



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Eduardo Alves Freire da Costa

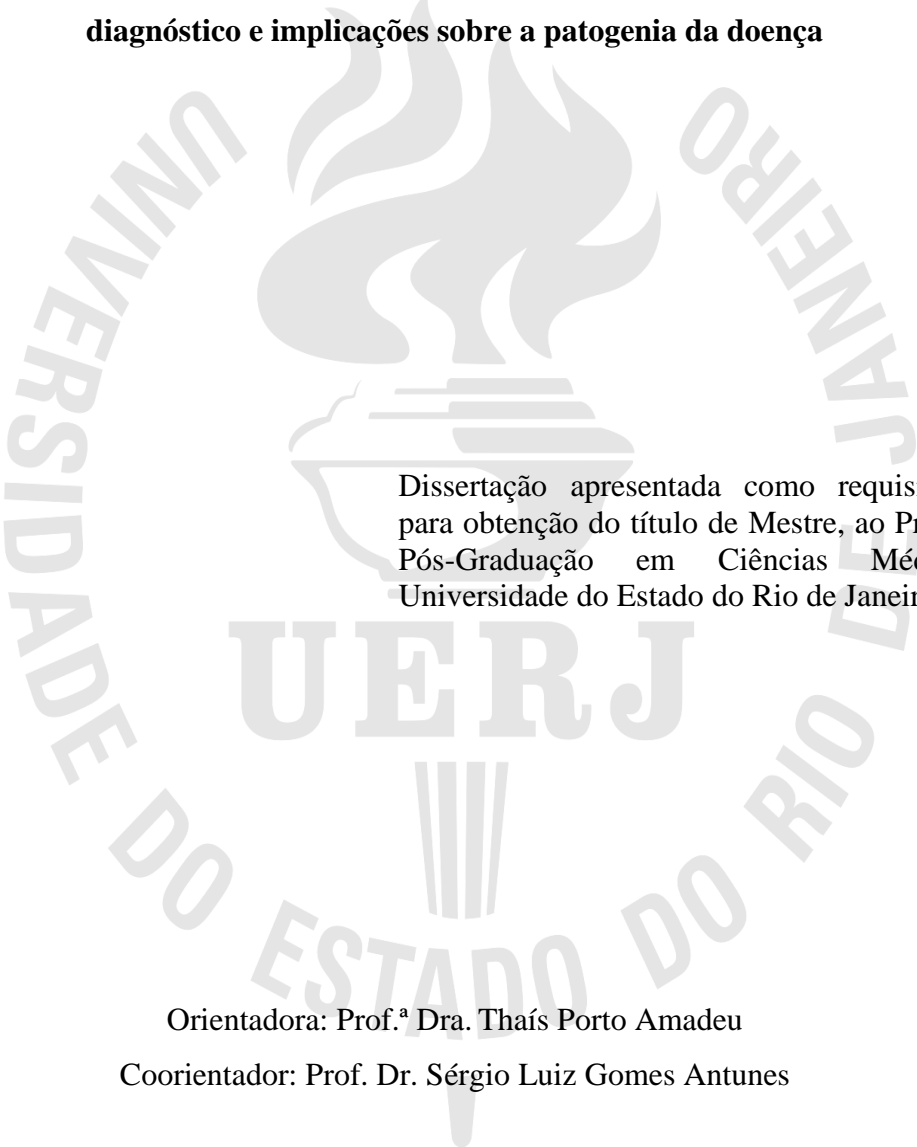
Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença

Rio de Janeiro

2017

Eduardo Alves Freire da Costa

Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes

Rio de Janeiro

2017

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

C837 Costa, Eduardo Alves Freire da
Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença./ Eduardo Alves Freire da Costa. – 2017.
86 f.

Orientadora: Thaís Porto Amadeu
Coorientador: Sérgio Luiz Gomes Antunes

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Hanseníase – Teses. 2. Histopatologia – Teses. 3. *Mycobacterium Leprae*. I. Amadeu, Thaís Porto. II. Antunes, Sérgio Luiz Gomes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.73

Bibliotecária: Angela da Silva Velho – CRB-7/ 4780

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

Assinatura

Data

Eduardo Alves Freire da Costa

Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de setembro de 2017

Orientadora: Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes
Fundação Oswaldo Cruz

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Roberta Olmo Pinheiro
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Maria Helena Faria Ornellas
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Jardim Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Salomão (*in memoriam*), Therezinha, Waldir (*in memoriam*) e Marli, por terem me ensinado o valor e o significado da palavra “honra” e serem exemplos de coragem e determinação. Aos meus pais Celso e Meireluci pelo incentivo, cuidado e educação ao longo da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força e coragem que pelo dom da fé jamais me faz desistir, guiando meus passos e iluminando meu caminho;

A minha família, por todo apoio, dedicação e ensinamentos;

A minha orientadora Dra. Thaís Porto Amadeu, por todo apoio, dedicação, consideração e por acreditar no meu sonho;

Ao meu orientador Dr. Sérgio Luis Gomes Antunes, por toda dedicação, paciência, sabedoria e humildade;

A Dr.^a Euzenir Nunes Sarno por acreditar e confiar em mim, dando a oportunidade de estudar e trabalhar no Laboratório de Hanseníase desde a iniciação científica.

A todos os amigos e equipe do laboratório de Hanseníase e Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ) por fazerem parte da construção desse estudo, de minha formação profissional, carinho, amizade, consideração e apoio desde a minha iniciação científica;

A todos do Laboratório de Imunopatologia (UERJ) pelo apoio e amizade;

A Dr.^a Suzana Corte Real e a equipe da plataforma Rudolf Barth pela assistência técnica e científica prestada durante o desenvolvimento do presente estudo;

A banca examinadora Dr.^a Roberta Olmo Pinheiro, Dr.^a Márcia Rodrigues Jardim e Dr.^a Maria Helena Faria Ornellas, por aceitarem o convite e fazerem parte do desenvolvimento desse estudo;

Aos suplentes Dr. Rafael Braga Petito e Dr.^a Luciana Silva Rodrigues por aceitarem o convite e por todo apoio.

RESUMO

COSTA, Eduardo Alves Freire da. **Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O diagnóstico precoce é uma importante estratégia para prevenir a transmissão e as incapacidades físicas dos portadores da doença. A procura de alterações histopatológicas nos ramos nervosos cutâneos ganha importância na busca de indícios de etiologia hanseniana, quando o paciente não apresenta o bacilo *Mycobacterium Leprae* nas amostras colhidas. O presente estudo foi dividido em três frentes (A, B e C): Estudo A: estudo morfológico dos ramos nervosos cutâneos e anexos em lesões cutâneas suspeitas de hanseníase. Os grupos foram divididos de acordo com o diagnóstico histológico emitido pelos patologistas, sendo divididos em: grupo hanseníase (HANSEN), grupo inconclusivo (INC) e o grupo de outras doenças (OD) não relacionadas com a hanseníase. Foram elaborados índices morfológicos de lesão dos nervos calculados pelo quociente entre o número de ramos nervosos com determinada alteração e o número, total de nervos na amostra. O grupo HANSEN demonstrou em relação aos outros grupos, aumento significativo dos seguintes índices de lesão de nervo estudados: hiperplasia de perineuro; infiltrado endoneural; infiltrado perineural; infiltrado sem contato com o nervo; e aumento de celularidade. A frequência de infiltrado inflamatório envolvendo os anexos também foi maior no grupo HANSEN. Em relação a marcação pelo anti-PGP 9.5 (produto de gene de proteína 9.5), o grupo HANSEN apresentou o menor índice de marcação nos ramos nervosos e nos anexos em relação aos outros grupos. O estudo B realizou o exame histopatológico e ultraestrutural da inervação da pele hipostésica com aspecto visual normal obtida de pacientes com a forma neural pura da doença confrontando os resultados com as alterações encontradas no tronco nervoso que inervava a área da pele no mesmo paciente. Houve concordância parcial entre os achados no nervo e na pele. Os parâmetros analisados foram os seguintes: aumento da matriz em 3 casos (27%), aumento de celularidade em 2 (22%), e espessamento perineural em 4 (44%). No total de 11 casos, 7 apresentaram células de Schwann desnervadas e 5 nervos mostraram a presença de bolsas de colágeno. O estudo C realizou a quantificação de fibras nervosas amielínicas em tronco nervoso periférico de pacientes com a forma neural pura, comparado com um grupo de amostras de nervo provenientes de pacientes com neuropatias de outras etiologias não relacionadas com a hanseníase. Não houve diferença significativa na quantificação de fibras amielínicas entre os dois grupos. A quantificação da lesão de nervo com a utilização de índices numéricos não se mostrou mais sensível em relação ao exame histopatológico para revelar mais casos de hanseníase no grupo onde o diagnóstico foi inconclusivo, entretanto, demonstrou que as maiores médias dos índices que mediram as lesões dos ramos nervosos e dos anexos pertenciam ao grupo HANSEN. Da mesma forma, a marcação das fibras nervosas pelo PGP 9.5 mostrou a maior redução, encontrada no grupo HANSEN. O estudo B mostrou que o exame ultraestrutural da biópsia de pele pode revelar alterações não perceptíveis pela microscopia ótica, sugerindo que a pele pode auxiliar no diagnóstico histopatológico, mostrando indício da lesão nervosa cutânea. O estudo C não mostrou diferença significativa na quantidade de fibras amielínicas entre os grupos comparados.

Palavras-chave: Hanseníase. Histopatologia. Ramos nervosos. PGP9.5.

ABSTRACT

COSTA, Eduardo Alves Freire da. **Estudo das alterações morfológicas na neuropatia da hanseníase: aplicações práticas no diagnóstico e implicações sobre a patogenia da doença**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Early diagnosis is an important strategy to prevent transmission and physical disability of patients with this disease. The search for histopathological alterations in the cutaneous nerve branches gains importance in the search for evidence of leprosy etiology, when the *Mycobacterium leprae* is not detected in the samples. The present study was divided into three fronts (A, B and C): Study A: morphological study of cutaneous nerve branches and appendages in cutaneous lesions suspected of leprosy. The groups were divided according to the histological diagnosis issued by pathologists, being divided into: HANSEN group, INCONCLUSIVE group (INC) and the group of OTHER DISEASES not related to leprosy (OD). Morphological indices of nerve damage calculated by the ratio between the number of nerve branches with a given alteration and the total number of nerves in the sample were elaborated. The HANSEN group, compared to the INC and OD samples, demonstrated, significantly higher indexes of nerve alterations (perineural hyperplasia, endoneurial infiltrate perineurial infiltrate, near but without contact with the nerve branch infiltrate and increased endoneurial cellularity). The frequency of inflammatory infiltrate involving the appendages was also higher in the HANSEN group. In regard to the quantification of anti-PGP 9.5 immunoreactive nerve fibers (protein 9.5 gene product), the HANSEN group had the lowest immunoreactivity index in the nerve branches as well as in the surroundings of the skin appendages compared to the INC and OD groups. Study B performed histopathological and ultrastructural examination of the innervation in hypoesthetic skin with normal visual appearance obtained from patients with the pure neural form of the disease. There was partial agreement between the findings in the nerve trunk and in the cutaneous branches examined; this was represented by increased matrix in 3 cases, endoneurial cellularity in 2 and perineurial thickening in 4. Out of 11 cases, 7 presented denervated Schwann cells and 5 nerves showed the presence of collagen pockets. Study C determined the quantification of non-myelinated fibers in peripheral nerve trunk of patients with pure neural form compared to a group of nerve samples from patients with other etiologies unrelated to leprosy. There was no significant difference in the comparison. Study A did not discriminate more cases of leprosy in the group where the diagnosis was inconclusive but showed that the highest mean indexes of nerve and of attachment skin appendages belonged to the HANSEN group. Likewise, the marking of nerve fibers by PGP 9.5 showed the greatest reduction, found in the HANSEN group. Study B showed that ultrastructural examination of skin biopsy may reveal changes not noticeable by conventional optical microscopy, suggesting that the skin ultrastructural analysis may be helpful in the histopathological diagnosis of leprosy. Study C showed no significant difference in the quantity of nonmyelinated fibers between the pure neural leprosy and nonleprosy groups.

Keywords: Leprosy. Peripheral nerves. Histopathology. PGP 9.5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Macrófagos vacuolados contendo bacilos (setas) em amostra de pele.....	16
Figura 2 –	Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015.....	18
Figura 3 –	Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015 (mapa).....	18
Figura 4 –	Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por estados, Brasil, 2015.....	19
Figura 5 –	Lesões de hanseníase de acordo com os polos Tuberculoide e Lepromatoso.....	20
Figura 6 –	Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley-Jopling.....	24
Figura 7 –	Apresentação histopatológica da pele com hanseníase.....	24
Figura 8 –	Representação da quantificação das fibras imunorreativas PGP 9.5+.....	44
Figura 9 –	Matriz emoldurada utilizada para quantificação das fibras amielínicas.....	48
Figura 10 –	Alterações histológicas dos ramos nervosos nos grupos HANSEN, INC e OD.....	52
Figura 11 –	Fibras imunorreativas PGP 9.5+ nas lesões cutâneas dos grupos HANSEN, INC e OD.....	55
Figura 12 –	Fibras imunorreativas PGP 9.5+ em glândulas sudoríparas nas lesões cutâneas dos grupos HANSEN, INC e OD.....	56
Figura 13 –	Caracterização histológica dos ramos nervosos de pacientes classificados como Neural Pura.....	58
Figura 14 –	Comparação de nervo com hanseníase com nervo controle.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência de casos registrados de hanseníase e novos casos registrados em 136 países ou territórios pela OMS 2015.....	17
Alterações morfológicas dos ramos nervosos cutâneos entre os grupos	
Tabela 2 – Hanseníase (Hansen), Inconclusivo (INC) e Outras doenças (OD).....	51
Tabela 3 – Alterações morfológicas em anexos entre os grupos Hanseníase (Hansen), Inconclusivo (INC) e Outras doenças (OD) (análise com HE).....	54
Tabela4 – Quantificação da área relativa ocupada pelas fibras marcadas para PGP9,5 no endoneuro dos ramos nervosos cutâneos.....	54
Tabela5 – Avaliação do índice obtido pelo quociente entre o número de ácinos sudoríparos circundados por fibras imunorreativas para PGP9.5 e o número total de ácinos no corte histológico.....	56
Tabela6 – Comparação por caso das alterações encontradas nos ramos nervosos cutâneos e no tronco nervoso em cada caso selecionado utilizando as técnicas convencionais histológicas e a ultraestrutura.....	60
Tabela7 – Comparação das alterações encontradas nos ramos nervosos cutâneos e no tronco nervoso.....	61
Tabela8 – Alterações ultraestruturais dos ramos nervosos cutâneos.....	62
Tabela9 – Quantificação das fibras amielínicas no grupo controle e neural pura.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INC	Inconclusivo
OD	Outras doenças
HANSEN	Hanseníase
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BL	<i>Borderline-Lepromatosa</i>
BT	<i>Borderline-Tuberculoide</i>
ENL	Eritema Nodoso Lepromatoso
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
LL	Lepromatosa-Polar
MB	Multibacilar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PQT	Poliquimioterapia
TT	Tuberculoide-Polar
RR	Reação Reversa
RTI	Reação Reversa tipo I
RTII	Reação Reversa tipo II
IFN- γ	Interferon Gama
IL-2	Interleucina-2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-10	Interleucina-10
IL-5	Interleucina 5
IL-4	Interleucina-4
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NP	Neural Pura
H-E	Hematoxilina-Eosina
T-G	Tricomática de Gomori
LAHAN	Laboratório de Hanseníase
MMP9	Metaloproteinase-9

PSECC	Potencial sensitivo evocado pelo contato ao calor
EAV	Escala analógica visual
<i>M. Leprae</i>	Mycobacterium Leprae
PLP	Proteína proteolipídica
P0	Proteína 0
ASA	Ambulatório Souza Araújo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Epidemiologia	16
1.2	Classificações da hanseníase	19
1.2.1	<u>Características das formas clínicas segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966)</u>	21
1.2.1.1	Tuberculoide polar (TT) e Borderline Tuberculoide (BT).....	21
1.2.1.2	Borderline-Borderline (BB).....	21
1.2.1.3	Borderline-Lepromatosa (BL) e Lepromatosa-Polar (LL).....	21
1.2.1.4	Reação Reversa (RR ou RTI).....	22
1.2.1.5	Eritema Nodoso Hansênico (ENH ou RTII).....	23
1.3	Neuropatia hanseniana	25
1.4	Diagnóstico da hanseníase	27
2	OBJETIVO GERAL	34
2.1	Objetivos específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Estudo A	37
3.1.1	<u>Avaliação clínica dermatológica</u>	37
3.1.2	<u>Avaliação clínica neurológica</u>	37
3.1.3	<u>Teste quantitativo da sensibilidade (TQS)</u>	38
3.1.4	<u>Procedimentos técnicos para avaliação morfológica das amostras colhidas</u>	39
3.1.5	<u>Avaliação da quantidade de fibras nervosas na pele pela técnica de imuno-histoquímica (marcação com anti-PGP 9.5)</u>	41
3.2	Estudo B	45
3.2.1	<u>Seleção dos pacientes</u>	45
3.3	Estudo C	46
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Estudo A	50
5.2	Estudo B	57

5.3	Estudo C	63
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Estudo A	65
6.2	Estudo B	70
6.3	Estudo C	74
	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

Existem questões relevantes na neuropatia da hanseníase que devem ser estudadas em profundidade para o avanço dos conhecimentos científicos referentes à doença. O primeiro está relacionado ao diagnóstico da doença, quando o encontro do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) sob a forma de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) na amostra colhida para diagnóstico (esfregaço cutâneo, amostra de pele e amostra de nervo colhidas por biópsia) não tenha sido possível; situação em que o médico vê-se compelido a assumir a decisão de tratar ou não o paciente como portador da doença. Dessa forma, o diagnóstico passa a ser um diagnóstico de maior ou menor probabilidade, gerando sempre um risco de erro. Uma das estratégias na tentativa de minimizar esse risco é a integração entre a equipe de neurologia, dermatologia e laboratorial (patologistas clínicos e anatomo-patologistas) a fim de que possam assumir em conjunto, essa decisão que é crítica para o paciente. Os achados histológicos inespecíficos de amostras colhidas por biópsia passam a ser valorizados na tentativa de construir um quadro morfológico de alta probabilidade diagnóstica. Os nervos dérmicos são então investigados com maior grau de minúcia, uma vez que a essência da hanseníase como doença do sistema nervoso periférico deve sempre ser lembrada como ponto de referência para o diagnóstico histopatológico da doença.

Outro aspecto importante é a patogenia da doença que ainda possui pontos obscuros não esclarecidos. Em relação aos mecanismos da lesão do sistema nervoso periférico na hanseníase, temos o questionamento sobre o mecanismo de lesão do nervo periférico; existem controvérsias em relação ao início da lesão do nervo; se esta seria induzida diretamente pelo próprio *M. leprae* ou se o parasito que consegue adentrar o nervo periférico deflagra os mecanismos imunoinflamatórios ocasionando a destruição do ambiente neural. Ainda outro aspecto que suscita discussão se refere ao início da lesão da fibra nervosa no nervo periférico afetado pela hanseníase; seria esse início através de um mecanismo primário de desmielinização da fibra nervosa ou ela se iniciaria por uma lesão primariamente axonal. Em relação ao mecanismo de lesão da fibra nervosa na hanseníase neural, surge também o interesse sobre a relação entre a desmielinização e a degeneração axonal, já que os dois processos são encontrados na lesão do nervo periférico na hanseníase.

Esse estudo pretende contribuir para o diagnóstico da hanseníase através da análise mais detalhada da frequência das alterações histológicas dos nervos dérmicos em amostras de pele de hanseníase (grupo HANSEN), comparando-os com o status morfológico dos nervos encontrados em amostras onde o diagnóstico histopatológico foi inconclusivo (grupo INC) e com o grupo de outras doenças (grupo OD) referentes a amostras diagnosticadas como doenças não relacionadas com a hanseníase, sendo elas: granuloma anular, eczema subagudo, síndrome de Sweet, mucinose papulosa, dermatose cinzenta, dermatite psoriasiforme e micose fungoide. Além dessa vertente, o estudo contribui para esclarecer as lesões morfológicas dos nervos dérmicos em amostras de pele de pacientes com a forma neural pura da doença (forma em que os pacientes só apresentam lesão do sistema nervoso periférico, e não mostram lesão cutânea alguma) comparados com as lesões do nervo periférico do mesmo paciente, uma vez que os nossos pacientes com a forma neural pura, que fazem biópsia de nervo para diagnóstico, são também submetidos à biópsia de pele hipoestésica com aspecto visual normal, obtida de região inervada pelo mesmo nervo biopsiado. No caso do presente trabalho, o nervo biopsiado foi o nervo cutâneo dorsal, ramo sensitivo do nervo ulnar. Vale ainda reforçar a lembrança de que a única alteração da pele colhida por biópsia foi a hipoestesia, pois o seu aspecto visual se mostrava como uma pele aparentemente normal.

Além do estudo dos ramos nervosos periféricos em amostras cutâneas, foram quantificadas as fibras amielínicas em amostras de nervo periférico colhidas por biópsia de nervo de pacientes com a forma neural pura da hanseníase, numa tentativa de vislumbrar alterações quantitativas dessas fibras associadas aos principais sintomas sensoriais da neuropatia hanseniana.

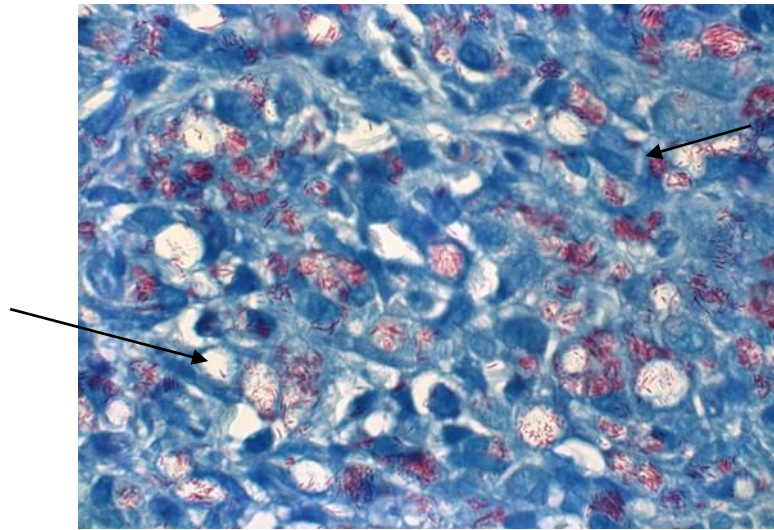
1 - REVISÃO DE LITERATURA

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica cujo agente etiológico é denominado: *M. leprae*, um parasito intracelular obrigatório que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, acarretando ao paciente alta morbidade, incapacidades físicas e deformidades das extremidades. A doença pode ainda afetar órgãos internos nos casos sem controle da doença (AZULAY, 1987).

O *M. leprae* infecta macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes dos nervos periféricos (NASCIMENTO, 2013). Descoberto em 1873 por Gerhard Armauer Hansen, o bacilo foi encontrado em lesão de doente com hanseníase, além de sugerir que uma doença humana estaria associada à presença de um agente etiológico de natureza infecciosa (SKINSNESS, 1973). Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado de 1,5 a 8,0 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool ácido sendo, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (ARAÚJO, 2003).

