

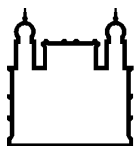
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**A BIÓPSIA CUTÂNEA COMO FERRAMENTA PARA O  
DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE FORMA NEURAL PURA**

Simone Neves de Campos

Rio de Janeiro  
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Simone Neves de Campos**

**A BIÓPSIA CUTÂNEA COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DA  
HANSENÍASE FORMA NEURAL PURA**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

**Orientadora:** Dra. Euzenir Nunes Sarno

Rio de Janeiro  
Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C198 Campos, Simone Neves de

A biópsia cutânea como ferramenta para o diagnóstico da hanseníase forma neural pura / Simone Neves de Campos. – Rio de Janeiro, 2016.

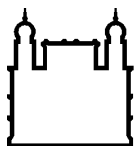
xviii, 77 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 68-76

1. Forma neural pura da hanseníase. 2. Nervos cutâneos. 3. Histopatologia. I. Título.

CDD 616.998075



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTORA: SIMONE NEVES DE CAMPOS**

**A BIÓPSIA CUTÂNEA COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DA  
HANSENÍASE FORMA NEURAL PURA**

**ORIENTADORA:** Dra. Euzenir Nunes Sarno

Avaliada pela banca examinadora composta por:

**Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel (Revisora)**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

**Dra. Leila Maria Cardão Chimelli**

Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer

**Dr. Juan Manuel Piñeiro Maceira**

Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual do Rio de Janeiro

**Dr. Flavio Alves Lara**

Laboratório de Microbiologia Celular – Fundação Oswaldo Cruz

**Dra. Suzana Côrte-Real Faria**

Laboratório de Biologia Estrutural - Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

Março de 2016

*À minha tão amada família*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Euzenir Nunes Sarno por ter acreditado em mim e pela oportunidade de aprendizado e de fazer parte de algo maior;

Ao Dr. Sérgio Antunes por todo ensinamento, incentivo e convívio diário;

À Dra. Marcia Jardim pelos procedimentos de biópsia que permitiram o desenvolvimento desse estudo e pelas importantes conversas na reta final;

Um agradecimento mais que especial à equipe da patologia Adelaide Amorim, Andreia Moraes, Daniel Chaves, Helen Ferreira e Vânia Valentim, pela compreensão, a disponibilidade e o refúgio de vocês;

À Dra. Patrícia Pignataro, por toda ajuda e amizade adquirida no convívio do laboratório e à Dra. Alice Miranda pelos seus ensinamentos na dermatopatologia;

Às Dras. Ximena Illarramendi e Mariana Hacker, não tenho como agradecer por toda ajuda;

À Dra. Roberta Olmo pelas conversas inspiradoras, à Mayara Barbosa pela ajuda com as imagens, à Andrea Cavalcante pela alegria diária, ao José Augusto por estar sempre solícito e à todas as pessoas do laboratório que indiretamente participaram desta fase;

Ao meu amado pai, Raimundo (*in memoriam*) por fazer de mim o que sou. Essa etapa é por você e para você. “Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você”, e minha amada mãe, Neíde por ser o alicerce da família em força e amor;

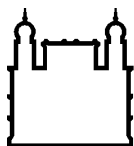
À minha irmã, Vania, minha melhor amiga e minha cúmplice e meus sobrinhos amados Sophie e Benjamin;

À Daniele Pimentel e Kailany Pimentel obrigada por fazerem de mim uma pessoa melhor;

Por fim, quero dedicar este trabalho à todas as pessoas que ainda sofrem com essa doença milenar. Que este estudo possa ser mais um passo no aprimoramento do diagnóstico.

*“Dans les champs de l’observation le  
hasard ne favorise que les esprits  
préparés”*

*(Louis Pasteur)*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

A BIÓPSIA CUTÂNEA COMO FERRAMENTA DE AUXÍLIO PARA O DIAGNÓSTICO DA FORMA  
NEURAL PURA DA HANSENÍASE

### RESUMO

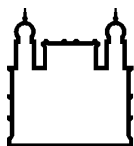
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Simone Neves de Campos**

A forma neural pura da hanseníase (FNP) está caracterizada pela presença da neuropatia periférica na ausência de lesões dermatológicas. O diagnóstico se baseia na análise histopatológica do nervo periférico em conjunto com os dados clínicos e a eletroneuromiografia. No entanto os achados histopatológicos muitas vezes são inespecíficos e o *Mycobacterium leprae* raramente é detectado. Diferente da biópsia de nervo, a biópsia cutânea pode ser realizada em unidades básicas de saúde visto se tratar de um exame pouco invasivo e de fácil realização. O objetivo deste estudo foi verificar através da análise histopatológica básica, o valor das biópsias cutâneas como ferramenta para o diagnóstico de pacientes com FNP. Cinquenta fragmentos cutâneos e de nervos periféricos correspondentes de pacientes com FNP e 50 fragmentos cutâneos de pacientes com neuropatias não hansênicas foram examinados através das colorações de hematoxilina&eosina, tricrômico de Gomori e Wade. Nossos resultados indicam que filetes nervosos foram observados em 91% das amostras cutâneas do total de pacientes com neuropatias periféricas. Destes, 33% pertenciam a pacientes com FNP e apresentaram alguma alteração morfológica nos nervos. As características confirmativas (presença de bacilo álcool-ácido resistente-BAAR) ou sugestivas de hanseníase (granuloma epitelióide, inflamação linfocítica endoneural e fibrose endoneural) foram observadas em 28% das amostras cutâneas. A fibrose foi a principal alteração histopatológica (14/50) e mesmo quando analisada individualmente pode ser sugestiva da doença. A formação de microfascículos foi observado em 4% das amostras sugerindo o papel da biópsia cutânea na identificação do processo regenerativo do nervo. Em 34% dos fragmentos de pele os filetes nervosos estavam normais. Quando as amostras cutâneas foram comparadas com as amostras dos nervos periféricos correspondentes, houve concordância em 86% quanto à ausência do BAAR. A inflamação endoneural e o granuloma epitelióide estiveram mais presentes no nervo do que na pele, não sendo um bom parâmetro de análise quando observados individualmente na pele. Outras alterações, consideradas inespecíficas, estiveram presentes em 38% das amostras cutâneas dos pacientes com FNP, como a laminação do perineuro e a proliferação das células de Schwann. O valor preditivo positivo do fragmento cutâneo coletado por procedimento de biópsia para o diagnóstico da FNP foi de 68,2%. Podemos concluir que a análise morfológica detalhada dos filetes nervosos dos fragmentos cutâneos coletados no dermatomo do nervo afetado pode ser uma importante ferramenta de



auxílio ao diagnóstico da FNP quando analisadas por patologistas experientes nos centros de referência para o tratamento da hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SKIN BIOPSY AS A TOOL FOR THE DIAGNOSIS ON NEURAL PURE LEPROSY

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Simone Neves de Campos**

Pure neural leprosy (PNL), characterized by peripheral neuropathy in the absence of dermatological alterations, is diagnosed based on the nerve biopsy results and the clinic and electroneuromyograph data. However, histological findings are nonspecific and *Mycobacterium leprae* detection is rare. Unlike nerve biopsy, a skin biopsy may be performed in basic health units since it is minimally invasive and easy access procedure. The aim of this study was to analyze the value of dermal nerves in routine histopathology of skin samples as a tool for diagnosis. Fifty skin and nerves samples from patients with PNL and fifty skin samples from patients with non-leprosy peripheral neuropathies were examined with hematoxylin&eosin, Gomori's trichrome and Wade stain. Our results showed that nerves are seen in 91% of skin fragments from patients with leprosy and others neuropathies. Thirty-three per cent were from PNL and had morfological alterations. Confirmatory findings such as acid-fast bacilli (AFB) and other strong suggestive leprosy findings were observed in 28% of the skin samples. Endoneural fibrosis was the major histopathologic alteration (14/50) and can be considered suggestive of leprosy even when seen alone. Microfasciculation was observed in 4% of skin biopsies suggesting it's value as a tool for identification of regenerative nerve process. Thirty-four per cent of the skin fragments had normal appearance. When the skin fragments were compared with the corresponding peripheral nerves, there was agreement in 86% regarding the absence of AFB. Endoneurial inflammatory and epithelioid granuloma were more frequent in nerves than in skin fragments. Unspecific alterations such as perineural thickening and Schwann cell proliferation were showed in 38% of skin fragments. The positive predictive value for diagnosis of PNL were 68,2% in skin fragments. We conclude that histopathologic analysis of skin fragments can be useful as a diagnostic tool for PNL when analyzed by experienced pathologists in referral centers for leprosy treatment.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>XVI</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hanseníase</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 Características gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2 Agente etiológico</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3 Transmissão e patogenia</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Neuropatias</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.1 Nervos periféricos</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.2 Neuropatias com diagnóstico diferencial para a hanseníase</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.3 Neuropatia por hanseníase</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Forma neural pura da hanseníase</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Pele e sistema nervoso cutâneo</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.1 Biópsia cutânea na forma neural pura da hanseníase</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Seleção das amostras</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Processamento histológico das biópsias cutâneas e dos nervos periféricos</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3 Seleção e análise histopatológica dos fragmentos cutâneos...</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Imunomarcção dos fragmentos cutâneos</b> .....	<b>30</b>

3.5	Processamento e análise em cortes semi-finos de fragmentos cutâneos com diagnóstico da forma neural pura da hanseníase.....	32
3.6	Seleção e análise histopatológica dos fragmentos dos nervos periféricos com diagnóstico da forma neural pura da hanseníase	32
3.7	Análise correlativa entre os filetes nervosos e os nervos periféricos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase .....	33
3.8	Avaliação estatística .....	33
3.9	Fluxograma representativo do desenho de estudo.....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1	Local anatômico dos fragmentos cutâneos referentes aos nervos periféricos comprometidos .....	36
4.2	Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos.....	37
4.2.1	Seleção dos fragmentos cutâneos e frequência de filetes nervosos .....	37
4.2.2	Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico final de forma neural pura da hanseníase .....	37
4.3	Imuno-histoquímica dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico de forma neural pura da hanseníase.....	46
4.4	Análise dos cortes semi-finos dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico de forma neural pura da hanseníase.....	47
4.5	Seleção dos fragmentos de nervo periférico de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.....	48
4.6	Análise histopatológica comparativa entre os fragmentos cutâneos e dos nervos periféricos correspondentes dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.....	50
4.6.1	Presença de ML .....	51
4.6.2	Presença do infiltrado inflamatório no endoneuro ....	52
4.6.3	Presença de granuloma epitelióide.....	52

4.6.4	Presença de fibrose no endoneuro .....	52
4.7	Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos de pacientes com diagnóstico final de outras neuropatias .....	55
4.8	Valor da biópsia cutânea no diagnóstico da forma neural pura da hanseníase.....	56
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXO I	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo esquemático do envelope celular do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Espectro clínico da hanseníase. ....	6
<b>Figura 3:</b> Histopatologia do espectro imunopatológico da hanseníase. ....	8
<b>Figura 4:</b> Corte histológico do nervo periférico normal. ....	10
<b>Figura 5:</b> Métodos diagnósticos da forma neural pura da hanseníase. ....	17
<b>Figura 6:</b> Diagrama do sistema sensorial da pele. ....	20
<b>Figura 7:</b> Desenho esquemático dos principais nervos palpáveis, comprometidos pela hanseníase.....	27
<b>Figura 8:</b> Dermátomo. ....	27
<b>Figura 9:</b> Fluxograma de análise dos dados.....	35
<b>Figura 10:</b> Gráfico de distribuição dos nervos biopsiados de 110 pacientes com neuropatia periférica entre os anos de 2004-2014.....	36
<b>Figura 11:</b> Cortes histológicos dos fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.....	41
<b>Figura 12:</b> Nervos cutâneos de pacientes com a forma neural pura da hanseníase. ....	42
<b>Figura 13:</b> Alterações histopatológicas nos nervos cutâneos de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase. ....	44
<b>Figura 14:</b> Corte histológico de fragmentos cutâneos de pacientes com a forma neural pura da hanseníase.....	45
<b>Figura 15:</b> Corpúsculo de Pacini em fragmento cutâneo de pacientes com hanseníase.....	46
<b>Figura 16:</b> Imunomarcção e corte semi-fino em nervo cutâneo de paciente diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase. ....	48
<b>Figura 17:</b> Cortes histológicos dos fragmentos dos nervos periféricos e de pele dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características e especificação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica usando corte em parafina .....	<b>31</b>
<b>Tabela 2:</b> Frequência dos achados histopatológicos observados nos filetes nervosos dos fragmentos de pele de paciente com hanseníase neural pura. ....	<b>40</b>
<b>Tabela 3:</b> Frequência dos achados histopatológicos observados nos nervos periféricos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase..	<b>49</b>
<b>Tabela 4:</b> Frequência de concordância quanto a ausência de qualquer parâmetro (0), à presença de um dos parâmetros (1) e à presença de dois ou mais parâmetros (2) nos fragmentos de pele e de nervo periférico. ....	<b>50</b>
<b>Tabela 5:</b> Frequência dos parâmetros histopatológicos nos fragmentos de pele e de nervo periférico de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase. ....	<b>53</b>
<b>Tabela 6:</b> Frequência dos achados histopatológicos observados nos filetes nervoso das amostras cutâneas de pacientes diagnosticados com outras neuropatias não hansênica. ....	<b>55</b>
<b>Tabela 7:</b> Frequência dos parâmetros histopatológicos nos fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticadas com forma neural pura da hanseníase e de pacientes diagnosticados com outras neuropatias não hansênicas. ....	<b>56</b>
<b>Tabela 8:</b> Frequência detalhada da presença (1) e ausência (0) dos parâmetros histopatológicos que são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase nos fragmentos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase e com outras neuropatias não hansênicas para o cálculo do valor preditivo positivo.....	<b>57</b>
<b>Tabela 9:</b> Frequência detalhada da concordância e discordância dos parâmetros histopatológicos que são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase na análise comparativa entre fragmentos cutâneos e os fragmentos de nervo dos pacientes diagnosticados com hanseníase neural pura. ....	<b>77</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm	Micrômetro
AG	Arabinogalactano
AT	Azul de toluidina
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Forma <i>borderline-borderline</i> da hanseníase
BL	Forma <i>borderline</i> -lepromatosa da hanseníase
BSA	Albumina bovina sérica
BT	Forma <i>borderline</i> -tuberculóide da hanseníase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CS	Células de Schwann
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENH	Eritema nodoso hansênico
ENMG	Eletroneuromiografia
<i>et al.</i>	Do latim, <i>et alia</i> – e outros
FNP/NP	Forma neural pura da hanseníase
GA	Glutaradeído
GalC	Galactocerebrosidase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da célula Glial
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
GGF	Fator de crescimento glial
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina & eosina
HI	Hanseníase indeterminada
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-gama
KCL	Cloreto de potássio
LAM	Lipoarabinomanana
LL	Forma lepromatosa da hanseníase
LM	Lipomanana
Lø	Linfócito



