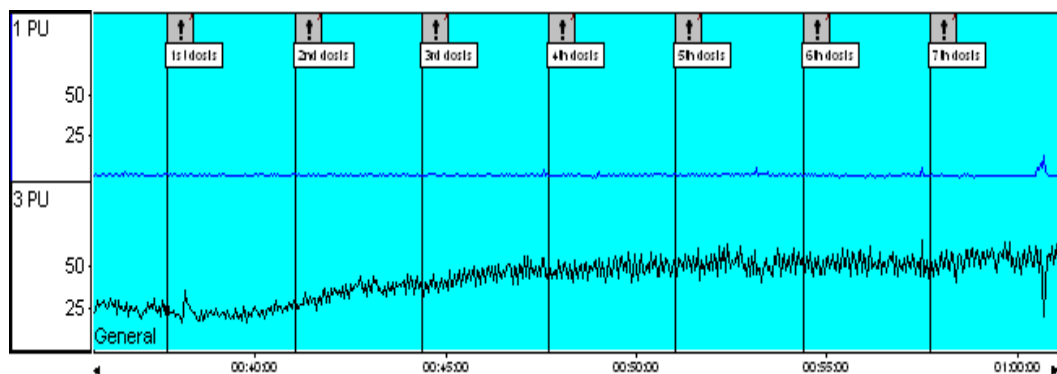


Figura 45 - Curva de iontoforese com nitroprussiato de sódio. 1 PU é a curva da mancha e 3 PU curva do controle.



### 3.4 Microscan

Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste *qui-quadrado* com correção de *Yates* ou teste exato de *Fisher* nas situações onde a contagem seja menor do que 5 (tabela 20). Em ambos os casos adota-se o nível de significância 5%.

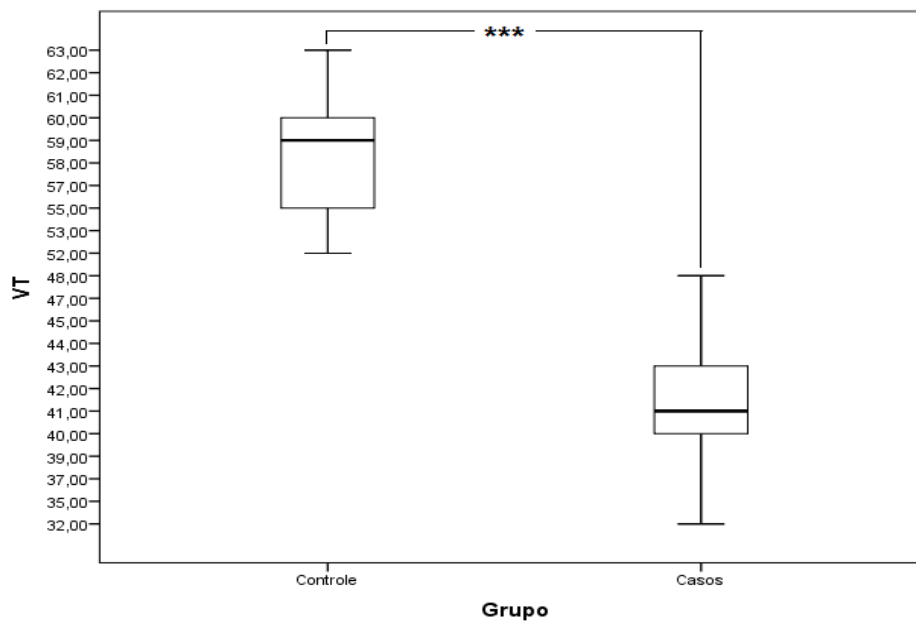
Tabela 20 -Comparação das variáveis analisadas no Microscan

Variáveis	Grupo		X <sup>2</sup>	P	
	Controle	Casos			
VT	Média	58.00	41.00	60.960	< 0.001
	Mediana	59.00	41.00		
	Desvio Padrão	3.18	3.78		
	Soma	1218.00	861.00		
VG	Média	.76	.52	0.593	0.441
	Mediana	1.00	.00		
	Desvio Padrão	.83	.75		
	Soma	16.00	11.00		
VP	Média	57.24	40.48	60.039	< 0.001
	Mediana	57.00	41.00		
	Desvio Padrão	3.48	3.59		
	Soma	1202.00	850.00		
VG_sem_fluxo	Média	.10	.00	0.488 (a)	0.244
	Mediana	.00	.00		
	Desvio Padrão	.30	.00		
	Soma	2.00	.00		
VP_sem_fluxo	Média	4.10	6.43	10.425	0.001
	Mediana	4.00	6.00		
	Desvio Padrão	1.95	1.25		
	Soma	86.00	135.00		
VG_com_fluxo	Média	.67	.52	0.160	0.689
	Mediana	1.00	.00		
	Desvio Padrão	.66	.75		
	Soma	14.00	11.00		
VP_com_fluxo	Média	53.14	34.05	87.384	< 0.001
	Mediana	54.00	34.00		
	Desvio Padrão	4.41	3.40		
	Soma	1116.00	715.00		

(a) Teste Exato de Fisher

Na variável VT o resultado foi significativo ( $X^2 = 60.960$  ;  $p < 0.001$ ) indicando que o grupo controle apresenta **mais** vasos totais que o grupo dos casos (figura 46).

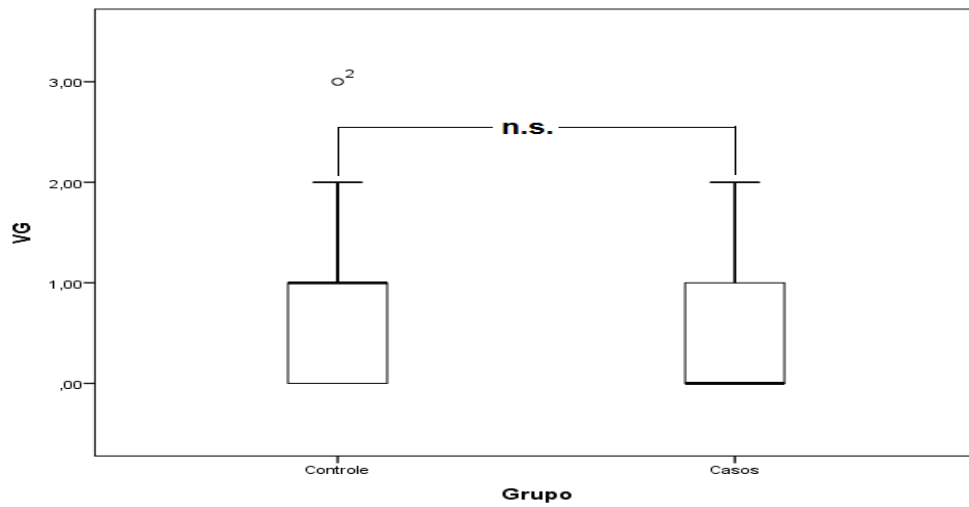
Figura 46 -Comparação da variável Vasos Totais (VT) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável VG o resultado não foi significativo ( $X^2 = 0.593$ ;  $p = 0.441$ ) indicando que a contagem dos vasos grandes no grupo controle e no grupo dos casos não difere significativamente (figura 47).

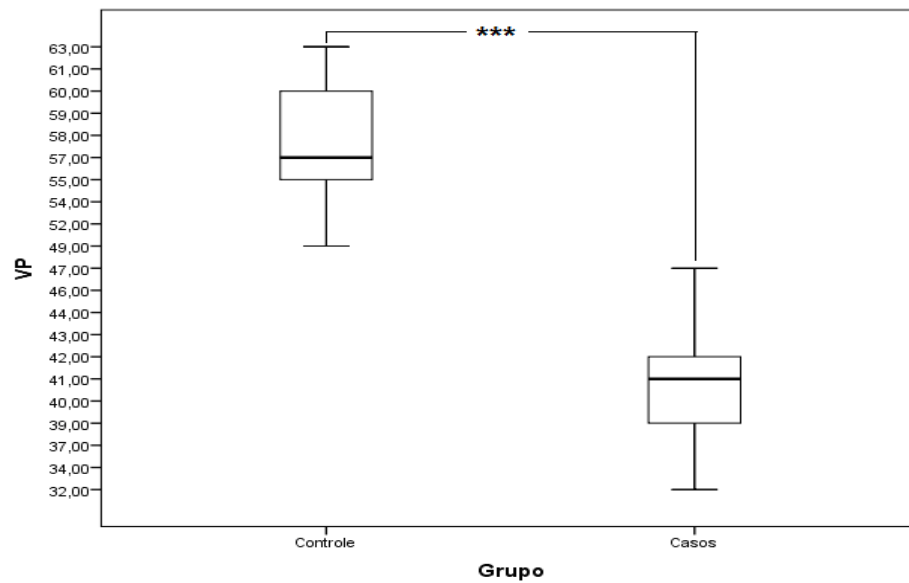
Figura 47- Comparação da variável Vasos Grandes (VG) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável VP o resultado foi significativo ( $X^2 = 60.039$  ;  $p < 0.001$ ) indicando que o grupo controle apresenta **mais** vasos pequenos que o grupo dos casos (figura 48).