A principal forma de transmissão é o contato íntimo e prolongado com pacientes multibacilares (com alta carga bacilar) não tratados, sendo o principal meio de transmissão as vias aéreas superiores, entretanto não é descartada a possibilidade de transmissão através das lesões de pele destes pacientes (HANSEN, 1874; WALKER& LOCKWOOD, 2006; JOPLING, 1982).

Figura 1- Macrófagos vacuolados contendo bacilos (setas) em amostra de pele



Fonte: Laboratório de Hanseníase – FIOCRUZ - RJ

1.1 - Epidemiologia

A prevalência da hanseníase no mundo foi reduzida consideravelmente de 5,4 milhões de casos em meados de 1980 para poucos milhares de casos atualmente (WHO, 2016), através da implementação da poliquimioterapia (PQT). A Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou uma estratégia baseada no diagnóstico precoce e no tratamento com a PQT para reduzir a prevalência da hanseníase, com compromisso de manter as iniciativas de controle entre o período de 2011 e 2015, priorizando a cobertura de populações carentes e em áreas de difícil acesso (WHO, 1994; PORTAL BRASIL, 2014; SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2014).

A PQT é o tratamento eficaz adotado pela OMS. Os principais fármacos utilizados são: rifampicina, clofazimina e dapsona. Entretanto, alguns pacientes não podem utilizar destes fármacos convencionais, sendo substituídos por outros, tais como: minociclina, claritromicina, ofloxacina e perfloxacina, que são considerados medicamentos de segunda linha contra a hanseníase (OPROMOLLA, 2000; GALLO ET AL. 2005, WALKER & LOCKWOOD, 2006).

A tabela 1 demonstra a prevalência de casos registrados e o número de novos casos detectados de hanseníase em 136 países ou territórios. No final do ano de 2015, houve um total de 174.608 casos de hanseníase mundialmente que receberam a PQT, isso corresponde a uma taxa de prevalência de 0,29 por 10.000 habitantes. Em 2014 a prevalência de novos casos detectados foi de 3,2 por 100.000 habitantes, totalizando 210.758 casos.

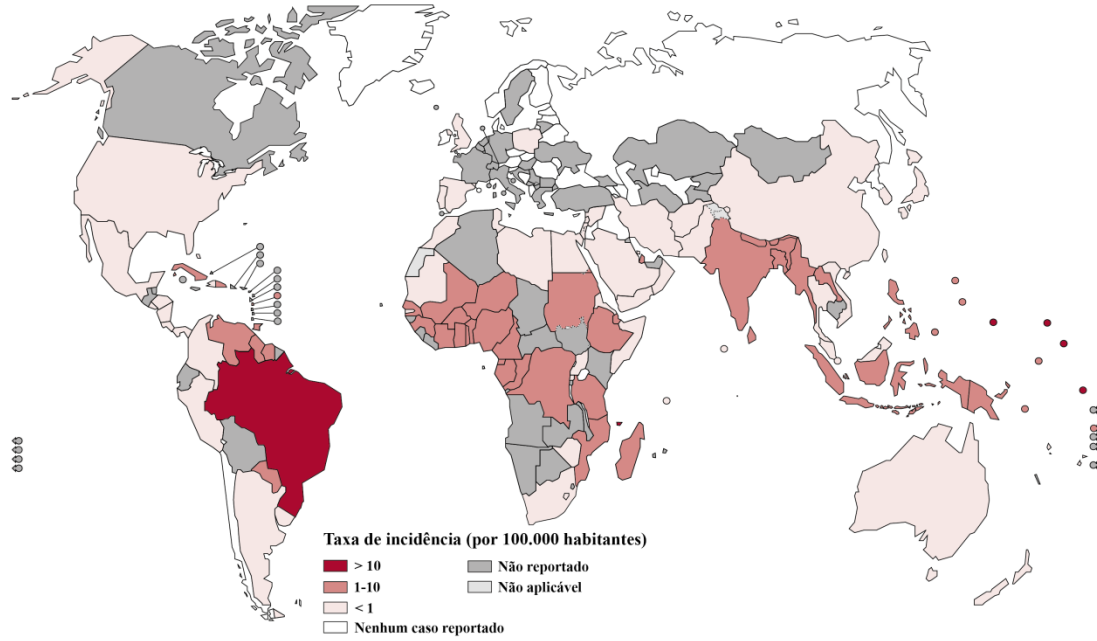
Tabela 1- Prevalência de casos registrados de hanseníase e novos casos registrados em 136 países ou territórios pela OMS 2015.

OMS - Região	Nº de casos registrados (prevalência/10.000 habitantes), primeiro quarteto de 2015.	Nº de novos casos detectados (quociente de novos casos detectados/100.000 habitantes), 2014.
África	20.564 (0,27)	20.004 (2,6)
Américas	27.955 (0,31)	28.806 (3,2)
Mediterrâneo oriental	2.865 (0,05)	2.167 (0,34)
Sul do leste Asiático	117.451 (0,61)	156.118 (8,1)
Oeste do Pacífico	5.773 (0,03)	3.645 (0,2)
Europa		18 (0,004)
TOTAL	174.608 (0,29)	210.758 (3,2)

Fonte: OMS, 2016. Traduzido.

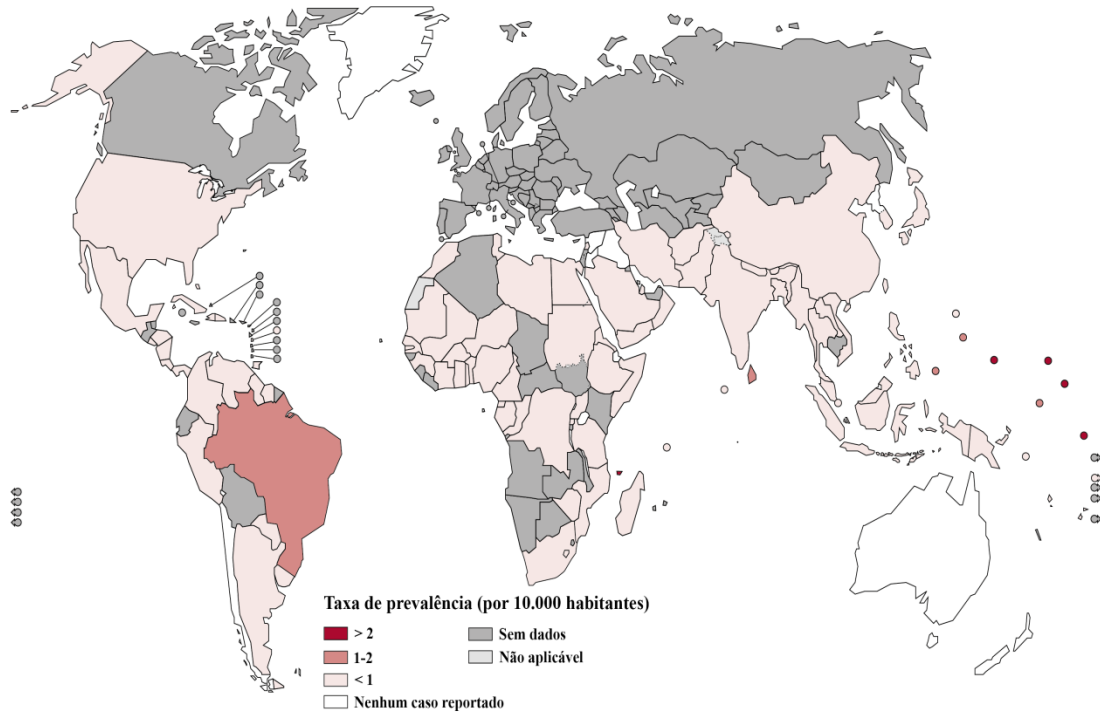
A figura 2 ilustra a taxa de incidência de hanseníase no mundo em 2015, demonstrando os principais países e continentes com a doença. O Brasil, Índia, Indonésia, e alguns países do continente africano, são os territórios mais acometidos pela hanseníase. Na figura 3 apresenta a taxa de prevalência. No Brasil, em 2015, foram detectados 28.761 casos novos. A meta estabelecida pela OMS para eliminação da hanseníase é de até 10 casos a cada 100.000 habitantes, entretanto, o índice de prevalência da hanseníase se apresenta mais alto (coeficiente geral de aproximadamente 14,07). Os Estados do Mato Grosso, Tocantins e Maranhão se apresentam com as maiores taxas de incidência no Brasil, sendo consideradas regiões hiperendêmicas (Figura 4).

Figura 2 - Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015



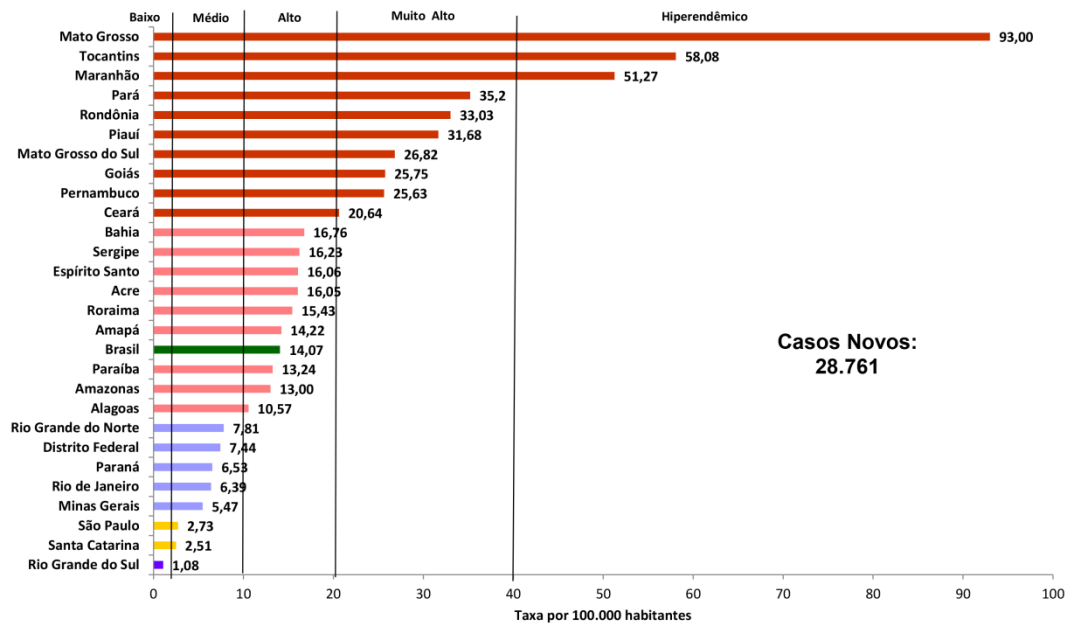
Fonte: Adaptado de WHO 2016.

Figura 3- Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015 (mapa)



Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

Figura 4 - Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por estados, Brasil, 2015



Fonte: SINAN / SVS / MS, 2016.

1.2 Classificações da hanseníase

A doença se apresenta clinicamente de várias maneiras nos serviços de assistência médica e essas formas clínicas de apresentação são classificadas segundo o aspecto clínico-imunológico avaliada no exame clínico, em testes de função imunológica e no aspecto histopatológico da lesão cutânea exibida pelo paciente. (WALKER, 2006).

A classificação utilizada nos postos e unidades de saúde pública no Brasil é essencialmente baseada nos critérios clínicos onde se classifica o paciente de acordo com a clínica, sendo esta avaliada pelo número de lesões cutâneas: pacientes com até cinco lesões cutâneas são considerados como paucibacilares (PB) e pacientes com mais de cinco lesões cutâneas são considerados como MB (OMS, 1998).

Há basicamente três tipos de classificações: A primeira, chamada como: classificação de Madrid classifica a doença em formas polares tuberculoide e virchowiana e formas interpolares; indeterminada e dimorfa (GALLO ET AL, 2005).

A segunda classificação utiliza o critério laboratorial do resultado do exame baciloscópico nos esfregaços de linfa cutânea (fragmento da área dérmica do cotovelo e

fragmento do lóbulo auricular) dos pacientes, podem ser classificados como PB quando a baciloscopia é negativa e MB quando a baciloscopia é positiva.(GALLO ET AL, 2005).

Os resultados apresentados nos exames baciloscópicos quando comparados à sensibilidade e à especificidade da classificação pelo número de lesões cutâneas revelam valores de concordância de 89,6% e 83,8%, respectivamente (GALLO ET AL., 2003).

A terceira classificação foi proposta por Ridley e Jopling (1966), que se baseia em critérios clínicos histopatológicos e imunológicos.

Como observação, deve-se citar que a baciloscopia da pele, quando disponível, é utilizada como um exame auxiliar e complementar ao diagnóstico da hanseníase (Ministério da saúde, 2000).

Figura 5 – Lesões de hanseníase de acordo com os polos Tuberculoide e Lepromatoso



Fonte: <http://www.dahwmt.org.br>. Acesso em 2015

Legenda da figura 5: (A) Mancha hipocrômica característica do polo tuberculoide; (B) Lesão em placa, também característica do polo tuberculoide; (C) Lesões em tubérculos eritematosos, característico do polo lepromatoso.

1.2.1 -Características das formas clínicas segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966)

1.2.1.1 -Tuberculoide-Polar (TT) e Borderline-Tuberculoide (BT)

Esta forma apresenta na histologia: um infiltrado inflamatório focal com presença de granulomas epitelioides e coroa de linfócitos CD4⁺, envolvendo o granuloma, mostra também uma alta resposta imunológica ao bacilo, havendo escassa presença ou ausência dos mesmos. A presença de células gigantes tipo Langhans pode ser observada. Os ramos dos nervos periféricos existentes na pele podem se apresentar lesados pelo processo inflamatório granulomatoso. A diferença entre essas duas formas clínicas se dá pelo número de lesões onde a forma tuberculoide polar (TT) apresenta lesão cutânea única, enquanto que a forma *borderline*-tuberculoide (BT) pode apresentar de 2 a 5 lesões cutâneas. Clinicamente essas lesões se caracterizam por áreas com distúrbio de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, manchas hipocrômicas, anestésicas ou hipoestésicas, ou por placas eritemato-infiltradas, acometimento de troncos nervosos, mono ou polineuropatia, em geral unilateral e assimétrica (GALLO et al. 2005)

1.2.1.2 - Borderline-Borderline (BB)

O infiltrado inflamatório apresenta menor número de linfócitos e o granuloma epitelioides mostra aspecto não compacto, sem formação de células gigantes (GUINTO et al, 1990).

1.2.1.3 - Borderline-lepromatosa (BL) e Lepromatosa-Polar (LL)

Essas formas se caracterizam pela presença de um infiltrado inflamatório difuso, com alto número de macrófagos vacuolados ou células de Virchow. As células de Virchow são macrófagos carregados de bacilo e com grande quantidade de lipídios em seu interior que lhe dão um aspecto espumoso. Essas lesões possuem uma alta carga bacilar e mostram a

presença de plasmócitos. As lesões cutâneas são mais numerosas do que nas formas tuberculoides (mais de cinco). É comum na forma lepromatosa polar (LL) observar epiderme atrófica, faixa de Unna e retificação de cristas. A faixa de Unna é uma faixa de matriz extracelular colagênica que separa o limite superior do infiltrado inflamatório lepromatoso da região basal da epiderme. O dano neural é menos intenso, porém com o decorrer crônico e lento da doença, ele também se torna grave. O quadro clínico se caracteriza pela presença de manchas, placas, tubérculos, nódulos com ou sem alteração de sensibilidade, infiltração eritematosa difusa, acometimento de troncos nervosos: mono ou polineuropatia, em geral simétrica confluenta. A distribuição das lesões tende à simetria (RIDLEY, 1974; GALLO, 2005).

Existem também os quadros reacionais da doença, que são quadros agudos, que ocorrem de maneira imprevisível, interrompendo o curso crônico e característico da doença. Caracterizam-se por respostas imunoinflamatórias exacerbadas e podem manifestar-se antes, durante ou após o tratamento poliquimioterápico (PQT). Os sintomas reacionais são os principais eventos que levam o paciente a procurar ajuda médica, devido ao aparecimento de novas lesões, piora das antigas e agravamento dos sintomas e sinais neurológicos, entre eles a dor neural, com aumento da incapacidade física dos pacientes pelo aumento da lesão neural (URA, 2007).

Há dois tipos principais de reação: a reação reversa (RR ou RTI) e o eritema nodoso da hanseníase (ENL ou RTII) (GUINTO et al, 1990).

1.2.1.4 - Reação Reversa (RR ou RTI)

A RR se manifesta mais frequentemente em pacientes multibacilares (BL e BB), embora possa aparecer também nos pacientes paucibacilares (BT). Os pacientes apresentam-se com seis lesões de pele com a característica de serem lesões bem mais eritematosas, e mais infiltradas. Ainda há sinais de inflamação aguda, tais como dor, infiltração e edema de lesões pré-existentes. Na histopatologia, verifica-se constantemente um infiltrado inflamatório característico por apresentar linfócitos e presença de granuloma epitelióide onde antes não havia (reação *upgrade*), além do acometimento dos filetes nervosos (infiltrado inflamatório cercado, invadindo e alterando a estrutura do nervo). Existe ainda a reação *downgrade* em

que um paciente tuberculoide desenvolve uma progressiva evolução clínica e da sua resposta imune para o polo lepromatoso (RIDLEY & RADIA, 1981).

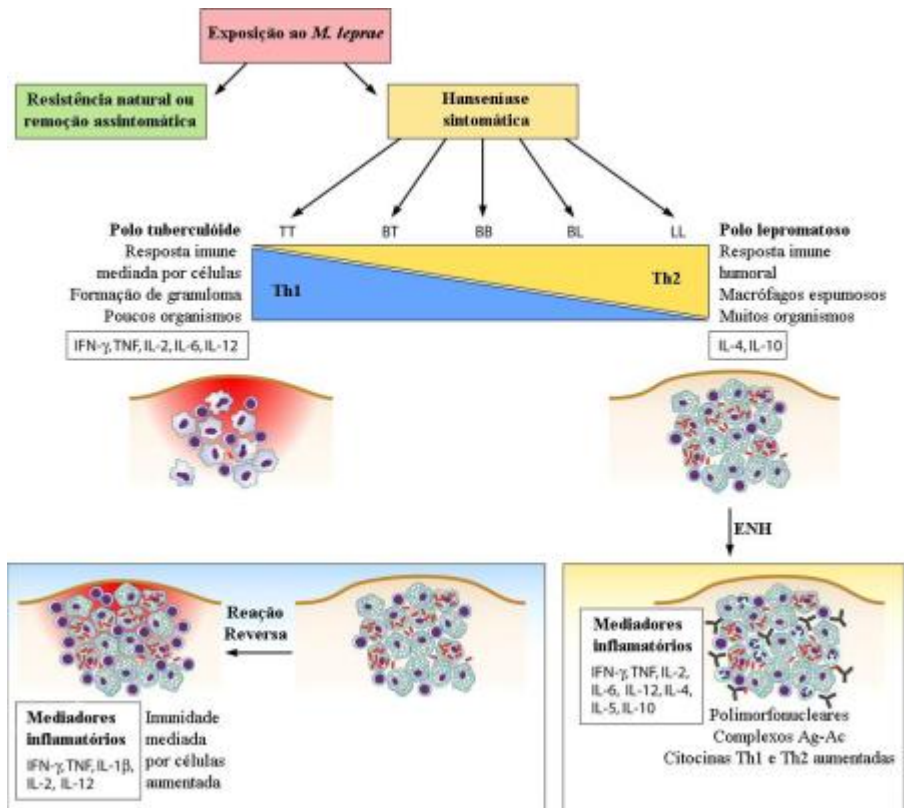
O acometimento do nervo nos estados reacionais pode atingir as fibras sensitivas e motoras dos troncos nervosos periféricos, gerando lesões definitivas, incapacidade física, espessamento e dor espontânea ou à palpação de troncos nervosos periféricos (neurite) (NAAFS, 2003).

1.2.1.5 - Eritema Nodoso Hansênico (ENH ou RTII)

Este é outro tipo de reação, que se manifesta em pacientes multibacilares (BL ou LL). Os pacientes apresentam um quadro de inflamação aguda com nódulos infiltrados, dolorosos, de coloração rósea, distribuição simétrica e bilateral, principalmente na face e extremidades e podem evoluir para pústulas e bolhas, com posterior ulceração e formação de necrose, nas formas mais graves do ENH. Além destas lesões, o paciente apresenta febre, dores musculares e ósseas, artrite, irite e orquite entre outras complicações (GUINTO et al, 1990).

Na histopatologia, verifica-se constantemente um infiltrado inflamatório (principalmente na hipoderme) muito intenso característico por apresentar grande número de macrófagos vacuolados (células de Virchow) e polimorfonucleares, com plasmócitos, além de um quadro de vasculite. Ocorre o aparecimento de neutrófilos e angiogênese local na derme profunda (PIRES et al, 1996).

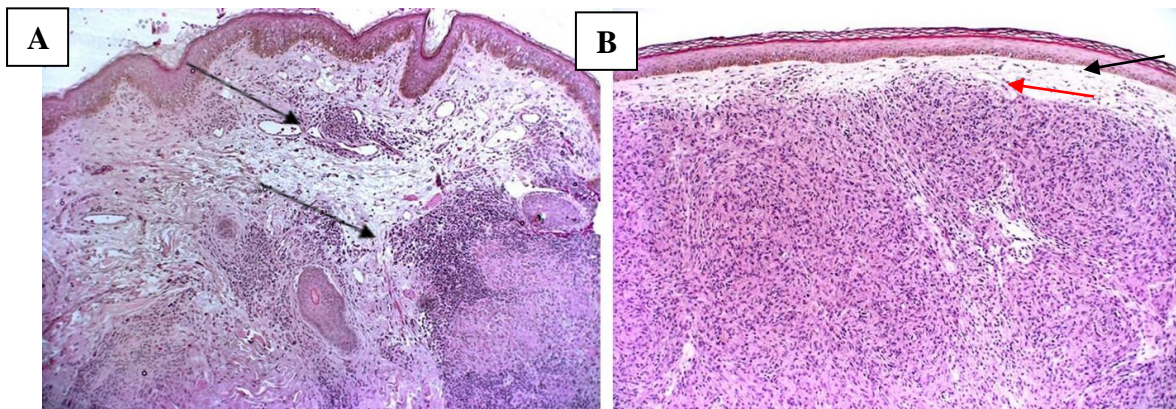
Figura 6 - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley-Jopling



Legenda da figura 6: Formas de classificação proposta por Ridley-Jopling, bem como o perfil inflamatório dos polos e as principais citocinas expressas.

Fonte: Adaptado de Misch *et al.*, 2010.