LøMø	Linfocítico-histiocitário
M	Molar
<i>M. leprae</i> (ML)	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC(HLA)	Complexo principal de histocompatibilidade
MI	Mililitro
mM	Milimolar
MnAb	Anticorpo monoclonal
Mø	Macrófago
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCAM	Molécula de adesão celular neural
NGF	Fator de crescimento neural
NGFR	Receptor do fator de crescimento neural
NGFR/p75	Receptor do fator de crescimento neural de baixa afinidade
NGS	Soro de cabra normal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Outras neuropatias (neuropatias não hansênicas)
PB	Paucibacilar
PBS	Tampão de fosfato salino / solução salina tamponada
PcAb	Anticorpo policlonal
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PDIMs	Ácidos micocerosóicos de dimicocerosatos de fitiocerol
PGL	Glicolípídeo fenólico
PGL-1	Glicolípídeo fenólico-1
PGP9.5	Produto proteico do gene 9.5
pH	Potencial de hidrogênio
PNL	<i>Pure neural leprosy</i>
PQT	Poliqumioterapia
RR	Reação reversa
S-100	Proteína S-100
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P

TG	Tricrômico de Gomori
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento-beta
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TLR	Receptor do tipo toll
TMM	Monocilato de trealose
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
Trka	Receptor de tirosina quinase
TT	Forma tuberculóide da hanseníase
WHO	World Health Organization

# INTRODUÇÃO

## 1.1 Hanseníase

### 1.1.1 *Características gerais*

A hanseníase é a doença infecciosa de origem bacteriana que atinge humanos de reconhecimento mais antigo do mundo. É caracterizada por um quadro de inflamação granulomatosa e crônica que acomete a pele e os nervos periféricos, levando a graves alterações motoras e sensitivas e ao desenvolvimento de deformidades e deficiências permanentes (Hansen, 1874; Britton & Lockwood, 2004).

A sua prevalência mundial tem diminuído nos últimos anos devido à ampla campanha de erradicação da doença realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O diagnóstico precoce e o livre acesso ao tratamento com a poliquimioterapia (PQT) a partir de 1995, reduziu tanto a prevalência quanto a incidência de novos casos. Até o começo de 1999, dos 122 países considerados endêmicos, 94 alcançaram a meta de eliminação da doença e a prevalência da hanseníase no mundo foi reduzida em 85% (WHO, 2002). A erradicação é definida pela redução da prevalência da doença para <1 caso por 10.000 pessoas.

Em 2013 a estatística anual registrada nos 103 países endêmicos foi de 215.656 casos, onde 9,2% eram crianças, mostrando que, apesar dos esforços globais, a estimativa de novos casos detectados ainda permanece alta, ainda que limitada a alguns países (WHO, 2014).

Estima-se que mais de três milhões de pessoas no mundo apresentem sequelas decorrentes da hanseníase. Dentre os novos casos registrados em 2013, 13.289 pessoas apresentavam grau 2 de incapacidade. O início tardio do tratamento com PQT ou sua descontinuidade pode ser a causa dessa alta taxa de lesões incapacitantes (Britton & Lockwood, 2004).

O Brasil, depois da Índia, é o país com o mais alto número absoluto de novos casos do mundo. Apesar da taxa de prevalência ter caído 65% últimos 10 anos com implantação da PQT e o coeficiente de detecção tem apresentado tendência à estabilidade, em 2014 foram registrados 31.064 novos casos de hanseníase gerando uma taxa de detecção geral de cerca de 15 casos por 100.000 habitantes (Ministério da saúde, 2014).

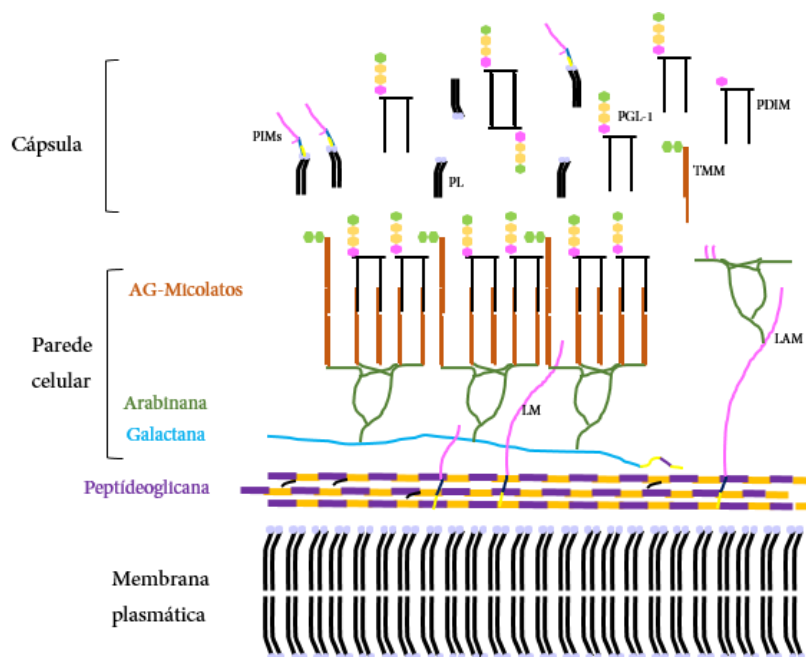
No país, a situação epidemiológica da doença é heterogênea devido à variação de incidências entre as regiões geográficas. Nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste a doença ainda é considerada endêmica (Penna *et al.*, 2009). O Ministério da Saúde reforça a importância do diagnóstico precoce e mais preciso da hanseníase. É crucial que todos os pacientes com a doença recebam o tratamento com PQT interrompendo a cadeia de transmissão da doença, visto que esta, se não reconhecida e tratada a tempo, pode resultar em deformidades e incapacidades permanentes e que reforçam o estigma que ainda hoje acompanha o diagnóstico (Ministério da saúde, 2014). O maior desafio recai sobre os casos em que os bacilos não podem ser identificados no raspado dérmico.

### **1.1.2 Agente etiológico**

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* (ML), um patógeno intracelular obrigatório, pertencente à família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*, classe *Schizomycetes*, descoberto em 1873 por Armauer Hansen e sendo o primeiro patógeno bacteriano identificado em seres humanos (Walker & Lockwood, 2006).

O ML é um bacilo imóvel, álcool-ácido resistente (BAAR), Gram-positivo, que se apresenta na forma de bastonetes levemente curvados, com 1 à 8 micra de comprimento (Rees & Waters, 1972; Brennan & Nikaido, 1995). Pode ser observado individualmente ou em grupamentos denominados “globias”, presentes no interior de macrófagos (Mø) ou das células de Schwann (CS), onde interagem entre si através de uma substância chamada de “gléia” (Hussain, 2007).

A estrutura básica da parede celular do ML é semelhante à composição da parede celular de todas as micobactérias. A membrana plasmática está envolta pela camada interna da parede celular, que é formada por peptidoglicanos, compostos por cadeias alternadas de N-acetilglicosaminas e N-glicosilmurâmico, que se ligam a camada de galactanos por uma ponte de arabinogalactanos (AG). Ligados à camada de galactanos estão as moléculas de arabinano contendo os ácidos micólicos acoplados. A porção externa da bicamada pseudolipídica é constituída por monocilato de trealose (TMM), fiticerol dimicocerosato (PDIM) e glicolipídios fenólicos (PGLs). A cápsula está composta por PGLs e PDIMs que envolve a bactéria e os lipomananas (LM) e lipoarabinomananas (LAM) são observados tanto ancorados à membrana plasmática quanto na constituição da cápsula (Figura 1).



**Figura 1: Modelo esquemático do envelope celular do *Mycobacterium leprae*.** Membrana plasmática está recoberta por uma parede celular acoplada ao galactano por um arabinogalactano. Três cadeias de arabinana estão ligadas a galactana. Ácidos micólicos estão ligados ao terminal arabinana. A cápsula está composta por glicolípídeos fenólicos (PGLs) e outras moléculas como os ácidos micocerasóis de dimicocerasóis fiticero (PDIMs). Lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) são observadas tanto ancoradas à membrana plasmática quanto constituinte da cápsula (adaptado de Scollard *et al.*, 2006).

O domínio lipídico que está associado à especificidade imunológica do ML é o antígeno glicolípídeo fenólico-1 (PGL-1). Este trissacarídeo, ao interagir com o domínio G da cadeia alfa-2 laminina presente na lâmina basal da CS, permite a entrada do bacilo no sistema nervoso periférico e determina o tropismo do patógeno ao nervo (Rambukanna *et al.*, 1997, 2000). Evidências clínicas e histopatológicas já demonstraram que as CS são o principal alvo do ML (Mukherjee & Antia, 1986). A predileção do bacilo pela célula neural traz vantagens à sua sobrevivência, visto que as CS não têm capacidade fagocítica, são incapazes de destruir o patógeno e o acesso aos agentes terapêuticos é limitado pela barreira hematoneural (Boddingius, 1984).

O sequenciamento genômico do ML evidenciou uma perda considerável de genes funcionais quando comparados ao *Mycobacterium tuberculosis*. O ML apresenta um genoma menor, de aproximadamente 3,3 Mb onde apenas 49,5% correspondem a genes funcionais e pseudogenes, enquanto que 90% do gene do *M. tuberculosis* codifica sequências proteicas. As mutações que levaram à redução do genoma resultaram na eliminação de vários caminhos metabólicos, inclusive da maioria dos genes da cadeia respiratória microaeróbica e anaeróbica e numerosos

sistemas catabólicos e regulatórios, deixando o patógeno com genes bem específicos para sua sobrevivência (Cole *et al.*, 2001). São sugeridas diversas causas para a ocorrência desse fenômeno, inclusive as alterações no ambiente em que vive. É possível que um ambiente intracelular estável, rico em substrato, dentro do nicho especializado de Mø e CS dos nervos periféricos do hospedeiro humano, tenha permitido essa adaptação ao ML (Williams *et al.*, 2007; Gómez-Valero *et al.*, 2007; Singh & Cole, 2011).

As tentativas de cultivar o ML em meios de cultura permanecem frustradas até o momento, mas sua multiplicação é possível através do modelo de inoculação no coxim plantar de camundongos (Shepard, 1962) ou no tatu (Ravisse *et al.*, 1984). O tempo de multiplicação dos bacilos é de 13 a 14 dias, permanecendo viáveis, fora do organismo humano, por 36 horas em temperatura ambiente. É provável que as deleções gênicas e as mutações ocorridas no metabolismo, na regulação e no reparo do DNA sejam as causas do insucesso do cultivo do bacilo *in vitro* (Vissa & Bernnan, 2001). Além dos aspectos genéticos, o crescimento do ML é regulado pela temperatura do ambiente no qual se encontra, tendo dificuldade em se multiplicar na temperatura corporal de 37°C. A temperatura ideal para seu crescimento encontra-se na faixa entre 27°C a 30°C, o que explica seu tropismo por áreas mais frias do corpo como a pele, os nervos periféricos e a cavidade nasal (Agrawal *et al.*, 2005). Entretanto, sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, onde o ML pode crescer em locais que apresentem a temperatura corporal elevada, tais como fígado, olhos, testículos, baço e linfonodos (Bernard & Vasquez, 1973; Chen *et al.*, 1976; Suster *et al.*, 1989).

### **1.1.3 Transmissão e patogenicia**

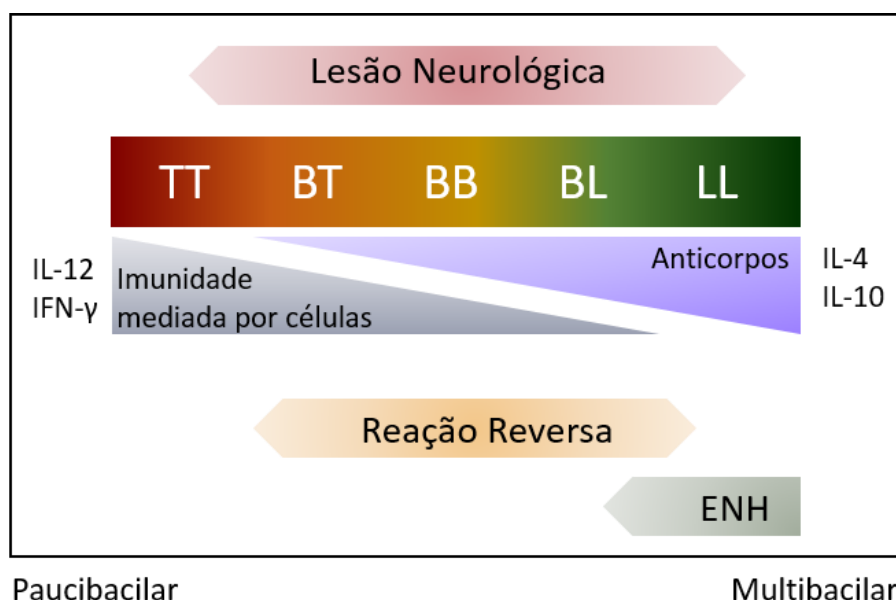
As vias de infecção pelo ML ainda não estão totalmente esclarecidas. Acredita-se que o bacilo penetre no organismo humano por inalação das partículas eliminadas pelas secreções da orofaringe (Pedley, 1975) ou por soluções de continuidade da pele de indivíduos multibacilares antes do início do tratamento (Job *et al.*, 2008). Seres humanos são os principais reservatórios de infecção do bacilo, embora camundongos e tatus também tenham sido considerados reservatórios (Truman *et al.*, 2011).