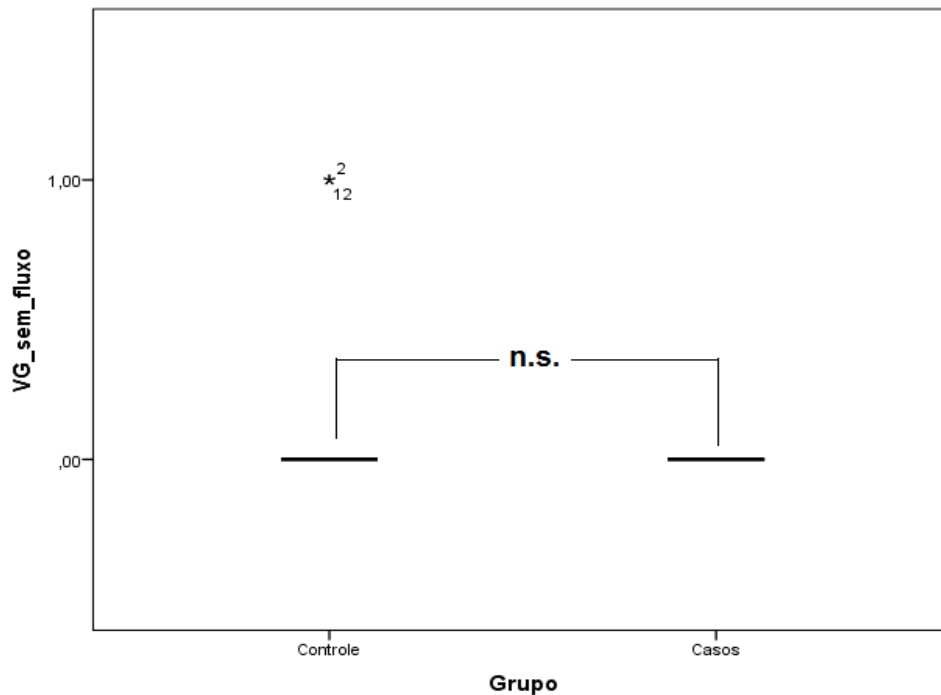
Figura 48 -Comparação da variável Vasos Pequenos (VP) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável VG\_sem\_fluxo o resultado não foi significativo ( $X^2 = 0.488$ ;  $p = 0.244$ ) indicando que a contagem dos vasos grandes no grupo controle e no grupo dos casos não difere significativamente (figura 49).

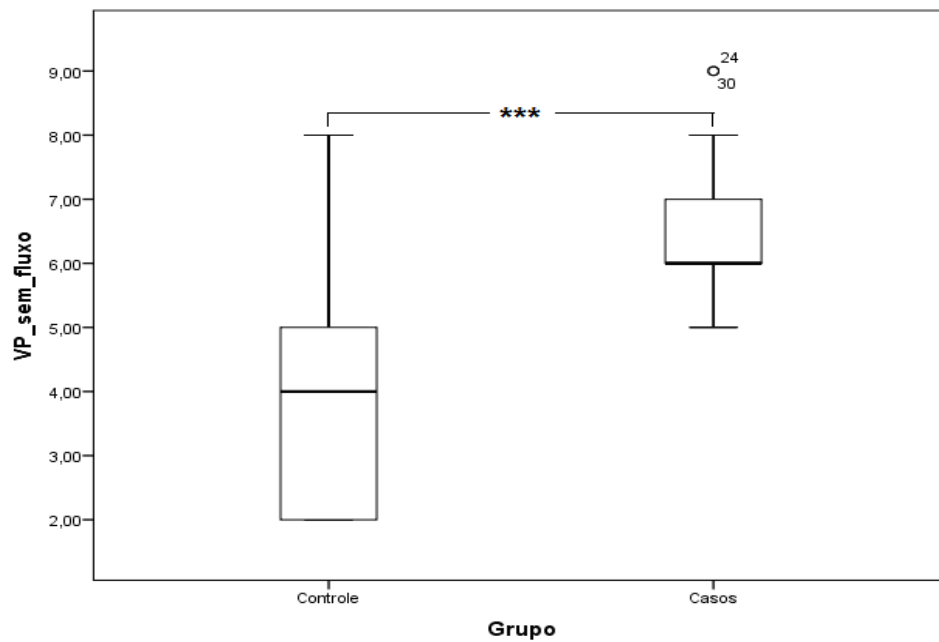
Figura 49 - Comparação da variável vasos grandes sem fluxo (VG sem fluxo) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável VP\_sem\_fluxo o resultado foi significativo ( $X^2 = 10.425$  ;  $p = 0.001$ ) indicando que o grupo controle apresenta **menos** vasos pequenos que o grupo dos casos (figura 50).

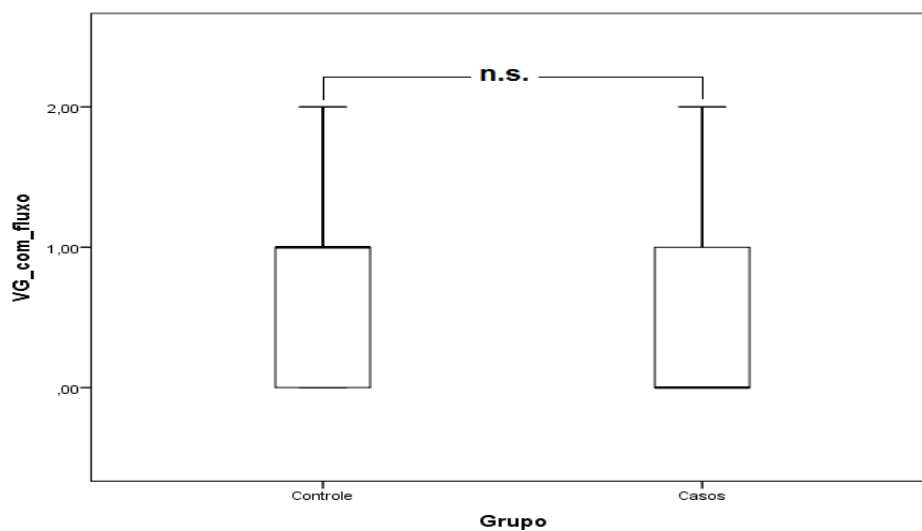
Figura 50 -Comparação da variável vasos pequenos sem fluxo (VP sem fluxo) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Na variável VG\_com\_fluxo o resultado não foi significativo ( $X^2 = 0.160$ ;  $p = 0.689$ ) indicando que a contagem dos vasos grandes no grupo controle e no grupo dos casos não difere significativamente (figura 51).

Figura 51 -Comparação da variável vasos grandes com fluxo (VG com fluxo) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan

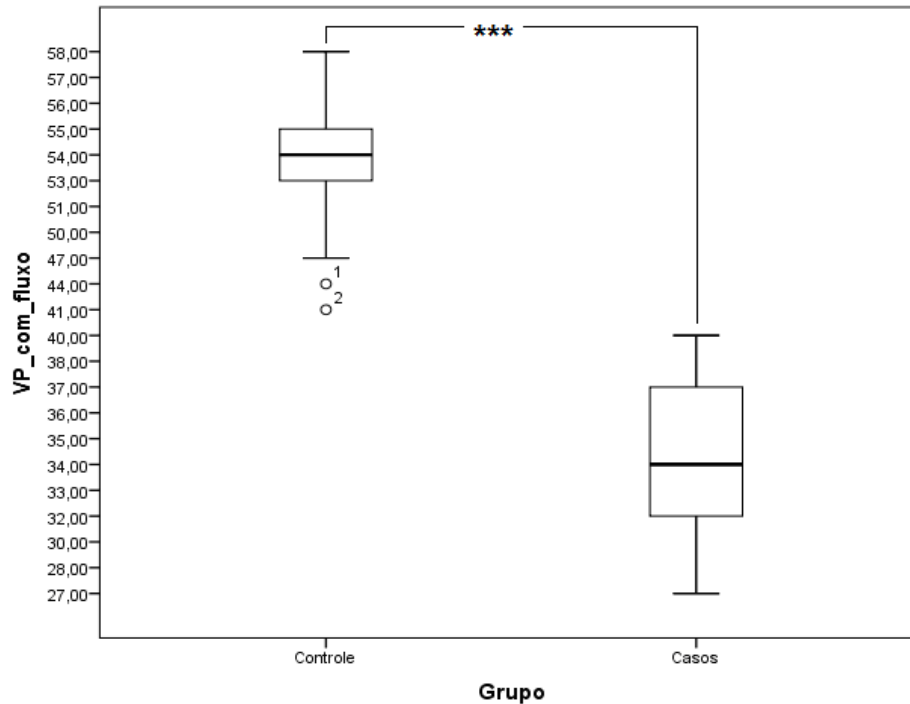


\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.



Na variável VP\_com\_fluxo o resultado foi significativo ( $X^2 = 87.384$  ;  $p < 0.001$ ) indicando que o grupo controle apresenta **mais** vasos pequenos que o grupo dos casos (figura 52).

Figura 52-Comparação da variável Vasos pequenos com fluxo (VP com fluxo) entre os grupos caso (placa) e controle no Microscan.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

Antes de iniciar as análises das variáveis contínuas verificou-se a normalidade das variáveis para avaliar qual o melhor teste estatístico deve ser utilizado.

Na tabela 21 são apresentados os valores de média, desvio padrão, mediana e o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para os controles e caso das variáveis.

Tabela 21 - Estatística descritiva e teste de normalidade das variáveis do Microscan

Variáveis	Grupo	Estatística Descritiva			Shapiro-Wilk		
		Média	Desvio Padrão	Mediana	W	Graus de Liberdade	P
DCF	Controle	16.40	1.36	16.67	0.829	21	0.002
	Casos	10.51	1.05	10.49	0.965	21	0.624
DCT	Controle	17.67	1.07	17.59	0.955	21	0.415
	Casos	12.49	1.11	12.65	0.966	21	0.647
MFI	Controle	2.36	0.28	2.25	0.917	21	0.075
	Casos	1.51	0.29	1.50	0.889	21	0.022

Os resultados indicam que o grupo controle da variável “DCF” e o grupo caso da variável “MFI” não apresentaram normalidade na distribuição.