Figura 7 - Apresentação histopatológica da pele com hanseníase



Legenda da figura 7: Imagens histológicas de amostras de pele pela coloração de hematoxilina-eosina (H-E); (A) pertence ao polo tuberculóide, grupo BT, nota-se a presença de granulomas bem formados (setas); (B), mostram-se características do polo lepromatoso, grupo LL, pode-se visualizar a faixa de Unna (seta vermelha) e uma epiderme retificada e atrófica (seta preta) características histopatológicas típicas de cada grupo. (A-B) aumento 400x. Fonte: Laboratório de Hanseníase – FIOCRUZ

1.3 Neuropatia hanseniana

A neuropatia hanseniana surge a partir da invasão dos nervos periféricos por *M. leprae* e através das respostas imunoinflamatórias a este patógeno (SCOLLARD et al, 2006). Do ponto de vista histopatológico, o achado mais característico da hanseníase neural é a presença de infiltrado inflamatório com intensidade variável, que ocupa de forma heterogênea o endoneuro, o perineuro e o epineuro. Normalmente, o infiltrado inflamatório pode estar localizado na área de transição do endoneuro com o perineuro, expandindo-se para o interior do endoneuro e para a espessura do perineuro. No nervo periférico, o infiltrado inflamatório pode ser constituído por macrófagos espumosos também conhecidos como macrófagos virchowianos repletos de bacilos, plasmócitos e linfócitos ou por um granuloma epitelióide, circundado por halo linfocitário, com ocasional presença de necrose caseosa (ANTUNES et al, 2012; SHETTY et al, 1997; FREITAS et al, 2003).

A fibrose é um achado muito frequente no estágio final da neuropatia hanseniana, em contraste com muitas outras neuropatias inflamatórias que não transformam o nervo em um cordão fibroso como faz a neuropatia da hanseníase. A fibrose do nervo na hanseníase ocorre de forma branda, moderada ou mais intensa. Na experiência do Laboratório de Hanseníase publicada em 2012 (ANTUNES et al, 2012), não foram encontradas fibrose endoneural e perineural em outras neuropatias não relacionadas com a hanseníase, embora houvesse um aumento de matriz extracelular em face da redução do número de fibras nervosas próprias dessas outras neuropatias, entretanto, a celularidade do endoneuro se mantinha preservada e não havia o aspecto hialinizado acelular encontrado na neuropatia hanseniana. A fibrose endoneural hanseniana prejudica a regeneração da fibra nervosa, o que explica a irreversibilidade do dano causado pela hanseníase ao nervo, mesmo após a infecção ter sido curada (TELES et al, 2007; MIKO et al, 1993). A fibrose neural está normalmente associada à perda parcial ou total de fibras nervosas no decorrer da neuropatia hanseniana (ANTUNES et al, 2012).

A lesão neural ocorre em todas as formas clínicas da hanseníase mesmo na ausência de lesões cutâneas. Em alguns casos, somente os nervos periféricos são acometidos, sem que ocorra formação de lesões cutâneas, caracterizando então a forma neural pura da doença (SCOLLARD et al, 2006; FREITAS et al, 1998). A forma neural pura compreende de 4 a 10% dos pacientes com hanseníase (GIRDHAR, 1996).

Existem controvérsias sobre o mecanismo de lesão da fibra nervosa na hanseníase: seria o dano neural induzido diretamente por *M leprae*, na sua interação direta com os componentes do nervo? Sabemos que *M leprae* é a única bactéria que se alberga seletivamente no nervo e consegue parasitar a célula de Schwann (BJUNE et al, 1983). Existem evidências importantes a favor dessa hipótese, como o trabalho de RAMBUKKANA et al, (2002) em que o processo de desmielinização da fibra nervosa é induzido pelo simples contato de *M leprae* com a fibra nervosa tanto em coculturas de células de Schwann como no camundongo RAG1, deficiente de imunidade adquirida. A inoculação intraneural experimental de *M leprae* em camundongos provocou uma diminuição da fosforilação de neurofilamentos, processo este, que é importante para o tropismo axonal (SAVE et al, 2009). SHETTY et al, (1988) demonstraram uma maior frequência de axônios atróficos em nervos acometidos por neuropatia hanseniana. Ainda a favor de uma direta indução de lesão axonal por *M leprae*, foi demonstrada no Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz por TELES et al, (2007) a capacidade de *M leprae* de induzir em células de Schwann cultivadas in vitro, a expressão e secreção de metaloproteinase 9 (MMP9) que está associada a processo de degeneração axonal e de desmielinização: *M leprae* também induz uma diminuição da transferência de lactato pela célula de Schwann para o axônio, restringindo a produção de energia pelas mitocôndrias axonais, fato que implica em grande prejuízo para a função axonal, incluindo a fosforilação dos neurofilamentos (MEDEIROS et al, 2016).

Apesar desses estudos apontarem o papel do bacilo, há outra corrente de pesquisadores que afirmam que a lesão do nervo na hanseníase ocorre por mecanismo imunomediado em face da capacidade da célula de Schwann apresentar antígenos para linfócitos T citotóxicos (SPIERINGS et al, 2000). Evidências experimentais observadas *in vivo* e *in vitro* mostram o envolvimento de mediadores imunológicos como o TNF- α na imunopatogênese da desmielinização da hanseníase (ANDRADE et al, 2016).

Outro assunto ainda não elucidado na neuropatia da hanseníase é o mecanismo primário de lesão da fibra nervosa: a lesão seria inicialmente desmielinizante? Ou o mecanismo inicial da lesão é a agressão axonal? A célula de Schwann vive em íntimo contato com o axônio, existindo uma dependência trófica entre esses dois componentes da fibra nervosa, de modo que qualquer dano infligido a um dos dois constituintes da fibra nervosa reflete incondicionalmente sobre o outro. Na hanseníase, são encontrados sinais de desmielinização, sinais de perda axonal significativa por degeneração axonal, sendo a relação espacial e temporal entre a desmielinização e a degeneração axonal, entretanto, desconhecida.

ANDRADE et al, (2016) mostraram que a desmielinização ocorre durante os processos reacionais da hanseníase e que ela pode estar associada a um aumento da expressão de TNF pelas células de Schwann. Os processos já mencionados nessa revisão de literatura, como a diminuição da fosforilação do neurofilamento, degeneração waleriana, alterações de desacoplamento energético das mitocôndrias em face da diminuição da oferta de lactato são evidências de que a degeneração axonal poderia ocorrer por uma disfunção mitocondrial induzida de alguma forma por *M leprae*, contudo pode estar ligada a uma alteração primária da mielina, conforme mostra o artigo sobre lesão experimental da mielina em camundongo construído geneticamente, em que a proteína PLP (proteína proteolipídica) foi substituída pela proteína P0 (proteína mielínica zero ou MPZ). Esses camundongos, em consequência de uma simples substituição de uma proteína da mielina por outra, desenvolvem alterações morfológicas e funcionais das mitocôndrias, mostrando mais uma vez o papel trófico que a mielina exerce sobre o axônio (YIN et al, 2016).

1.4 Diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é prioritariamente clínico. Como o bacilo não cresce em cultura torna-se difícil a conclusão do diagnóstico. Entretanto, pode ser feito por meio de biópsias de pele quando a doença se apresenta com lesões cutâneas características, como a mácula hipocrômica, a mácula eritematosa, a placa eritematosa, as pápulas, os tubérculos e os nódulos próprios da doença (GUINTO et al, 1990). A precocidade desse diagnóstico passou a ser considerada como um aspecto operacional relevante para o controle da doença. Apesar da bem sucedida diminuição da prevalência ocasionada pela instituição da poliquimioterapia (PQT) como tratamento ministrado na rede de saúde de vários países do mundo, no Brasil, o índice de detecção de casos novos continua elevado, mostrando que a transmissão da doença continua a ocorrer. Portanto, a fonte dessa transmissão continua provavelmente sendo pacientes bacilíferos ou possivelmente os pacientes com hanseníase subclínica, oligossintomáticos ou assintomáticos. Outros focos também são encontrados na natureza como o tatu nove bandas, esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) e macacos *Mangabey*. (TRUMAN et al, 2011; AVANZI et al, 2016; HAMILTON et al, 2008).

A lesão de fibras nervosas finas, representadas pelas fibras amielínicas ou pelas fibras mielínicas de pequeno calibre (tipo A δ), parece ocorrer na fase inicial da doença, uma vez que *M. leprae* possui afinidade preferencial pelas células de Schwann não mielinizantes, embora possam também albergar-se em células de Schwann de fibras mielinizadas em menor frequência (SCOLLARD et al, 2006). As células de Schwann desse tipo de fibra têm maior plasticidade, de forma que, ao perderem o contato com o axônio transformam-se em células de Schwann desnervadas ou mais imaturas, respondendo mais facilmente a estímulos migratórios e proliferativos; elas acabam servindo de nicho para a instalação de *M. leprae* no nervo periférico. Essa é a hipótese levantada por RAMBUKKANA et al, (2002) para explicar que o efeito desmielinizante de *M. leprae* teria uma vantagem na forma de manutenção do parasito no ambiente hospedeiro. As fibras amielínicas (fibras tipo C) são responsáveis pela sensibilidade térmica e dolorosa dos pacientes, assim como pela função autonômica, frequentemente afetadas na hanseníase (SNELL, 2010).

Um aspecto praticamente pouco estudado da neuropatia hanseniana é a alteração morfológica e quantitativa das fibras não mielinizadas na hanseníase, especialmente no tronco nervoso. Um trabalho de GIBBELS et al, (1988) mostra um estudo quantitativo e qualitativo de somente dois casos de amostras de nervo sural colhidas por biópsia. As lesões do nervo periférico acometido pela hanseníase mostram perda de fibras mielinizadas de grande calibre, enquanto que as fibras mielinizadas de pequeno calibre e as fibras amielínicas estão presentes em lesões avançadas do nervo periférico da hanseníase (ANTUNES et al, 2006). Antunes et al (manuscrito em preparação) mostrou também, através de métodos morfométricos que quantificaram a frequência da faixa de 1 a 2,5 micrômetros de diâmetro das fibras nervosas em amostras de nervo com a forma neural pura da doença, um aumento da proporção de fibras mielinizadas de pequeno calibre em relação às fibras mielinizadas de grande calibre, corroborando o primeiro achado do mesmo grupo em 2006.

A avaliação clínica da função e da integridade estrutural desses tipos de fibras requer equipamentos especiais, uma vez que os testes neurológicos para sensibilidade são influenciados pela subjetividade das respostas e até mesmo pelas condições sócio-culturais do paciente. A função autonômica avaliada pelo fluxo sanguíneo capilar e a capacidade de sudorese das glândulas da pele somente geram sintomas no paciente (eritrocianose e xerodermia localizada), que não levam o paciente geralmente à procura da assistência médica. Da mesma forma, o TQS (teste quantitativo sensorial) é um equipamento capaz de quantificar o estímulo sensorial ao qual o paciente acusa sensibilidade térmica (frio e calor) ou dolorosa

permitindo reduzir a subjetividade própria desse tipo de exame (ILLARRAMENDI et al, 2005). Os monofilamentos graduados com escala de peso crescente também foram utilizados para avaliação da sensibilidade tátil, particularmente da área da lesão (DORAIRAJ et al 1988). O exame da sensibilidade sempre comporta um grau de subjetividade que varia com a idade, com o sexo e a condição sociocultural de cada indivíduo.

Morfologicamente, as fibras não mielinizadas só podem ser avaliadas por estudo ultraestrutural com a microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou pela expressão imunohistoquímica de marcadores axonais (proteína de gene de proteína 9.5 e proteína S100, respectivamente), permitindo a quantificação de fibras intraepidérmicas ou dérmicas evidenciadas com esse método em amostras de pele colhidas por biópsia. Os equipamentos tecnológicos que permitem a realização de testes especiais como o teste quantitativo sensorial (TQS) (RODRIGUES et al, 2012) e o potencial sensitivo evocado pelo contato ao calor (PSECC) (WU et al, 2017), permitem respectivamente a avaliação da sensibilidade térmica, dolorosa, enquanto que o método da fluxometria pelo laser *doppler* propicia a avaliação da funcionalidade da inervação autonômica vascular em torno de vasos e anexos, exercendo influência essencial no fluxo capilar cutâneo e nos seus reflexos relacionados com os movimentos respiratórios naturais associados (ILLARRAMENDI et al, 2005).

Outro exame realizado é a sorologia que avalia anticorpos IgM anti PGL-1, entretanto possui baixa sensibilidade nos pacientes PB, sendo positiva frequentemente entre os pacientes MB. (DUPPRE et al, 2012). A sorologia auxilia na correta classificação clínica, mas se torna limitada nos casos PB.

Um aspecto prático que causa dificuldades para o diagnóstico histopatológico da hanseníase na amostra de pele é a ausência de bacilo resistente à descoloração pela solução de álcool-ácido (BAAR) nos cortes histológicos das amostras cutâneas. O patologista encarregado de liberar o diagnóstico histopatológico da doença deve proceder o diagnóstico diferencial com outras doenças cutâneas que se apresentam clinicamente com lesões de aspecto semelhante à hanseníase, tais como lesões em placas, maculares, tuberculares e nodulares (LASTÓRIA&ABREU, 2014). O diagnóstico clínico requer, quando possível, a realização de biópsia da lesão cutânea, para esclarecimento. Nesses casos, a ausência de BAAR na lesão se constitui em um obstáculo a ser vencido para que o patologista possa chegar a uma conclusão diagnóstica. A análise histopatológica voltará o seu foco nesses casos, para o envolvimento de ramos nervosos cutâneos pelo infiltrado inflamatório característico da hanseníase, para a constituição do infiltrado com a verificação da formação

de granuloma epitelióide, o qual também é um indício de probabilidade da doença. A relação espacial e interativa do infiltrado inflamatório com esses ramos nervosos pode fornecer para o patologista sinais indicativos de que a hanseníase possa ser o diagnóstico etiológico da amostra em questão. O diagnóstico dessa forma de hanseníase se faz, portanto, na base da probabilidade, uma vez que a certeza diagnóstica só é adquirida pela presença indiscutível do BAAR na amostra colhida, entretanto, uma eficiente integração entre a equipe clínica e de Patologia, em conjunto com os exames de sensibilidade apurados em um contexto de país endêmico, onde normalmente existem médicos experientes em reconhecimento de lesões próprias da doença tanto do ponto de vista clínico como histopatológico, a chance de erro acaba sendo reduzida, sem, no entanto, deixar de existir.

A forma neural pura da hanseníase também oferece problemas diagnósticos pelo mesmo motivo, ou seja, quando a presença de BAAR no nervo não é detectada. Da mesma forma, a integração entre os dados clínicos, laboratoriais e histopatológicos serve para arriscar um diagnóstico de probabilidade para os casos em que o bacilo não é detectado. A forma neural pura não possui lesão de pele e a biópsia de nervo se faz necessária para o diagnóstico da doença (JARDIM et al, 2003).

Visando uma melhor compreensão do leitor, o presente trabalho de tese foi dividido em três frentes de investigação, todas utilizarão como instrumento a análise morfológica de amostras de tecido colhido por biópsia que teve sempre a finalidade diagnóstica. As três frentes de investigação são enumeradas a seguir:

A) estudo morfológico dos ramos nervosos cutâneos e estruturas anexiais em lesões cutâneas de pacientes suspeitos de hanseníase.

B) estudo histopatológico e ultraestrutural da inervação em pele hipoestésica com aspecto visual normal obtida de pacientes com a forma neural pura da doença.

C) quantificação de fibras amielínicas em tronco nervoso periférico da forma neural pura.

O foco da primeira frente do trabalho desse estudo é o diagnóstico precoce da hanseníase em pacientes com áreas ou lesões cutâneas mostrando alterações da sensibilidade. As lesões cutâneas iniciais da hanseníase paucibacilar podem apresentar dificuldades no diagnóstico diferencial com outras doenças cutâneas, que causam lesões semelhantes às da hanseníase (ABBAS & BHAWAN, 2010), porém sem um comprometimento tão pronunciado da função sensorial da pele, embora, também essas lesões possam apresentar alterações no exame da sensibilidade cutânea. Diante de lesões suspeitas de hanseníase paucibacilar, existe

na prática clínica o risco de que a sua etiologia não seja hanseníase, assim como também existe o risco de que essas lesões sejam confundidas com outras doenças, retardando o diagnóstico e permitindo o avanço da lesão neural agravando o risco de incapacidade (BARBIERI et al, 2014). O estudo das alterações morfológicas dos ramos nervosos cutâneos tanto nas lesões de pele em que a hanseníase foi diagnosticada, comparadas com os casos em que o diagnóstico histopatológico foi inconclusivo é o foco dessa parte do estudo na tentativa de contribuir para aumentar a eficiência diagnóstica da doença, uma vez que o diagnóstico pode se confundir com outras lesões de etiologia diversa como sífilis, granuloma anular, sarcoidose, micose fungóide, etc.

Em relação à segunda abordagem do presente estudo, e em paralelo com os objetivos descritos acima, pretende-se avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais dos ramos nervosos da pele hipostésica com aspecto dermatológico normal, colhidas de pacientes com hanseníase neural pura diagnosticados por biópsia de nervo, além de outros exames clínicos e laboratoriais. Essa pele de aspecto normal foi colhida de região inervada pelo nervo biopsiado do mesmo paciente. Esses pacientes tiveram o diagnóstico de hanseníase neural pura firmado pela histopatologia de amostras de nervo cutâneo dorsal colhidas por biópsia, além da avaliação clínica, eletrofisiológica da condução nervosa e laboratorial. O grupo neural pura é um grupo que não apresenta lesão de pele, mas somente apresenta um quadro de neuropatia periférica, a ser esclarecida, uma vez que a doença fica restrita aos nervos (ANTUNES et al, 2012; GARBINO et al, 2013; JARDIM et al, 2003). A coleta de pele hipostésica da região inervada pelo nervo biopsiado é um procedimento de rotina do Ambulatório Souza Araújo(ASA) e que tem a finalidade de auxiliar o diagnóstico da forma neural pura da doença baseado no trabalho de MENICUCCI et al, (2005). No caso do presente estudo, a região onde foi colhida a amostra foi a dorso-medial da mão, inervada pelo nervo cutâneo dorsal, ramo sensitivo do nervo ulnar.

A caracterização das alterações ultraestruturais das fibras nervosas contidas nos ramos nervosos cutâneos e a sua relação com um possível infiltrado inflamatório próximo a esses ramos ou ainda, a ausência de infiltrado circunjacente ao nervo poderão contribuir para o conhecimento de como os componentes do nervo reagem à agressão neural pela hanseníase. A detecção de alterações induzidas pela presença de *M.leprae* no nervo e não mediadas pelo processo imunoinflamatório também poderá ser apreciada.

O estudo ultraestrutural permite aprofundar também o entendimento do papel da biópsia de pele visualmente normal, porém hipoestésica, como método de estudo já utilizado pelo grupo do Laboratório de Hanseníase em trabalho publicado por MENICUCCI et al, (2005). Esse artigo demonstrou evidências da doença neural pura no exame das amostras de pele visualmente normal, mas hipoestésica, colhida de região inervada pelo nervo biopsiado. O estudo ultraestrutural não foi realizado no estudo de MENICUCCI et al (2005), tampouco a comparação com os eventos patológicos no tronco nervoso.

No presente estudo, foi possível comparar as alterações histológicas e ultraestruturais dos ramos nervosos da pele colhida com os achados morfológicos encontrados nos troncos dos nervos periféricos biopsiados dos mesmos pacientes.

As amostras de pele do grupo de pacientes com a forma neural pura foram examinadas com as colorações histológicas de rotina com, a microscopia ótica de cortes semifinos e com a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os nervos selecionados nos cortes semifinos (0,5µm de espessura), foram levados para análise pela MET, permitindo a observação do aspecto ultra-estrutural das fibras nervosas mielínicas pequenas (fibras finas) e das fibras amielínicas, bem como as alterações ultraestruturais das células de Schwann, dos axônios, dos fibroblastos e da matriz colagênica do ramo nervoso selecionado para esse exame. Somente as amostras de pele provenientes de pacientes com a forma neural pura foram examinadas com o método ultraestrutural de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A terceira frente de estudo do presente trabalho é a alteração da fibra amielínica nos nervos periféricos na neuropatia da hanseníase. As fibras amielínicas assim como as fibras mielinizadas de pequeno calibre são frequentemente afetadas na neuropatia da hanseníase, afirmação essa, evidenciada pelos sintomas sensitivos predominantes desde o início da doença e que são manifestações de alteração desse tipo de fibra. O único estudo específico encontrado sobre morfologia das fibras amielínicas é representado por GIBBELS et al, (1988) que estudou em dois casos as suas alterações sem no entanto, um componente quantitativo. A detecção de sintomas referentes à sensibilidade alterada é muito estudada na hanseníase, já que as alterações dessas fibras são mais precoces do que as alterações de fibras mielinizadas grandes responsáveis pela função motora e sensorial profunda, esta particularmente, não muito afetada na hanseníase. Os estudos clássicos morfológicos sobre as alterações do nervo periférico na hanseníase mencionam alterações dessas fibras, entre elas a invasão das células de Schwann não mielinizantes por *M leprae*, entre diversas alterações morfológicas elencadas no livro de ANTIA & SHETTY (1997). O foco do presente estudo sobre as fibras amielínicas

é quantitativo, já que não encontramos esse aspecto nos trabalhos clássicos morfológicos sobre alterações dos nervos periféricos na hanseníase. O estudo tem também a intenção de correlacionar os seus achados com as hipóteses elaboradas por RAMBUKKANA et al, (2002).

O intento desse estudo é abordar as alterações morfológicas do sistema nervoso periférico, em seu segmento de tronco nervoso sensitivo e ramos nervosos cutâneos comparando as alterações nesses dois segmentos do sistema, procurando obter subsídios aplicáveis à prática diagnóstica da doença e vislumbrar aspectos que contribuam para o entendimento mais profundo da patogenia da doença.

2 - OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações morfológicas do sistema nervoso periférico em seu compartimento cutâneo e de tronco nervoso em pacientes portadores de hanseníase, visando as implicações para o diagnóstico da doença, assim como aspectos da patogenia da sua lesão neural.

2.1 - Objetivos específicos

a) Detectar as alterações histopatológicas dos ramos nervosos em amostras de pele de pacientes que apresentaram lesões clinicamente suspeitas de hanseníase e apurar o diagnóstico da hanseníase e de outras doenças que compõem a lista de diagnóstico diferencial da doença.

b) Caracterizar através de índices quantitativos o grau de alterações inflamatórias, a relação do ramo nervoso com o infiltrado, as alterações inespecíficas dos ramos nervosos cutâneos (fibrose, espessamento de perineuro, aumento de celularidade) e a sua influência no diagnóstico diferencial histopatológico da hanseníase.

c) Avaliar a frequência de infiltrado inflamatório em torno de glândulas sudoríparas, folículos pilosos e músculos piloerectores, como aspecto indicativo do diagnóstico de hanseníase.

d) Avaliar e quantificar através do estabelecimento de índices quantitativos, as fibras nervosas na derme marcadas pelo anticorpo PGP9.5 no interior de ramos nervosos e na inervação das estruturas anexiais da pele, a fim de obter subsídios que auxiliem a distinguir os casos reais de hanseníase dos casos inconclusivos e de outras doenças não relacionadas com a doença.

e) Descrever a frequência das alterações ultraestruturais dos ramos nervosos de pele hipoestésica com aspecto visual normal de pacientes com a forma neural pura, comparando com as alterações encontradas nos troncos nervosos biopsiados dos mesmos pacientes.

f) Quantificar as fibras amielínicas nos troncos nervosos da forma neural pura da hanseníase comparando-as com a quantidade dessas fibras em outras neuropatias não relacionadas com a hanseníase.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IOC (CEP-IOC), protocolo número 42191215.2.0000.5248 e parecer consubstanciado 1.033.761. Todos os pacientes foram atendidos regularmente no Ambulatório Souza Araújo (ASA) do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz no Rio de Janeiro. Como unidade assistencial filiado ao Ministério da Saúde do Brasil, o Ambulatório Souza Araújo realiza um atendimento de maior complexidade, incluindo biópsias e outros procedimentos com utilização de técnicas de Biologia Molecular e diversos testes para avaliação da eficácia da resposta imune nos pacientes.