O bacilo possui alta infectividade e baixa patogenicidade. Estima-se que, dos indivíduos expostos ao bacilo, acima de 95% sejam resistentes ao

desenvolvimento da doença. Uma vez exposto, a proteção imunológica inata do indivíduo é capaz de controlar a infecção e nenhum sinal da doença é desenvolvido (Scollard *et al.*, 2006). Nos indivíduos suscetíveis, a doença pode evoluir para uma das formas do espectro de apresentações clínicas, sendo que o período de incubação do bacilo pode variar entre 2-12 anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos (Araújo, 2003).

As diferentes apresentações clínicas desenvolvidas pelos pacientes estão diretamente relacionadas ao padrão de resposta imunológica que esse paciente é capaz de desenvolver contra o ML. Segundo a OMS, o sistema de classificação operacional compreende duas categorias, a forma paucibacilar (PB), definida pela presença de até cinco lesões cutâneas e apresentando baciloscopia negativa nos esfregaços de pele e a forma multibacilar (MB), definida quando o paciente exibe acima de seis lesões cutâneas e demonstra baciloscopia positiva nos esfregaços de pele (WHO, 1998). Este sistema de classificação é bem simples e útil, principalmente em locais onde não há recursos para obtenção de outras informações.

A classificação proposta por Ridley & Joppling (1966), considera as características clínicas, histopatológicas, baciloscópicas e as variações da resposta imunológica dos pacientes para definir as formas do espectro clínico observado na hanseníase. Segundo essa classificação, podem ser distinguidos dois pólos da doença: em um dos pólos estão os pacientes com forma tuberculóide-tuberculóide (TT) que exibem certa resistência imunológica ao parasita, e no outro pólo estão os pacientes com forma lepromatosa-lepromatosa (LL) que possuem baixa resistência imunológica permitindo que os bacilos se multipliquem livremente. Entre os pólos podem ser identificadas as formas *borderline* classificadas como *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL), cuja apresentação varia de acordo com a proximidade de cada pólo (figura 2) (Walker & Lockwood, 2006).



**Figura 2: Espectro clínico da hanseníase.** TT= forma tuberculóide-tuberculóide; LL= forma lepromatosa-lepromatosa; BT, BB, BL= grupo “borderline”; ENH= eritema nodoso hansênico; IL= interleucina; IFN- $\gamma$ = interferon-gama.

Os pacientes com a forma TT e BT desenvolvem uma resposta imunológica celular, mediada por linfócitos ( $L\theta$ ) T *helper* (Th) tipo 1 com produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e IL-12, responsáveis pela ativação de  $M\theta$  (Spellberg & Eswards, 2001).

Na histopatologia, esta resposta imunológica leva à formação de granulomas bem organizados, raramente contendo bacilos, distribuídos tanto na derme superficial quanto na derme profunda, podendo atingir a hipoderme. Os granulomas são formados por  $M\theta$  e células epitelióides, podendo apresentar células gigantes multinucleadas e intenso infiltrado de linfócitos ao redor. A epiderme se encontra comprometida pelo granuloma (figura 3) (Ridley, 1974). Os nervos podem estar aumentados ou destruídos e a presença de centro caseoso no nervo da derme é um achado importante (Ridley, 1974; Massone *et al.*, 2015). Alguns autores descreveram o uso da proteína S-100 como ferramenta para identificação dos nervos fragmentados pelo processo inflamatório, principalmente nos casos onde o bacilo não é visualizado (Fleury & Bacchi, 1987; Gupta *et al.*, 2006).

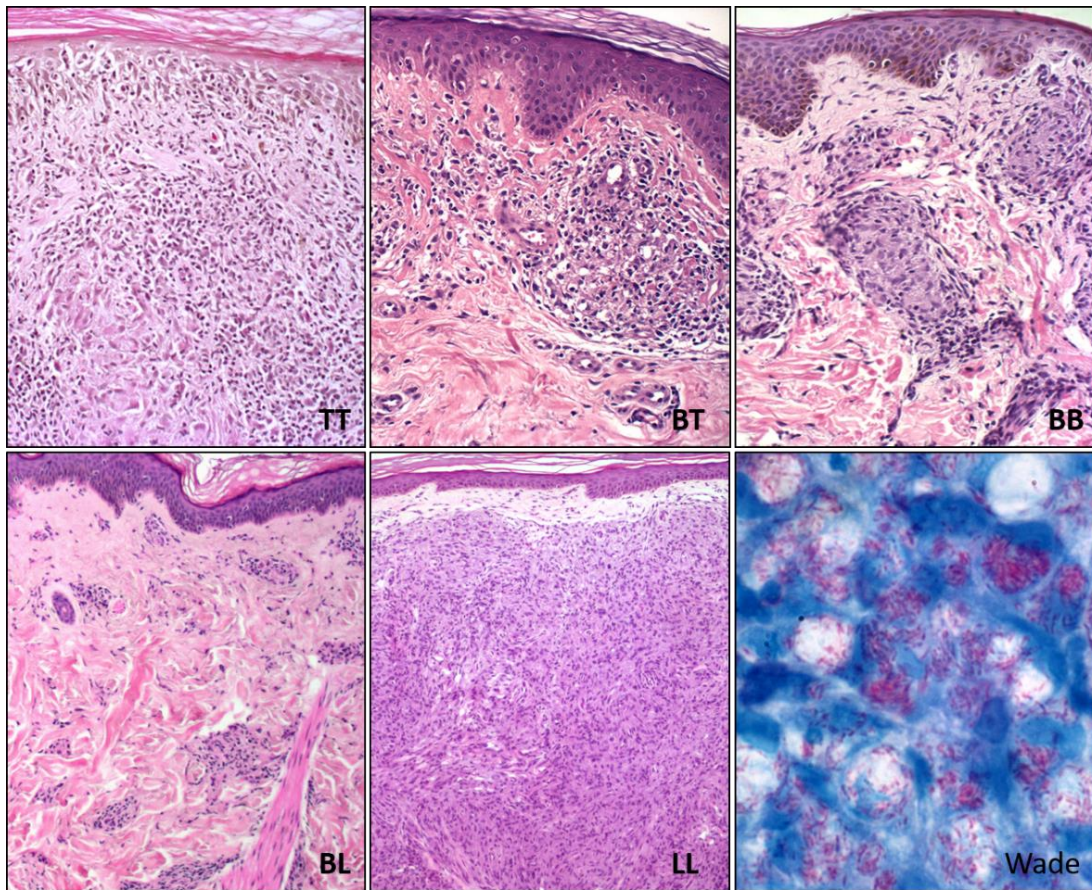
Clinicamente estes pacientes apresentam lesões bem delimitadas, eritematosas ou acastanhadas, com contornos regulares ou irregulares, de aspecto anular ou geográfico, enquanto os troncos periféricos podem aparecer espessados e com dor à palpação principalmente nos casos de evolução com neurite (Talhari *et al.*, 2015). As alterações de sensibilidade térmica, dolorosa ou tátil nestes pacientes são



mais rápidas e intensas, visto que os nervos podem estar parcialmente ou totalmente substituídos pelo granuloma inflamatório (Scollard *et al.*, 2006).

No outro extremo do espectro estão os pacientes com a forma LL. Estes desenvolvem uma resposta imunológica do tipo humoral contra o bacilo, com ativação de linfócitos Th2, produtores de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Yamamura *et al.*, 1992) e com inibição do receptor do tipo *Toll-2* (TLR-2) (Krutzik *et al.*, 2003). A ausência de uma resposta efetora leva à alta carga bacilar observadas no interior de Mø e das CS e ao aumento na produção de anticorpos, principalmente contra o PGL-1, componente específico da parede celular do ML (Cho *et al.*, 2001). Microscopicamente, estes pacientes apresentam a derme difusamente comprometida com macrófagos repletos de bacilos (globias), sem a formação do granuloma epitelióide; linfócitos e plasmócitos podem ser observados dispersos ou agrupados. Os nervos da derme estão rodeados pelo infiltrado inflamatório e apresentam um aspecto normal ou podem estar fibrosado e hialinizados. A laminação do perineuro com formação de “bulbo de cebola” é um achado comum. A epiderme apresenta-se atrofiada com a região sub-epidérmica preservada (faixa de Unna) (figura 3) (Ridely, 1974; Massone *et al.*, 2015). Clinicamente, estes indivíduos desenvolvem lesões numerosas e disseminadas, com infiltração difusa na face e no pavilhão auricular (Talhari *et al.*, 2015).

As formas denominadas *borderline* são instáveis e podem tender a qualquer um dos pólos. Os pacientes BT tendem ao pólo tuberculóide e apresentam maior resistência ao bacilo. Histologicamente formam granulomas de células epitelióides morfológicamente semelhantes as observadas na pele dos pacientes TT, com linfócitos formando um halo ao redor do granuloma. A presença de células gigantes é variável e os nervos podem estar aumentados pela presença do granuloma. A forma BB é a mais instável. Histologicamente a região subepidérmica não é afetada e os nervos geralmente se apresentam como normais, mas pode formar granulomas epitelióides, sem células gigantes e com escasso halo de linfócitos. A forma BL caminham para o pólo lepromatoso e também apresenta maior susceptibilidade à doença. Histologicamente os pacientes BL apresentam granulomas compostos por macrófagos, com poucos linfócitos e plasmócitos. Os nervos geralmente apresentam formação em “bulbo de cebola”. Assim como no pólo LL, o bacilo é frequente nesta forma clínica (figura 3) (Ridely, 1974; Britton & Lockwood, 2004).



**Figura 3: Histopatologia do espectro imunopatológico da hanseníase.** TT- forma tuberculóide-tuberculóide: presença de granuloma epitelióide rodeado por numerosos linfócitos; HE, 100x; BT- “Borderline”-tuberculóide: granuloma epitelióide em derme superficial com halo de linfócitos; HE, 100x; BB- “Borderline-borderline”: focos de granulomas em derme superficial com leve infiltrado de linfócitos e plasmócitos; HE, 100x; BL- “Borderline”-lepromatosa: pequenos granulomas adjacente ao músculo pilo-erector e focos de linfócitos e perivasculares; HE, 100x; LL- lepromatoso-lepromatoso: infiltrado maciço de macrófagos espumosos, contendo numerosos bacilos, ocupando toda derme . Epiderme retificada e faixa de Unna preservada; HE, 100x. Wade: numerosos bacilos álcool-ácido resistentes no interior de macrófagos em paciente com a forma lepromatosa; 1000x.

Os indivíduos que apresentam uma resposta imunológica indiferenciada são denominados de pacientes com hanseníase indeterminada (HI) e podem evoluir para qualquer uma das formas clínicas ou para cura espontânea (Goulart *et al.*, 2002). A pele apresenta lesão única hipocrômica e hipoestésica que histologicamente podem se apresentar como infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário (LøMø) inespecífico, perivascular ou perianexial na derme superficial ou profunda. A presença de mastócitos é aumentada, enquanto que áreas com granuloma estão ausentes. A inflamação perineural é raramente observada, assim como a presença de bacilo (Massone *et al.*, 2015).

As chamadas reações hansênicas são surtos inflamatórios localizados ou sistêmicos, que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento específico da doença. As manifestações reacionais estão relacionadas à carga bacilar e à resposta imunológica do paciente e vêm acompanhadas das neurites (Nery *et al.*, 1998). A

reação do tipo I ou reação reversa (RR) ocorre, principalmente, nos pacientes TT ou BT onde a liberação de antígenos decorrente da destruição dos bacilos leva a exacerbação da resposta imunológica, com intensa produção de citocinas pró-inflamatórias e um quadro reacional de hipersensibilidade. Dados de literatura correlacionam a alta concentração do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) à participação ativa direta ou sinérgica com outras citocinas pró-inflamatórias, como responsável por essa reação inflamatória exacerbada observada na RR (Sarno *et al.*, 1991; Chaitanya *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2015).

A reação do tipo II ou eritema nodoso hansênico (ENH) ocorre nas formas multibacilares LL ou BL e acredita-se que sejam desencadeadas por depósitos de imunocomplexos (Wemambu *et al.*, 1969). Reflete um processo inflamatório agudo, envolvendo qualquer órgão ou tecido em que o bacilo ou seus antígenos estejam presentes com alta expressão de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10 (Vieira *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 1999). Clinicamente os pacientes desenvolvem placas ou nódulos subcutâneos, eritematosos e dolorosos que podem estar associados a sintomas sistêmicos como neurites, artrites, linfadenomegalias e hepato-esplenomegalia (Tolentino *et al.*, 1965).