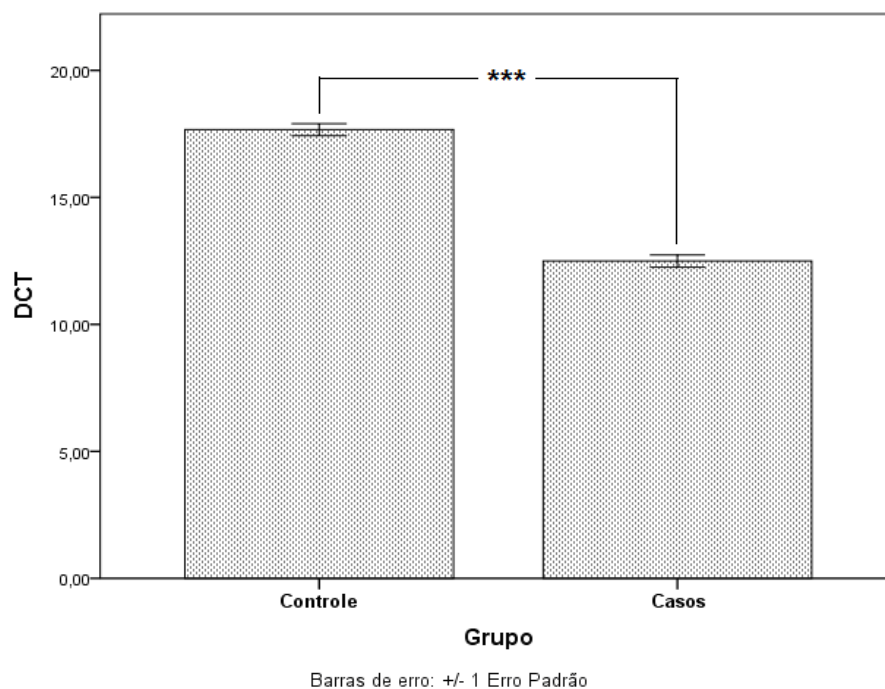
Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste t para amostras independentes nas situações em que as variáveis apresentaram distribuição normal (tabela 22). Adotou-se o nível de significância 5%.

Tabela 22 -Teste t para amostras independentes nas variáveis Microscan

Variáveis	Grupo		t	P
	Controle	Casos		
	Média	17.67	12.49	
DCT	Mediana	17.59	12.65	15.377
	Desvio Padrão	1.07	1.11	<0.001

As diferenças encontradas foram significativas ao nível de 5% na variável “DCT” ( $t = 15,377$  ;  $p < 0,001$ ), com o grupo controle obtendo score médio ( $\mu = 17,97$ ) superior ao grupo dos casos ( $\mu = 12,49$ ) (Figura 53).

Figura 53 -Comparação da variável DCT entre os grupos caso (placa) e controle



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

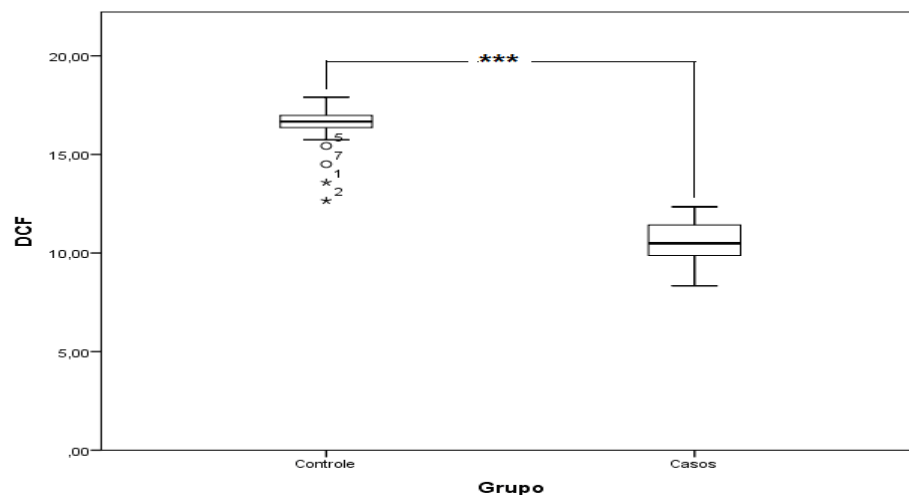
Para avaliar a diferença entre os grupos dos casos e controles nas variáveis selecionadas utilizou-se o teste U de Mann-Whitney nas situações em que as variáveis não apresentaram distribuição normal (tabela 23). Adotou-se o nível de significância 5%.

Tabela 23 -Teste U de Mann-Whitney para variáveis Microscan

Variáveis	Grupo		U	Z	p	
	Controle	Casos				
DCF	Média	16.40	10.51	0.000	-5.559	< 0.001
	Mediana	16.67	10.49			
	Desvio Padrão	1.36	1.05			
	Posto Médio	32.00	11.00			
	Soma dos postos	672.00	231.00			
MFI	Média	2.36	1.51	6.000	-5.459	< 0.001
	Mediana	2.25	1.50			
	Desvio Padrão	.28	.29			
	Posto Médio	31.71	11.29			
	Soma dos postos	666.00	237.00			

As diferenças encontradas foram significativas ao nível de 5% na variável “DCF” (U = 0,000 ; p < 0,001), com o grupo controle obtendo escore médio ( $\mu = 16,40$ ) superior ao grupo dos casos ( $\mu = 10,51$ ) (Figura 54).

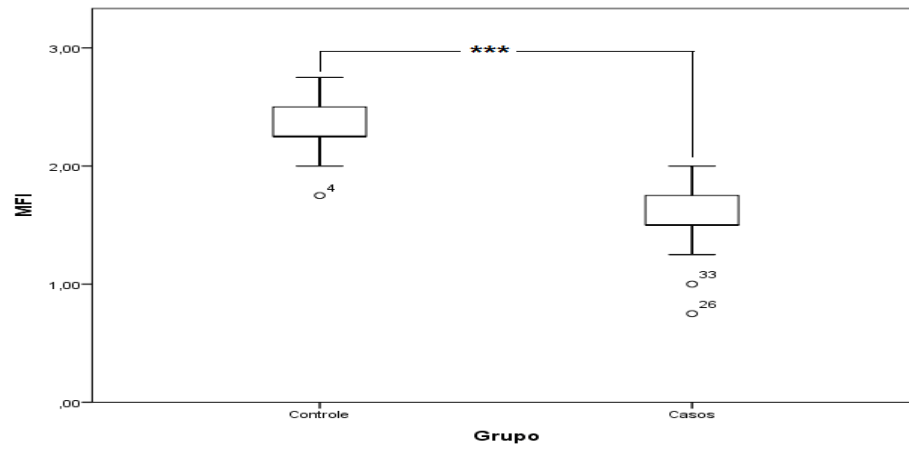
Figura 54 -Comparação da variável DCF entre os grupos caso (placa) e controle.



\*\*\* significativo ao nível de p < 0,01; \*\* significativo ao nível de p < 0,05; n.s. não significativo.

As diferenças encontradas também foram significativas ao nível de 5% na variável “MFI” (U = 6,000 ; p < 0,001), com o grupo controle obtendo escore médio ( $\mu = 2,25$ ) superior ao grupo dos casos ( $\mu = 1,50$ ) (figura 55).

Figura 55 -Comparação da variável MFI entre os grupos caso (placa) e controle.



\*\*\* significativo ao nível de  $p < 0,01$ ; \*\* significativo ao nível de  $p < 0,05$ ; n.s. não significativo.

## 4 DISCUSSÃO

Ao que consta após extensa revisão bibliográfica, esta é a primeira vez em que se avalia a repercussão da hanseníase tuberculóide na reatividade vascular destes pacientes, bem como de que forma a doença repercute na microcirculação cutânea, sendo também a primeira vez em que se usa a tecnologia SDF (Microscan®) no estudo da microcirculação deles. Os resultados encontrados de cada exame são discutidos a seguir.

### 4.1 SDF (Microscan®)

Conforme observamos nos resultados apresentados foram achadas alterações importantes ao exame de Microscan, com importante significância estatística. Neste exame foi encontrado um número maior de vasos totais, vasos pequenos e vasos pequenos com fluxo nos controles em relação ao grupo dos casos (placa). Também foi observado um número maior de vasos pequenos sem fluxo nos casos quando comparado ao controle.

Nas variáveis qualitativas foram encontradas diferenças significativas na DCF e DCT, nas quais o grupo controle apresentou escore médio superior aos casos (placa). Diferença também observada na MFI com escore médio do controle maior do que nos casos.

Não achamos na literatura trabalhos até a presente data que avaliem a repercussão da hanseníase tuberculóide na reatividade vascular destes pacientes e também a avaliação da microcirculação destes pacientes com a videomicroscopia de campo escuro (Microscan®).

Uma hipótese para explicar esta diferença quantitativa, estatisticamente significativa encontrada entre os grupos casos (placa) e controles nos pacientes com hanseníase tuberculóide, pode ser que os capilares e vênulas estejam colabados pela perda de tônus vasomotor consequente à denervação (parede vascular comprometida) e possível desvio de fluxo para shunts abertos e ainda preservados na pele normal. Isto justificaria o eritema perilesional e área central da placa mais clara.

Podemos confirmar nossos resultados com dados obtidos na literatura científica. Em 1978, Yadav (YADAV, 1978) já havia descrito diminuição do calibre das artérias digitais em pacientes com hanseníase.

Agrawal e Agrawal, em 1985, descreveram que os vasos cutâneos na hanseníase apresentam ausência de colaterais, oclusão de artérias e tortuosidade dos vasos, além de

diminuição do fluxo sanguíneo nas artérias. Os autores sugerem que estes achados arteriográficos se devam à presença de granuloma perivascular e ao infiltrado linfocítico. (AGRAWAL E AGRAWAL, 1985)

Abbot e colaboradores (ABBOT *ET AL.*, 1992) relataram que pacientes BT apresentam fluxo de sangue digital reduzido em relação aos indivíduos controle. Este fluxo lento foi associado à insuficiência do controle vasomotor nesta região anatômica, sugerindo que possa ser consequência tanto da neuropatia periférica quanto das alterações vasculares encontradas na hanseníase. Eles ainda sugerem que a simples avaliação do sinal clínico de dedos frios pode ser de grande valor na avaliação preliminar para controle da hanseníase em países endêmicos.