A partir dos casos acompanhados no ASA, são realizadas pesquisas de caráter clínico, epidemiológico e laboratorial. Foram coletadas para o presente estudo um total de 84 amostras, sendo divididas em:

Estudo A (Diagnóstico histológico de hanseníase em lesões suspeitas: 35 amostras de pele)

Estudo B (Estudo ultraestrutural dos ramos nervosos cutâneos de pele): 11 amostras de pele e 11 amostras do nervo periférico

Estudo C (Quantificação das fibras amielínicas nos troncos nervosos acometidos por hanseníase): 27 amostras de nervo periférico (18 amostras de nervo com hanseníase neural e 9 amostras de nervo com neuropatias não relacionadas com a hanseníase).

Todas as mencionadas amostras foram coletadas por biópsia com finalidade diagnóstica.

Os Critérios de exclusão dos pacientes foram:

a) Apresentar doença(s) coexistente(s) que cursem com neuropatia periférica, tais como, diabetes mellitus, alcoolismo crônico, SIDA, doenças reumatológicas, neuropatias tóxicas e hereditárias;b) Estar em uso de droga neurotóxica ou corticosteroides;c) Apresentar déficit mental.

3.1 -Estudo A

Diagnóstico histológico de hanseníase em lesões dermatológicas suspeitas.

Nesse estudo, os pacientes foram submetidos à:

3.1.1 - Avaliação clínica dermatológica

A origem dos pacientes dessa frente de estudo foi a população de pacientes que procura o ASA por demanda espontânea passando pelo serviço de triagem e também de contatos de pacientes de hanseníase cadastrados no ASA e que desenvolveram lesões dermatológicas suspeitas. Os contatos são indivíduos que possuem contato com paciente com o diagnóstico definido de hanseníase.

O exame dermatológico foi direcionado para avaliar a presença de lesões cutâneas características da hanseníase: presença de uma ou poucas máculas hipopigmentadas, hipoestésicas ou anestésicas, características da forma indeterminada; placas eritematosas com borda elevada e centro hipopigmentado, anestésico, seco e alopecico das formas tuberculoides. As máculas e as áreas anestésicas foram avaliadas com a prova de histamina, com injeção de 0,1mL de histamina intradérmica para exame de reação flogística em torno do local da injeção.

3.1.2 - Avaliação clínica neurológica

O exame neurológico foi direcionado para avaliar a função autonômica, sensitiva e motora dos nervos periféricos. Na anamnese foram avaliadas as queixas de dor neural e/ou parestesia, as quais foram graduadas de acordo com a escala analógica visual (EAV) (BATALHA, 2016). Todos os nervos periféricos foram palpados para avaliar a presença de

espessamento. A sensibilidade foi avaliada na distribuição cutânea de cada nervo periférico resultando na soma de 13 áreas de cada lado (direito e esquerdo). A sensibilidade tátil foi avaliada, utilizando-se os monofilamentos de Semmes-Weinstein (BELL-KROTOSKI, 1990), e os resultados foram registrados de acordo com o peso mínimo do monofilamento sentido pelo paciente durante o exame de sensibilidade tátil. Cada monofilamento representa um determinado valor como se segue: 5 pontos para o monofilamento de 0,05g (normal), 4 pontos para 0,2g (normal em membros inferiores), 3 pontos para 2g; 2 pontos para 4g; 1 ponto para 300g; e 0 para anestesia tátil. A sensibilidade térmica foi testada com uso de metal frio e quente. Um material pontiagudoseguro (alfinete para fixar fraldas de crianças) foi utilizado para avaliar a sensibilidade dolorosa, a qual foi registrada com escala semelhante à escala da sensibilidade térmica. As sensibilidades à temperatura e à dor serão graduadas de 0 a 2 (0 se anestesia, 1 se hipoestesia e 2 se normal). A avaliação motora foi realizada através da medida da força muscular em todos os grupos musculares inervados pelo mediano, ulnar, radial e fibular seguindo as recomendações do *Medical Research Council*. Cada músculo foi graduado de 0 (paralisia) até 5 (normal) de acordo à resposta motora.

3.1.3 - Teste quantitativo da sensibilidade (TQS)

Os pacientes foram submetidos ao TQS através do uso do equipamento *Medoc TSA-II Neurosensory analyzer* (*Medoc advanced medical system, Israel*) um aparelho acoplado a um computador, capaz de gerar e documentar uma resposta a estímulos térmicos e vibratórios altamente replicáveis como calor, frio, dor induzida pelo calor, dor induzida pelo frio e vibração. O TSA-II permite a avaliação quantitativa da função nervosa sensitiva de pequeno calibre (fibras A-delta e Fibras C), assim como para fibras A-beta de maior calibre. O TSA-II também foi usado para identificar o limiar de dor induzida pelo calor. O eletrodo térmico foi colocado sobre a pele do paciente para esquentar ou esfriar a região. O paciente foi instruído a responder ao estímulo pressionando um botão conectado ao equipamento. O limiar sensitivo foi gravado e automaticamente comparado com resultados normais de acordo com a faixa etária.

3.1.4 -Procedimentos técnicos para avaliação morfológica das amostras colhidas

Esse estudo foi iniciado com uma análise histopatológica das lesões. Nas amostras de pele colhidas de área com alteração de sensibilidade foram realizados os seguintes procedimentos:

a) Exame histopatológico com técnicas histológicas de coloração:

- as colorações utilizadas foram a hematoxilina-eosina para avaliar a presença de infiltrado inflamatório e aspectos histopatológicos gerais da pele e Wade para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes. Essas colorações (HE e Wade) fazem parte da rotina de processamento das amostras colhidas por biópsia no ASA e, portanto, já estão feitas estando as lâminas histológicas arquivadas no serviço do Laboratório de Hanseníase.

Foram realizadas no presente estudo as seguintes colorações:

- Hematoxilina-eosina para avaliar os índices de lesão de nervos que serão explicados adiante nesta mesma seção.

- Coloração tricromática de Gomori para estudo da matriz extracelular do nervo e avaliação da presença de fibras mielinizadas nos ramos nervosos;

- Coloração de Wade para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes na amostra.

O comprometimento histopatológico dos ramos nervosos da derme, em amostras colhidas por biópsias de lesões suspeitas de hanseníase sem ainda ter o seu diagnóstico definido é verificado de rotina como instrumento diagnóstico dermatológico dessas lesões. Quando o BAAR é encontrado na pele, o diagnóstico de certeza fica confirmado, entretanto, quando a presença do bacilo não é detectada, o diagnóstico do paciente deixa de ser de certeza e passa a ser de probabilidade, e até mesmo de possibilidade. A alteração histopatológica como o comprometimento de ramos nervosos cutâneos pelo infiltrado inflamatório próprio da hanseníase é então buscada como evidência diagnóstica, entretanto, nenhuma dessas alterações do ramo nervoso pode ser tomada como base para o diagnóstico de certeza da doença, pois falta a elas a presença do BAAR.

Para a quantificação das alterações histológicas encontradas nas amostras de pele foram elaborados índices de lesão do nervo, que levaram em consideração o número de nervos com um determinado tipo de lesão em relação ao número total de nervos. Dessa forma, os vários índices enunciados a seguir, foram obtidos pelo quociente entre o número de

nervos que possuíam cada alteração correspondente ao nome do índice e o número total de nervos encontrado no corte histológico da amostra. Os índices selecionados para a comparação entre os três grupos classificados segundo o diagnóstico histológico são os seguintes:

- 1) índice infiltrado endoneural do ramo nervoso;
- 2) índice infiltrado perineural do ramo nervoso;
- 3) o infiltrado inflamatório próximo ao nervo sem contato com o mesmo;

Esses índices foram elaborados segundo os aspectos histopatológicos da relação espacial do infiltrado inflamatório com os ramos nervosos envolvidos pelo infiltrado inflamatório da hanseníase.

Foram também utilizados índices que mostram alterações dos ramos sem a presença do infiltrado inflamatório. Esses ramos nervosos com alterações morfológicas possivelmente secundárias a uma prévia agressão inflamatória ao nervo não mostram mais a presença do infiltrado em relação com o ramo nervoso no corte examinado. Essas alterações também foram quantificadas sob a forma de índices, levando em consideração da mesma forma o quociente entre o número de nervos que exibiam cada uma dessas alterações e o número total de nervos encontrados no corte histológico. Os índices referentes a essas alterações são listados a seguir em continuidade com a lista anterior:

- 4) o aumento de matriz extracelular no endoneuro ocasionado por fibrose,
- 5) o espessamento perineuro dos ramos nervosos por aumento do número de camadas perineurais.
- 6) aumento de celularidade endoneural independente de infiltrado inflamatório circunjacente ou no interior do nervo.

Da mesma forma, outra alteração investigada no corte histológico cutâneo foi o envolvimento das estruturas anexiais (glândulas sudoríparas, folículo piloso e glândula sebácea) pelo infiltrado inflamatório nas lesões. Esse envolvimento é comum de ser encontrado na hanseníase, mas também em outras alterações específicas de anexos. Sabemos que o infiltrado inflamatório próprio da hanseníase está envolvido com a inervação autonômica dos anexos cutâneos como glândulas sudoríparas, folículo piloso e glândula sebácea; esse envolvimento dos anexos é responsável pelas manifestações clínicas autonômicas da doença como a xerodermia localizada, alteração do teste da pilocarpina que detecta a falta de sudorese localizada e a rarefação de pelos nas lesões.

Também foram criados índices com o objetivo de quantificar essas alterações, levando em consideração o quociente entre o número de grupos de anexos envolvidos com infiltrado inflamatório e o número total de grupos de anexos no corte histológico da amostra.

Como já dissemos o patologista diante da suspeita de hanseníase no exame histológico da lesão cutânea, procura com minúcia, evidências da relação de contato do infiltrado inflamatório com o ramo nervoso na amostra de pele biopsiada para tentar detectar evidências de hanseníase na amostra. Essa relação pode assumir variadas formas, pois o infiltrado pode circundar o nervo, pode tocar o perineuro, pode permanecer sem contato com o nervo ou estar a caminho de fazê-lo, pode também invadir o endoneuro do ramo nervoso causando maior destruição do mesmo. Da mesma forma, o envolvimento inflamatório de grupos de anexos na pele pode ser um sinal da doença, embora, seja um sinal de menor especificidade, uma vez que várias outras doenças não relacionadas com a hanseníase também mostram esse envolvimento dos anexos.

As médias desses índices acima listados foram comparadas entre os grupos separados de acordo com o diagnóstico histopatológico das amostras colhidas após o exame clínico dos pacientes. Essas amostras foram diagnosticadas pelos patologistas do serviço em três grupos de diagnóstico a seguir descritos: 1) grupo HANSEN: grupo em que o diagnóstico de hanseníase foi firmado, 2) INC (inconclusivo): grupo onde o diagnóstico histopatológico de hanseníase não pode ser concluído e nem totalmente afastado e 3) grupo OD: grupo onde o diagnóstico foi firmado como sendo outra doença não relacionada com a hanseníase.

3.1.5 -Avaliação da quantidade de fibras nervosas na pele pela técnica de imuno-histoquímica (marcação com anti-PGP 9,5)

Esse procedimento teve o objetivo de realizar a quantificação de fibras imunorreativas para um marcador praticamente universal de axônios com a técnica da imunoperoxidase. Esse marcador é denominado PGP 9,5 (protein gene product 9.5, traduzido como produto do gene da proteína 9.5). Essa proteína é uma hidroxilase da ubiquitina, envolvida em degradação celular (WANG et al, 1990).

A quantificação de fibras nervosas é um método utilizado para o diagnóstico de neuropatia de fibras finas (MELLGREN et al, 2013) cujas manifestações não são perceptíveis pela microscopia óptica e nem pela microscopia de cortes semifinos. As fibras nervosas imunomarcadas foram quantificadas e expressas de forma indexada como o quociente entre a área PGP-específica marcada no interior do endoneuro do ramo nervoso e a área total do endoneuro, (vide figura 8). Quando houve mais de um ramo nervoso na imagem capturada e digitalizada do corte histológico, as áreas de todas as fibras nervosas imunorreativas para o PGP9 dentro dos ramos nervosos foram somadas, assim como a área endoneural de todos os ramos nervosos do corte histológico. Foi assim determinado um quociente entre essas áreas totais das fibras e dos ramos nervoso do corte.

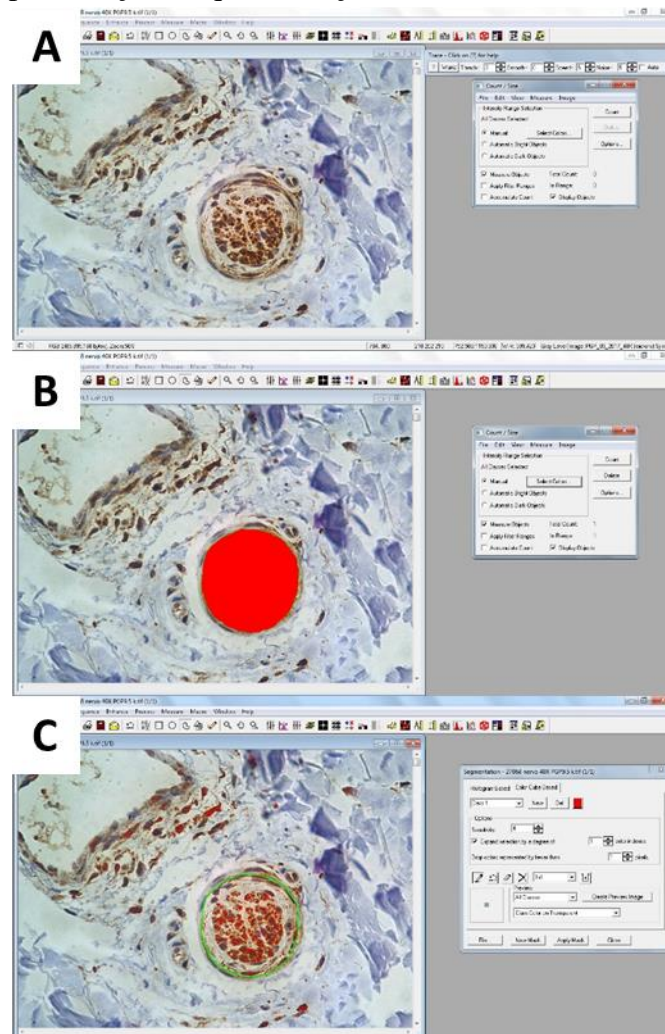
A imunomarcção com a utilização do anticorpo anti-PGP9,5 foi também comparada entre os grupos separados de acordo com o diagnóstico histopatológico das amostras: 1) HANSEN, 2) INC e 3) OD. As fibras imunorreativas para PGP9,5 no interior dos ramos nervosos da derme e em torno das estruturas anexiais como as glândulas sudoríparas, folículo piloso e glândulas sebáceas foram quantificadas comparando-se os índices obtidos em três grupos.

O procedimento de imuno-histoquímica para a marcação do PGP 9,5 foi realizado em cortes histológicos parafinizados de 5 µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados, em banhos de xilol e reidratados em álcoois graduados de 70% a 100%, seguidos de banho em salina tamponada com fosfato (0,01M, pH 7,4). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido de solução de recuperação antigênica (DAKO) aplicada por quinze minutos a 90°C. Ligações não específicas dos anticorpos foram bloqueadas com soro não imune do mesmo animal em que foi fabricado o anticorpo secundário (soro de cabra) por uma hora, à temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados durante a noite, à 4°C com o anticorpo primário policlonal anti-PGP 9.5 (Thermo Scientific, EUA) diluído em PBS 0,01M a 1:200. Após a incubação os cortes foram lavados com PBS 0,01M três vezes por três minutos cada banho, seguido por incubação com o anticorpo secundário biotinilado produzido em cabra estimulada com imunoglobulina de coelho por uma hora e meia à 37°C, lavado três vezes, por três minutos cada banho. Sem deixar que os cortes sequem em nenhuma das etapas, eles foram submetidos à revelação com diaminobenzidina (Sigma), contracorado com hematoxilina de Meyer, desidratados em álcoois seriados, tratados com banho de xilol e montados com meio Entelan (Merck). Secções histológicas controles foram processadas somente com o anticorpo secundário, substituindo o anticorpo primário por

soro normal. Um anticorpo com especificidade distinta do anti-PGP9,5 utilizado foi utilizado em paralelo como controle interno da técnica. As lâminas montadas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse 550i. As imagens histológicas dos cortes foram capturadas pela câmera Infinity capture (Canada), em aumento de 400x. As imagens digitalizadas foram submetidas ao processamento da Imagem descrito a seguir

Para o procedimento de quantificação de fibras imunorreativas para o PGP 9,5 vale lembrar que a decisão de utilizar os índices como instrumentos para quantificar a lesão do nervo na hanseníase teve como principal razão a falta de pareamento das amostras colhidas dos três grupos em relação à região do corpo, faixa etária em década, raça e sexo, condições essas que por si, já causam variação na quantidade de fibras nervosas na pele. Em face desse obstáculo metodológico, a fim de realizar a análise comparativa entre os grupos de lesões provenientes de regiões corporais diferentes, de pacientes com diferentes sexos, idade e raça também diversificadas, assumimos que a elaboração dos índices realizaria uma espécie de ajuste e controle da variabilidade do número de nervos encontrados com lesão e reduziria a necessidade desse pareamento, o que inviabilizaria a análise. As amostras nas quais, não foram encontrados ramos nervosos nos cortes histológicos não foram incluídas na análise, uma vez que o índice obtido pela razão entre número de nervos alterados sobre número total de nervos na amostra adquiriria o valor zero, e este valor seria igual ao valor obtido em amostras com presença de ramos nervosos, mas sem alterações de qualquer tipo, que geraria um valor também igual a zero. Essa possibilidade induziria a erro de quantificação.

Figura 8 – Representação da quantificação das fibras imunorreativas PGP 9.5+



Legenda: **(A)** Imagem do ramo nervoso antes de iniciar a quantificação pelo programa ImagePro. **(B)** Área endoneural total do ramo nervoso selecionada. **(C)** Área das fibras imunorreativas para PGP 9.5 dentro da área endoneural do ramo nervoso. A contagem das fibras marcadas foi feita somente dentro da área delimitada previamente, ou seja, as fibras contadas foram somente fibras localizadas no espaço endoneural. O índice de marcação foi dado pelo quociente da área endoneural marcada na figura C e a área endoneural marcada na figura B.

Fonte: Freire 2017

Para calcular o índice de fibras imunorreativas em torno das estruturas anexiais como as glândulas sudoríparas, folículo piloso e glândulas sebáceas, foram contados os números de cada uma dessas estruturas anexiais no corte histológico; a essa primeira contagem seguiu-se então a contagem do número de cada uma dessas estruturas anexiais que mostravam em torno delas fibras imunorreativas para PGP9,5. O índice foi então calculado pela razão ou quociente entre o número de anexos que mostravam fibras PGP9,5-positivas e o número de estruturas anexiais totais no corte histológico. Esses índices é uma expressão quantitativa do número relativo de estruturas anexiais cutâneas privadas de inervação em face da hanseníase.

3.2 Estudo B

Estudo ultraestrutural dos ramos nervosos cutâneos de pele com aspecto dermatológico normal, porém hipoestésica e comparação com as alterações do tronco nervoso do mesmo paciente na forma neural pura.

Nesse estudo foram executados os seguintes procedimentos:

3.2.1 - Seleção dos pacientes

Os pacientes desse estudo foram todos pacientes portadores da forma neural pura da hanseníase, diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo. Para a confirmação diagnóstica, os pacientes foram submetidos, além de exame clínico neurológico, descrito acima, a testes eletroneuromiográficos, biópsia de nervo, e detecção de DNA de *M leprae* nas amostras do nervo e testes sorológicos para anti-PGL1 (JARDIM et al 2003, ANTUNES et al, 2012)

O Ambulatório Souza Araújo adota como procedimento de rotina diagnóstica, além da coleta da amostra de nervo periférico, a coleta de amostra de pele com aspecto dermatológico normal, mostrando alterações de sensibilidade térmica, tátil, ou dolorosa, detectadas respectivamente com objetos de metal aquecidos ou resfriados, como monofilamento de Semmes-Weinstein, e com objetos pontiagudos para testar a dor. A mencionada amostra de pele colhida foi oriunda da região inervada pelo mesmo nervo biopsiado do paciente. Dessa forma, foi possível comparar as alterações ultraestruturais encontradas na pele com as alterações histopatológicas achadas no nervo.

Foram selecionadas onze amostras colhidas de pele na região inervada pelo nervo cutâneo dorsal na região dorsomedial do quinto metacarpo.

Seguindo essa orientação, um pequeno fragmento da amostra de pele foi colhido juntamente com o ato da biópsia de nervo cutâneo dorsal por incisão com bisturi circular (“punch”). Esse fragmento foi separado para ser fixado em glutaraldeído overnight a 4° C, seguido de lavagem com tampão cacodilato 0,01M, pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%, lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,01M, desidratado em acetona seriada até 100%, impregnado e incluído em resina EPON e cortado em ultramicrótomo, colocado o corte em

grade de cobre, contrastado com acetato de uranila e com citrato de chumbo, finalizando com a observação ultraestrutural em microscópio eletrônico de transmissão JEOL (JEM-1011) das áreas que continham ramos nervosos dérmicos.

As alterações ultraestruturais dos ramos nervosos dérmicos foram anotadas como presença (SIM) ou ausência (NÃO) e lançadas em uma planilha de dados elaborada para essa finalidade. As alterações investigadas foram as seguintes: a presença de fibras nervosas desmielinizadas, a presença de células de Schwann desnervadas, a presença de bolsas de colágeno nas células de Schwann, o aumento da ocupação do espaço endoneural por fibras colágenas mostrando a perda de fibras nervosas e a reposição do seu espaço deixado vazio por matriz extracelular. Também foram observadas a presença e a natureza do infiltrado inflamatório em torno ou no interior do ramo nervoso, assim como a relação do infiltrado com os componentes do nervo.

3.3 Estudo C

Quantificação de fibras amielínicas em amostras de nervo periférico provenientes de pacientes com a forma neural pura da hanseníase.

Foi realizada a quantificação de perfis de fibras amielínicas constituídas por uma célula de Schwann que envolve vários axônios individualmente. Esses perfis desse tipo de fibras nervosas não mielinizadas somente são visualizados no exame ultraestrutural do nervo pela microscopia eletrônica de transmissão. Na microscopia ótica elas não são distinguíveis e aparecem coradas como estruturas de fundo rosa, se a coloração for a hematoxilina-eosina, misturada com a matriz extracelular; ou aparecem ainda, coradas em verde se a coloração for a tricromática de Gomori. Fica impossível distingui-las das estruturas matriciais próprias do ambiente endoneural. Os núcleos das células de Schwann aparecem corados, mas da mesma forma, é difícil distingui-los de outras células habitantes do endoneuro como é o caso de macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Até mesmo as fibras mielinizadas de pequeno calibre são difíceis de serem visualizadas no processamento de rotina, onde o material é processado para blocos de parafina.