O envolvimento neural ocorre em todas as formas clínicas da hanseníase, sendo necessária a destruição de, em média, 30% das fibras nervosas para que haja manifestação clínica. Essa agressão pode se estabelecer nas fases iniciais, com o processo inflamatório mais ameno ou nas fases tardias, onde está acompanhada por intenso processo inflamatório (Sarno *et al.*, 2000; Chacha *et al.*, 2009).

## 1.2 Neuropatias

A suspeita clínica para o diagnóstico da hanseníase é baseada em alguns sinais cardinais como a presença de lesões cutâneas hipostésicas, quadro neuropático com espessamento de nervos periféricos e alterações sensitivo-motoras. No entanto, além da hanseníase, outras neuropatias que apresentem manifestações clínicas semelhantes devem ser consideradas como diagnóstico diferencial.

A avaliação clínica e eletroneuromiográfica (ENMG) dos pacientes com neuropatias pode ser complementada com a coleta de fragmento do nervo por procedimento de biópsia. O exame do fragmento neural pode permitir não só o diagnóstico, mas também fornecer informações sobre o tipo de fibra nervosa afetada, o tipo de desmielinização e se está ocorrendo remielinização (Werneck, 1988).

### 1.2.1 Nervos periféricos

A compreensão da organização funcional do sistema nervoso é fornecida através da observação da morfologia e da interação entre os neurônios. Estas características são aplicadas às duas subdivisões do sistema nervoso, o sistema nervoso central (SNC) constituído pelo cérebro e pela medula espinhal e o sistema nervoso periférico (SNP) composto pelos nervos periféricos, com fibras sensitivas, motoras e autônomas interconectadas estruturalmente e funcionalmente (Stermini, 1997). Os principais componentes celulares destes sistemas são os neurônios, capazes de transmitir sinais elétricos sob a forma de potenciais de ação, e as células da glia ou neuroglia, que são determinantes para a formação da arquitetura neural e para transmissão sináptica. No SNP, as CS têm como principais funções fornecer suporte, proteção e nutrição aos neurônios e facilitar a condução dos impulsos nervosos (Doetsch, 2003; Martini & Wilison, 2015). O acúmulo de neurônios do sistema periférico é denominado gânglio nervoso.

Morfologicamente, o nervo periférico é composto por fascículos separados e envolvidos por tecido conjuntivo denominado epineuro. Cada fascículo está envolvido por camadas de células fusiformes especializadas, intimamente unidas entre si chamadas de perineuro, que tem por objetivo sustentar, isolar e proteger os axônios. O endoneuro é constituído por fibras colágenas arranjadas longitudinalmente e sintetizadas por fibroblastos do endoneuro (figura 4). Entremeadado ao endoneuro são observados os axônios mielínicos de vários diâmetros e amielínicos envoltos por prolongamentos das CS e visíveis somente na microscopia ultraestrutural (Shetty, 1997).



**Figura 4: Corte histológico do nervo periférico normal.** A) Fascículo nervoso único apresentando envoltório conjuntivo externo (epineuro) e células especializadas ao redor do fascículo (perineuro); HE, 200x; B) Fascículo nervoso único corado em tricrômico de Gomori, evidenciando os axônios mielinizados (em vermelho). A seta indica o núcleo de uma célula de Schwann; 200x; C) Fascículo nervoso em maior aumento evidenciando o tecido conjuntivo frouxo (endoneuro) que sustenta os axônios; HE, 400x.

A etapa final de diferenciação das populações mielinizantes e não-mielinizantes das CS acontece no final do seu desenvolvimento. Morfologicamente, as CS imaturas e as CS não-mielinizantes são semelhantes assim como a expressão de marcadores moleculares, com exceção da galactocerebrosidase e das integrinas alfa1-beta1 e alfa7- beta1, exclusivo do perfil não-mielinizantes (Woodhoo & Sommer, 2008). No mais, as CS não-mielinizantes envolvem múltiplos axônios de pequeno calibre, formando estruturas chamadas *Remak bundle* e expressam a proteína fibrilar glial ácida (GFAP), o receptor do fator de crescimento neural de baixa afinidade (NGFR/p75) e a molécula de adesão celular neural (NCAM) (Ndubaku & Bellard, 2008). Para o processo de mielinização das CS é necessário que ocorra o rearranjo espacial dessas células com os axônios numa relação de 1:1 e que ocorra o alongamento lateral da célula definindo assim a orientação da membrana axonal que será mielinizada e a face externa que irá secretar a lâmina basal (Simons & Trotter, 2007). Associado as CS mielinizadas e amielínicas no endoneuro, existe uma variedade de tipos celulares que incluem mastócitos, pericitos, células endoteliais e células endoneurais semelhantes a fibroblastos. Essas últimas parecem ter uma atividade potencialmente maior que o fibroblasto comum, com produção de citocinas e atividade fagocítica (Richard *et al.*, 2012).

Para compreender as alterações sintomáticas das neuropatias é preciso entender as principais lesões morfológicas que ocorrem nos ramos nervosos periféricos.

Na neuropatia axonal há degeneração de axônios, afetando quase sempre os de maior calibre, seguindo para os axônios amielínicos com a cronicidade da lesão. São lesões inespecíficas não sendo possível, na grande maioria dos casos, determinar, pela morfologia, a causa da degeneração dos axônios. Os cortes transversais do nervo mostram redução global na população de axônios. Os axônios e suas bainhas de mielina degeneradas são englobados pelas CS ou por Mø e permanecem, temporariamente, como corpúsculos eletrodensos (Vallat *et al.*, 2008). Eventualmente, pode haver regeneração de alguns axônios que, caso sofram remielinização, a mielina formada tem aproximadamente o mesmo diâmetro e espessura e estes formam grupamentos de dois ou mais axônios.

Na desmielinização segmentar há o comprometimento de internodos isolados ou múltiplos da bainha de mielina. O material resultante da degeneração da mielina forma envoltórios de membrana (ovóide de mielina) encontrados no citoplasma das CS e de Mø. A degeneração das fibras motoras com extensa degeneração Walleriana

pode se estender ao glânglio ventral (Martini & Wilison, 2015). O processo pode ser intenso, envolvendo simultaneamente muitos internodos, como na síndrome de *Guillain-Barré* ou pode ter evolução indolente, afetando internodos isolados.

Na neuropatia hipertrófica são observados repetidos ciclos de desmielinização e remielinização nos axônios periféricos. A mielina formada é frágil e degenera facilmente, sendo substituída por outra também fragilizada. No processo, as proliferações dos prolongamentos das CS tendem a se dispor ao redor dos axônios formando estruturas do tipo “bulbo de cebola” visíveis nos cortes histológicos corados em HE (Freitas *et al.*, 1995).

### **1.2.2 Neuropatias com diagnóstico diferencial para a hanseníase**

Diferentes neuropatias podem ser consideradas no diagnóstico diferencial para a hanseníase. A partir do exame clínico, o espessamento de nervos periféricos pode ser encontrado na doença de *Charcot-Marie-Tooth*, na doença de *Déjérine-Sottas* e na doença de *Refsum*. As polineuropatias, com alterações sensitivas, motoras, ou ambas, incluídas como diagnóstico diferencial são a difteria, o botulismo, a mononucleose infecciosa, a brucelose, a porfíria, intoxicação por ouro, além da doença de *Déjérine-Sottas*. A disfunção predominantemente sensitive pode ocorrer na leucemia, doença de Hodgkin e na isquemia neuropática. A perda mista, motora e sensitiva, semelhante à da hanseníase, ocorre na intoxicação por arsênico, brômio, tálio ou mercúrio, por uso de drogas, como isoniazida e talidomida, e nas doenças como o *Diabetes mellitus*, amiloidose, lúpus eritematosos sistêmicos e esclerodermia (Souza, 1997).

As alterações histopatológicas das neuropatias inflamatórias podem mostrar-se similares às alterações observadas nos nervos dos pacientes com hanseníase dificultando a confirmação diagnóstica quando o bacilo não é observado na amostra. Os principais achados histopatológicos de algumas doenças com diagnósticos diferenciais da FNP são (Weis *et al.*, 2012):

1) Neuropatia isquêmica (poliarteritis nodosa; granulomatose de Wegener; síndrome de Churg-Strauss e vasculite): os nervos apresentam degeneração axonal, algum grau de desmielinização segmentar e inflamação perivascular inespecífica que

envolve vasos sanguíneos do perineuro ou endoneuro; raramente é observado vasculite necrosante;

2) Neuropatias infecciosas (difteria, herpes zóster, doença de Lyme desmielinizante, hepatite B): os nervos apresentam degeneração axonal com algum grau de desmielinização segmentar secundária; na doença de Lyme pode apresentar infiltração perivascular de linfócitos e plasmócitos em torno de pequenos vasos sanguíneos do endoneuro, perineuro e epineuro, sem vasculite necrotizante;

3) Neuropatias metabólicas (*Diabetes mellitus*): os nervos demonstram degeneração axonal e desmielinização segmentar. Às vezes pode ser observada uma perda assimétrica de axônios entre e dentro de fascículos do nervo, com grupamentos de axônios regenerados pequenos, hiperplasia endotelial de arteríolas e capilares do epineuro e endoneuro e presença de células inflamatórias perivasculares;

4) Amiloidose: os nervo periférico exibem deposição de substância amiloide em um padrão globular ou difuso dentro de tecidos epineural e endoneural e em torno de paredes dos vasos sanguíneos. Degeneração axonal ativa e grave perda de pequenas fibras mielinizadas e amielínicas são observadas. A coloração de vermelho-congo é útil para a confirmação do diagnóstico.

### **1.2.3 Neuropatia por hanseníase**

A hanseníase é a principal causa das neuropatias não-traumáticas no mundo. Estima-se que mais de um quarto de todos os pacientes hansenícos apresentam algum grau de incapacidade e destes, cerca de metade apresenta lesões neurológicas que podem permanecer mesmo após a eliminação do patógeno (Jardim *et al.*, 2015). O potencial de desenvolvimento das deformidades nas mãos e pés e comprometimento ocular estão associados aos nervos lesionados. A dor neuropática pode ocorrer durante a infecção ou durante o tratamento, e pode persistir mesmo após o término do PQT, compromete a saúde e bem-estar dos pacientes de uma forma devastadora (Nascimento, 2013; Ramos *et al.*, 2014).

A neuropatia hanseniana surge a partir da invasão dos nervos periféricos pelo ML e através das respostas imunológicas a esse patógeno. Dois aspectos devem ser considerados para a compreensão da patogênese da neuropatia hanseniana: primeiro a localização do ML nos nervos periféricos, o qual pode ser encontrado no interior de CS, de MØ endoneurais, de fibroblastos, de células perineurais ou ainda de células

endoteliais (Chimelli *et al.*, 1997; Scollard *et al.*, 2006). No entanto, a CS principalmente amielínica, é o principal alvo do ML (Rambukanna *et al.*, 2002). Como as CS não são fagócitos profissionais, elas apresentam dificuldade em destruir o ML, que ao permanecer no meio intracelular, consegue escapar da ação do sistema imune do hospedeiro e se proteger contra agentes terapêuticos, garantindo sua sobrevivência e replicação (Rambukanna, 2001). Já foi descrito que o ML, uma vez no interior da CS, provoca um processo de desdiferenciação celular com destruição da bainha de mielina, gerando a perda da função axonal e favorecendo a disseminação da infecção (Masaki *et al.*, 2013).

O segundo aspecto de importância para o desenvolvimento da neuropatia hanseniana é a resposta imuno-inflamatória desencadeada pela presença do bacilo. Apesar de não ser uma célula fagocítica especializada, as CS também têm a capacidade de produzir e secretar uma variedade de citocinas, o que reforça seu potencial modulador de resposta imunológica, durante a infecção ou em condições normais. Estudos já detectaram a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-8 por essas células *in vitro* e algumas dessas moléculas também *in vivo*, assim como de outros mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas E2, tromboxano A2, o leucotrieno C4 e a secreção da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (Oliveira *et al.*, 2005; Kieseier *et al.*, 2006). Além disso, a CS infectada é fortemente suscetível ao L $\alpha$  efector CD4+, passando a expressar molécula do complexo principal de histocompatibilidade classes I e II, ICM-1 e CD80, moléculas de superfície envolvidas na apresentação de antígeno. O resultado final consiste numa neuropatia desmielinizante (Scollard *et al.*, 2006) com proliferação de fibroblastos e depósito de colágeno (Job, 1989).

Apesar das CS colaborarem indiretamente com a injúria nervosa, essas células são essenciais para o processo de regeneração do nervo periférico, através da sua influência neurotrófica e neurotrópica (Johnson *et al.*, 2005). O dano neural é seguido de um fenômeno denominado “degeneração Walleriana”, que consiste em uma série de respostas celulares direcionadas para remoção e reciclagem de fragmentos oriundos da destruição celular, gerando assim, um ambiente permissivo para o início da degeneração axonal. Os macrófagos são recrutados para o local comprometido e juntamente com as CS promovem a retirada dos *debris* celulares e desta forma, enquanto a porção distal do axônio sofre degeneração, a região proximal inicia a sua recuperação (Chen *et al.*, 2007).



A neuropatia da hanseníase é geralmente caracterizada pela perda sensitiva parcial ou total nas áreas afetadas pelo nervo comprometido. A lesão pode ocorrer em nível dérmico, onde somente as terminações nervosas finais são afetadas, em nível subcutâneo ou no tronco nervoso. Os nervos motores e autônomos também podem ser afetados. A lesão aos nervos motores gera um quadro de perda de força muscular, paresia, paralisia e atrofia muscular. Quando as fibras autonômicas são afetadas há apresentação clínica de cianose, pele seca e de redução ou ausência de sudorese no local. A função autonômica, assim como o estudo da condução nervosa, é relevantemente mais alterada nos pacientes MB do que nos pacientes PB (Illarramendi *et al.*, 2012; Vital *et al.*, 2012).