Wilder-Smith e colaboradores em 1996 (WILDER-SMITH, WILDER-SMITH, *ET AL.*, 1996) já haviam notado, com o uso da LDF, uma diminuição no fluxo de sangue em pacientes com hanseníase quando comparado a controles sadios. Observou também que em contatos de paciente com hanseníase o fluxo sanguíneo possuía níveis intermediários.

Ridley (RIDLEY, 1982) já havia descrito que a maior parte dos capilares dos granulomas tuberculóides encontrava-se obliterada.

Em contrapartida aos resultados achados no presente estudo, Agusni e colaboradores (AGUSNI *ET AL.*, 1988) mediram a velocidade do fluxo sanguíneo nas lesões cutâneas da hanseníase através da LDF e observou em três pacientes BT que a velocidade do fluxo sanguíneo era um pouco mais rápida sobre a lesão do que na pele sã adjacente e que esta velocidade era muito maior quando o paciente encontrava-se em reação reversa.

O estudo que mais se assemelha ao nosso foi o estudo realizado por Treu (TREU, 2010) com pacientes com hanseníase virchowiana através do uso do Cytoscan. Nesta a diferença encontrada na morfologia dos capilares nos pacientes com hanseníase virchowiana pode ser correlacionada com o maior diâmetro dos capilares. As alterações morfológicas foram justamente relacionadas ao maior tamanho e envelhecimento destes capilares. Estes resultados estão de acordo com vários estudos prévios tanto em pacientes quanto em animais submetidos a algum tipo de denervação e que mostram alterações nos capilares destes. Lefrandt e colaboradores (LEFRANDT *ET AL.*, 2003) demonstraram que pacientes diabéticos portadores de neuropatia diabética apresentavam aumento de tamanho e extravasamento nos capilares. A observação do aumento importante no tamanho das alças e discreto do diâmetro dos capilares, vistos na hanseníase virchowiana, pode ser correlacionada com tais achados. É possível especular que a diminuição da inervação causada pela hanseníase possa refletir na microcirculação de forma análoga ao bloqueio do plexo nervoso.

Landsversk e colaboradores (LANDSVERK *ET AL.*, 2006) descreveram discreto aumento do fluxo sanguíneo na pele, medido pelo laser Doppler após bloqueio do plexo braquial que inervava a área estudada. Esta alteração foi observada em estudo de simpatectomia e denervação que mostra aumento de fluxo e permeabilidade capilar. (KOMAN *ET AL.*, 1995) Já é bem constatado que a denervação de um órgão terminal diminui a atividade simpática distal e produz vasodilatação da microcirculação distal, aumentando o fluxo sanguíneo (POLLOCK *ET AL.*, 1997).

O referido aumento da permeabilidade capilar secundário à denervação pode explicar o aumento no diâmetro das papilas dérmicas visto no Cytoscan®. Henriksen e colaboradores (HENRIKSEN 1976; HENRIKSEN, SEJRSEN *ET AL.* 1983) demonstraram que ratos submetidos a denervação crônica, quando submetidos ao aumento da pressão venosa, não têm a vasoconstrição reflexa que animais saudáveis têm como mecanismo protetor, gerando maior extravasamento. Sugere-se que um mecanismo de reflexo simpático veno-arteriolar desempenhe papel dominante na redução do aumento de filtração capilar durante grandes aumentos de pressão venosa. Este reflexo simpático veno-arteriolar é determinante como fator protetor contra o edema inclusive em humanos (HENRIKSEN, 1991).

Quando há aumento da permeabilidade, com manutenção do fluxo, conseqüentemente há maior extravasamento de transudato para fora dos capilares. Este maior extravasamento cria edema dérmico que se reflete em alargamento das papilas e com isto, aumento em seus diâmetros.

É possível que a manutenção da densidade capilar funcional nos virchowianos, apesar do discreto aumento de tamanho de capilar e do diâmetro das alças capilares, decorra do fato de que diante de um edema na papila dérmica, há diminuição da densidade capilar funcional (LUPI *ET AL.*, 2007). Logo, é podemos especular que este edema de papila contraponha o teórico aumento de fluxo esperado pela alteração morfológica dos capilares.

É possível que as alterações secundárias a alterações de inervação discutidas acima em pacientes virchowianos, perdurando por longo período, possam evoluir causando a alteração morfológica descrita para os capilares. Normalmente, nos pacientes com hanseníase virchowiana o diagnóstico geralmente é feito após alguns anos do início da instalação da doença, gerando um tempo maior para instalação de alterações adaptativas dos capilares.

Estes resultados se contrapõem aos encontrados no presente estudo em pacientes com hanseníase tuberculóide. Esta diferença pode ser explicada pelas alterações encontradas nestes pacientes que sofrem de lesão nervosa aguda.

Apesar do n do nosso estudo ser pequeno, tais alterações com significância estatística

nos leva a crer que este exame seja uma excelente futura opção de diagnóstico de hanseníase, uma vez que o método é não invasivo, indolor, portátil e de fácil execução.

#### 4.2 Vasomotricidade

Partindo-se do pressuposto de que a inervação se encontra localmente alterada nas placas e regiões adjacentes dos pacientes portadores de hanseníase tuberculóide, os resultados encontrados com o uso de laser Doppler para avaliação da vasomotricidade mostram que não há diferença estatística significativa entre os pacientes portadores de hanseníase e os controles, exceto no componente endotelial da vasomotricidade. Na análise deste componente encontramos significância estatística, sendo o score médio da placa score médio menor do que o grupo controle. Acreditamos que esta alteração se deu porque a fase endotelial é uma das alterações mais precoces na vasomotricidade.

Outra hipótese que pode explicar a alteração do componente endotelial é a já descrita “parasitose endotelial pelo *Micobacterium leprae*”. Esta alteração foi vista por alguns autores como Scollard (SCOLLARD, 2000A) que descreveu a colonização das células endoteliais dos vasos sanguíneos epineurais pelo *M. leprae* e estudou a colonização das células endoteliais da veia umbilical humana *in vitro*, utilizando microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura confocal a laser de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. O mesmo autor já havia descrito em estudo anterior, evidências que sugeriam que as células endoteliais da vasculatura dos nervos periféricos e adjacências poderiam atuar como “reservatórios” pelo qual o *M. leprae* infecta os nervos, sugerindo, assim, que a patogênese da neuropatia na hanseníase pode, portanto, implicar uma sequência dinâmica de processos de adesão imunológica e inflamatória que envolve as células endoteliais dos nervos periféricos. (SCOLLARD, 2000B)

Buchard e colaboradores (BURCHARD E BIERATHER, 1985) já haviam descrito que os capilares cutâneos desempenham papel importante para a propagação do *Mycobacterium leprae*, uma vez que as micobactérias podem multiplicar-se em células endoteliais, assim como nos pericitos e podem entrar na corrente sanguínea.

Turkel e colaboradores (TURKEL, 1982) descreveram alterações estruturais importantes na microvasculatura dérmica semelhantes às descritas anteriormente nos vasos endoneurais, sugerindo um possível papel dos pequenos vasos cutâneos na natureza crônica da resposta do hospedeiro à infecção por *M. leprae*.



Dugue e colaboradores (DUGUE *ET AL.*, 2004) demonstraram o desenvolvimento de anticorpos anti células endoteliais (membrana basal e citosol) indicado pela adesão de E-selectina e / ou pela apoptose induzida por eles. Estes dados encontrados sugeriram que em alguns pacientes com hanseníase, os anticorpos anti células endoteliais podem desempenhar papel importante na patogênese da hanseníase.

Antunes e colaboradores (ANTUNES *ET AL.*, 2000) descreveram através do uso de técnica de imunohistoquímica com marcadores para células endoteliais que pacientes virchowianos apresentam malha densa de capilares tortuosos e que nos tuberculóides as lesões vasculares ficam restritas à periferia dos granulomas, não sendo encontradas em meio as células epitelióides.

Outra explicação para a alteração da vasomotricidade endotelial seria a disfunção endotelial que pode ser corroborada por alguns estudos.

Schon (SCHON *ET AL.*, 2001) observou aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e NT (nitrotirosina) nos queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais com estreita relação com a reação granulomatosa. Sabemos que a NT é uma espécie reativa de oxigênio que pode lesar o endotélio. A pele normal dos pacientes com MHT não apresentou iNOS e NT.

Abdel Hafez (ABDEL-HAFEZ *ET AL.*, 2010) relatou a diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) em MHT, com conseqüente aumento de superóxido e peroxinitrito (ONOO-), levando ao dano endotelial.

Kar, (KAR E KAVDIA, 2013) relatou que o stress oxidativo endotelial aumenta a concentração de superóxido e ONOO- no endotélio e no lúmen. Excesso na produção de ON pela iNOS, aumenta a produção de ONOO- que leva ao dano endotelial, durante o stress oxidativo.

Uma possibilidade para que não tenha havido diferença estatisticamente significativa nos outros componentes da vasomotricidade reside no fato de que o método é extremamente sensível, com alta variabilidade nos resultados. Diante de um número amostral reduzido, isto pode comprometer a análise dos resultados, fazendo com que estes possam não ser fidedignos. Vale ressaltar, entretanto, que o número amostral utilizado é semelhante ao da grande maioria dos estudos que usam o laser Doppler na avaliação da vasomotricidade.