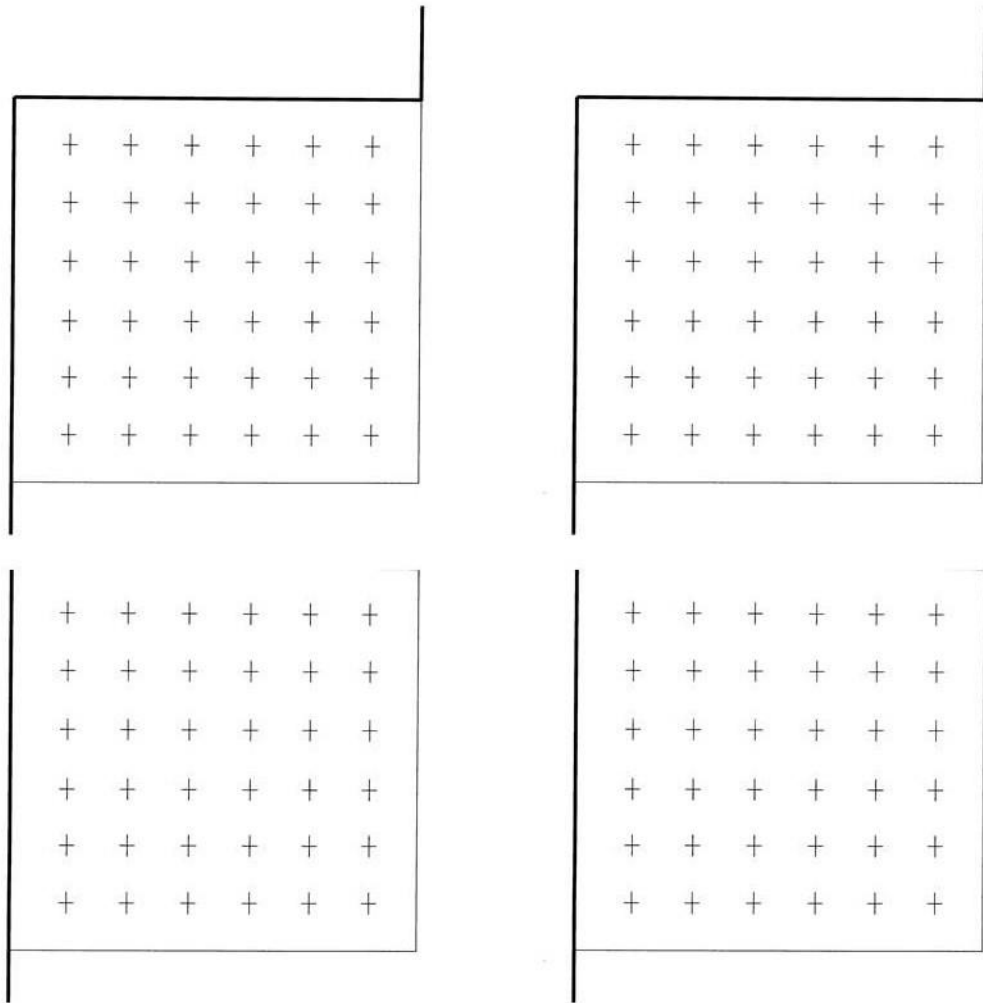
O termo “perfil de fibras amielínicas” é utilizado em face de que a estrutura correspondente visualizada não é tridimensional, sendo vista como uma área bidimensional de

um corte transversal das fibras amielínicas, gerando uma imagem constituída pela célula de Schwann com seus processos citoplasmáticos englobando diversos axônios. O axônio não mielinizado pode abrigar-se em reentrâncias na superfície da célula de Schwann que o alberga. A área de ocupação da imagem pelo perfil acima descrito é que foi quantificada com o método morfométrico que utiliza matriz padronizada descrita mais adiante.

As secções ultrafinas examinadas com a microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas nos blocos incluídos em resina epon polimerizada na estufa a 60° C por 72 horas. Esses blocos pertencem ao arquivo do serviço de Patologia do Laboratório de Hanseníase e foram confeccionados por ocasião do processamento do material colhido por biópsia de nervo para o diagnóstico de pacientes com a forma neural pura da hanseníase que procuram o Ambulatório Souza Araújo, funcionando de forma integrada com o Laboratório.

A quantificação foi realizada pelo uso de uma matriz emoldurada com total de 144 pontos, cuja imagem impressa em meio acetato transparente foi superposta sobre a imagem digitalizada projetada na tela de um monitor de computador. Os pontos que estiverem sobrepostos sobre os perfis das fibras amielínicas foram contados e ao final cada imagem gerou uma quantidade de pontos proporcional à área ocupada pelos perfis das fibras (LACERDA, 2003). As imagens digitalizadas possuíam sempre a mesma área. Vide figura 9.

Figura 9- Matriz emoldurada utilizada para quantificação das fibras amielínicas



Legenda: Sistema de teste com 36 pontos.
Fonte: Freire, 2017.

4 -ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação das alterações dos ramos nervosos cutâneos entre os grupos HANSEN, INC e OD foram feitas várias análises estatísticas dependendo do tipo de variável analisada: para as variáveis contínuas, como os índices de lesão do nervo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que as amostras não apresentavam distribuição paramétrica seguido dos testes secundários de Tukey e Bonferroni.

A comparação da taxa de ocupação dos cortes ultrafinos dos nervos com hanseníase e o grupo com outras doenças, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para variáveis com distribuição não paramétrica.

Já em relação às variáveis categóricas, como foi o caso da presença de infiltrado em grupos de ácinos sudoríparos, glândulas sebáceas ou folículos pilosos foi utilizado o teste do qui-quadrado de Spearman (χ^2 de *Spearman*). O programa de análise estatística empregado foi GraphPad Prism 7 e Epi Info 7.

Foram considerados significativos os valores de p abaixo de 0,05.

5 -RESULTADOS

Os resultados do presente estudo serão mostrados de acordo com as três frentes de investigação em que esse trabalho foi dividido. Assim teremos primeiramente os resultados do Estudo A (alterações histológicas dos ramos nervosos cutâneos nas amostras de pele suspeitas de hanseníase); Estudo B (alterações ultraestruturais dos ramos nervosos cutâneos comparadas com as alterações dos troncos nervosos cutâneos) e Estudo C (quantificação das fibras amielínicas na neuropatia hanseniana).

5.1 Estudo A

Os índices de mensuração das alterações morfológicas dos ramos nervosos cutâneos que se revelaram significativamente diferentes entre os grupos Hansen, INC e OD foram: a hiperplasia perineural, onde o grupo HANSEN apresentou o maior índice (0,31) em relação ao grupo OD (0) valor de $p < 0,01$. O índice de infiltrado endoneural também foi maior no grupo HANSEN (0,52), havendo diferença significativa em relação ao grupo INC (0), valor de $p < 0,002$. O índice de infiltrado perineural, foi significativamente maior no grupo HANSEN (0,67), $p < 0,001$.

A média do aumento de celularidade endoneural e infiltrado sem contato com o nervo foram maiores no grupo HANSEN, entretanto não houve diferença significativa entre os grupos três grupos. O aumento de matriz extracelular foi maior no grupo OD Vide Tabela 2

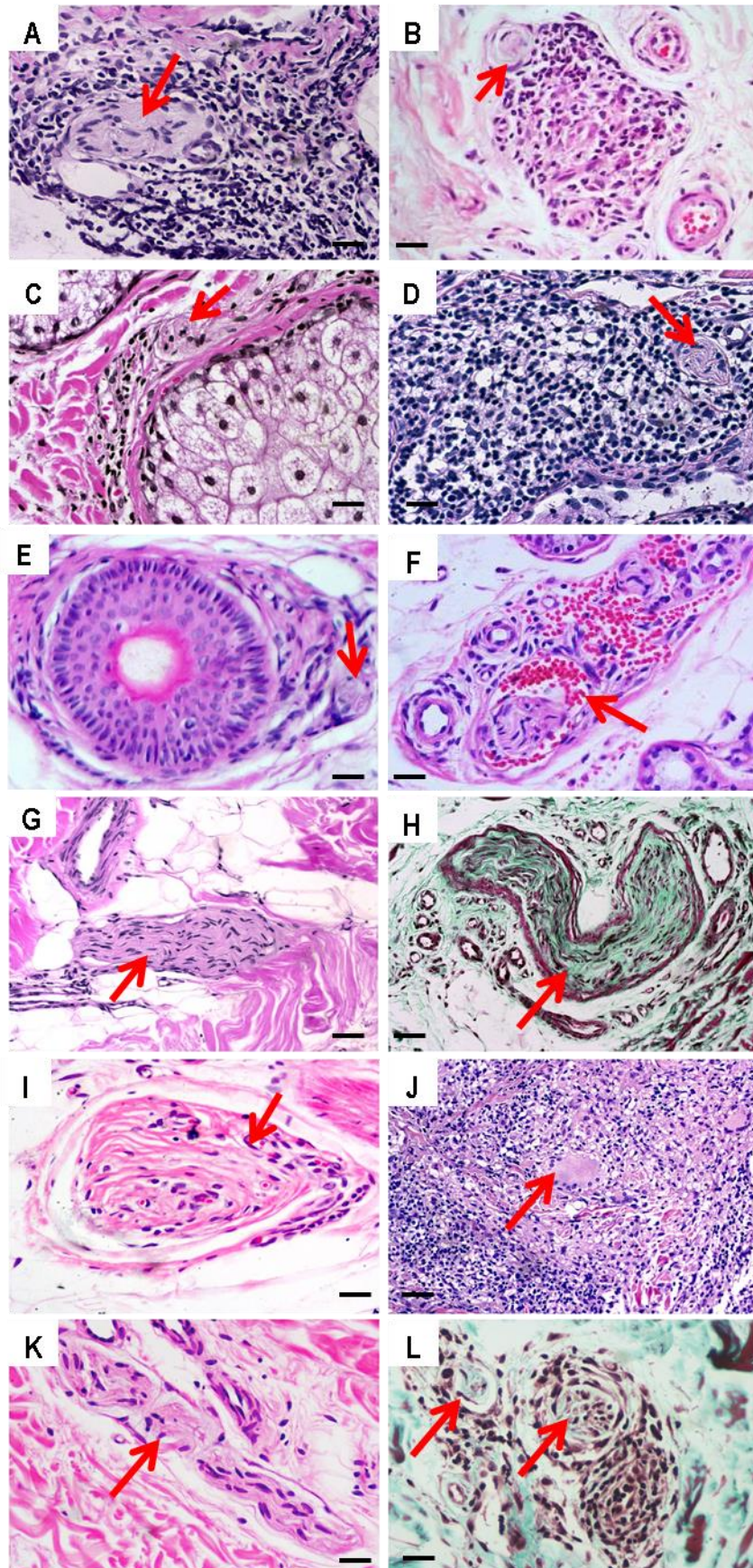
Tabela 2 - Alterações morfológicas dos ramos nervosos cutâneos entre os grupos Hanseníase (HANSEN), Inconclusivo (INC) e Outras doenças (OD)

	HANSEN	INC	OD	Diferença entre grupos Valor de p	
	N=13	N= 11	N= 11		
	Média ± desvio padrão Mediana (valor mínimo, valor máximo)				
Índice hiperplasia perineuro	0,31 ± 0,44 0 (0 - 1)	0.05 ± 0,15 0 (0 - 0,5)	0 0 (0 - 0)	H x OD	< 0,019
Índice infiltrado endoneural	0,52 ± 0,44 0,5 (0 - 1)	0 0 (0 - 0)	0,19 ± 0,35 0 (0 - 1)	H x INC	< 0,002
Índice infiltrado perineural	0,67 ± 0,40 1 (0 - 1)	0,04 ± 0,15 0 (0 - 0,5)	0,32 ± 0,42 0 (0 - 1)	H x INC	< 0,001
Índice infiltrado sem contato com o nervo	0,52 ± 0,43 0,5 (0 - 1)	0,25 ± 0,24 0,33 (0 -0,5)	0,42 ± 0,45 0,25 (0 - 1)	NS	<0,238
Índice aumento matriz	0,03 ± 0,13 0 (0 - 0,5)	0 0 (0 - 0)	0,10 ± 0,14 0 (0 - 3)	NS	<0,123
Índice aumento de celularidade endoneural	0,51± 0,4 0,66 (0 - 1)	0,32 ± 0,31 0,33 (0 - 1)	0,34 ± 0,39 0,33 (0 - 1)	NS	<0,552

*Teste estatístico de Bonferroni.

Fonte: FREIRE, 2017.

Figura 10 - Alterações histológicas dos ramos nervosos nos grupos HANSEN, INC e OD



Legenda da figura 10: (A-D): Grupo hanseníase (HANSEN). (A) - Ramo nervoso com infiltrado inflamatório ao redor permeando o perineuro. (B) - Ramo nervoso com duplicação da camada de células perineurais, mostrando em área adjacente em contato com o perineuro granuloma epitelióide bem delimitado, com células inflamatórias começando a invadir o espaço perineural. (C) - Ramo nervoso próximo à glândula sebácea com discreto infiltrado inflamatório ao redor. (D) - Ramo nervoso com infiltrado linfocítico ao redor.

(E-H): Grupo inconclusivo (INC). (E) - Ramo nervoso ao lado de bainha do pelo. (F) Extravasamento de hemácias com presença das mesmas no espaço sub-perineural (seta), acarretando em edema ao ramo nervoso. (G) - Ramo nervoso com aumento de celularidade. (H) Ramo nervoso com discreto aumento de matriz extracelular próximo a vasos.

(I-L): Grupo outras doenças (OD). (I) - Ramo nervoso com discreto espessamento de perineuro. (J) Granuloma epitelióide sem nervo no interior só com células gigantes (caso de sarcoidose). (K) - Ramo nervoso normal. (L) - Ramo nervoso com espessamento de perineuro e infiltrado inflamatório em torno de um vaso ao redor. (A-E, G, I-K): coloração hematoxilina-eosina; (F, H, L): coloração tricromática de Gomori. Barras (A-L): 20 μ m. Fonte: FREIRE, 2017.

A tabela 3 apresenta os anexos estudados entre os grupos. Os anexos estudados foram: glândula sudorípara, folículo piloso e glândula sebácea, sendo avaliados pela presença ou ausência de infiltrado inflamatório relacionando-se espacialmente com essas estruturas anexiais. O grupo HANSEN apresentou a maior frequência de infiltrado inflamatório envolvendo ácinos das glândulas sudoríparas, (9, 64,2%). Entretanto o grupo INC apresentou somente um caso com essa alteração, enquanto que o grupo OD não apresentou caso algum. O valor de p foi $< 0,008$.

A presença de infiltrado no folículo piloso também foi maior no grupo HANSEN (40%) do que nos outros grupos. Valor de $p < 0,01$.

O infiltrado na glândula sebácea foi encontrado apenas no grupo HANSEN, sendo a frequência de 11,1%, entretanto, não houve diferença significativa.

Tabela 3 – Alterações morfológicas em anexos entre os grupos Hanseníase (Hansen), Inconclusivo (INC) e Outras doenças (OD) (análise com HE)

Nome do índice	HANSEN N=13	INC N=11	OD N=11	Valor de p
Inf. gls sudoríparas	9(64,2%)	1(9,0%)	0	0,01*
Inf.folículo piloso	4 (40,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,02*
Inf.glândula sebácea	1 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0,60

Legenda (*) = Estatisticamente significativo. Teste estatístico X^2 de spearman, com correção de Montecarlo.
Fonte: FREIRE, 2017.

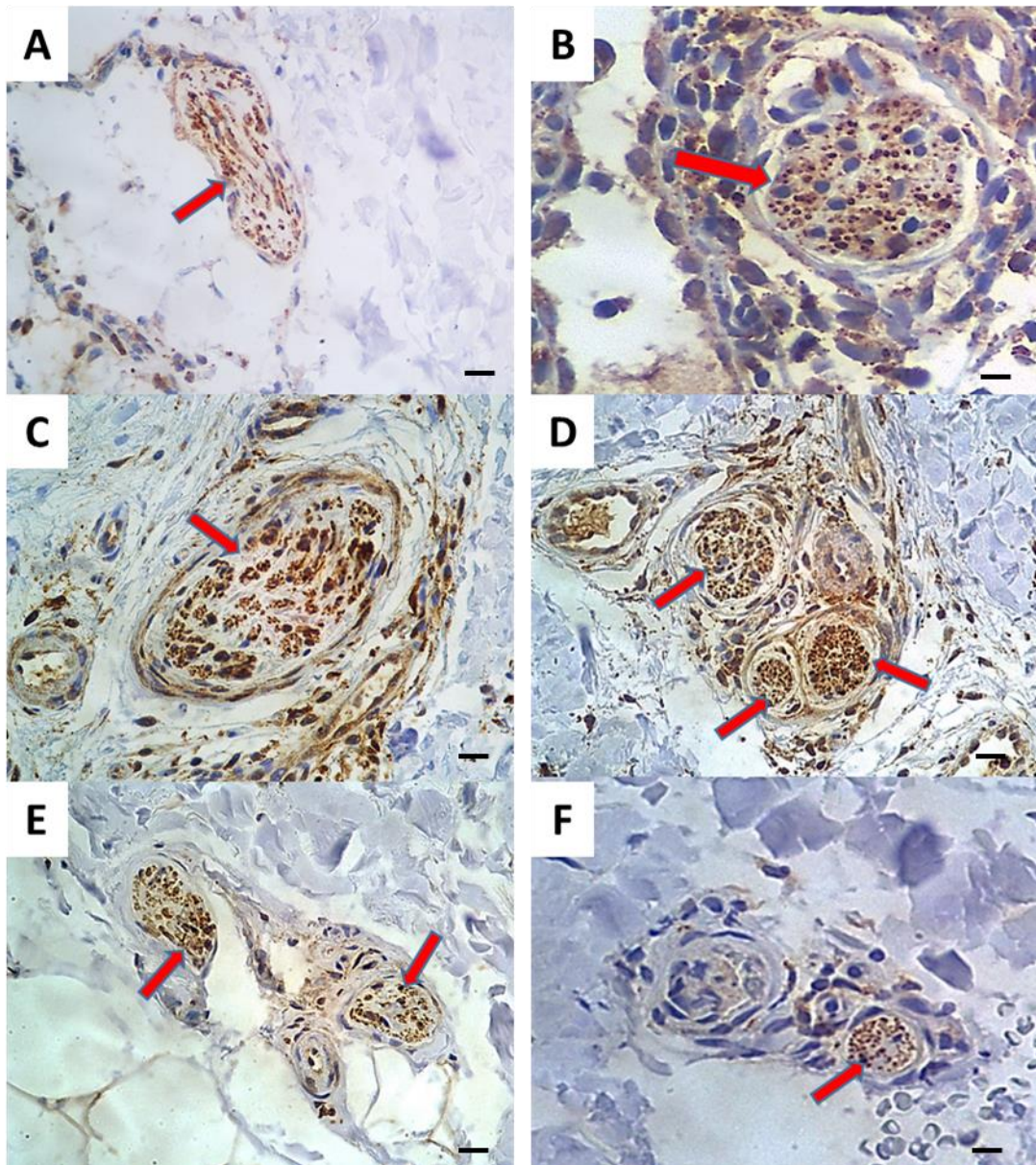
Em relação à marcação pelo anti-PGP 9.5 por imunoperoxidase, realizada com a finalidade de avaliar quantitativamente o status da inervação cutânea nas lesões suspeitas de hanseníase, o grupo HANSEN obteve a menor média de fibras positivas pelo marcador dentro do espaço endoneural dos ramos nervosos (0,02). Essa média foi bem menor em relação ao grupo INC (0,13) e ao grupo OD (0,11) com valor de $p < 0,002$. Não houve, entretanto, diferença significativa entre os grupos INC e OD. Vide tabela 4.

Tabela 4 - Quantificação da área relativa ocupada pelas fibras marcadas para PGP9,5 no endoneuro dos ramos nervosos cutâneos

HANSEN = 6	INC = 10	OD = 10	Valor de p
0,02 ± 0,008	0,13 ± 0,067	0,11 ± 0,058	0,002

Teste estatístico de Kruskal-Wallis.
Fonte: FREIRE, 2017.

Figura 11 – Fibras imunorreativas PGP 9.5+ nas lesões cutâneas dos grupos HANSEN, INC e OD



Legenda da figura 11 – Fibras imunorreativas para PGP9.5 nas lesões cutâneas dos grupos estudados. (A-F) Ramos nervoso (setas) com fibras marcadas pelo anticorpo PGP 9.5. (A-B) Grupo HANSEN; (C-D) Grupo INC; (E-F) Grupo OD. O grupo Hansen mostrou menor índice de marcação relativa à área do ramo nervoso delimitada comparada aos outros dois grupos. Barras (A-F): 10µm.
Fonte: FREIRE, 2017.

Em relação à marcação das fibras nas glândulas sudoríparas o grupo HANSEN também obteve a menor média de áreas imunorreativas para PGP9.5 em torno dos ácinos sudoríparas. Nos testes estatísticos complementares verificou-se que a diferença

estatisticamente significativa foi somente entre o grupo HANSEN e o grupo OD. Vide tabela 5.

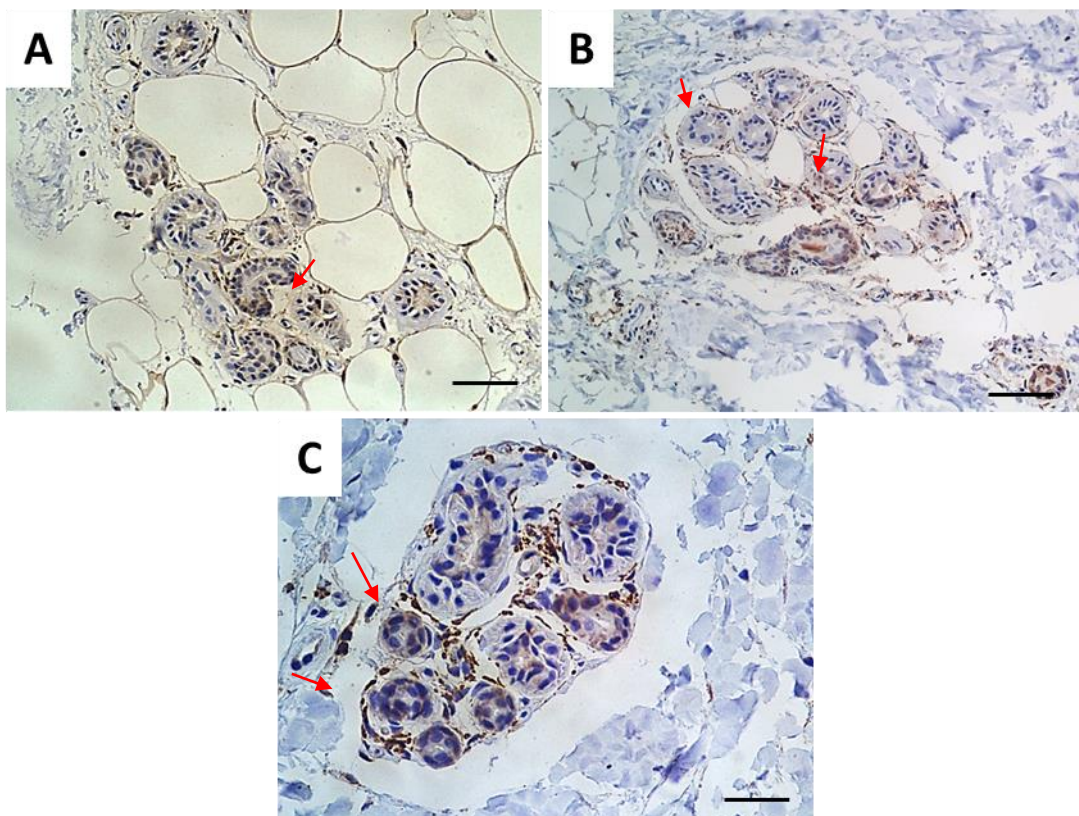
Tabela 5 - Avaliação do índice obtido pelo quociente entre o número de ácinos sudoríparos circundados por fibras imunorreativas para PGP9.5 e o número total de ácinos no corte histológico

HANSEN = 4	INC = 9	OD = 9	Valor de p
$0,6 \pm 0,21$	$0,7 \pm 0,17$	$0,8 \pm 0,15$	$p < 0,04$

Teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Fonte: FREIRE, 2017.