Os nervos mais comprometidos pela lesão por hanseníase são o ulnar, o mediano, o auricular posterior, o radial superficial, o fibular comum, o fibular superficial e o tibial posterior (Nascimento, 2013). As apresentações neuropáticas incluem, principalmente, a mononeuropatia (onde somente um nervo é afetado) e a mononeuropatia múltipla (onde dois ou mais nervos são afetados de forma assimétrica), em alguns casos, a polineuropatia (onde muitos nervos são afetados simultaneamente). Em estudo realizado com 20.000 pacientes em cinco continentes, durante 28 anos, Browne (1965) observou que manifestações neuríticas, principalmente a parestesia localizada, apresentando-se como mononeurite ou mononeurites múltiplas, podem preceder as lesões cutâneas por muitos meses.

A mononeuropatia múltipla é a apresentação mais comum observada na hanseníase. O processo inflamatório que atinge os nervos periféricos, leva ao aumento do ramo afetado com dor à palpação. O nervo ulnar é o tronco nervoso mais acometido pela doença e representa cerca de 60% dos casos onde somente um nervo é lesionado (Van-Brakel & Khawas, 1994). Quando existe o envolvimento do nervo tibial posterior, a sola plantar é afetada gerando anestesia, úlcera e, com a evolução do quadro, deformidades severas nos pés com reabsorção óssea (Nascimento, 2013).

Na prática, os testes mais utilizados para o diagnóstico da hanseníase são os testes de sensibilidade tátil com uso do algodão seco ou embebido em álcool, teste de pressão com os monofilamentos de Semmes-Weinstein, teste de sensibilidade térmica usando tubos de ensaio contendo água quente e fria na área hipoestésica ou anestésica e avaliação da força muscular (Ministérios da Saúde, 2002). A principal preocupação do diagnóstico precoce é a prevenção das deformidades incapacitantes.

### 1.3 Forma neural pura da hanseníase

O diagnóstico cardinal da hanseníase inclui a observação das lesões cutâneas hipoestésicas, do quadro de neuropatia e a presença de bacilo nos esfregaços de pele. Contudo, existe um grupo de pacientes onde o comprometimento neurológico pode aparecer sozinho ou anteceder as lesões dermatológicas por meses ou anos (Browne, 1965; Skacel *et al.*, 2000). Esta forma é diagnosticada como forma neural pura da hanseníase (FNP), hanseníase neurítica ou hanseníase neurítica primária e está caracterizada pela presença dos sintomas clínicos do comprometimento sensitivo, parestesia, espessamento do tronco nervoso, dor neural e atrofia muscular com ausência das lesões dermatológicas típicas da hanseníase (Ooi *et al.*, 2004; Walker & Lockwood, 2007).

A FNP é de difícil diagnóstico e sua classificação requer uma análise integrada e minuciosa do paciente. Na verdade, este grupo de pacientes não pode ser classificado de acordo com o sistema de Ridley & Jopling, devido à ausência das lesões cutâneas. Ainda assim, a OMS classifica este grupo como paucibacilar devido à ausência de bacilo no esfregaço cutâneo. Quando existe a suspeita clínica da FNP sua confirmação exige um grupo de neurologistas especializados e métodos de investigação complementares como a eletroneuromiografia (ENMG), testes sorológicos anti-PGL-1, a reação da cadeia de polimerase (PCR) para detecção do DNA do *M. leprae* e a coleta de fragmento do nervo periférico por procedimento de biópsia para análise histopatológica (Chimelli *et al.*, 1997). Essa dificuldade leva, muitas vezes ao atraso no diagnóstico e a evolução sequelante da doença (Rodriguez *et al.*, 1993).

A sua incidência varia entre 1 a 16% dos pacientes dentro de populações de áreas endêmicas (Skacel *et al.*, 2000; Scollard *et al.*, 2006). No Brasil, a prevalência é baixa, mas pode ser subestimada devido à dificuldade no diagnóstico. Em estudo no Instituto Lauro de Souza Lima, no estado de São Paulo, entre 1985-2005, indicou a prevalência de menos de dois casos por ano (Garbino, 2007). Já o Ambulatório Souza Araújo (ASA), Fiocruz, centro de referência no estado do Rio de Janeiro, mostrou que os pacientes FNP correspondiam à 17,1% de todos os casos diagnosticados como hanseníase no período de 1998-2001 (Jardim *et al.*, 2003).

A apresentação mais comum da FNP é o comprometimento de um nervo (mononeuropatia) ou mais nervos (mononeuropatia múltipla) de forma assimétrica, sendo o nervo ulnar o mais afetado (de-Freitas *et al.*, 2004; Jardim *et al.*, 2003; Kumar

*et al.*, 2004). A avaliação eletrofisiológica nos pacientes contribui para a compreensão do comprometimento neurológico da doença. O padrão axonal é o mais comumente observado e representa uma correlação entre a diminuição da condução nervosa e a perda das fibras mielinizadas nos nervos periféricos (Jardim *et al.*, 2004 e 2015). Entretanto, o número de nervos clinicamente envolvidos é variável, visto que o ML tem a capacidade de parasitar um ramo nervoso sem comprometer o ramo adjacente (Mahajan *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2004).

Clinicamente o paciente apresenta sinais e sintomas de comprometimento neural de sensibilidade na forma de parestesia localizada, hipoestesia, anestesia térmica e dolorosa, dor à palpação e espessamento do nervo afetado que podem evoluir para alteração motora (Rodriguez *et al.*, 1993; Garbino *et al.*, 2004; Jardim *et al.*, 2015).

Diante da dificuldade no diagnóstico, principalmente em serviços onde a biópsia do nervo e a ENMG não são realizadas (Garbino *et al.*, 2004), o déficit motor e consequentemente as deformidades tão estigmatizantes, são frequentes na FNP (figura 5) (Jenkins *et al.*, 1990; Mahajan *et al.*, 1996; Girdhar, 1996).



**Figura 5: Métodos diagnósticos da forma neural pura da hanseníase.** A) Avaliação clínica – mão de paciente em apresentando lesão em nervo mediano com reabsorção óssea da falange distal do dedo indicador e ausência de lesões dermatológicas; B) Procedimento cirúrgico de retirada do fragmento do nervo mediano para análise histopatológica.

A análise histopatológica do fragmento neural é considerada um exame chave para diagnóstico da FNP. A interpretação das alterações histopatológicas observadas nos nervos pode ser confirmatória ou fortemente sugestiva de lesão por ML e continua a ser a base para o diagnóstico da FNP. Os achados histopatológicos dos nervos são semelhantes aos observados nos padrões histológicos da hanseníase na pele e dependem da gravidade da doença assim como a presença ou ausência de quadros

reacionais. Entretanto, algumas alterações histopatológicas observadas nos fragmentos de nervo podem ser vistas em outras neuropatias além da hanseníase, em particular na vasculite e na polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (Chimelli *et al.*, 1997).

Dentre os achados histopatológicos, a observação do bacilo é confirmatória do diagnóstico. O bacilo, no entanto, não é encontrado na maioria das biópsias. Em cerca de 20% dos pacientes é possível a observação do bacilo através da coloração de Wade-Fite (Chimelli *et al.*, 1997; Antunes *et al.*, 2012). Quando possível, a microscopia em corte semi-fino do tecido coletado por biópsia permite ainda a visualização do bacilo em outros sítios de infecção além das CS e dos Mø, como as células endoteliais ou no lúmen vascular (Chimelli *et al.*, 1997).

Dentre os achados inespecíficos, porém fortemente sugestivos de lesão por hanseníase estão o infiltrado inflamatório LøMø envolvendo os compartimentos neurais epi-, peri- e endoneuro, a formação do granuloma epitelióide e, nos estágios mais tardios, a substituição do tecido lesado por fibrose e hialinização do endoneuro, gerando completa destruição da arquitetura do nervo e o prejuízo funcional do tecido (Chimelli *et al.*, 1997; Jardim *et al.*, 2004; Antunes *et al.*, 2012).

Quando os achados nos fragmentos de nervo coletados por procedimento de biópsia são inespecíficos ou inconclusivos, o diagnóstico da FNP se dá através da associação entre o exame clínico, a ENMG, a pesquisa do DNA do bacilo através do PCR e a pesquisa do anticorpo anti-PGL-1 (Jardim *et al.*, 2003).

Por ser um antígeno específico do ML a investigação sorológica por Elisa do anti-PGL-1 é um critério bem menos invasivo de investigação da hanseníase e mostrou-se eficaz em 21% dos pacientes diagnosticados com FNP (Jardim *et al.*, 2005). Nos últimos anos, a identificação do ML através de métodos de extração, amplificação e identificação do DNA da espécie pelo PCR tem se tornado mais eficaz, com isso tornou-se uma importante ferramenta para o auxílio ao diagnóstico da FNP (Jardim *et al.*, 2005; Bezerra-da-Cunha *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2014).

A biópsia do tronco nervoso exige a presença de neurologistas especializados e de infra-estrutura somente encontrada em hospitais gerais ou excepcionalmente em alguns centros de referência para o tratamento da hanseníase. De forma diferente, a biópsia cutânea é um exame pouco invasivo e pode ser realizada em procedimento de fácil realização, quando necessário ou para finalidades de pesquisa. Filetes nervosos são observados na maioria dos fragmentos cutâneos coletados para fins

diagnósticos, no entanto, o uso destes como auxílio ao diagnóstico na FNP ainda não foi bem estabelecido (Ura & Barreto, 2004).

A inexistência de um teste único, com garantia elevada para conclusão do diagnóstico, direciona a procura por exames que possam agregar eficiência ao diagnóstico da FNP, uma vez que não existe o padrão-ouro de diagnóstico quando o bacilo não é observado (Bührer-Sékula *et al.*, 2009).

## **1.4 Pele e sistema nervoso cutâneo**

O sistema tegumentar é um órgão complexo que cobre toda a superfície do corpo e está contínua à membrana mucosa dos orifícios naturais. Contabiliza 15% de todo peso corporal e com isso é o maior órgão do organismo humano. A pele exerce múltiplas funções e é a primeira barreira de proteção físico-química do corpo. Está organizada em três camadas bem definidas: a epiderme, a derme composta predominantemente por tecido conjuntivo e seus anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) e a hipoderme ou panículo adiposo (Butnaru & Kanitakis, 2002).

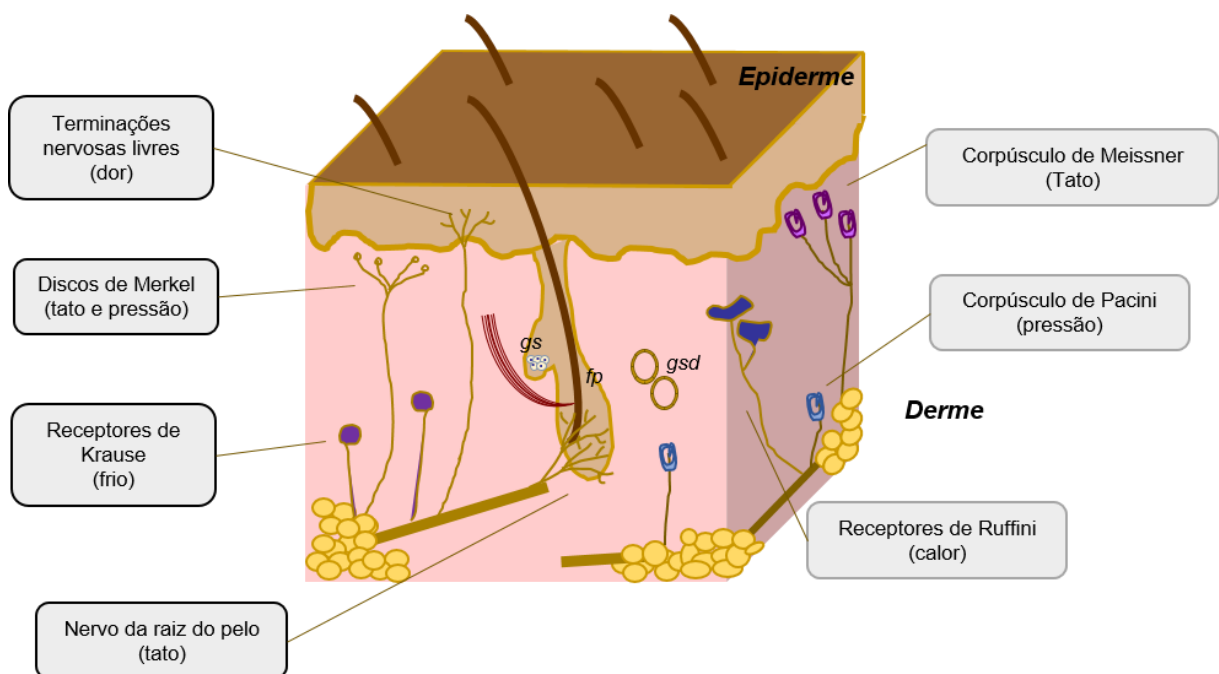
A epiderme é classificada como epitélio escamoso estratificado por possuir diferentes camadas celulares com espessura distinta de acordo com a região do corpo. Basicamente está composta por uma camada mais inferior, denominada de camada basal, seguida pelo estrato espinhoso que pode ter entre 5-15 camadas celulares, estrato granuloso com 1-3 camadas celulares e estrato córneo, contendo de 5-10 camadas celulares (Kanitakis, 2002). Na pele glabra o estrato córneo e o granuloso estão separados por uma camada de células ceratinizadas e compactadas, o estrato lúcido. O ceratinócito é o principal tipo celular presente na epiderme. Já se sabe que, além da função protetora e estrutural, os ceratinócitos são indutores e produtores de citocinas e quimiocinas estimuladoras da resposta imunológica (Sugaya, 2014).