Em estudo semelhante ao nosso, com pacientes virchowianos, Treu não achou diferença no resultado da vasomotricidade dos pacientes virchowianos quando comparados aos controles. Estes dados podem ser corroborados pelo estudo de Yuill e colaboradores (YUILL *ET AL.*, 2010) que relataram que o tônus miogênico é desencadeado pela

despolarização da musculatura lisa vascular, através do influxo de cálcio para o meio intracelular, num mecanismo relacionado apenas com a tensão na parede do vaso, independente de outros fatores,mas alguns fatores podem ajudar a modular esta resposta. Neste estudo eles demonstraram que um mecanismo de controle da vasomotricidade é através da liberação basal do óxido nítrico endotelial, que pode diminuir e até suprimir o tônus vasomotor.

Os resultados negativos encontrados nos demais componentes da vasomotricidade podem ser confirmados em estudos anteriores de Bouskela e colaboradores (BOUSKELA E GRAMPP, 1992; BOUSKELA E CYRINO, 1994; 1997). Tais estudos já sugeriam que a vasomotricidade é um fenômeno essencialmente miogênico. Isto foi inicialmente deduzido tendo em vista que, mesmo sob anestesia com pentobarbital de sódio ou  $\alpha$ -cloralose, com o uso de bloqueador nervoso misto ou seletivo (tetrodotoxina, propranolol e fenoxibenzamina), a vasomotricidade não foi afetada. Por outro lado o uso de ativadores ou bloqueadores dos canais de  $K^+$  pode suprimir e posteriormente reativar (respectivamente) a vasomotricidade.

Segundo Achakri e colaboradores (ACHAKRI *ET AL.*, 1995), a frequência e magnitude da vasomotricidade são influenciadas pela pressão intraluminal, e não por agentes externos, com isto o fato de não haver alteração na amplitude e frequência da vasomotricidade, apesar das alterações vistas na hanseníase, coloca os resultados obtidos de acordo com tal hipótese.

#### 4.3 Iontoforese

Em relação aos achados com iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato de sódio, podemos constatar que não houve diferença significativa entre a placa e o controle, exceto na variável Platô do NPS, onde o controle apresentou score maior do que a placa.

Como possível explicação para este achado, acreditamos que além da lesão no endotélio (disfunção endotelial) detectada na vasomotricidade, pode existir comprometimento da parede vascular.

A denervação leva a perda da tonicidade muscular, baixa atividade muscular, hipotonia e até atrofia muscular levando a baixa responsividade da parede muscular;

Wilder-Smith e Treu (WILDER-SMITH, WORPEL, *ET AL.*, 1996; WILDER-SMITH *ET AL.*, 2000; TREU, 2010) já haviam demonstrado uma baixa resposta vascular aos

estímulos vasodilatadores em pacientes com hanseníase virchowiana, como mecanismo compensatório ao reflexo vasomotor diminuído (denervação e disautonomia) para evitar hipotensão postural. Acreditamos que os resultados não significativos das demais variáveis da iontoforese se deva ao fato de que n amostral era pequeno ou porque realmente não existe, apesar da diferença encontrada na vasomotricidade endotelial.

Os resultados encontrados com a iontoforese de Ach e SNP não corroboram os achados de alguns estudos (RIZZONI *ET AL.*, 2000)(CARR *ET AL.*, 1993), onde a reatividade vascular às substâncias vasoativas foi menor de forma estatisticamente significativa no membro desnervado do que no membro de inervação mantida. Assim como na vasomotricidade, acreditamos que este resultado estatisticamente negativo se deve ao fato de que o método é extremamente sensível, com alta variabilidade nos resultados. Diante de um numero amostral reduzido, isto pode comprometer a análise dos resultados, fazendo com que estes possam não ser fidedignos.

Em relação aos achados com iontoforese de acetilcolina e nitroprussiato de sódio dos pacientes virchowianos no estudo de Treu (TREU, 2010) foi observado que houve uma diminuição da resposta vasodilatadora sob a ação destas duas substâncias vasoativas. Este comportamento se mostrou totalmente dissociado de qualquer alteração do endotélio vascular, que parece estar íntegro nos pacientes virchowianos. Este resultado foi constatado pelas curvas de resposta vasodilatadora a ambas as substâncias serem absolutamente idênticas. Caso houvesse interferência do endotélio capilar por comprometimento deste, a resposta à acetilcolina seria inferior a do nitroprussiato de sódio.

Os resultados encontrados com a iontoforese de Ach e SNP por Treu estão de acordo com os achados de Carr e colaboradores (CARR *ET AL.*, 1993), que já haviam percebido uma alteração na reatividade vascular em ratos submetidos à denervação de membro. Tais animais tiveram seletivamente uma das patas traseiras desnervada e foi realizada ionoforese transdérmica de nitroprussiato de sódio e de acetilcolina. A reatividade vascular às substâncias vasoativas foi menor de forma estatisticamente significativa no membro desnervado do que no membro de inervação mantida.

Em outro estudo com ratos simpatectomizados, Rizzoni e colaboradores (RIZZONI *ET AL.*, 2000) demonstraram que a reatividade vascular de tais animais esta significativamente alterada em relação a animais controles. A resposta para substâncias vasodilatadoras (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) foi reduzida nos animais simpatectomizados, o que vai de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo. Neste

mesmo estudo, especulam que este comportamento de baixa resposta vascular aos estímulos vasodilatadores pode se tratar de um mecanismo compensatório para o fato de que os pacientes com quadro de denervação, e conseqüentemente disautonomia, apresentam um reflexo vasomotor diminuído, com isso têm grande tendência para hipotensão postural. Este comportamento também é descrito em pacientes hansenianos, principalmente nos virchowianos (WILDER-SMITH E WILDER-SMITH, 1996; WILDER-SMITH *ET AL.*, 2000; ILLARRAMENDI *ET AL.*, 2005; WILDER-SMITH E VAN BRAKEL, 2008).

Esta resposta vasodilatadora diminuída pode se tratar de um mecanismo protetor para que estes pacientes não façam uma queda pressórica acentuada, relacionada à perda do controle autônomo. Estes resultados também podem representar uma diminuição crônica do tônus da musculatura lisa vascular, que pela diminuição por longos períodos do estímulo nervoso, pode resultar em diminuição de responsividade.

Conforme já relatado, a nossa amostra final foi pequena. Isto se deve aos inúmeros critérios de exclusão adotados. A importância da exclusão de pacientes com algumas doenças de base e condições e hábitos de vida se dá pela influência destas na microcirculação. Diversos estudos já mostraram tais alterações: hipertensão, diabetes mellitus (DE JONGH *ET AL.*, 2007), obesidade (DE JONGH *ET AL.*, 2008), idade e fumo (Monfrecola *et al.*, 1998). Estes são fatores que alteram a resposta microcirculatória na fluxometria com laser Doppler, inclusive alterando a vasomotricidade.

Apesar destes critérios excluirmos uma enorme quantidade de pacientes eles foram essenciais para excluir qualquer outra doença que pudesse influenciar a microcirculação e, com isto, colocar em dúvida onexo causal entre as alterações encontradas e a hanseníase. Esta talvez seja uma das maiores dificuldades de estabelecer um *n* maior de pacientes.

Apesar da avaliação de 12 pacientes, tivemos que excluir 2 pacientes, por problemas na gravação do exame e outros 3 por apresentarem placa pequena e com cicatriz de biópsia recente que ocupava quase que a totalidade da mancha, e desta forma apresentaram interferências na avaliação da vasomotricidade provavelmente pela presença de neovascularização e fibrose da cicatriz cirúrgica.

Sabemos que cada região do corpo apresenta características específicas de sua microcirculação e que desta forma, o ideal seria avaliar apenas as lesões que estivessem em um mesmo segmento da pele. Porém sabemos que as placas da hanseníase tuberculóide podem surgir em qualquer área do corpo, e desta forma, seria difícil limitarmos ainda mais o *n* de pacientes. A fim de evitar algum tipo de viés na comparação dos resultados, optamos por avaliar somente placas que estivessem localizadas em membros superiores e inferiores, e usar

o paciente como seu próprio controle. Ou seja, se o paciente apresenta uma placa de hanseníase tuberculóide no antebraço direito, usamos a mesma região contralateral do paciente (área sadia). Como não existe ainda na literatura estudos com este tipo de paciente, optamos por realizar o protocolo desta forma.

Encontramos apenas trabalhos com avaliação da microcirculação de pacientes virchowianos. Nestes foi avaliado a microcirculação digital e realizado o controle em indivíduos sadios, uma vez que nestes pacientes a doença é sistêmica, logo se acredita que qualquer área da pele avaliada teria os mesmos resultados e desta forma, indivíduos sadios tiveram que ser usados como controle (TREU, 2010). No nosso estudo, outros indivíduos sadios não foram usados como controle, pois a área das placas não são as mesmas e a microcirculação da pele é diferente dependendo da região anatômica. Desta forma tentamos evitar vieses que atrapalhassem o resultado e confiabilidade dos dados.

Sabemos que a hanseníase é endêmica em países subdesenvolvidos e tem grande importância devido ao seu poder incapacitante. O diagnóstico precoce da doença é de suma importância para evitar a transmissão e as possíveis deformidades.

O diagnóstico através de métodos invasivos, como a biópsia e baciloscopia, são difíceis de executar em determinadas cidades e muitas vezes não são realizadas até mesmo nos grandes centros. Assim, o diagnóstico da doença, utilizando métodos não-invasivos ou minimamente invasivos, de fácil execução e portátil (laser Doppler associada à iontoforese e Microscan) é de grande importância clínica e pode se tornar um excelente método diagnóstico para realização de pesquisas de campo.