Figura 12 – Fibras imunorreativas PGP 9.5+ em glândulas sudoríparas nas lesões cutâneas dos grupos HANSEN, INC e OD



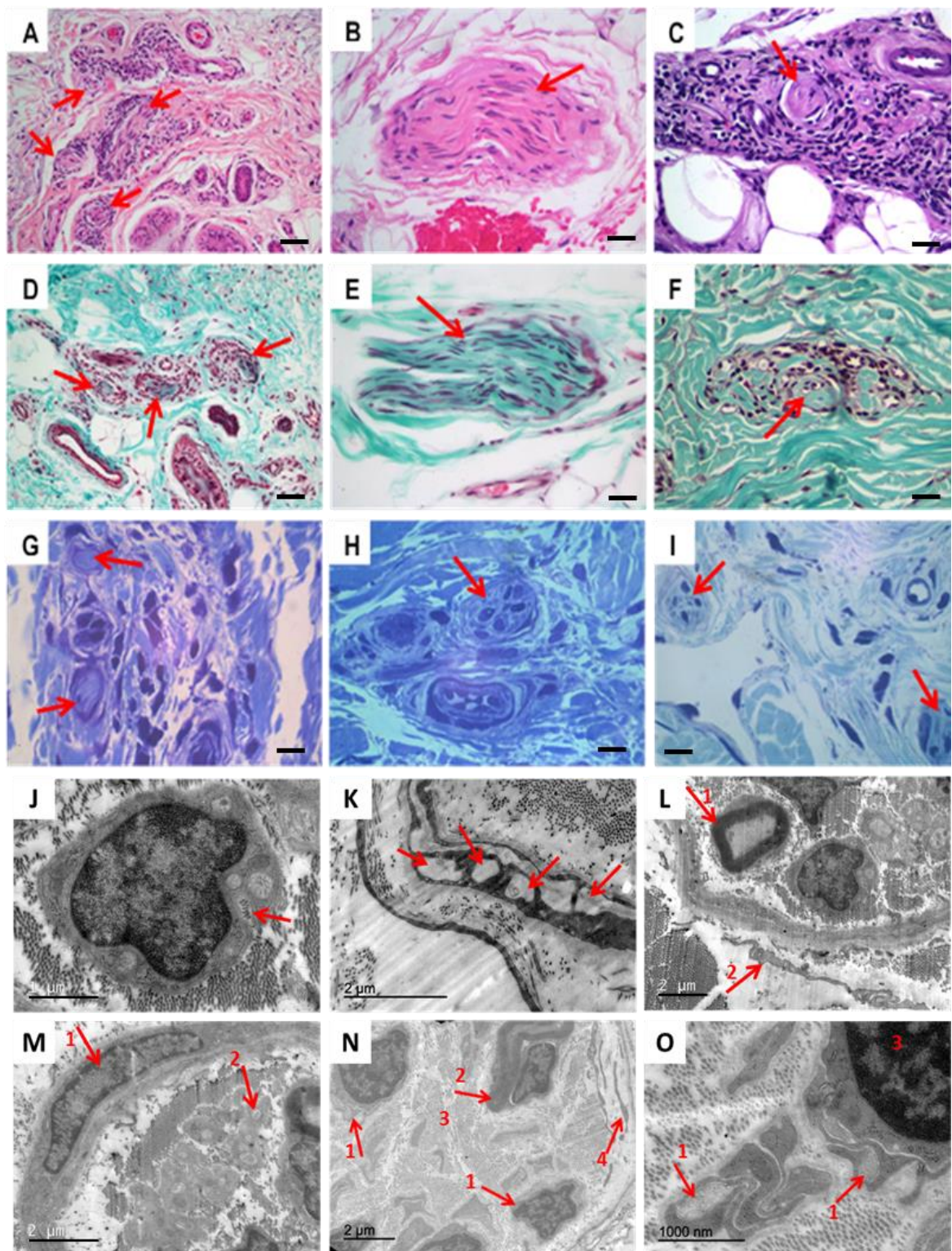
Legenda da figura 12: O grupo Hansen (A) mostrou menor número de ácinos com fibras nervosas marcadas pelo anticorpo anti-PGP em relação ao grupo INC (B) e ao grupo OD (C). Barras (A-C): 50µm.

Fonte: FREIRE, 2017.

5.2 Estudo B

Os parâmetros morfológicos observados no exame ultraestrutural e histológico convencional (HE e TG) dos ramos nervosos cutâneos examinados na pele aparentemente de aspecto normal, porém hipoestésica, provenientes de pacientes com a forma neural pura da hanseníase foram comparadas com os mesmos parâmetros observados no exame histológico convencional do tronco nervoso biopsiado. Vale lembrar que as peles com aspecto normal foram colhidas de região inervada pelo nervo biopsiado, que foi em todos os casos do presente estudo, o nervo cutâneo dorsal, ramo do nervo ulnar. A amostra de pele foi colhida com bisturi circular (“punch”) na região medial em relação à borda da ferida cirúrgica realizada para a biópsia de nervo. A incisão para a coleta da biópsia de nervo foi a região dorsomedial da mão.

Figura 13 - Caracterização histológica dos ramos nervosos de pacientes classificados como Neural Pura



Legenda da figura 13: (A) Infiltrado inflamatório em torno dos ramos nervosos e invasão do mesmo, no espaço endoneural. (B) Ramo nervoso com discreto aumento de celularidade. (C) – Ramo nervoso em processo de fibrose (hialinização) e infiltrado inflamatório em torno do mesmo. (D) Ramos nervosos com células inflamatórias em torno, e invadindo o espaço endoneural. (E) – Ramo nervoso com aumento de celularidade. (F) – Ramo nervoso com processo de fibrose (hialinização) (mesmo caso); (C) notar presença de células inflamatórias vacuolizadas no endoneuro. (G) – Corte semifino onde observamos ramos nervosos com diminuição de celularidade (fibrose). (H) - Ramo nervoso com aspecto normal. (I) - Ramo nervoso com aspecto normal. (J) Célula de Schwann desnervada com bolsa de colágeno (seta). Notar colágeno fibrilar ao redor da célula de Schwann. (K) Perineuro apresentando estruturas vacuolares diferenciadas (vacúolos de pinocitose dilatados). (L) Ramo nervoso mostrando perineuro, fibra mielinizada (seta nº 1) e fibroblasto epineural se justapondo ao perineuro (seta nº 2). (M) Célula perineural única (seta 1) e bolsa de colágeno (seta 2). (N) Células de Schwann com poucos axônios (setas 1), fibra nervosa mielinizada (seta 2), aumento de colágeno por todo o espaço endoneural (nº 3) e fibroblastos endoneurais (seta 4). (O) Presença de axônios (setas 1) e núcleo da célula de Schwann (nº3). (A-C): Coloração Hematoxilina-eosina; (D-F): Coloração Tricromática de Gomori. (G-I): Coloração azul de toluidina; (J-O): Microscopia eletrônica de transmissão. Barras: (A-I): 20 µm, (J, O): 1 µm, (K-M): 2 µm. Fonte: FREIRE, 2017.

Comparação das alterações morfológicas encontradas nos ramos cutâneos e tronco nervoso por microscopia de luz e microscopia eletrônica.

Na tabela 6, podem ser vistas as alterações encontradas na análise. Os casos foram separados individualmente apresentando as alterações morfológicas presentes em cada caso analisadas por microscopia ótica, usando as colorações HE e TG e por microscopia eletrônica de transmissão. Com essa tabela podem ser vistas as alterações encontradas em dois segmentos distintos do nervo periférico, ou seja, no ramo nervoso na pele e no tronco nervoso que inervava essa região de onde a pele do mesmo paciente foi colhida). Os ramos nervosos sensitivos da pele portanto, são ramos da extensão do segmento de tronco nervoso sensitivo biopsiado (nervo cutâneo dorsal ramo sensitivo do nervo ulna

Tabela 6 – Comparação por caso das alterações encontradas nos ramos nervosos cutâneos e no tronco nervoso em cada caso selecionado utilizando as técnicas convencionais histológicas (H-E e TG) e a ultraestrutura

Casos	Infiltrado endoneural			Infiltrado perineural			Espessamento perineural			Aumento de matriz			Aumento de celularidade		
	HE Pele	HE Tronco	UE Pele	HE Pele	HE Tronco	UE Pele	TG Pele	TG Tronco	UE Pele	TG Pele	TG Tronco	UE Pele	TG Pele	TG Tronco	UE Pele
1	N	S	N	S	N	N	S	S	N	S	S	S	S	N	*
2	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N	S	S	N	*
3	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	S	S	N	*
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	*
5	N	S	N	N	S	N	S	S	N	N	N	S	S	N	*
6	N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	S	S	*
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	*
8	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	*
9	N	N	S	N	N	N	N	S	N	N	S	N	S	N	*
10	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	S	N	N	N	*
11	S	S	N	S	S	N	S	N	S	S	S	S	S	S	*

Legenda: S = SIM (presença), N = NÃO (ausência), * = Não foi avaliado, HE: coloração histológica pela hematoxilina-eosina; TG: coloração histológica tricromática de Gomori; UE: ultra estrutura. Fonte: FREIRE, 2017

A análise ultraestrutural dos ramos nervosos mostrou algumas alterações já observadas pela coloração de hematoxilina-eosina e tricromática de Gomori pela microscopia ótica, sendo encontrada concordância de achados nas variáveis infiltrado endoneural, que foi encontrado pela ultraestrutura da pele em 18,1% dos casos enquanto no tronco nervoso em 36,3% e na microscopia ótica da pele na ultraestrutura da pele em 9%; em relação ao aumento de matriz extracelular endoneural na ultraestrutura 54,5%, no tronco em 18,1% e na microscopia ótica da pele em 27,2%; em relação ao espessamento perineural, foi encontrado em 18,1% na ultraestrutura, em 55,5% na microscopia ótica do tronco nervoso e em 27,2% na microscopia ótica da pele.

Houve concordância entre os achados do nervo e da pele em relação ao infiltrado endoneural em 1 caso (9%); no espessamento perineural em 2 (18,1%); aumento da matriz extracelular endoneural em 2 (18,1%) e no aumento de celularidade em 2 casos (18,1%).

Tabela 7- Comparação das alterações encontradas nos ramos nervosos cutâneos e no tronco nervoso

	Infiltrado endoneural	Infiltrado perineural	Aumento de matriz	Espessamento perineural
Nervos cutâneos H-E e TG	1 (9,09%)	4 (36,3%)	3 (27,2%)	3 (27,2%)
Tronco H-E e TG	4 (36,3%)	3 (27,2%)	4 (36,3%)	6 (54,5%)
Nervos cutâneos UE	2 (18,1%)	0	6 (54,55%)	2 (18,1%)

Legenda: H-E = Hematoxilina-eosina; T-G = Tricrômica de Gomori; UE = Ultraestrutural. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Fonte: FREIRE, 2017.

As alterações detectadas somente pelo exame ultraestrutural dos ramos nervosos cutâneos da forma neural pura foram observadas, descritas e mostradas na tabela 8. As alterações são representadas pela presença de células de Schwann desnervadas e a presença de bolsas de colágeno na superfície das células de Schwann. As bolsas de colágeno são formadas por reentrâncias em forma de sacos na superfície das células de Schwann, onde se alojam normalmente os axônios não mielinizados; em vez de axônios as bolsas contêm fibras colágenas que preenchem o lugar vazio deixado pelos axônios que sofreram processo degenerativo. A célula de Schwann desnervada também indica a degeneração de axônios não mielinizados. Em um total de 11 casos, 7 (63,64%) apresentaram células de Schwann desnervadas e 5 (54,55%) apresentaram bolsa(s) de colágeno, achado este que indica degeneração de axônios não mielinizados. Essas alterações somente podem ser detectadas na microscopia eletrônica de transmissão, uma vez que as fibras amielínicas não são vistas em microscopia ótica.

Tabela 8 - Alterações ultraestruturais dos ramos nervosos cutâneos

Célula de Schwann desnervada	Bolsa de colágeno
7 (63,64%)	5 (54,55%)

Teste estatístico de Mann-Whitney.
Fonte: FREIRE, 2017

5.3 Estudo C

A quantificação de área ocupada por perfis transversais de fibras amielínicas em cortes ultrafinos de troncos nervosos acometidos por neuropatia da hanseníase (grupo neural pura), comparada com um grupo controle constituído por amostras de nervo acometidas por outras doenças não relacionadas com a hanseníase revelou os seguintes achados: a área ocupada pelas fibras amielínicas no grupo de amostras com neuropatia hanseniana mostrou que não houve diferença significativa em relação à mesma variável analisada em nervos acometidos por neuropatia de outra etiologia diversa da hanseníase. Vide Tabela 9

As fibras não mielinizadas, também chamadas de amielínicas ficam localizadas entre as fibras mielinizadas de grande e de pequeno calibre e estão normalmente presentes em maior quantidade nos nervos, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos na quantificação de fibras amielínicas. (figura 14; A-B). O grupo neural pura demonstra um intenso processo de fibrose no tronco nervoso, com redução parcial ou total da presença de fibras mielinizadas e amielínicas (figura 14; C-D). Outras alterações dessas fibras também foram descritas, presença de bacilos no interior de células de Schwann, aumento do número de mitocôndrias nessas células, interação de contato entre linfócitos, fibroblastos, etc.

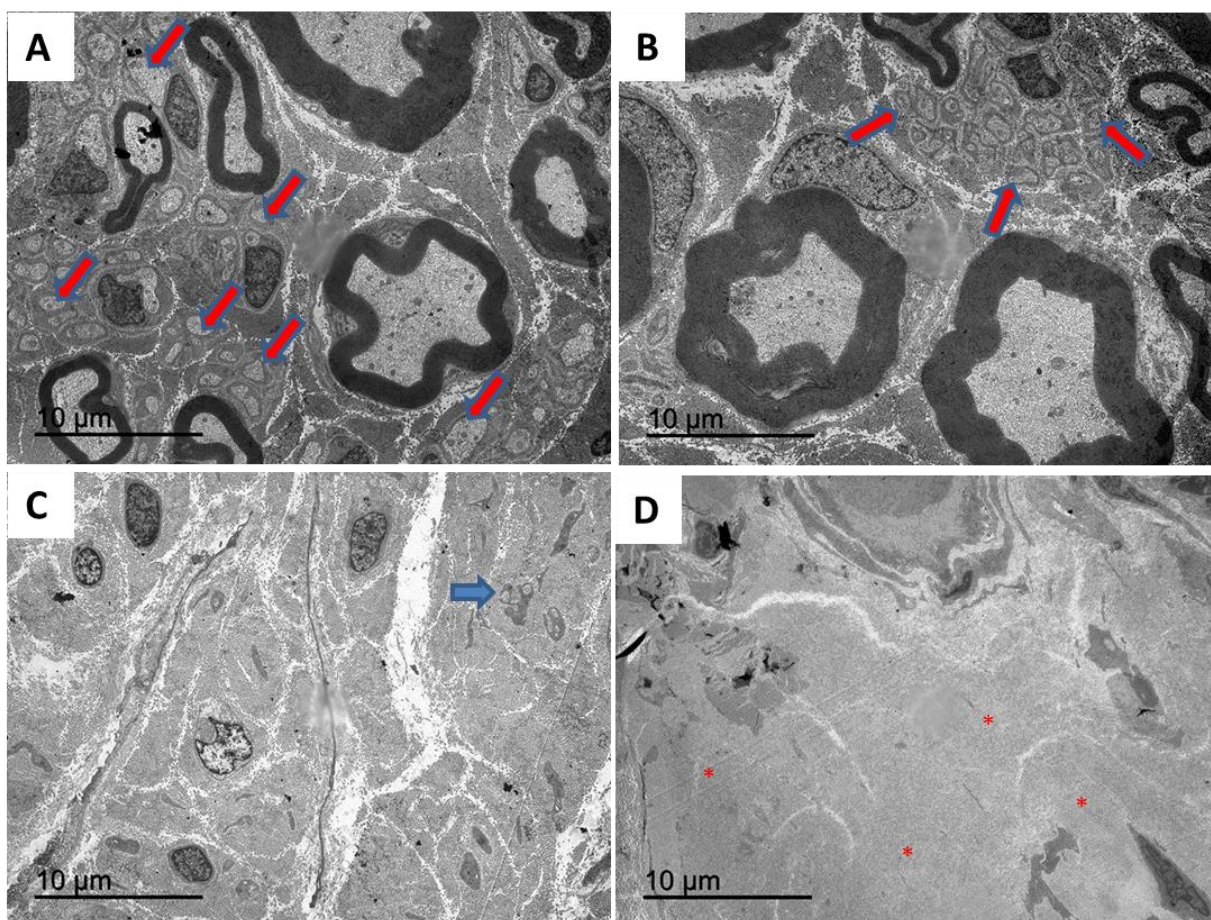
Tabela 9 - Quantificação das fibras amielínicas no grupo controle e neural pura

Grupo Controle = 8	Grupo Neural Pura = 15	Valor de p
11,9 ± 7,29	11,0 ± 7,58	<0,87

Teste de Mann-Whitney.

Fonte: FREIRE, 2017.

Figura 14 - Comparação de nervo com hanseníase com nervo controle



Legenda da figura 14: Imagens do nervo (tronco) grupo controle (A-B) mostrando perfil de seção transversal de fibras amielínicas (setas) entre as fibras mielinizadas de grande calibre. As imagens (C-D) pertencem ao grupo de amostras de nervo com a forma neural pura. Notar a grande perda de fibras mielinizadas nas duas imagens representativas do grupo com neuropatia hanseniana (C e D), substituídas por feixes de fibras colágenas; essas fibras ocupam a maior parte do campo nas imagens. Observam-se ainda, algumas células inflamatórias mononucleares residuais, um fibroblasto com seu corpo muito alongado e fino (C). Esses nervos estão acometidos por intenso processo de fibrose da região endoneural (asteriscos) e presença de bolsa de colágeno. (seta; C). Visão parcial de um vaso capilar na borda superior da figura D.

6 - DISCUSSÃO

A discussão também será conduzida seguindo a divisão do trabalho em três partes, já que operacionalmente essas abordagens são distintas entre si, mantendo, contudo uma unidade em torno do tema da lesão do nervo periférico na neuropatia da hanseníase com implicações para o diagnóstico e para o aprofundamento da compreensão dos mecanismos patogênicos da agressão ao nervo periférico na doença.

6.1 - Estudo A

A constatação de que a análise morfológica das amostras suspeitas de hanseníase paucibacilar deixa dúvidas para a decisão diagnóstica decorre da longa experiência do Laboratório de Hanseníase e de outros centros de estudo dedicados à assistência aos pacientes portadores da doença, uma vez que o tipo das lesões cutâneas são semelhantes às lesões de outras doenças. Além disso, a ausência do bacilo no exame histopatológico deixa o clínico sem poder fechar um diagnóstico de certeza. Particularmente, o foco dessa análise se concentra sobre a relação do nervo periférico com o infiltrado inflamatório e sobre as alterações encontradas nos ramos nervosos sem a presença do infiltrado inflamatório característico da doença. Diante dessa vivência no Laboratório, ficou patente a necessidade de tentar aperfeiçoar a análise morfológica dos ramos nervosos da biópsia de pele realizada em pacientes com suspeita de hanseníase paucibacilar, esse diagnóstico deve ser comparado com as doenças que podem gerar lesões clinicamente semelhantes gerando a necessidade do estabelecimento de critérios diferenciais. Essa análise da simples relação do nervo com o infiltrado inflamatório e das alterações intrínsecas e isoladas desses ramos assume, portanto, um papel crítico para o diagnóstico.

Na prática diagnóstica do exame histopatológico de amostras de pele e de nervo colhidas por biópsia, ocorrem muitas dúvidas na interpretação da imagem morfológica, que mostra o comprometimento do ramo nervoso cutâneo e a sua interação com o infiltrado inflamatório presente nas suas adjacências, invadindo ou não o compartimento nervoso dérmico. Da mesma forma, as alterações do nervo isoladas observadas sem a presença do infiltrado inflamatório nas adjacências do ramo nervoso, tais como o aumento de celularidade endoneural dos ramos nervosos, o espessamento do perineuro ou ainda, o aumento de matriz extracelular endoneural ou hialinização do endoneuro podem ser valorizados, uma vez que podem representar indícios de que os nervos possam ter sido alvo de agressões por um infiltrado não mais presente no momento da biópsia ou presente em um segmento proximal do nervo periférico não alcançado pela coleta da amostra utilizada no procedimento diagnóstico. O responsável pelo diagnóstico pode muitas vezes permanecer em dúvida sobre a valorização desses achados.

Esse estudo tentou fazer, portanto, uma análise sistemática dessas alterações, frequentemente encontradas no diagnóstico histopatológico da hanseníase, comparando a frequência e o grau de intensidade das mesmas expressos por índices numéricos entre os grupos HANSEN, INC e OD.

A intenção do estudo foi sistematizar a análise do comprometimento nervoso nas amostras cutâneas, de forma a chegar com mais segurança ao diagnóstico de hanseníase paucibacilar. Em muitas situações de diagnóstico, o patologista fica em dúvida se o ramo nervoso está sendo realmente atingido pelo infiltrado inflamatório ou se a proximidade do infiltrado não é apenas ocasional. Com a determinação dos índices de lesão de nervo nos casos suspeitos de hanseníase, foi possível dimensionar com maior precisão o valor de cada alteração encontrada. Esse estudo tem valor para os que utilizam a técnica da análise histológica no diagnóstico da hanseníase, entretanto, ele não prescinde da eficiente interação entre o clínico e a equipe diagnóstica de patologistas, uma vez que o diagnóstico de certeza da doença não pode ser emitido quando a presença de BAAR não é detectada, sendo que a integração dos dados clínicos e morfológicos obtidos na biópsia adquire a maior relevância para aumentar a eficiência diagnóstica.