Além dos ceratinócitos, estão presentes na epiderme os melanócitos, distribuídas pela camada basal na proporção de 4:10 células e são responsáveis pela produção do pigmento melânico, conferindo proteção contra os raios ultravioleta. Os melanócitos também são responsáveis pela produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , assim como de quimiocinas (Gasque & Jaffar-Bandjee, 2015). As células de Langerhans são células dendríticas (CD34-positiva), apresentadoras de antígeno e formam a primeira linha de defesa imunológica do corpo.

Os anexos cutâneos são compostos pelas unidades folículos-sebáceas e pelas glândulas sudoríparas. As células das glândulas sudoríparas expressam diferentes marcadores imunohistoquímicos, entre eles a proteína S-100, um importante marcador de identificação das estruturas neurais (Kanitakis, 2002).

O sistema nervoso cutâneo representa uma importante parte do SNP. A pele contém um rico e complexo sistema nervoso que consiste em ramos aferentes e eferentes. Os ramos aferentes pertencem ao sistema cérebro-espinhal e consistem no sistema sensitivo que se originam do gânglio dorsal e se subdividem em dois grupos, os nervos epidérmicos e nervos dérmicos (Malinovský, 1996).

AS terminações nervosas intraepidérmicas consistem em uma rede de terminações nervosas finas, com ramificações livres, pelas CS que ao cruzarem a junção dermo-epidérmica, perdem o perineuro tornando-se células não mielinizadas e nas células de Merkel que ficam na camada basal da epiderme (Fortman & Winkelmann, 1973; Butnaru & Kanitakis, 2002). Na derme, os nervos terminam nos receptores nervosos capilares ou nos receptores sensoriais não-capsulados e encapsulados (Ruffini, Meissner, Krause, Pacini) (Malinovský, 1996) (figura 6).



**Figura 6: Diagrama do sistema sensorial da pele.** Mecanoreceptores: corpúsculo de Pacini; corpúsculo de Meissner, discos de Merkel. Termoreceptores: receptores de Krause (frio); receptores de Ruffini (calor). Nociceptores: terminações nervosas livres. gs- glândula sebácea; gsd- glândula sudorípara; fp- folículo piloso.

Histologicamente as terminações nervosas motoras e sensitivas não são visíveis na coloração de rotina. Elas podem ser identificadas através de marcações imunofenotípicas como o produto protéico do gene 9.5 (PGP9.5), a molécula de adesão celular neural (NCAM), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (SP) (Griffin *et al.*, 2001; Roosterman *et al.*, 2006).

Os nervos dérmicos podem ser reconhecidos devido a sua aparência ondulada onde os axônios são rodeados pelas CS e por fibroblastos perineurais (Kanitakis, 2002).

A presença de fibras nervosas intraepidérmicas e dérmicas já foi demonstrada através de microscopia eletrônica ou de imunofluorescência confocal usando diferentes marcadores neuronais (Reilly *et al.*, 1997; Lauria *et al.*, 2009). As fibras intraepidérmicas são terminações nervosas amielínicas provenientes de células de Schwann que ao penetrarem na epiderme perdem sua camada de mielina ou de fibras nervosas que emergem do plexo nervoso subepidérmico (Wendelschafer-Crabb, Kennedy, 2006)

Existem três padrões predominantes de fibras nervosas na derme. As fibras A $\beta$  são moderadamente mielinizadas e captam os receptores táteis, as fibras A $\delta$  que contém uma fina bainha mielínica e as fibras C que possuem baixa condutividade, são amielínicas e pequenas (Roosterman *et al.*, 2006).

A inervação cutânea consiste, principalmente por fibras nervosas amielínicas (Griffin *et al.*, 2001; Roosterman *et al.*, 2006; Ebenezer *et al.*, 2007), com uma pequena quantidade adicional de fibras nervosa autonômicas, sendo que essas nunca inervam a epiderme. As fibras nervosas sensitivas estão localizadas na derme papilar e intermediária, onde diferentes subtipos de fibras inervam os anexos cutâneos e os vasos sanguíneos, sendo responsáveis também pela inervação do tecido subcutâneo hipodérmico (Steinhoff *et al.*, 2003).

Apesar da baixa incidência de fibras autonômicas na pele, no couro cabeludo e na pele glabra, as fibras nervosas intraepidérmicas possuem uma exclusiva função somática pois sua degeneração só acontece após axotomia ou gangliotomia, mas não depois da simpatectomia (Lauria *et al.*, 2009). Neurofisiologicamente, tanto as fibras C quanto as fibras A $\delta$  respondem a uma variável gama de estímulos físicos como trauma, calor, frio, variações osmóticas, distensão ou estímulos mecânicos e luz ultravioleta, assim como aos estímulos químicos, agentes alergênicos, proteases ou microrganismos (Roosterman *et al.*, 2006).

A pele normal expressa uma variedade de neuropeptídeos que são tanto derivados diretamente dos neurônios sensitivos como derivados dos ceratinócitos, do endotélio microvascular ou dos fibroblastos (Roosterman *et al.*, 2006). Os axônios peptidérgicos expressam o CGRP junto aos outros peptídeos incluindo a SP. Os axônios não-peptidérgicos são indentificados por sua atração à lecitina IB-4 (Ebenezer *et al.*, 2007).

Os axônios amielínicos estão organizados nos feixes de *Remak*. Esses são definidos como formações de células de Schwann não mielinizadas e variáveis números de axônios de fibras C. Existem, pelo menos, três fatores tróficos que afetam os nociceptores de fibras C: o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado da célula glial (GDNF) e o fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1). Os neurônios que dependem do NGF expressam alta afinidade pelo receptor de tirosina quinase (*trkA*), assim como baixa afinidade NGFR/p75 (Griffin *et al.*, 2001). A expressão de ambos é necessária para a regeneração do nervo periférico após injúria (Mendell *et al.*, 1999).

Aproximadamente metade dos nociceptores dos nervos sensitivos dependem do NGF para suporte trófico. O NGF é importante para sobrevivência e inervação do alvo das fibras sensitivas finas. Sua expressão em células como os ceratinócitos indica um possível papel na manutenção e plasticidade dos neurônios sensitivos (Bennet, 2001). A outra metade é sensível aos GDNF e seu receptor c-ret e outros marcadores. Esses marcadores possuem a habilidade de se ligar a lecitina *Griffonia*, a isoleucina B4 e a metade dos ligantes para fusosil marcando a população de neurônios dependentes de GDNF (Griffin *et al.*, 2001).

A maioria dos nociceptores carrega o receptor para capsaicina. Esse receptor vaniloide tipo 1 está relacionado a sensação de dor por calor (>52°C). Existe a hipótese que subpopulação de fibras C, que são os neurônios aferentes não-mielinizados (nociceptores C-polimodais), contenham receptores para capsaina e com isso tornam-se um importante regulador de inflamação (Steinhoff *et al.*, 2003).



### **1.4.1 Biópsia cutânea na forma neural pura da hanseníase**

Como explicado anteriormente, a FNP é de difícil identificação e seu diagnóstico envolve a associação do exame clínico, ENMG, da biópsia do nervo para análise histopatológica do fragmento neural, testes sorológicos e moleculares. A biópsia de nervo é ainda uma das ferramentas principais para o diagnóstico desta forma clínica. Segundo Jacob & Mathai (1988), a FNP só deveria ser diagnosticada através da análise histopatológica do fragmento do nervo periférico comprometido. Entretanto outros autores têm relatado o uso da biópsia cutânea realizada em regiões com alteração de sensibilidade ou próximas ao nervo afetado como ferramenta de auxílio ao diagnóstico da FNP (Suneetha *et al.*, 1998; Menicucci *et al.*, 2005). Diferente da biópsia do nervo, a biópsia cutânea é uma técnica segura, pouco invasiva e que tem fornecido importantes informações sobre fibras nervosas que não são identificadas nos testes neurofisiológicos de rotina (Lauria & Denigilli, 2007). Nas biópsias realizadas na pele pilificada é possível a investigação de fibras amielínicas e das fibras mielinizadas de pequeno calibre enquanto que na pele glabra, permite a investigação das fibras mielinizadas de grande calibre (Lauria *et al.*, 2009).

Alguns estudos em pele hipoestésica ou anestésica, sem lesão dermatológica mostram alterações histopatológicas compatíveis com lesão por hanseníase. Suneetha *et al.*, (1998) reportaram alterações morfológicas em 32,1% das amostras cutâneas em pacientes da FNP. De igual maneira, Menicucci *et al.*, (2005) demonstraram alterações histológicas específicas de hanseníase em 31% dos fragmentos de pele de pacientes com FNP. Quando as alterações inespecíficas foram consideradas e o diagnóstico de hanseníase foi cogitado, esses números subiam consideravelmente (Suneetha *et al.*, 1998; Garbino *et al.*, 2004; Menicucci *et al.*, 2005).

Estudos comparando as alterações histopatológicas observadas nos nervos periféricos e na pele da área hipoestésica têm se baseado, principalmente na identificação do perfil inflamatório e na classificação das lesões segundo o espectro de Ridley & Jopling (Pannikar *et al.*, 1983; Jacob & Mathai, 1988; Kumar *et al.*, 1996; Suneetha *et al.*, 1998; Menicucci *et al.*, 2005).

No presente estudo iremos investigar as alterações morfológicas observadas nos nervos dérmicos e/ou hipodérmicos dos fragmentos cutâneos coletados por procedimento de biópsia, realizadas nas áreas sem lesão dermatológica afetadas pelo

nervo comprometido, de pacientes diagnosticados com a FNP, e compará-las com as alterações morfológicas observadas no fragmento do ramo nervoso periférico correspondente a fim de investigar o valor da biópsia cutânea como ferramenta auxiliar no diagnóstico da FNP.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar o valor da análise histopatológica dos nervos cutâneos no diagnóstico da forma neural pura da hanseníase, quando comparado aos achados histopatológicos da biópsia de nervo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Realizar a análise histopatológica dos fragmentos de pele obtidos por procedimento de biópsia, de pacientes com neuropatias periféricas submetidos as biópsias de nervo periférico e de pele no mesmo ato cirúrgico para verificar a frequência de filetes nervosos;
2. Selecionar os casos diagnosticados como forma neural pura da hanseníase para análise morfológica dos filetes nervosos;
3. Utilizar a técnica de imuno-histoquímica para identificar os fenótipos das células de Schwann e confirmar a presença da estrutura neural cutânea;
4. Utilizar cortes semi-finos para analisar os nervos cutâneos nos casos diagnosticados como forma neural pura da hanseníase;
5. Rever as lâminas histológicas dos fragmentos de nervos periféricos nos casos diagnosticados como forma neural pura da hanseníase e correlacionar com os parâmetros histopatológicos observados nos filetes nervosos das amostras cutâneas;
6. Realizar a análise morfológica dos filetes nervosos nas amostras cutâneas de casos diagnosticados como neuropatias não hanseníacas para calcular o valor preditivo positivo da pele coletada no dermatomo do nervo afetado no diagnóstico da forma neural pura da hanseníase.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

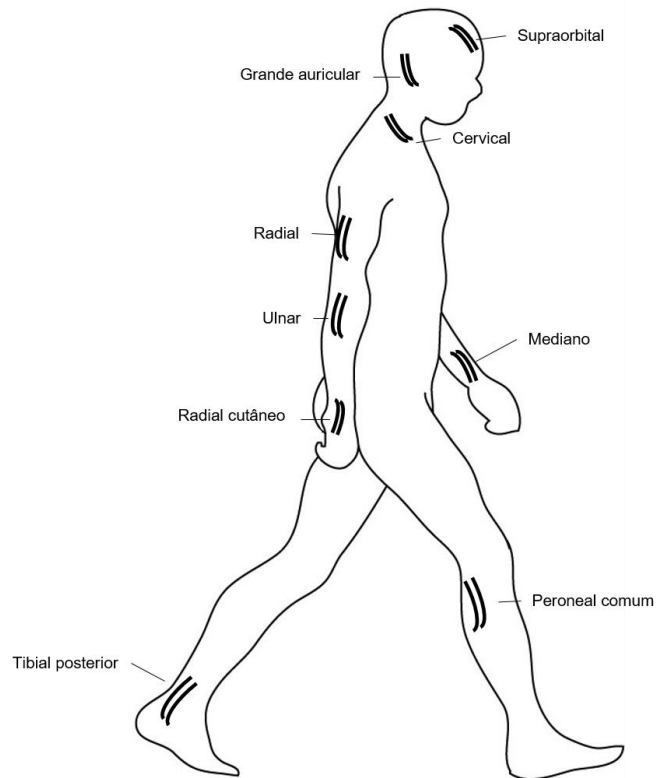
### 3.1 Seleção das amostras

Para o presente estudo foram selecionados 110 pacientes que apresentavam exame clínico e eletroneuromiográfico com suspeita da forma neural pura da hanseníase no período de 2004 a 2014 e que possuíam o fragmento de nervo periférico e o fragmento de pele coletados através de procedimento de biópsia no dermatomo do nervo comprometido, durante o mesmo ato cirúrgico.