Esta nossa hipótese pode ser corroborada por estudos prévios como o realizado por Illarramendi e colaboradores (ILLARRAMENDI *ET AL.*, 2005) que já haviam descrito que a LDF consiste em excelente método para diagnóstico da disfunção autonômica periférica precoce em pacientes com hanseníase recém diagnosticada, mesmo antes do surgimento das lesões cutâneas.

#### 4.4 Resumo dos achados

- Alteração apenas no componente endotelial da vasomotricidade;
- Não há alterações na iontoforese de substâncias vasoativas entre o grupo mancha e controle, exceto no grupo platô do NPS

- Alterações importantes nos achados do Microscan: na variável VT (controle apresenta mais vasos totais do que na placa); na variável VP (controle apresenta **mais** vasos pequenos que o grupo das placas); na variável VP\_sem\_fluxo (controle apresenta **menos** vasos pequenos sem fluxo que o grupo das placas); na variável VP\_com\_fluxo (controle apresenta **mais** vasos pequenos com fluxo que o grupo das placas); na variável DCF (grupo controle apresenta escore médio superior ao grupo da placa); e na variável MFI (controle obtendo escore superior ao grupo da placa) e por fim na variável DCT (controle obtendo escore médio superior ao grupo da placa).

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados em nosso estudo, podemos corroborar a hipótese de que a microcirculação na mancha dos pacientes com hanseníase tuberculóide apresenta importantes diferenças com significância estatística quando comparada à área de pele sã.

Corroboramos a hipótese de que o Microscan mostrou-se um exame de fácil manejo, portátil e mostrou as alterações quantitativas e qualitativas (diminuição do número de capilares, aumento do número de capilares sem fluxo, diminuição da DCF e do MFI na mancha quando comparado ao controle).

Não conseguimos corroborar totalmente a hipótese de que a microcirculação cutânea no paciente com hanseníase tuberculóide é um modelo de disautonomia vascular por denervação, através do uso de laser Doppler associado à iontoforese de substâncias vasoativas. Acreditamos que este resultado foi negativo pela labilidade do método e principalmente pelo n pequeno.

Como perspectivas futuras sugerimos:

- 1- Repetir o estudo para avaliação de vasomotricidade e iontoforese com um número amostral maior de pacientes, para que a alta sensibilidade com grande labilidade do método não comprometam a análise dos resultados.
- 2- Repetir o estudo para avaliação morfológica dos capilares, onde poderemos observar se existe alteração da morfologia capilar, como encontrada nos pacientes com hanseníase virchowiana e em outros estudos com animais submetidos à denervação crônica.
- 3- Repetir o estudo global, tentando comparar sempre áreas semelhantes da pele com a placa;
- 4- Confirmando estas alterações quantitativas nos capilares das manchas de pacientes tuberculóide e sendo o SDF um aparelho portátil, este poderá ser um excelente método diagnóstico não invasivo para pesquisa de campo em países endêmicos;
- 5- Realizar um grande artigo de revisão das alterações microcirculatórias encontradas na hanseníase (dados obtidos na tese com os pacientes virchowianos, nossos dados, além das alterações microcirculatórias já conhecidas na hanseníase – fenômeno de Lúcio, eventos tromboembólicos.

**REFERÊNCIAS**

ABBOT, N. C. et al. Sympathetic vasomotor dysfunction in leprosy patients: comparison with electrophysiological measurement and qualitative sensation testing. **Neurosci Lett**, v. 206, n. 1, p. 57-60, Mar 8 1996. ISSN 0304-3940 (Print)

ABBOT, N. C. et al. Cold fingers in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 60, n. 4, p. 580-6, Dec 1992. ISSN 0148-916X (Print)

ABDEL-HAFEZ, H. Z.; MOHAMED, E. E.; ABD-ELGHANY, A. A. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 6, p. 704-8, Jun 2010. ISSN 1468-3083 (Electronic)

ACHAKRI, H. et al. Intraluminal pressure modulates the magnitude and the frequency of induced vasomotion in rat arteries. **J Vasc Res**, v. 32, n. 4, p. 237-46, Jul-Aug 1995. ISSN 1018-1172 (Print)

AGRAWAL, B. R.; AGRAWAL, R. I. Arteriography in leprosy. **Indian J Lepr**, v. 57, n. 1, p. 138-45, Jan-Mar 1985. ISSN 0254-9395 (Print)

AGUSNI, I. et al. Blood flow velocity in cutaneous lesions of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 56, n. 3, p. 394-400, Sep 1988. ISSN 0148-916X (Print)

ALVIM, I. **Modulação da ativação de linfócitos T pelo glicolípido fenólico-I (PGL-1), uma molécula exclusiva do Mycobacterium leprae**. . 1998. 78 (Mestrado). Biologia parasitaria, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ., FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

ANTUNES, S. L. et al. Distinct patterns of microvasculature in the cutaneous lesions of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 68, n. 2, p. 143-51, Jun 2000. ISSN 0148-916X (Print)

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54 Suppl 1, p. S31-40, Nov 1 2002. ISSN 0169-409X (Print)

BIRDI, T. J.; ANTIA, N. H. Mechanisms involved in peripheral nerve damage in leprosy with special reference to insights obtained from in vitro studies and the experimental mouse model. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 71, n. 4, p. 345-54, Dec 2003. ISSN 0148-916X (Print)



BODDINGIUS, J. Mechanisms of peripheral nerve damage in leprosy: electron and light microscope studies in patients throughout the spectrum. **Quaderni coop. san. - health coop. papers**, v. 1, p. 65-85, 1982.

BOUSKELA, E.; CYRINO, F. Z. Effects of buflomedil on spontaneous vasomotion and mean arteriolar internal diameter in the hamster cheek pouch. **J Vasc Res**, v. 31, n. 5, p. 287-94, Sep-Oct 1994. ISSN 1018-1172 (Print)

Effects of a calcium antagonist and of the adrenergic system on spontaneous vasomotion and mean arteriolar diameter in the hamster cheek pouch: influence of buflomedil. **Int J Microcirc Clin Exp**, v. 17, n. 4, p. 164-74, Jul-Aug 1997. ISSN 0167-6865 (Print)

BOUSKELA, E.; GRAMPP, W. Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions. **Am J Physiol**, v. 262, n. 2 Pt 2, p. H478-85, Feb 1992. ISSN 0002-9513 (Print)

BOUSKELA, E. et al. [Vascular dysfunction in metabolic disorders: evaluation of some therapeutic interventions]. **Bull Acad Natl Med**, v. 191, n. 3, p. 475-92; discussion 492-3, Mar 2007. ISSN 0001-4079 (Print)

BURCHARD, G. D.; BIERATHER, M. Study on the micromorphology of *Mycobacterium leprae*. **Arch Dermatol Res**, v. 277, n. 3, p. 220-4, 1985. ISSN 0340-3696 (Print)

BUSS, C. **Relações entre fase cefálica da digestão, consumo alimentar e reatividade microvascular de indivíduos saudáveis** 2010. 82fls (Doutorado). FISCLINEX, UERJ, Rio de Janeiro.

BUSSE, R. et al. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 8, p. 374-80, Aug 2002. ISSN 0165-6147 (Print)

CARR, R. W. et al. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. **Neuroreport**, v. 4, n. 5, p. 467-70, May 1993. ISSN 0959-4965 (Print)

CERNY, V.; TUREK, Z.; PARIZKOVA, R. Orthogonal polarization spectral imaging. **Physiol Res**, v. 56, n. 2, p. 141-7, 2007. ISSN 0862-8408 (Print)

CUTOLO, M. et al. Nailfold capillaroscopy is useful for the diagnosis and follow-up of autoimmune rheumatic diseases. A future tool for the analysis of microvascular heart involvement? **Rheumatology (Oxford)**, v. 45 Suppl 4, p. iv43-6, Oct 2006. ISSN 1462-0332 (Electronic)

CZERNIELEWSKI, J. M.; BAGOT, M. Class II MHC antigen expression by human keratinocytes results from lympho-epidermal interactions and gamma-interferon production. **Clin Exp Immunol**, v. 66, n. 2, p. 295-302, Nov 1986. ISSN 0009-9104 (Print)

DE BACKER, D. et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 1, p. 98-104, Jul 1 2002. ISSN 1073-449X (Print)

DE BACKER, D. et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. **Crit Care**, v. 11, n. 5, p. R101, 2007. ISSN 1466-609X (Electronic)

DE JONGH, R. T. et al. Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women. **Microvasc Res**, v. 75, n. 2, p. 256-62, Mar 2008. ISSN 0026-2862 (Print)

DE JONGH, R. T. et al. Microvascular function: a potential link between salt sensitivity, insulin resistance and hypertension. **J Hypertens**, v. 25, n. 9, p. 1887-93, Sep 2007. ISSN 0263-6352 (Print)

DEPS, P. D. et al. Adverse effects from multi-drug therapy in leprosy: a Brazilian study. **Lepr Rev**, v. 78, n. 3, p. 216-22, Sep 2007. ISSN 0305-7518 (Print)

DOBBE, J. G. et al. Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis. **Med Biol Eng Comput**, v. 46, n. 7, p. 659-70, Jul 2008. ISSN 1741-0444 (Electronic)

DOGRA, S.; NARANG, T.; KUMAR, B. Leprosy - evolution of the path to eradication. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 1, p. 15-35, Jan 2013. ISSN 0971-5916 (Print).

DUGUE, C. et al. Effects of anti-endothelial cell antibodies in leprosy and malaria. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 301-9, Jan 2004. ISSN 0019-9567 (Print)

ENGELBERGER, R. P. et al. Acute endotoxemia inhibits microvascular nitric oxide-dependent vasodilation in humans. **Shock**, v. 35, n. 1, p. 28-34, Jan 2011. ISSN 1540-0514 (Electronic)

FEIHL, F. et al. Hypertension: a disease of the microcirculation? **Hypertension**, v. 48, n. 6, p. 1012-7, Dec 2006. ISSN 1524-4563 (Electronic)

FOSS NT, S. C., GOULART IMB, GONÇALVES HS, VIRMOND M. . **Hanseníase: episódios reacionais**. . DERMATOLOGIA, S. B. D. H. E. S. B. D.: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina: p 5-14. p. 2003.