Conforme descrito na seção de material e métodos, os grupos de amostras analisados em relação aos índices de lesão do nervo foram três: 1) grupo Hansen; 2) grupo INC e 3) grupo OD. Essa separação das amostras colhidas nesses três grupos foi baseada

apenas no diagnóstico histopatológico das amostras emitidos por patologistas do mesmo serviço, que as examinaram em sua rotina cotidiana de trabalho sem a aplicação desses índices. No presente estudo, foram reanalisadas as mesmas amostras já diagnosticadas previamente por patologistas do serviço, sendo desta vez, com a aplicação dos mencionados índices. Os índices de lesão do nervo periférico se mostraram alterados no grupo HANSEN, como era de se esperar, uma vez que esse grupo costuma apresentar o maior grau de lesão dos nervos periféricos visíveis ao exame histopatológico. O intento do presente estudo focalizou principalmente o grupo que ficou diagnosticado como inconclusivo (INC), e o laudo do exame histopatológico foi emitido apenas com a descrição dos achados encontrados na amostra sem uma conclusão em relação à etiologia da doença. Acreditamos que nesse grupo possam estar contidas amostras que diante de uma análise mais sistematizada possam mostrar indícios, ainda que indiretos da presença da hanseníase. Já nas amostras do grupo OD, foram encontrados indícios que permitiram o diagnóstico de doenças especificadas como granuloma anular, infecções por fungos, outras micobacterioses, micose fungoide, mucinose folicular (ABBAS; BHAWAN, 2010) doenças essas que podem mostrar lesões com aspecto clínico semelhante a lesões da hanseníase, assim como alterações de sensibilidade, sintoma este que a julgar pelos resultados desse estudo, não foi exclusivo de lesões cutâneas da hanseníase. Esse fato sempre nos deixa abertos a uma perspectiva de que as lesões da hanseníase possam cursar com outras comorbidades ou ainda que doenças distintas da hanseníase promovam alterações da sensibilidade da pele e até mesmo alterações morfológicas dos ramos nervosos cutâneos encontrados na histologia da pele. Vale lembrar que a subjetividade do exame neurológico da sensibilidade nesse estudo foi reduzida pela utilização da quantificação sensorial feita pelo aparelho TSA mencionado na seção de material e métodos e mesmo assim, o grupo de pacientes que forneceram as amostras do OD mostrou alterações de sensibilidade nas lesões.

Não bastando às dificuldades no diagnóstico clínico, há relatos na literatura mostrando a presença de envolvimento de ramos nervosos cutâneos pelo infiltrado inflamatório em doenças não relacionadas com a hanseníase e que entram na lista do diagnóstico diferencial da doença (ABBAS & BHAWAN, 2010). Essas doenças podem ser infecciosas (sífilis, a leishmaniose, a infecção herpética ou por outros vírus na pele, outras micobacterioses); podem ser inflamatórias (esclerodermia, sarcoidose, doença de Degos, lupus eritematoso cutâneo); assim como podem ser neoplásicas (carcinoma epidermóide, basalioma, linfoproliferativas neoplásicas).

Nota-se, portanto, que a evidência histopatológica de envolvimento dos ramos nervosos não é exclusiva da hanseníase e que uma variedade de doenças pode cursar com essa alteração, embora as outras doenças não produzam uma destruição do nervo tão exuberante quanto à hanseníase. É necessário reforçar que para o diagnóstico histopatológico, sejam procuradas outras alterações na secção histológica como a composição e a distribuição do infiltrado na derme, as estruturas que o infiltrado inflamatório predominantemente agride as alterações da epiderme e dos anexos cutâneos próprias de cada grupo de doença. Em relação à composição celular do infiltrado, a presença de células epitelioides, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos são fatores indicativos de grupos de afecções da pele correspondentes a cada tipo de infiltrado. Além disso, a associação das alterações histopatológicas com os sinais e sintomas clínicos investigados na interação da equipe clínica com a equipe da Patologia constituem-se em instrumentos adicionais para minimizar a possibilidade de erro diagnóstico, além do exame baciloscópico e molecular através do PCR.

Embora as outras doenças cursem com inflamação relacionada ao nervo, os índices de lesão de nervo utilizados conseguiram discriminar de forma significativa o diagnóstico diferencial entre os casos do grupo Hansen e OD do presente estudo. Os índices que mediram o contato do infiltrado com o ramo nervoso e a invasão do ramo nervoso pelo infiltrado foram superiores no grupo de amostras HANSEN, quando comparado ao grupo INC ou ao grupo OD, mostrando que a agressão neural na hanseníase é mais intensa do que em outras doenças listadas no diagnóstico diferencial e constantes da casuística do nosso grupo OD.

Em relação aos índices que mensuravam as alterações próprias do ramo nervoso não acompanhadas da presença de infiltrado inflamatório, notamos que nem o aumento de matriz extracelular e nem o aumento de celularidade endoneural foram significativamente diferentes entre os três grupos. O aumento da matriz endoneural pode indicar dois eventos no interior do nervo; uma perda de fibras, seguido de ocupação do espaço por tecido conjuntivo que aparece na coloração tricromática de Gomori como aumento da área verde no interior do endoneuro (Antunes et al, 2012). A certeza da presença da fibrose endoneural só pode ser afirmada quando se observa a hialinização do endoneuro, isto é, o endoneuro adquire uma textura homogeneizada acelular, em vez da textura correspondente a pequenas fibras nervosas paralelas e colágeno frouxo, que é própria do aspecto normal. Esse achado é importante, pois pode sugerir um processo de fibrose instalado nos ramos mais

distais da inervação em continuidade com o processo de fibrose no tronco nervoso periférico descrito por ANTUNES et al (2012). A fibrose segundo Antunes, é um indício forte para a etiologia hanseniana na neuropatia, já que nenhuma outra neuropatia periférica mostrou essa alteração de maneira intensa no nervo.

Por outro lado, o aumento de celularidade em relação a células de Schwann no endoneuro é um parâmetro difícil de ser avaliado e carrega certo grau de subjetividade, entretanto a presença de núcleos de células de Schwann superpostos podem indicar proliferação dessas mesmas células e o número de núcleos no endoneuro visto em cortes mais longitudinais do nervo podem fornecer indícios dessa proliferação. Mitoses de células de Schwann não são vistas nos cortes histológicos dos ramos nervosos nem dos troncos, mas a superposição e aumento da densidade de núcleos pode ser indício de proliferação. As células de Schwann proliferam em duas ocasiões básicas: no caso de remielinização, secundária a um processo desmielinizante e no caso de regeneração axonal (MIDRONI & BILBAO, 1995). Nas doenças desmielinizantes, as células de Schwann tentam recompor a bainha de mielina desintegrada por doenças inflamatórias ou genéticas. No processo regenerativo axonal, a célula de Schwann também prolifera para formar as bandas de Bungener, que são túneis por onde penetrarão os brotamentos regenerativos axonais. ANTUNES et al, (2012) mostraram que nos cortes semifinos de troncos nervosos obtidos por biópsias de pacientes com hanseníase, os sinais de desmielinização eram menos frequentes do que nas neuropatias não relacionadas com a hanseníase. Esses sinais eram representados por uma bainha de mielina fina nos axônios em cortes transversais ou pela presença do aspecto de bulbo de cebola, que é uma proliferação concêntrica de células de Schwann em torno de um axônio com bainha de mielina delgada. Esse aspecto corresponde a uma tentativa de remielinização do axônio que foi desmielinizado. Esse aspecto é encontrado em neuropatias hereditárias, em neuropatias desmielinizantes inflamatórias (MIDRONI & BILBAO, 1995) e também em nervos acometidos por hanseníase neural de longo tempo de evolução (manuscrito em preparação). A imagem histológica do bulbo de cebola representa, portanto, uma tentativa da célula de Schwann de remielinizar os axônios que perderam a mielina. Apesar desse resultado de menor frequência da lesão remielinizante na hanseníase, o achado de aumento de celularidade de células de Schwann nos ramos nervosos pode ser um sinal auxiliar, uma vez que a hanseníase comprovadamente apresenta um processo de desmielinização demonstrado em exames eletrofisiológicos da condução nervosa (JARDIM et al, 2004; GARBINO et al, 1998). Portanto, a existência de um processo desmielinizante na hanseníase é indiscutível, entretanto,

falta ainda conhecer a real dimensão temporal e espacial da desmielinização e qual o seu papel na patogenia da dessa doença. Outro tipo celular que possa estar contribuindo para o aumento de celularidade seria o fibroblasto, uma vez que a hanseníase causa um relevante processo de fibrose no nervo periférico (ANTUNES et al, 2012). Os fibroblastos são responsáveis pelo aumento de matriz no espaço endoneural, característica encontrada no presente estudo. Para solucionar tal problema, o ideal seria realizar uma imunomarcção com os anticorpos S100 para marcar as células de Schwann e (CD34) para fibroblastos.

6.2 - Estudo B

A relação de *M leprae* com o nervo periférico ainda é muito pouco entendida e esse fato se deve a vários fatores que acompanham a história da pesquisa da hanseníase. Os modelos experimentais para estudar a patogenia da hanseníase não são fáceis de trabalhar como é o exemplo do macaco Mangabey (GORMUS et al, 1995). O tempo que o animal leva para desenvolver a doença após a inoculação, assim como o tempo de evolução da mesma são extensos, dificultando muito o estudo cinético dos eventos patogênicos que levam à destruição do nervo. O modelo experimental de infecção do tatu de nove bandas desenvolve uma doença hepática e esplênica com grande proliferação de bacilos, e o nervo periférico também mostra alguma neuropatia não tão florida quanto à humana, mas com alteração da inervação da pele (TRUMAN et al, 2014). Os animais mais práticos para o trabalho experimental são os camundongos, entretanto, esses animais desenvolvem um tipo de hanseníase com pouca semelhança à doença humana e, portanto, também é um modelo limitado para o estudo da sua patogenia. O uso desses animais de menor porte é adotado com outros objetivos diversos como teste de resistência à drogas, isolamento de antígenos, obtenção e isolamento de bacilos vivos de patas de animais geneticamente imunodeficientes como o camundongo nude (BANERJEE, 1997).

O estudo da patogenia da neuropatia hanseniana fica praticamente restrito a modelos experimentais in vitro, com a utilização de culturas primárias ou de linhagens de

células de Schwann e de coculturas de neurônios obtidos a partir de gânglios da raiz dorsal de ratos em estágio embrionário adicionados de células de Schwann obtidas a partir de nervo periférico de ratos adultos também são instrumentos de experimentação na hanseníase, embora com menor frequência (BANERJEE, 1997).

Outra opção utilizada para estudar a patogenia da lesão neural da hanseníase também menos frequente é a observação de amostras de pele e de nervo periférico obtidas por biópsia de nervo ou de pele a partir de pacientes portadores de hanseníase; este é o caso do presente estudo. Embora esse material nos mostre histologicamente a lesão do nervo na realidade, esse tipo de estudo é dificultado pelas restrições impostas pela ética em pesquisa e pela falta do elemento cinético, próprios dos estudos experimentais em animais, em que o tempo de evolução da doença pode ser controlado. Na prática clínica da hanseníase, entretanto, os pacientes que procuram assistência médica no ambulatório especializado estão em diferentes estágios de evolução da doença, sendo que a maioria se apresenta para procurar a assistência médica em estágios avançados da doença. A evolução da neuropatia da hanseníase é lenta e insidiosa e muitos pacientes relatam na primeira consulta uma evolução prévia dos seus sintomas de aproximadamente quatro anos (JARDIM et al, 2003). A doença também é subdiagnosticada por médicos não familiarizados com o problema, apesar de ser uma causa frequente de neuropatia periférica no Brasil (ANTUNES et al, 2006).

Em face do Laboratório de Hanseníase do IOC-FIOCRUZ ser uma unidade básica de saúde filiada ao Ministério da Saúde do Brasil, ele tem um afluxo grande de pacientes com neuropatia hanseniana; o laboratório desenvolveu também experiência em lidar com o diagnóstico desse tipo de paciente, assim como possuir uma eficiente integração funcional entre a equipe clínica de Neurologia e da Patologia; por isso, o presente estudo pode ser realizado, procurando montar uma cinética, ainda que imperfeita, da neuropatia hanseniana. Lembramos que estudar a sequência de eventos patogênicos a partir de amostras de biópsias colhidas de pacientes em diversos estágios evolutivos da doença requer uma montagem de uma sequência lógica baseada nos conhecimentos sobre o processo inflamatório e no conhecimento de aspectos biológicos básicos do nervo periférico. Os nossos casos de amostras de nervo ou de pele examinadas histopatologicamente são em termos de estágio da lesão muito diversificados, estando alguns em fases iniciais enquanto em outros, encontramos avançada destruição das estruturas dos nervos. Procuramos então, baseados nos critérios acima expostos, colocar em sequência cronológica essas amostras em diferentes estágios

evolutivos de lesão. Tentamos assim, montar um estudo cinético, ainda que não controlado cronometricamente, mas que obedeça a uma sequência lógica correspondente ao processo inflamatório.

O acesso ao que está acontecendo no nervo periférico também é limitado, uma vez que apenas uma amostra do nervo, que varia de 3 a 5 cm de comprimento é colhida para a análise histológica e ultraestrutural. Na tentativa de ampliar esse acesso e aumentar a janela de observação do nervo periférico, uma amostra de pele inervada pelo próprio nervo biopsiado também foi colhida. A pele escolhida para essa coleta, como já foi dito, sempre apresentava manifestações de diminuição da sensibilidade, entretanto, visualmente, apresentava um aspecto normal. Dessa forma, além do acesso ao segmento do tronco nervoso sensitivo biopsiado, foi possibilitado também o acesso aos seus ramos mais distais que se distribuía em torno das estruturas cutâneas. De forma interessante, essas amostras mostravam-se histologicamente com alterações morfológicas que foram descritas na tabela 6. Entre elas, a presença de infiltrado inflamatório endoneural (33%) infiltrado inflamatório perineural (44%), espessamento do perineuro (44%), aumento de matriz extracelular no endoneuro (66%) e aumento de celularidade (99%). A análise dos ramos nervosos dessa pele colhida revelou que os ramos nervosos apresentam já algum comprometimento mesmo estando a pele visualmente sem sinais de lesão da doença, exceto a hipoestesia. Esse achado mostra que a biópsia de pele com alterações de sensibilidade pode dar subsídios que favoreçam o médico a decisão diagnóstica e o tratamento da hanseníase, particularmente, nos serviços que não dispõem de biópsia de nervo como é a maioria dos postos de atendimento da rede de Saúde, que atendem à população brasileira.

As concordâncias encontradas ainda que parciais entre os achados do nervo e da pele no que se refere ao aumento da matriz (27%), aumento de celularidade (22%) e ao espessamento perineural (44%) se tornam evidências de que as mesmas alterações encontradas no tronco nervoso podem ou não estar presentes no ramo nervoso dérmico. Portanto, o mesmo processo patológico se estende ao longo da árvore de inervação do órgão inervado e, portanto, sugere que deva existir uma continuidade espacial entre os dois sítios. Não temos subsídio para afirmar por esse achado se o sentido dessa extensão é centrífugo ou centrípeta, isto é, se a lesão se inicia nos ramos nervosos da pele e se estende em direção ao sistema nervoso central (extensão centrípeta) ou ao contrário se ela se inicia no tronco nervoso e se estende à periferia dos ramos nervosos cutâneos (extensão centrífuga). Essa é

uma questão básica sobre a patogenia da neuropatia hanseniana: onde seria o ponto de origem da lesão neural da hanseníase, o tronco nervoso ou o órgão alvo inervado por esse tronco, no caso a pele?

O exame ultraestrutural do ramo nervoso cutâneo revelou alterações não perceptíveis pela resolução da microscopia ótica e que correspondem a alterações degenerativas de axônios não mielinizados; são elas: a presença de células de Schwann desnervadas, isto é, sem axônios e a presença de bolsas de colágeno nas células de Schwann. A célula de Schwann desnervada é a célula que perdeu contato com o axônio e, portanto, precisa secretar fatores autotróficos para manter-se viva, já que o axônio é fonte de neuregulina, importante fator trófico para a célula glial (MEIER et al, 1999; TOFARIS et al, 2002). A bolsa de colágeno por sua vez, é uma reentrância ou invaginação na superfície da célula de Schwann, que normalmente é ocupada por um axônio não mielinizado, entretanto, quando o axônio se degenera, essa bolsa passa a ser ocupada por pequeno feixe de fibras colágenas (BEHSE et al, 1975). Ambas alterações somente são vistas pelo exame ultraestrutural.

Esses achados ultraestruturais estão em conexão com a diminuição de fibras nervosas imunorreativas para PGP9.5, encontrado no grupo HANSEN, em relação aos grupos INC e OD, no estudo a. Essa ligação entre esses achados se deve ao fato de que as fibras amielínicas responsáveis pela sensibilidade à dor e ao calor estarem alteradas na hanseníase. Os resultados desse estudo mostram que as fibras amielínicas estão diminuídas em quantidade tanto pela marcação imuno-histoquímica pelo anti-PGP9.5, como pela detecção de degeneração de axônios não mielinizados pela ultraestrutura representada pelas imagens de células de Schwann desnervadas e pelas bolsas de colágeno presentes em reentrâncias na superfície das células de Schwann.

Na marcação de imunoperoxidases pelo anti-PGP9.5, podemos afirmar que as fibras amielínicas estão diminuídas, porque a maioria das fibras nos ramos nervosos sensitivos encontrados na pele são amielínicas (LAVERDETE et al, 2015), uma vez que as fibras mielinizadas de maior calibre inervam as estruturas pertencentes ao sistema de sensibilidade profunda, representada pela propriocepção (tendões e fuso muscular) e sensibilidade vibratória e de pressão (derme profunda) (LAURIA et al, 2009). Portanto, nos ramos nervosos cutâneos, encontramos algumas fibras amielínicas acompanhadas de fibras mielinizadas de pequeno calibre em menor número, mediadoras da sensibilidade profunda

(fibras A β e A γ) e para sensibilidade tátil (A) e C (térmica e (dolorosa) (SNELL, 2010). Em face da explicação acima, compreende-se o motivo pelo qual as alterações encontradas nos ramos nervosos cutâneos só podem estar associadas às sensibilidades térmica, tátil e dolorosa, detectadas clinicamente nos portadores da doença.

O trabalho de ANTUNES et al, (2006) mostrou que as fibras mielinizadas de pequeno calibre, assim como as fibras amielínicas estão presentes nos nervos periféricos acometidos pela hanseníase, ao passo que as fibras mielinizadas de grande calibre estavam muito escassas; o autor demonstrou que as fibras que primeiro desaparecem no nervo seriam as mielinizadas de grande calibre. Um estudo em preparação para a publicação de ANTUNES et al, (2017) mostra da mesma forma que a proporção de fibras mielinizadas pequenas em relação às fibras grandes nos nervos com hanseníase está aumentada, quando comparadas a um grupo de nervos normais.

6.3 - Estudo C

O estudo ultraestrutura das fibras amielínicas permitiu o acesso a esses componentes do nervo, que normalmente não são visíveis nos estudos histológicos de rotina realizados pela microscopia ótica, mesmo com os cortes semifinos. Nas preparações as fibras amielínicas são indistinguíveis e nos cortes semifinos, elas podem aparecer com seus contornos difíceis de delinear em meio às fibras mielinizadas de grande e de pequeno calibre, sendo impossível identifica-las com segurança. As fibras amielínicas, entretanto, podem ser evidenciadas através da evidenciação imuno-histoquímica do marcador universal axonal, o PGP9.5, contudo, o PGP 9.5 marca também os axônios de fibras mielinizadas (HENDERSON, et al 2012). O marcador NGFr também evidencia as células de Schwann de fibras amielínicas, assim como os seus axônios, podendo funcionar como um bom identificador desse tipo de fibra (DOU et al, 2006; ANTUNES et al, 2003). Outros marcadores utilizados para essa finalidade são a proteína glial fibrilar acídica (GFAP) que no nervo periférico marca as células de Schwann não mielinizantes (JESSEN et al, 1990) e o c-

jun, que também identifica seletivamente as células de Schwann não mielinizantes (HUTTON et al, 2006).

O estudo ultraestrutural das lesões do nervo periférico causadas pela hanseníase apresenta também a vantagem de permitir o acesso às alterações imperceptíveis apresentadas pelas fibras nervosas se forem procuradas somente pela microscopia ótica. A microscopia eletrônica de transmissão propicia aumentos de maior magnitude e a obtenção de resolução incrementada.

Uma vez que a doença tem a sua predominante manifestação através de alterações da sensibilidade térmica, tátil, dolorosa, manifestações autonômicas e em menor escala, manifestações motoras, o presente estudo teve como um dos seus focos o envolvimento de fibras amielínicas e de fibras mielinizadas de pequeno calibre. Vale comentar que a hanseníase pode acometer ao longo da sua evolução, as fibras motoras que estão enfeixadas no nervo seguindo o trajeto para inervação eferente em contraste com as fibras que trazem estímulos aferentes. Embora a hanseníase seja uma doença que comprometa todo o nervo periférico, onde estão enfeixadas as fibras sensitivas, as fibras autonômicas e as fibras motoras, essa parte do estudo (estudo C), teve o seu foco de atenção sobre as fibras amielínicas, envolvidas predominantemente na perda de sensibilidade, e nas disautonomias sintoma frequentes na manifestação da doença.

As fibras amielínicas são muito estudadas atualmente (LAURIA et al, 2010) para o diagnóstico de neuropatia de fibras finas muito frequente nos pacientes diabéticos.

Como peculiaridade, a disfunção dessas fibras não suscita alterações detectáveis nos exames eletrofisiológicos da condução nervosa (JARDIM et al, 2015) e as alterações quantitativas desse tipo de fibra na epiderme são procuradas para identificar o diagnóstico das neuropatias de fibras finas (GIESEL et al, 2017). Não encontramos estudos recentes que se ocupem das alterações morfológicas ultraestruturais das fibras amielínicas nos nervos com hanseníase.

A ideia de se realizar esse tipo de estudo inspirou-se também nos trabalhos de RAMBUKANA et al, (2002) que mostraram que o *M leprae* induz a desmielinização das fibras nervosas em modelos experimentais de camundongo sem a imunidade adquirida e que as células de Schwann correspondentes a essas fibras adquirem um fenótipo de células de Schwann menos diferenciadas que apresentam maior capacidade proliferativa e portanto

acabam expandindo o nicho de sobrevivência de *M leprae*, o qual segundo a literatura, é mais frequente encontrado em células de Schwann não mielinizantes do que nas mielinizantes. Um achado de Antunes et al (2006) por sua vez, já observara que as fibras amielínicas e as fibras mielinizadas de pequeno calibre também são as que predominam em amostras de nervo provindas dos pacientes com hanseníase em avançado grau de destruição nervosa pela presença de infiltrado inflamatório, perda de fibras e fibrose endoneural, dando a impressão de que as fibras mielinizadas de pequeno calibre seriam mais resistentes à destruição causada pela neuropatia hanseniana. Essa hipótese foi corroborada pelo estudo morfométrico de ANTUNES et al (em preparação para publicação) em que o grupo verificou que a frequência de fibras mielinizadas de pequeno calibre está significativamente aumentada em relação ao grupo de nervos normais utilizado como controle.