A seleção do nervo para a biópsia foi baseada nos seguintes critérios:

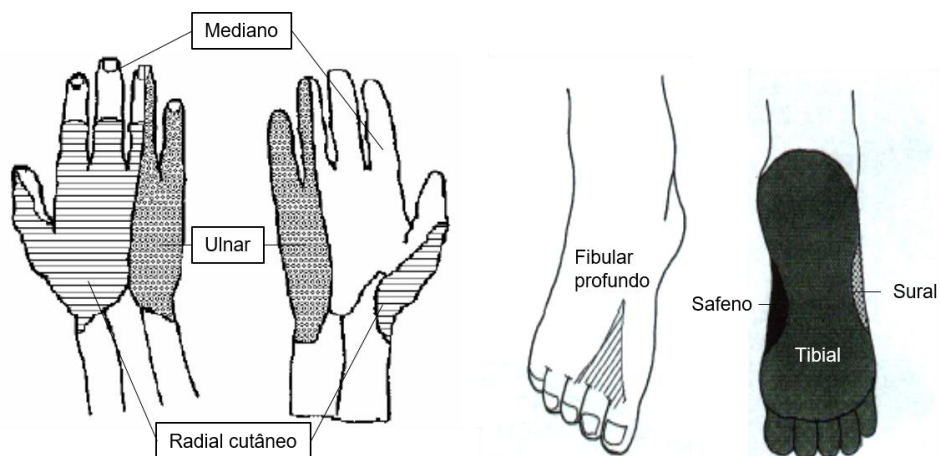
- 1) Pacientes com mononeuropatia: apenas um nervo comprometido com alteração de sensibilidade no território do nervo afetado, atrofia de músculos inervados por este nervo ou apenas alteração do mesmo no exame de eletroneuromiografia. A biópsia foi realizada no único nervo comprometido.
- 2) Pacientes com mononeuropatia múltipla: mais de um nervo comprometido de forma assimétrica, com alteração de sensibilidade nos territórios dos nervos afetados, atrofia de músculos inervados por estes nervos ou alteração dos mesmos no exame de eletroneuromiografia. A biópsia foi realizada no nervo comprometido que apresentou maior alteração clínica e maior alteração no exame de eletroneuromiografia.
- 3) Pacientes com polineuropatia: mais de um nervo comprometido de forma simétrica com alteração de sensibilidade nos territórios dos nervos afetados, atrofia de músculos inervados por estes nervos ou alteração dos mesmos no exame de eletroneuromiografia. A biópsia foi realizada no nervo comprometido que apresentou maior alteração clínica e maior alteração no exame de eletroneuromiografia.

Dessa forma, a depender do nervo afetado, a biópsia do nervo foi realizada nos membros direito ou esquerdo superiores: no ramo cutâneo dorsal do nervo ulnar, ramo digital do nervo mediano e radial cutâneo e nos membros inferiores direito ou esquerdo: nervo sural ou no nervo fibular superficial (figura 7).



**Figura 7: Desenho esquemático dos principais nervos palpáveis, comprometidos pela hanseníase.**

Durante o procedimento cirúrgico foram retirados um fragmento do nervo periférico (7 mm) e um fragmento da pele (*punch* 3 à 5 mm), no dermatomo correspondente ao nervo lesionado, em local sem alteração dermatológica, a fim de se analisar o comprometimento cutâneo da doença (Figura 8). Todas as biópsias foram realizadas pela neurologista Dra. Márcia Jardim, no Ambulatório Souza Araújo - Fiocruz/RJ, em pacientes sintomáticos.



**Figura 8: Dermatomo.** Área da pele inervada por nervos periféricos afetados pela hanseníase. (Adaptado de Brasil, Ministério da Saúde, 2001).

O diagnóstico da FNP foi realizado em pacientes com neuropatias periféricas que, no ato do exame dermatológico, não exibiam lesão cutânea ou histórico de lesão compatível com hanseníase. Além do procedimento de biópsia do nervo periférico e da pele, os pacientes foram submetidos a exames laboratoriais para pesquisa do anticorpo anti-PGL-1 e reação de cadeia de polimerase (PCR) para investigação de DNA de *M. leprae*, para fins do diagnóstico final. Os pacientes com diagnóstico confirmado de hanseníase foram notificados e submetidos a tratamento poliquimioterápico (PQT) conforme recomendação do Ministério da Saúde.

Os fragmentos dos nervos periféricos e de pele foram então clivados em três partes para diferentes processamentos. Uma parte foi fixada em formalina tamponada 10% (Millong) para o processamento histológico de rotina e diagnóstico histopatológico, a segunda foi fixada em glutaraldeído (GA) para microscopia de alta resolução e a terceira parte armazenada em nitrogênio (congelamento) para os ensaios imunológicos e moleculares.

### **3.2 Processamento histológico das biópsias cutâneas e dos nervos periféricos**

Para o exame histopatológico de rotina, os fragmentos fixados em solução de Millong foram processados de acordo com protocolo convencional de técnicas histológicas, cortados com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e coradas na coloração de hematoxilina & eosina (HE) para a avaliação das estruturas tissulares. A coloração histoquímica de tricrômico de Gomori (TG) foi realizada para avaliação da integridade estrutural, como a presença de fibrose e detecção de microfasciculação, e a distinção segura das estruturas neurais. A coloração de Wade modificada do método Ziehl-Nielsen foi realizada para identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

A solução de HE está composta pela (i) hematoxilina de Mayer e (ii) eosina alcoólica. A hematoxilina é um corante que tem afinidade pelas estruturas ácidas da célula resultando na coloração azul do núcleo e regiões acidófilas do citoplasma celular, enquanto que a eosina é um corante que tem afinidade as estruturas básicas do tecido corando de rosa as fibras colágenas e regiões basófilica do citoplasma celular. A coloração de TG está composta pelas soluções: (i) hematoxilina férrica de Weigert; (ii) solução de tricrômico [cromótopo C, verde luz e ácido fosfotúngstico] e (iii) ácido acético 0,5%. Essa coloração é utilizada para o estudo de fibras do tecido

muscular e conjuntivo, corando de vermelho as fibras musculares, de verde o colágeno e o núcleo, cora de azul a preto. Nos nervos, as fibras mielinizadas são coradas de vermelho. A solução de Wade (modificado do método Ziehl-Nielsen) está composta pela (i) fucsina básica; (ii) ácido sulfúrico 20%; (iii) azul de metileno 1%. O ML por ser uma bactéria Gram-positiva, ácool-ácido resistente, se cora numa tonalidade avermelhada pela fucsina, enquanto que as outras estruturas do tecido ficam coradas em azul.

### **3.3 Seleção e análise histopatológica dos fragmentos cutâneos**

Os fragmentos cutâneos selecionados foram aqueles coletados no dermatomo do nervo afetado, em local sem lesão dermatológica, no momento do ato cirúrgico, proveniente de pacientes com neuropatias periféricas, para o diagnóstico diferencial para forma neural pura da hanseníase, no período de 2004 – 2014 (n=110). Para o diagnóstico das formas clínicas foram consultados os bancos de dados que incluíam os resultados da análise histopatológica e as informações gerais dos pacientes, inclusive o seu diagnóstico final. Desta forma foram selecionadas para análise todos os casos contendo o diagnóstico final de FNP do período (n=60) e 50 casos de neuropatias não hansênicas, denominadas de outras neuropatias (ON). A frequência de filetes nervosos observados nos fragmentos de pele foi avaliada através da quantificação de todas as estruturas presentes na derme e/ou hipoderme, onde foi possível a identificação do perineuro e do endoneuro.

A análise histopatológica das biópsias cutâneas se baseou nos parâmetros morfológicos passíveis de identificação nos filetes nervosos através das colorações histoquímicas de HE, TG e Wade e classificadas como presentes ou ausentes, em um ou mais filetes nervosos da amostra, tendo sido avaliados em conjunto. Desta forma foram analisadas três lâminas coradas em HE, uma lâmina corada em TG e uma lâmina corada em Wade, cada uma contendo dois a três cortes sequenciados totalizando 650 lâminas histológicas. Para verificar a frequência dos filetes nervosos em cada biópsia, os cortes histológicos das lâminas foram fotografados em microscópio óptico nas objetivas de 4x, 10x e 40x e comparadas para que o mesmo filete nervoso não fosse quantificado mais de uma vez.

Os critérios histopatológicos selecionados para a análise dos filetes nervosos foram: (a) presença de bacilo álcool-ácido resistente no interior de macrófagos ou de células de Schwann; (b) presença de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (macrófagos e linfócitos) nos componentes neurais (perineuro e/ou endoneuro); (c) formação de granuloma epitelióide na derme e/ou comprometendo o endoneuro; (d) presença de fibrose no endoneuro, tendo sido considerada fibrose o aumento de matriz colagenosa no interior do tecido neural, com diminuição e/ou ausência de fibras nervosas; (e) proliferação das células de Schwann, caracterizada quando pode ser observado a sobreposição nos núcleos celulares em cortes longitudinais dos filetes nervosos; (f) hiperplasia do perineuro, identificada através do aumento no número de camadas de células do perineuro em cortes transversais dos filetes nervosos e (g) presença de microfasciculação, identificada conforme descrito por Antunes *et al.* (2011).

Foram excluídas desta análise as amostras cutâneas que não apresentaram nervos passíveis de identificação dos pacientes diagnosticados com FNP. No final foram analisados os filetes nervosos de 50 fragmentos cutâneos de pacientes com diagnóstico final de FNP e 50 fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticados com ON.

Os fragmentos de pele dos pacientes diagnosticados com ON foram analisadas com base nos mesmos parâmetros histopatológicos selecionados para análise das amostras cutâneas dos pacientes com FNP.

Como padrão morfológico de normalidade, foram selecionadas 16 amostras de pele normal, de doadores saudáveis, coletadas no terço médio do antebraço (20 cm do punho). Estas biópsias foram realizadas pela Dra. Maria Clara Galhardo durante sua tese de doutorado após aprovação do comitê de ética do IPEC/INI. As secções coradas foram examinadas no microscópio óptico (MO) modelo Nikon Eclipse E400 e fotografadas através do programa *Infinity capture X-32*.

### **3.4 Imunomarcção dos fragmentos cutâneos**

A caracterização fenotípica dos componentes celulares das células de Schwann foi realizada, através de ensaios imunohistoquímicos, em 15 amostras de pele que continham filetes nervosos.

Os blocos de parafina foram cortados com 4-5µm de espessura cada e colocados em lâminas tratadas com o adesivo Silano (3-aminopropil-trietoxy-silano)



da marca Knittel. Para a reação, os cortes histológicos foram colocados em estufa 37° C, durante uma noite para, no dia seguinte, ser colocado em estufa a 60° C por 5 minutos. A seguir, a desparafinização foi realizada utilizando três banhos em xilol por 5 minutos, seguidos da re-hidratação em álcool utilizando banhos sucessivos em solução com concentração regressiva (100, 95, 85, 70%) por 5 minutos e depois em água destilada. Para bloquear o efeito da peroxidase endógena, os cortes foram previamente tratados em solução inibidora [solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% em água destilada] durante 30 minutos, em temperatura ambiente e depois imersos em tampão citrato, pH6,0 [3,84 g de ácido cítrico, 48ml de NaOH 1M e 2 litros de água destilada] para a recuperação da atividade antigênica nos cortes histológicos a 96C° durante 30 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS), pH de 7.4 [NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM], tratados em solução inibidora de reações inespecíficas [5% albumina fetal bovina (BSA), 10% soro de cabra normal (NGS), 0,25% TRITON 100X em PBS] e depois incubados a 4° C durante uma noite com anticorpo monoclonal (MnAb) ou policlonal (PcAb) primários testados, diluídos em solução diluidora de anticorpo *Emerald: Antibody Diluent* (Cell Marque-CAT936B-03) (especificações técnicas e diluição constam na tabela 1). Em seguida os anticorpos foram lavados e incubados com polímero *Kit HiDef Detection* (Cell marque-CAT 954D-31/32) durante 40 minutos usando as especificações do fabricante. Após esta etapa, os cortes foram lavados e revelados com diaminobenzidina (DAB, Dako). Antes do exame microscópico, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, montados em goma de Damar e examinados em microscópio óptico (MO), modelo Nikon Eclipse E400 e fotografados no programa *Infinity Capture X-32*.

**Tabela 1: Características e especificação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica usando corte em parafina**

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca/código (reatividade principal)</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Isotipo controle</b>
<b>S-100<sup>1</sup></b>	1:200	Abcan/ ab4066 (células de Schwann mielinizada)	Tampão citrato (pH6.0)	IgG2a (1:200)
<b>GFAP<sup>2</sup></b>	1:1000	Abcan/ab7260 (célula de Schwann não mielinizante)	Tampão citrato (pH6.0)	IgG (1:1000)

1- Anticorpo monoclonal derivado de camundongo; 2- Anticorpo policlonal derivado de camundongo.

### **3.5 Processamento e análise em cortes semi-finos de fragmentos cutâneos com diagnóstico da forma neural pura da hanseníase**

A análise em cortes semi-finos foi utilizada para avaliação minuciosa da pele e tentativa de identificação de outras estruturas neurais não identificadas através da técnica de rotina. Como parâmetro de observação foram avaliados a presença de fibras mielinizadas, perda da mielina dos axônios, presença de fibrose, hiperplasia do perineuro e presença de microfasciculação. Para o estudo das fibras nervosas através do corte semi-fino, foram observadas uma ou duas lâminas, contendo de 6-10 cortes seriados cada, em sete biópsias cutâneas disponíveis para execução dessa técnica.

Resumidamente, para o processamento em corte semi-fino, o material fresco foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2, sendo fixados em solução de 2,5% glutaraldeído (GA) em 0.1M de tampão cacodilato, pH 7,2. A pós-fixação foi realizada em solução de 1% tetróxido de ósmio ( $O_3O_4$ ) 0.1M tampão cacodilato, pH 7,2. Em seguida o material foi desidratado em acetona através de banhos sucessivos de soluções com concentração progressiva (30, 50, 70, 90 e 100%), sendo então incluídas em resina dura (Epon). Após a polimerização dos blocos de resina na temperatura de 60°C, os cortes semi-finos (espessura de 0,5µm) foram corados em azul de toluidine O (AT). As seções coradas foram observadas no microscópio modelo Nikon Eclipse E400 e fotografadas no programa *Infinity Capture X-32*.