GARBINO JA, N. J., VIRMOND M, STUMP PRN, BACARELLI R, MARQUES JR W. . **Hanseníase: diagnóstico e tratamento da neuropatia**. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HANSENOLOGIA, A. B. D. N. E. S. B. D. N. C.: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina: p 4-15 p. 2003.

GOEDHART, P. T. et al. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. **Opt Express**, v. 15, n. 23, p. 15101-14, Nov 12 2007. ISSN 1094-4087 (Electronic)

GOMES, A. **Contribuição ao estudo da co-infecção Mycobacterium leprae e HIV**. 2001. 75f mestrado (Mestrado). IOC - FIOCRUZ, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul-Aug 2002. ISSN 0037-8682 (Print)

GOULART, I. M. B. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 453-460, 2002. ISSN 0037-8682.

GOULART, I. M. B. P., GERSON OLIVEIRA; CUNHA, GABRIEL. . **Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae**. . Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba. 35: 363-375 p. 2002.

GRONER, W. et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. **Nat Med**, v. 5, n. 10, p. 1209-12, Oct 1999. ISSN 1078-8956 (Print)

HARRIS, A. G.; SINITSINA, I.; MESSMER, K. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. **J Vasc Res**, v. 37, n. 6, p. 469-76, Nov-Dec 2000. ISSN 1018-1172 (Print)

HASTINGS, R. C. et al. Leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 3, p. 330-48, Jul 1988. ISSN 0893-8512 (Print)

HENRIKSEN, O. Sympathetic reflex control of blood flow in human peripheral tissues. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 603, p. 33-9, 1991. ISSN 0302-2994 (Print)

ILLARRAMENDI, X. et al. High prevalence of vasomotor reflex impairment in newly diagnosed leprosy patients. **Eur J Clin Invest**, v. 35, n. 10, p. 658-65, Oct 2005. ISSN 0014-2972 (Print)

JAC., N. **Reação na hanseníase: uma descrição epidemiológica.** 1995. p 34-36 (Mestrado). Dermatologia - UFF UFF, Niterói.

JOB, C. K. Nerve in reversal reaction. **Indian J Lepr**, v. 68, n. 1, p. 43-7, Jan-Mar 1996. ISSN 0254-9395 (Print)

JOSHI, P. B. Pilocarpine test in assessment of therapeutic efficacy in maculoanaesthetic leprosy. **Lepr India**, v. 48, n. 1, p. 55-60, Jan 1976. ISSN 0024-1024 (Print)

KAJIHARA, H. et al. Light and electron microscopic study of peripheral nerve damage in patients with lepromatous leprosy (LL) and borderline lepromatous leprosy (BL). **Hiroshima J Med Sci**, v. 49, n. 1, p. 83-92, Mar 2000. ISSN 0018-2052 (Print)

KAPLAN, G.; COHN, Z. A. The immunobiology of leprosy. **Int Rev Exp Pathol**, v. 28, p. 45-78, 1986. ISSN 0074-7718 (Print)

KAR, S.; KAVDIA, M. Endothelial NO and O<sub>2</sub>(-) production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation. **Free Radic Biol Med**, v. 63, p. 161-74, Oct 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic)

KATZ, S. I.; TAMAKI, K.; SACHS, D. H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. **Nature**, v. 282, n. 5736, p. 324-6, Nov 15 1979. ISSN 0028-0836 (Print)

KHANOLKAR, V. R. Recent Advances in Our Knowledge of Mycobacterium Leprae. **Indian J Med Res**, v. 52, p. 139-50, Feb 1964. ISSN 0971-5916 (Print).

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 39, n. 3, p. 693-702, Jul-Sep 1971. ISSN 0148-916X (Print)

KOMAN, L. A. et al. The microcirculatory effects of peripheral sympathectomy. **J Hand Surg Am**, v. 20, n. 5, p. 709-17, Sep 1995. ISSN 0363-5023 (Print)

KRUSHAT, W. M. et al. Studies of the mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. 4. Statistical analysis of harvest data. **Lepr Rev**, v. 47, n. 4, p. 275-86, Dec 1976. ISSN 0305-7518 (Print)

LANDSVERK, S. A. et al. Human skin microcirculation after brachial plexus block evaluated by wavelet transform of the laser Doppler flowmetry signal. **Anesthesiology**, v. 105, n. 3, p. 478-84, Sep 2006. ISSN 0003-3022 (Print)

LEAHY, M. J. et al. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. **Technol Health Care**, v. 7, n. 2-3, p. 143-62, 1999. ISSN 0928-7329 (Print)

LEFRANDT, J. D. et al. Sympathetic mediated vasomotion and skin capillary permeability in diabetic patients with peripheral neuropathy. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 40-7, Jan 2003. ISSN 0012-186X (Print)

LEVY, B. I. et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. **Circulation**, v. 118, n. 9, p. 968-76, Aug 26 2008. ISSN 1524-4539 (Electronic)

LEVY, L.; MURRAY, L. P. Studies of the mouse foot pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. 2. The relationship between incubation period and generation time. **Lepr Rev**, v. 47, n. 1, p. 13-23, Mar 1976. ISSN 0305-7518 (Print)

LINDBOM, L.; TUMA, R. F.; ARFORS, K. E. Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observation. **Acta Physiol Scand**, v. 114, n. 1, p. 121-7, Jan 1982. ISSN 0001-6772 (Print)

LINDERT, J. et al. OPS imaging of human microcirculation: a short technical report. **J Vasc Res**, v. 39, n. 4, p. 368-72, Jul-Aug 2002. ISSN 1018-1172 (Print)

LUPI, O. et al. Evaluation of the effects of caffeine in the microcirculation and edema on thighs and buttocks using the orthogonal polarization spectral imaging and clinical parameters. **J Cosmet Dermatol**, v. 6, n. 2, p. 102-7, Jun 2007. ISSN 1473-2165 (Electronic)

MACHADO, A. **Parametos morfológicos e imunohistoquímicos da resposta imune celular na hanseníase: na forma “borderline” lepromatosa e na reação tipo II ou ENL.** 1992. 66 (Mestrado). Anatomia patológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro.

**Eritema Multiforme na hanseníase: uma reação tipo II. Estudo histo-morfométrico da vasculopatia do quadro reacional.** . 2000. 150 (Doutorado). Ciências – patologia, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ., FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

MACHADO, A. M., CP & SARNO, EM. **ICAM-1 expression in reactional states of leprosy.** . Anais do Simpósio Internacional de Matriz Extracelular – SIMEC. Campos de Jordão, SP: 25 p. 1993.

MANHÃES, P. **O comportamento clínico e neurológico da neuropatia durante os episódios reacionais da hanseníase.** 2011. 92fls (Mestrado). UERJ - FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

MODLIN, R. L. et al. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 8, n. 2, p. 182-9, Feb 1983. ISSN 0190-9622 (Print)

MONFRECOLA, G. et al. The acute effect of smoking on cutaneous microcirculation blood flow in habitual smokers and nonsmokers. **Dermatology**, v. 197, n. 2, p. 115-8, 1998. ISSN 1018-8665 (Print)

MORITA, Y.; HARDEBO, J. E.; BOUSKELA, E. Influence of cerebrovascular sympathetic, parasympathetic, and sensory nerves on autoregulation and spontaneous vasomotion. **Acta Physiol Scand**, v. 154, n. 2, p. 121-30, Jun 1995. ISSN 0001-6772 (Print)

MORRIS, S. J.; SHORE, A. C. Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. **J Physiol**, v. 496 ( Pt 2), p. 531-42, Oct 15 1996. ISSN 0022-3751 (Print)

NEGESSE, Y. Leprous neuritis, classification of leprosy, and multidrug therapy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 56, n. 2, p. 329-30, Jun 1988. ISSN 0148-916X (Print)

NENCIONI, A.; TRZECIAK, S.; SHAPIRO, N. I. The microcirculation as a diagnostic and therapeutic target in sepsis. **Intern Emerg Med**, v. 4, n. 5, p. 413-8, Oct 2009. ISSN 1970-9366 (Electronic)

NERY, J. A. et al. Hansen's disease in a general hospital: uncommon presentations and delay in diagnosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, n. 2, p. 150-6, Feb 2009. ISSN 1468-3083 (Electronic)

NOLAN, L. M. et al. Iontophoretic and chemical enhancement of drug delivery. Part I: across artificial membranes. **Int J Pharm**, v. 257, n. 1-2, p. 41-55, May 12 2003. ISSN 0378-5173 (Print)

NORMAN, G.; JOSEPH, G.; RICHARD, J. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 72, n. 3, p. 278-83, Sep 2004. ISSN 0148-916X (Print)

ORSINI, O. [Histamine test in the diagnosis of leprosy]. **Arq Min Leprol**, v. 12, n. 2, p. 124-6, Apr 1952.

PIMENTEL, M. I. et al. Impairments in multibacillary leprosy; a study from Brazil. **Lepr Rev**, v. 75, n. 2, p. 143-52, Jun 2004. ISSN 0305-7518 (Print)

POLLOCK, D. C. et al. Acute effects of periarterial sympathectomy on the cutaneous microcirculation. **J Orthop Res**, v. 15, n. 3, p. 408-13, May 1997. ISSN 0736-0266 (Print)

PRASAD, H. K.; MISHRA, R. S.; NATH, I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. **J Exp Med**, v. 165, n. 1, p. 239-44, Jan 1 1987. ISSN 0022-1007 (Print)

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 1261-8, Nov 2008. ISSN 1546-1696 (Electronic)

PREVEDELLO, F. M., MT. Hanseníase: uma doença genética? . **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451-9, 2007.