Em vista dos resultados descritos nos estudos de ANTUNES et al (2006 e no manuscrito em preparação), podemos afirmar que eles corroboram a hipótese de RAMBUKKANA (2002) em que as células de Schwann menos diferenciadas estão significativamente expandidas em sua população nos nervos afetados pela hanseníase.

Os resultados da terceira parte desse trabalho de tese, não estão na mesma tendência demonstrada pelos estudos anteriores, já que a taxa de ocupação das áreas de secção transversal das fibras amielínicas, conhecidas como feixes de Remak nas amostras de nervo acometidas pela hanseníase não se mostrou significativamente diferente da mesma variável no grupo de amostras de nervos com neuropatias não relacionadas com a hanseníase como os autores desse trabalho esperavam.

A prevalecer a hipótese elaborada por RAMBUKKANA et al (2002), seria esperado o encontro de uma taxa de ocupação pela área de fibras não mielinizadas significativamente maior no grupo de amostras de nervos de portadores de hanseníase do que no grupo de amostras de neuropatia não relacionadas com a doença, uma vez que essa situação seria o resultado de um processo de expansão do nicho ecológico do *M leprae*, por ele próprio induzido no interior do nervo, ou seja, o *M leprae* teria induzido as células de Schwann menos diferenciadas, não mielinizadas a aumentar em número estimulando a sua desdiferenciação e a sua proliferação, pois, nesse ambiente intracelular, em face de alguma preferência por motivos ignorados, esses parasitas são encontrados com maior frequência do que nas células de Schwann mielinizantes bem diferenciadas. Os achados do estudo C, entretanto, não estão de acordo com tal hipótese.

Para explicar essa discrepância, poderíamos começar derrubando a hipótese de RAMBUKKANA, que foi observada em modelo animal camundongo Rag1, dizendo que esse raciocínio não pode ser aplicado em amostras provenientes de seres humanos. Esse argumento embora não possa ser afastado, deve ser deixado como hipótese última. Existem outras explicações possíveis e plausíveis para argumentar sobre esse resultado inesperado pelos autores do presente trabalho: a primeira é que o grupo controle ideal para esse trabalho deveria ter sido constituído por amostras de nervo de indivíduos saudáveis, desafio que não foi possível de se obter para a realização do presente estudo, por dificuldades éticas e operacionais. O grupo então utilizado como controle foi constituído por amostras de nervos provenientes de outras neuropatias não relacionadas com a hanseníase constituído por doenças heterogêneas. Foram selecionados casos em que não havia perda de fibras mielinizadas nas amostras de nervo examinadas histologicamente para tentar simular um nervo de aspecto normal. A quantidade de fibras amielínicas não pode ser selecionada nesse grupo uma vez que não havia um parâmetro de normalidade disponível para selecionar amostras com quantidade normal de fibras amielínicas, já que elas não são visíveis pela microscopia ótica e tampouco havia um padrão universal dessa quantidade de fibras normais que servisse como controle. Os pacientes também não foram excluídos por terem manifestações de neuropatia de fibras finas. Enfim esse grupo foi heterogêneo e somente em relação à quantidade de fibras mielinizadas o estudo foi controlado.

O grupo de amostras com hanseníase por sua vez possuía amostras em vários estágios de evolução da doença com relação à presença de perda de fibras nervosas, presença de infiltrado inflamatório e presença de fibrose endoneural, portanto esse grupo também era representado por uma amostra proveniente de pacientes com hanseníase, entretanto os estágios evolutivos das amostras eram muito variáveis, fato este que pode enviesar os resultados do trabalho. Na esperança de encontrar uma evidência que confirmasse a hipótese elaborada por RAMBUKKANA, julgamos que apesar dessa heterogeneidade das amostras tanto do grupo controle, como do grupo de hanseníase a análise realizada pudesse revelar mesmo assim uma expansão do compartimento menos diferenciado das células de Schwann maior no grupo de amostras com hanseníase, adquirido por uma proliferação das mesmas, fato este que não pode ser verificado. Esse estudo necessita, portanto de uma seleção de amostras mais homogêneas e mais criteriosamente escolhidas para compor os grupos de análise.

Os três estudos realizados nesse trabalho gravitaram em torno do tema aspecto morfológico da lesão neural da hanseníase, tentando aplicar esses achados histológicos ao diagnóstico e de posse deles, raciocinar sobre as questões da patogenia da doença. Embora as limitações metodológicas impostas pela análise morfológica tenham restringido os avanços obtidos por esse estudo, o método de estudo anátomo-clínico ainda continua sendo o ponto de partida das perguntas relevantes para o conhecimento e pesquisa sobre a neuropatia hanseniana, portanto, ele é sempre importante ser revisitado para trazer novas perguntas à tona.

CONCLUSÕES

A seguir vão estabelecidas às conclusões do presente estudo:

1) No estudo morfológico da inervação cutânea, a análise sistematizada do aspecto morfológico dos nervos e anexos com a relação do infiltrado inflamatório, conseguiu distinguir o grupo de amostras com hanseníase dos outros grupos. O grupo inconclusivo, no entanto, não mostrou padrão de lesão semelhante ao do grupo Hansen, não sendo, portanto, distinguido pela análise. O método de aplicação dos índices não se mostrou superior à análise desarmada (sem os índices) das alterações morfológicas para realizar o diagnóstico feito pelos patologistas em seu serviço de rotina, ao contrário, o método de índices valorizou o método clássico, baseado na experiência de observação visual utilizado pelos patologistas.

2) O mesmo resultado foi obtido com a evidenciação imuno-histoquímica da inervação cutânea pela marcação do PGP9.5, o qual também não conseguiu encontrar no grupo INC alguma semelhança na diminuição da marcação pelo PGP com o grupo Hansen. Não houve, portanto, aumento da sensibilidade diagnóstica com ambos os métodos histopatológicos e imuno-histoquímicos.

3) O estudo ultraestrutural dos ramos nervosos cutâneos mostrou alterações imperceptíveis ao exame histopatológico convencional da lesão cutânea, entretanto, essas alterações são consideradas inespecíficas e podem aparecer em outras neuropatias e, portanto, não justificam um estudo ultraestrutural incluído na rotina diagnóstica, exceto em condições excepcionais.

4) A análise histológica da pele hipoestésica com aspecto visual normal proveniente de pacientes com a forma neural pura da doença, colhida de região inervada pelo mesmo nervo biopsiado pode evidenciar alterações dos ramos nervosos cutâneos em relação ao infiltrado inflamatório, estrutura do perineuro, aumento de matriz extracelular e hialinização do endoneuro que levantam fortemente a suspeita de hanseníase. Essas alterações foram também detectadas em concordância parcial no tronco nervoso biopsiado mostrando a extensão ao longo do sistema nervoso periférico ao longo de um processo único.

5) O estudo B mostrou que a análise histológica e ultraestrutural da pele hipoestésica dos pacientes com a forma neural pura pode levantar indícios sugestivos do diagnóstico da doença.

6) O estudo C não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação do grupo neural pura e grupo controle.

REFERÊNCIAS

- Abbas O, Bhawan J. Cutaneous perineural inflammation: a review. *J Cutan Pathol*. 2010 Dec; 37(12):1200-11.
- Andrade, P.R.; Jardim M.R.; Da Silva, A.C.; Manhaes, P.S.; Antunes, S.L.G.; Vital, R.; Prata, R.B.; Petito, R.B.; Pinheiro, R.O.; Sarno, E.N. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. *J Neuropathology Exp Neurol*. 2016 Mar; 75(3):272-83.
- Antunes S.L.; Liang Y.; Neri JA.; Haak-Frendscho M.; Johansson O. The expression of NGFr and PGP 9.5 in leprosy reactional cutaneous lesions: an assessment of the nerve fiber status using immunostaining. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003 Jun; 61(2B):346-52.
- Antunes, S.L.G.; Chimelli, L.M.; Jardim, M.R.; Vital, R.T.; Nery, J.A.; Real, S.C.; Hacker, M.A.; Sarno, E.N. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107: 246-253.
- Antunes, S.L.G.; Chimelli, L.M.; Rabello, E.T.; Valentim, V.C.; Real, S. C.; Sarno, E.N.; Jardim, M.R. An immunohistochemical, clinical and electroneuromyographic correlative study of the neural markers in the neuritic form of leprosy. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Aug; 39(8):1071-81.
- Opromolla, D.V.A.; ed Noções de hansenologia; por Diltor Vladimir Araujo Opromolla, e colaboradores. Bauru: Centro de Estudos Dr.Reynaldo Quagliato, 2000 Maio p: 1-6, 2000.
- Avanzi, C.; Del-Pozo, J.; Benjak, A.; Stevenson, K.; Simpson, V.R.; Busso, P.; Mcluckie, J.; Loiseau, C.; Lawton, C.; Schoening, J.; Shaw, D.J.; Piton, J.; Vera-Cabrera, L.; Velarde-Felix, J.S.; Mcdermott, F.; Gordon, S.V.; Cole, S.T.; Meredith, A.L. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016 Nov 11; 354(6313):744-747.
- Azulay, R.D. Primary visceral virchowian (lepromatous) hanseniasis. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1987 Sep; 55(3):450-3.
- Banerjee, D.K.; Mcdermott-Lancaster, R.D.; Mckenzie, S. Experimental evaluation of possible new short-term drug regimens for treatment of multibacillary leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Feb; 41(2):326-30.
- Barbieri, R.R.; Sales, A.M.; Illarramendi, X.; Moraes, M.O.; Nery, J.A.; Moreira, S.J.; Sarno, E.N.; Machado, A.M.; Bozza, F.A. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Nov; 109(7):944-7).
- Batalha, L.M.C. Avaliação da dor. Coimbra: ESEnfC; 2016 (Manual de estudo –versão 1), p. 20-24.

Behse F.; Buchthal F.; Carlsen F.; Knappeis G.G. Unmyelinated fibres and schwann cells of sural nerve in neuropathy. *Brain*. 1975 Sep; 98(3):493-510.

Bjune, G. Reactions in leprosy. *Lepr Rev*. 1983 Jun; Spec No: 61-7.

Brasil, Portal Brasil. Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, 2014.

Camargo, L.H.S, Baccarelli, R. Avaliação sensitiva na neuropatia hansênica. In: Duerksen, E & Virmond, M. Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase. Bauru, ALM International, p.75-83, 1997.

De Freitas, M.R.; Nascimento, O.J.; Drago, M.J.; De Freitas, A.R.; Hahn, M.D. Ulnar nerve palsy in leprosy without skin changes: biopsy of the superficial branch of the ulnar nerve in the hand. *Arq Neuropsiquiatr*. 1998 Sep; 56(3B):585-94.

De Freitas, M.R.; Nascimento, O.J.; Quaglino, E.A.; Oliveira A.; Hahn, M.D. Small-fiber polyneuropathy in leprosy without skin changes: study of 17 cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003 Sep; 61(3A):542-6. Pub 2003 Sep 16.

Dorairaj, A.; Reddy, R.; Jesudasan, K. An evaluation of the Semmes-Weinstein 6.10 monofilament as compared with 6 nylon in leprosy patients. *Indian J Lepr*. 1988 Jul; 60(3):413-7.

Dou Y.C.; Hagströmer L.; Emtestam L.; Johansson O. Increased nerve growth factor and its receptors in atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res*. 2006 Jun; 298(1):31-7

Düppre, N.C.; Camacho, L.A.; Sales, A.M.; Illarramendi, X.; Nery, J.A.; Sampaio, E.P.; Sarno, E.N.; Bühner-Sékula, S. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1711.

Gallo, M.E.N.; Ramos, Jr A.N.; Albuquerque, E.C.A.; Nery, J.A.C.; Salles, A.M. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *An. Bras. Dermatol*. 2003, vol.78, n.4, pp.415-424.

Gallo, M.E.N.; Sampaio, E.; Nery, J.A.C.; Moraes, M.O.; Antunes, S.L.G.; Pessolani, M.C.V.; Sarno, E.N. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR (Org.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 1383-1394, 2005.

Garbino, J.A. *Revista Acta Fisiátrica*, 5(1); 11-17, 1998.

Gibbels, E.; Lübke-Henke, U.; Klingmüller, G. Unmyelinated nerve fibers in leprosy. A qualitative and quantitative study of serral nerve biopsies in 2 cases of lepromatous leprosy. *Lepr Rev*. 1988 Jun; 59(2):153-62.

Giesel, L.; Pitta, I.; Silveira, R.; Andrade, L.; Vital, R.; Sarno, E.N.; Jardim, M. *Neurology* April 18, 2017 vol. 88 no. 16 Supplement P1.315

Girdhar, B.K. Neurotic leprosy. *Indian J Lepr.* 1996 Jan-Mar; 68(1):35-42.

Gormus, B.J.; Xu, K.; Baskin, G.B.; Martin, L.N.; Bohm, R.P.; Blanchard, J.L.; Mack, P.A.; Ratterree, M.S.; McClure, H.M.; Meyers, W.M.; ET AL. Experimental leprosy in monkeys. I. Sooty mangabey monkeys: transmission, susceptibility, clinical and pathological findings. *Lepr Rev.* 1995 Jun; 66(2):96-104.

Guinto, R.S.; Abalos, R.M.; Cellona, R.V.; Fojardo, T.T. An atlas of leprosy. Sasakawa memorial health foundation. pp 1-56, 1990.

Hagge, D.A.; Oby, R.; Scollard, D.; McCormick, G.; Williams, D.L. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *J Infect Dis.* 2002 Nov 1; 186(9):1283-96.

Hansen, G.H.A. Undersolgelser angaende spedalskhedens aasager. *Norsk Magazin for laegervi.* 1874; 4(Suppl):1-88.

Henderson, J.; Ferguson, M.W.; Terenghi, G. The reinnervation pattern of wounds and scars after treatment with transforming growth factor β isoforms. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012 Apr; 65(4):e80-6.

Hutton E.J.; Carty L.; Laurá M.; Houlden H.; Lunn Mp.; Brandner S, Mirsky R.; Jessen K.; Reilly M.M. c-Jun expression in human neuropathies: a pilot study. *J Peripher Nerv Syst.* 2011 Dec; 16(4):295-303.

Illarramendi, X.; Bühner-Sékula, S.; Sales, A.M.; Bakker, M.I.; Oliveira, A.; Nery, J.A.; Oskam, L.; Wilder-Smith, A.; Sampaio, E.P.; Sarno, E.N.; High prevalence of vasomotor reflex impairment in newly diagnosed leprosy patients. *Eur J Clin Invest.* 2005 Oct; 35(10):658-65.

Jardim M.R.; Vital R.; Hacker M.A.; Nascimento M.; Balassiano S.L.; Sarno E.N.; Illarramendi X. Leprosy neuropathy evaluated by NCS is independent of the patient's infectious state. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Apr; 131:5-10.

Jardim, M.R.; Antunes, S.L.; Santos, A.R.; Nascimento, O.J.; Nery, J.A.; Sales, A.M.; Illarramendi, X.; Duppre, N.; Chimelli, L.; Sampaio, E.P.; Sarno, E.P. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol.* 2003 Jul; 250(7):806-9.

Jardim, M.R.; Chimelli, L.; Faria, S.C.; Fernandes, P.V.; Da Costa, N.; Sales, A.M.; Sarno, E.N.; Antunes S.L.G. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. *Lepr Rev.* 2004 Sep; 75(3):242-53.

Jessen K.R.; Morgan L.; Stewart H.J.; Mirsky R. Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c (Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development.* 1990 May; 109(1):91-103.

Jopling, W.H. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle.* 1982 Dec; 63(4):295-305.

Lacerda, C.A.M.; 2003. Stereological tools in biomedical research. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2003; 75(4):469-486.

Lastória, J.C.; De Abreu, M.A.M.M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(2):205-218.

Lauria G.; Lombardi R.; Camozzi F.; Devigili G. Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology*. 2009 Feb; 54(3):273-85.

Lauria, G.; Hsieh, S.T.; Johansson, O.; Kennedy, W.R.; Leger, J.M.; Mellgren, S.I.; Nolano, M.; Merkies Is, Polydefkis, M.; Smith, A.G.; Sommer, C.; Valls-Solé, J. European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol*. 2010 Jul; 17(7):903-12, e44-9.

Medeiros, R.C.; Girardi, K.D.; Cardoso, F.K.; Mietto, B.S.; Pinto, T.G.; Gomez, L.S.; Rodrigues, L.S.; Gandini, M.; Amaral, J.J.; Antunes, S.L.; Corte-Real S.; Rosa, P.S.; Pessolani, M.C.; Nery, J.A.; Sarno, E.N.; Batista-Silva, L.R.; Sola-Penna, M.; Oliveira, M.F.; Moraes, M.O.; Lara, F.A. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 2016 Oct 7; 291(41):21375-21387.

Meier C.; Parmantier E.; Brennan A.; Mirsky R.; Jessen K.R. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci*. 1999 May 15; 19(10):3847-59.

Mellgren, S.I.; Nolano, M.; Sommer, C. The cutaneous nerve biopsy: technical aspects, indications, and contribution. *Handb Clin Neurol*. 2013; 115:171-88.

Midroni, G.; Bilbao, J.M. Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. *Butterworth-Heinemann*. 1995. p. 54-71.

Miko, T.L.; Le Maitre, C.; Kinfu, Y. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. *Lancet*. 1993 Aug 28; 342(8870):521-5.

Naafs, B. Treatment duration of reversal reaction: a reappraisal. *Back to the past. Lepr rev* (2003) 74, 328-336.

Nascimento, O.J.M. Leprosy neuropathy: clinical presentations. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. vol.71 no.9B São Paulo Sept. 2013.

OMS. Guia para la eliminación de la lepra como problema de salud pública, Ginebra, 1998.

Opromolla, D.V.A. Noções de hansenologia. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 2000.

Pires, M.C.; Calux, M. J. F.; Valente, N.Y.S. Características histopatológicas necessárias para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no eritema nodoso. *Rev. Saúde Pública*. 1996, vol.30, n.6, pp.536-541.

- Rambukkana, A.; Zanazzi, G.; Rambukkana, N.; Salzer, J.L. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 May 3; 296(5569):927-31
- Ridley, D.S. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull. World Health Organ*, 1974. 51(5): 451–465.
- Ridley, D.S.; Radia, K.B. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1981 Dec; 49(4):383-92.
- Rodrigues Júnior, I.A.; Silva, I.C.; Gresta, L.T.; Lyon, S.; Villarroel, M.D.E.F.; Arantes, R.M. Degree of skin denervation and its correlation to objective thermal sensory test in leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(12):e1975.
- Salgame, P.; Abrams, J.S.; Clayberger, C.; Goldstein, H.; Convit, J.; Modlin, R.L.; Bloom, B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cells clones. *Science* 254: 279-282, 1991.
- Save, M.P.; Shetty, V.P.; Shetty, K.T. Hypophosphorylation of NF-H and NF-M subunits of neurofilaments and the associated decrease in KSPXK kinase activity in the sciatic nerves of swiss white mice inoculated in the foot pad with *mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2009 Dec; 80(4):388-401.
- Scollard, D.M.; Adams, L.B.; Gillis, T.P.; Krahenbuhl, J. L.; Truman, R.W.; Williams, D.L. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(2): 338-381.
- Shetty, V.P.; Antia, N.H. Pathology of nerve damage in leprosy. *The Peripheral Nerve in Leprosy and Other Neuropathies*. Delhi: Oxford University Press, 1997; 30-35.
- Shetty, V.P.; Antia, N.H.; Jacobs, J.M. The pathology of early leprosy neuropathy. *J Neurol Sci*. 1988 Dec; 88(1-3):115-31.
- Shetty, V.P.; Suchitra, K.; Uplekar, M.W.; Antia, N.H. Higher incidence of viable *Mycobacterium leprae* within the nerve as compared to skin among multibacillary leprosy patients released from multidrug therapy. *Lepr Rev*. 1997 Jun; 68(2):131-8.
- Skinsness, O.K. Immuno-pathology of leprosy: the century in review. Pathology, pathogenesis, and the development of classification. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1973 Jul-Sep; 41(3):329-60.
- Snell, Richard S. *Clinical Neuroanatomy*, 7th Edition Copyright ©2010 Lippincott Williams & Wilkins. Neural pain in leprosy neuropathy (P1.315).
- Spierings, E.; De Boer, T.; Zulianello, L.; Ottenhoff T.H. The role of schwann cells, T cells and *mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev*. 2000 Dec; 71 Suppl: S121-9.
- Teles R.M.; Antunes, S.L.G.; Jardim, M.R.; Oliveira, A.L.; Nery, J.A.; Sales, A.M; Sampaio, E.P.; Shubayev, V.; Sarno, E.N. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and

TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2007 Sep; 12(3):195-204.

Tofaris G.K.; Patterson P.H.; Jessen K.R.; Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci.* 2002 Aug 1; 22(15):6696-703.

Truman, R.W.; Singh, P.; Sharma, R.; Busso, P.; Rougemont, J.; Paniz-Mondolfi, A.; Kapopoulou, A.; Brisse, S.; Scollard, D.M.; Gillis, T.P.; Cole, S.T. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med.* 2011 Apr 28; 364(17):1626-33.

Truman, R.W.; Ebenezer, G.J.; Pena, M.T.; Sharma, R.; Balamayooran, G.; Gillingwater, T.H.; Scollard, D.M.; McArthur, J.C.; Rambukkana, A. The armadillo as a model for peripheral neuropathy in leprosy. *ILAR J.* 2014; 54(3):304-14.

Ura S. Tratamento e controle das reações hansenicas. *Hansen Int.* 2007; 32(1): 67-70.

Van Brakel, W.H.; Nicholls, P.G.; Wilder-Smith, E.P.; Das L.; Barkataki, P.; Lockwood, D.N. INFIR study group. early diagnosis of neuropathy in leprosy--comparing diagnostic tests in a large prospective study (the INFIR cohort study). *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Apr 2; 2(4):e212.

Walker, S.L.; Lockwood, D.N.J. The clinical and immunological features of leprosy. *British Medical Bulletin* 2006; 78:103-121.

Wang, L.; Hilliges, M.; Jernberg, T.; Edström-Wiegleb, D.; Johansson. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Res.* 1990; 261:25-33.

WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy. Report of a WHO Study Group. NO 847, 1994.

WHO, World Health Organization. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. NO 35, 2016, 91, 405-420.

Wu, S.W.; Wang, Y.C.; Hsieh, P.C.; Tseng, M.T.; Chiang, M.C.; Chu, C.P.; Feng, F.P.; Lin, Y.H.; Hsieh, S.T.; Chao, C.C. Biomarkers of neuropathic pain in skin nerve degeneration neuropathy: contact heat-evoked potentials as a physiological signature. *Pain.* 2017 Mar; 158(3):516-525.

Yamamura, M.; Uyemura, K.; Deans, R.J.; Weinberg, K.; Modlin, L.R. Defining protective responses to pathogens: cytokines profiles in leprosy patients. *Science* 254 (5029): 277-279, 1991.

Yin, X.; Kidd, G.J.; Ohno, N.; Perkins, G.A.; Ellisman, M.H.; Bastian, C.; Brunet, S.; Baltan, S.; Trapp, B.D. Proteolipid protein-deficient myelin promotes axonal mitochondrial dysfunction via altered metabolic coupling. *J Cell Biol.* 2016 Nov 21; 215(4):531-542.