RAMOS-E-SILVA, M.; REBELLO, P. F. Leprosy. Recognition and treatment. **Am J Clin Dermatol**, v. 2, n. 4, p. 203-11, 2001. ISSN 1175-0561 (Print)

1

REA, T. M., RL. . Leprosy. In: MACGRAW-HILL. (Ed.). **Fitzpatrick's dermatology in systemic medicine**. . 5° Ed., 1999. cap. Chapter 203, p. 2306-2318.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul-Sep 1966. ISSN 0148-916X (Print)

RIDLEY, M. J. R., D. An immunoperoxidase study of immunological factors in high immune and low resistance granulomas in leprosy. **J Pathol.** , v. 137, n. 2, p. 149-57, 1982.

RIVA, C.; ROSS, B.; BENEDEK, G. B. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. **Invest Ophthalmol**, v. 11, n. 11, p. 936-44, Nov 1972. ISSN 0020-9988 (Print)

RIZZONI, D. et al. Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. **J Hypertens**, v. 18, n. 8, p. 1041-9, Aug 2000. ISSN 0263-6352 (Print)

ROOSTA, N.; BLACK, D. S.; REA, T. H. A comparison of stigma among patients with leprosy in rural Tanzania and urban United States: a role for public health in dermatology. **Int J Dermatol**, v. 52, n. 4, p. 432-40, Apr 2013. ISSN 1365-4632 (Electronic)

ROSSI, M.; MAURIZIO, S.; CARPI, A. Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. **Microvasc Res**, v. 70, n. 1-2, p. 17-22, Jul 2005. ISSN 0026-2862 (Print)

SABIN TD, S. T., JACOBSON RR. Leprosy. In: DYCK PJ, T. P. (Ed.). **Peripheral neuropathy**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. p.p 2081-2108.

SALGAME, P. R.; MAHADEVAN, P. R.; ANTIA, N. H. Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. **Infect Immun**, v. 40, n. 3, p. 1119-26, Jun 1983. ISSN 0019-9567 (Print)

SANTOS, F. S. D. D.; SOUZA, L. P. A. D.; SIANI, A. C. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 15, p. 29-46, 2008. ISSN 0104-5970.

SAÚDE., M. D. S. S. D. P. D. **Guia para o controle da hanseníase**. SAÚDE., S. D. P. D. Brasília - Brasil: D. d. A. Básica: 89 p. 2002.

SCHON, T. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **Br J Dermatol**, v. 145, n. 5, p. 809-15, Nov 2001. ISSN 0007-0963 (Print)

SCOLLARD, D. M. Association of Mycobacterium leprae with human endothelial cells in vitro. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 663-9, May 2000a. ISSN 0023-6837 (Print)

Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. **Microbes Infect**, v. 2, n. 15, p. 1835-43, Dec 2000b. ISSN 1286-4579 (Print)

SEMENOVITCH, I. J. F. D. **Avaliação da microcirculação dos carcinomas basocelulares pela técnica da imagem espectral obtida através da polarização ortogonal**. 2008. 56 (Doutorado). BIOLOGIA- BIOVASC, UERJ, Rio de Janeiro.

SHEPARD, C. C. The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. **J Exp Med**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep 1 1960. ISSN 0022-1007 (Print)



SHEPARD, C. C.; MCRAE, D. H. Mycobacterium Leprae in Mice: Minimal Infectious Dose, Relationship between Staining Quality and Infectivity, and Effect of Cortisone. **J Bacteriol**, v. 89, p. 365-72, Feb 1965. ISSN 0021-9193 (Print)

SHETTY, V. P.; ANTIA, N. H. Relapse in a borderline-tuberculoid case of leprosy 5 years after the release from rifampicin monotherapy. **Lepr Rev**, v. 68, n. 2, p. 162-6, Jun 1997. ISSN 0305-7518 (Print)

SHETTY, V. P.; MISTRY, N. F.; ANTIA, N. H. Current understanding of leprosy as a peripheral nerve disorder: significance of involvement of peripheral nerve in leprosy. **Indian J Lepr**, v. 72, n. 3, p. 339-50, Jul-Sep 2000. ISSN 0254-9395 (Print)

SIELING, P. A. et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol**, v. 150, n. 12, p. 5501-10, Jun 15 1993. ISSN 0022-1767 (Print)

SINGH, P.; MAIBACH, H. I. Iontophoresis in drug delivery: basic principles and applications. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 11, n. 2-3, p. 161-213, 1994. ISSN 0743-4863 (Print)

SLAAF, D. W. et al. A versatile incident illuminator for intravital microscopy. **Int J Microcirc Clin Exp**, v. 6, n. 4, p. 391-7, Dec 1987. ISSN 0167-6865 (Print)

SLOAN, J. B.; SOLTANI, K. Iontophoresis in dermatology. A review. **J Am Acad Dermatol**, v. 15, n. 4 Pt 1, p. 671-84, Oct 1986. ISSN 0190-9622 (Print)

SOUZA, C. S. **Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial**. Medicina Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto. jul/set: 325-334 p. 1997.

STEFANOVSKA, A.; BRACIC, M.; KVERNMO, H. D. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. **IEEE Trans Biomed Eng**, v. 46, n. 10, p. 1230-9, Oct 1999. ISSN 0018-9294 (Print)

THILAKAVATHI, S.; MANICKAM, P.; MEHENDALE, S. M. Awareness, social acceptance and community views on leprosy and its relevance for leprosy control, Tamil Nadu. **Indian J Lepr**, v. 84, n. 3, p. 233-40, Jul-Sep 2012. ISSN 0254-9395 (Print)

TREU, C. **Estudo da microcirculação na hanseníase virchowiana com o uso da microscopia de Luz Ortogonal Polarizada e com Laser-Doppler Fluxometria**. 2010. 96f (Doutorado). BIOVASC - FISCLINEX, UERJ, Rio de Janeiro.

TREU, C. M. et al. Sidestream dark field imaging: the evolution of real-time visualization of cutaneous microcirculation and its potential application in dermatology. **Arch Dermatol Res**, v. 303, n. 2, p. 69-78, Mar 2011. ISSN 1432-069X (Electronic)

TRIFILIO, M. O. **Avaliação baciloscópica na hanseníase virchowiana: estudo de 60 autópsias**. 1991. (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

TRINDADE, M. A. B. **Evolução Histológica de reativações da hanseníase durante ou após o tratamento**. . 1996. 63 (Doutorado). Departamento de Dermatologia, Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

TRINDADE, M. A. B. **Evolução Histológica de reativações da hanseníase durante ou após o tratamento**. . 1996. 63 (Doutorado). Departamento de Dermatologia. , Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. , São Paulo.

TURKEL, S. V. H., HM. Ultrastructure of the dermal microvasculature in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.**, v. 50, n. 2, p. 164-71, 1982.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B. Nerve function impairment in leprosy: an epidemiological and clinical study--Part 2: Results of steroid treatment. **Lepr Rev**, v. 67, n. 2, p. 104-18, Jun 1996. ISSN 0305-7518 (Print)

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B.; LUCAS, S. B. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. **Lepr Rev**, v. 65, n. 3, p. 190-203, Sep 1994. ISSN 0305-7518 (Print)

VAN VOORHIS, W. C. et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. **N Engl J Med**, v. 307, n. 26, p. 1593-7, Dec 23 1982. ISSN 0028-4793 (Print)

WARDELL, K. et al. Spatial heterogeneity in normal skin perfusion recorded with laser Doppler imaging and flowmetry. **Microvasc Res**, v. 48, n. 1, p. 26-38, Jul 1994. ISSN 0026-2862 (Print)

WHEELER, P. R.; GREGORY, D. Superoxide dismutase, peroxidatic activity and catalase in Mycobacterium leprae purified from armadillo liver. **J Gen Microbiol**, v. 121, n. 2, p. 457-64, Dec 1980. ISSN 0022-1287 (Print)

WILDER-SMITH, A.; WILDER-SMITH, E. Electrophysiological evaluation of peripheral autonomic function in leprosy patients, leprosy contacts and controls. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 64, n. 4, p. 433-40, Dec 1996. ISSN 0148-916X (Print)

WILDER-SMITH, E. et al. Vasomotor reflex testing in leprosy patients, healthy contacts and controls: a cross-sectional study in western Nepal. **Lepr Rev**, v. 67, n. 4, p. 306-17, Dec 1996. ISSN 0305-7518 (Print)

WILDER-SMITH, E.; WORPEL, F.; WILDER-SMITH, A. Changes of autonomic nerve function in the first two weeks of acute neuritis in a patient with borderline leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 64, n. 2, p. 169-71, Jun 1996. ISSN 0148-916X (Print)

WILDER-SMITH, E. P.; VAN BRAKEL, W. H. Nerve damage in leprosy and its management. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 4, n. 12, p. 656-63, Dec 2008. ISSN 1745-8358 (Electronic)

WILDER-SMITH, E. P.; WILDER-SMITH, A. J.; NIRKKO, A. C. Skin and muscle vasomotor reflexes in detecting autonomic dysfunction in leprosy. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 7, p. 1105-12, Jul 2000. ISSN 0148-639X (Print)

YADAV, S. S. Arteriographic evaluation of vascular changes in leprosy. **Angiology**, v. 29, n. 1, p. 17-21, Jan 1978. ISSN 0003-3197 (Print)

0003-3197 (Linking).

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-9, Oct 11 1991. ISSN 0036-8075 (Print)

YUILL, K. H. et al. Nitric oxide suppresses cerebral vasomotion by sGC-independent effects on ryanodine receptors and voltage-gated calcium channels. **J Vasc Res**, v. 47, n. 2, p. 93-107, 2010. ISSN 1423-0135 (Electronic)