### **3.6 Seleção e análise histopatológica dos fragmentos dos nervos periféricos com diagnóstico da forma neural pura da hanseníase**

Os fragmentos de nervo periférico dos pacientes com o diagnóstico final de FNP foram revisados e selecionados aqueles que coincidiam com os fragmentos cutâneos que apresentaram filetes nervosos (n=50).

Na análise, foram utilizados os mesmo parâmetros histopatológicos observados nas amostras cutâneas: (a) presença de bacilo álcool-ácido resistente no interior de macrófagos ou de células de Schwann; (b) presença de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (macrófagos e linfócitos) nos

componentes neurais; (c) formação de granuloma epitelióide comprometendo o endoneuro; (d) presença de fibrose nos compartimentos neurais, tendo sido considerada fibrose o aumento de matriz colagenosa no interior do tecido neural, com diminuição e/ou ausência de fibras mielinizadas; (e) proliferação das células de Schwann, caracterizada quando pode ser observado a sobreposição nos núcleos das células de Schwann nos cortes longitudinais; (f) hiperplasia do perineuro, identificada através do aumento no número de camadas celulares do perineuro ou de matriz colagenosa intercelular e (g) presença de microfasciculação, conforme descrita por Antunes *et al.* (2011). As seções coradas foram observadas no microscópio modelo Nikon Eclipse E400 e fotografadas no programa *Infinity Capture X-32*.

### **3.7 Análise correlativa entre os filetes nervosos e os nervos periféricos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase**

A análise de comparação foi realizada entre os fragmentos cutâneos e os nervos periféricos correspondentes, dos pacientes com diagnóstico final de FNP (n=50) para verificar se havia correlação entre os achados histopatológicos nos dois compartimentos. Para isto foram utilizados os parâmetros que são confirmativos (presença de bacilo álcool-ácido resistente) ou fortemente sugestivos (presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos no interior do endoneuro, formação do granuloma epitelióide e presença de fibrose no endoneuro) de lesão por hanseníase.

### **3.8 Avaliação estatística**

A frequência dos parâmetros que quando observados nos fragmentos dos nervos periféricos são confirmativos (presença de bacilo álcool-ácido resistente) ou fortemente sugestivos de hanseníase (presença de infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário no endoneuro, formação do granuloma epitelióide e presença de fibrose no endoneuro) foi comparada entre os fragmentos cutâneos e os fragmentos dos nervos periféricos utilizando-se tabelas de contingência.

Foram calculadas as proporções de concordância e discordância quanto a (a) ausência de qualquer um dos quatro parâmetros; (b) presença de qualquer um dos

quatro parâmetros; (c) presença de um, e de dois ou mais dos quatro parâmetros. As proporções de concordância dos parâmetros foram calculadas baseadas na presença na pele e presença no nervo; ausência na pele e ausência no nervo e concordância total (ausência ou presença em ambos os fragmentos). As proporções de discordância foram calculadas na presença na pele e ausência no nervo; ausência na pele e presença no nervo e discordância total (ausência ou presença em ambos os fragmentos), bem com o coeficiente de contingência geral. O coeficiente de contingência varia entre 0 e 1, onde 1 indica concordância máxima. Foi utilizado o teste de qui-quadrado (de acordo com Pearson ou Fisher) para verificar a correlação entre os resultados. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

O cálculo do valor preditivo positivo dos parâmetros selecionados na análise dos fragmentos de pele foi feito pela proporção de casos diagnosticados com FNP que exibiam estes parâmetros, entre o total de casos (FNP e ON) que apresentaram os mesmos parâmetros.

### 3.9 Fluxograma representativo do desenho de estudo

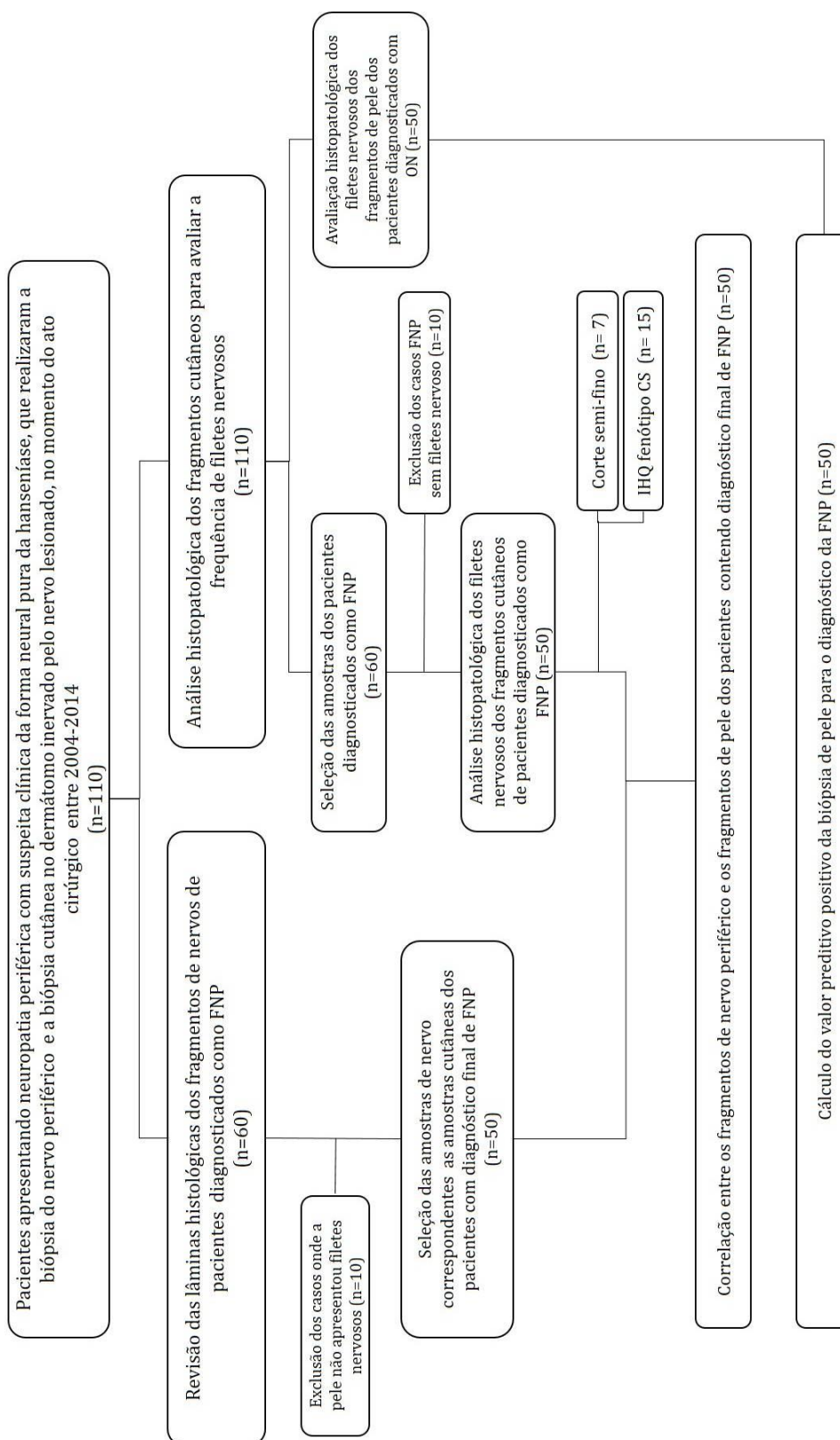


Figura 9: Fluxograma de análise dos dados

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Local anatômico dos fragmentos cutâneos referentes aos nervos periféricos comprometidos

Durante os anos de 2004 a 2014 foram realizadas 395 biópsias de nervos periféricos de pacientes com neuropatias periféricas para o diagnóstico diferencial da forma neural pura da hanseníase ou para o esclarecimento de quadros de neuropatia pós tratamento. Para este estudo foram selecionadas 110 amostras cutâneas coletadas por procedimento de biópsia realizada no dermatomo inervada pelo ramo nervoso comprometido, provenientes de pacientes sintomáticos que tinham suspeita clínica de hanseníase forma neural pura (FNP) e que continham todas as suas informações nos bancos de dados.

As biópsias cutâneas foram realizadas nos membros superiores ou inferiores, de acordo com os critérios de seleção de local para biópsia de nervo periférico utilizada no Ambulatório Souza Araújo (ASA) -Fiocruz. Dessa forma, os fragmentos cutâneos foram retirados dos dermatomos provenientes do ramo cutâneo dorsal do nervo ulnar em 57/110 (52%) casos, do nervo sural em 39/110 (35%) casos, do nervo fibular em 10/110 (9%) casos, do ramo digital do nervo mediano em 3/110 (3%) casos e do ramo superficial do nervo radial em 1/110 (1%) (figura 10). Os pacientes apresentaram idades variando entre 12 e 86 anos, com a idade média de 55,7 anos, onde 68% (75/110) eram do gênero masculino.

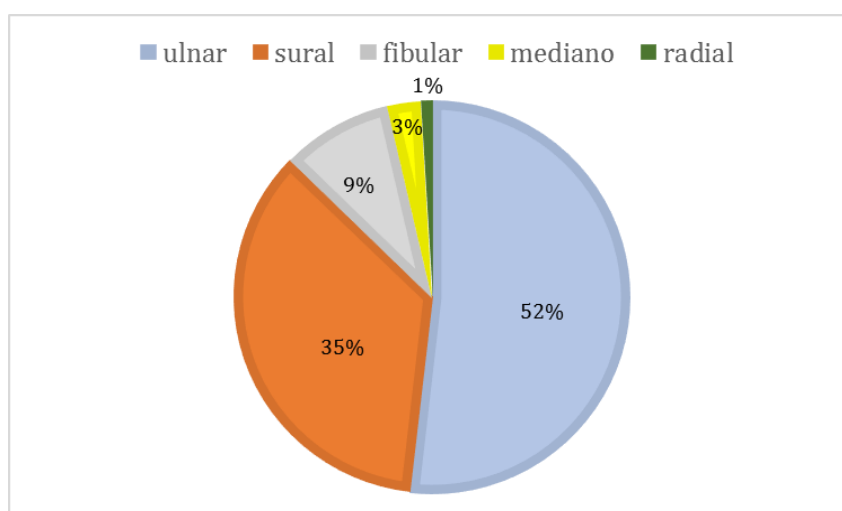


Figura 10: Gráfico de distribuição dos nervos biopsiados de 110 pacientes com neuropatia periférica entre os anos de 2004-2014.

## **4.2 Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos**

### **4.2.1 Seleção dos fragmentos cutâneos e frequência de filetes nervosos**

Os nervos cutâneos são observados na maioria dos fragmentos de pele. As amostras analisadas neste trabalho, através das colorações histoquímicas de HE e TG, corresponderam àquelas coletadas no dermatomo inervado pelo nervo afetado, em local sem alteração dermatológica.

Os filetes nervosos foram observados em 91% (100/110) das amostras cutâneas. Ao todo foram observados 321 filetes nervosos passíveis de análise histopatológica. Entretanto, a ausência de filetes nervosos não exclui o diagnóstico de hanseníase, visto que dez casos onde os nervos não foram observados eram de pacientes diagnosticados com FNP.

Nas 16 amostras cutâneas provenientes de doadores saudáveis, também foram observados filetes nervosos distribuídos na derme ou hipoderme. Ao todo, foram observados 33 filetes nervosos nestas amostras sem qualquer alteração morfológica.

Para fazer a seleção das amostras a serem analisadas, foram consultados os bancos de dados que incluíam os resultados das análises histopatológicas e as informações gerais sobre o paciente, inclusive o seu diagnóstico final. A partir dessa seleção, os casos com diagnóstico final de forma neural pura e os casos diagnosticados como outras neuropatias não hanseníase foram separados para a análise morfológica dos filetes nervosos.

### **4.2.2 Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico final de forma neural pura da hanseníase**

Os casos confirmados de FNP foram diagnosticados através da análise dos fragmentos do nervo ou em associação com a ENMG, testes sorológicos ou moleculares conforme descritos por Jardim *et al.* (2003).

No total, 60 casos tiveram o diagnóstico de FNP. O diagnóstico da FNP contou com o exame de PCR em 78% (47/60) das amostras, onde em 32% (19/60) o

resultado foi positivo e em 45% (27/60) o resultado foi negativo. O exame de PCR é uma valiosa ferramenta para o diagnóstico da FNP, principalmente quando a baciloscopia é negativa e/ou o exame histopatológico é inconclusivo. No entanto, quando o exame se mostra negativo, cabe à avaliação clínica associada ao resultado da ENMG e/ou exame sorológico o diagnóstico final.

Os filetes nervosos foram observados em 83% (50/60) das amostras cutâneas. A presença de filetes nervosos na maioria das biópsias confirma que a avaliação dos fragmentos de pele pode ser uma boa ferramenta de análise da FNP. Estas amostras foram selecionadas para análise histopatológica. Ao todo, havia 166 filetes nervosos distribuídos na derme e/ou hipoderme dos 50 fragmentos. Destes, 62 (37%) apresentaram alguma das alterações morfológicas.

Dentre os critérios histopatológicos observados nos filetes nervosos, foram incluídos aqueles que quando presentes nas biópsias de nervo periféricos, são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por ML, sendo estes: a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), a presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos (LøMø) no endoneuro, a formação de granuloma epitelióide comprometendo os compartimentos neurais e a presença de fibrose no endoneuro. Em 28% (14/50) das biópsias cutâneas foi identificado pelo menos um desses critérios histológicos (Tabela 2).

#### **4.2.2.1 Presença do *M. Leprae***

A identificação do BAAR através da coloração de Wade é patognomônica para o diagnóstico de hanseníase. As amostras de pele analisadas foram realizadas em local sem lesão dermatológica e consideradas normais no exame clínico. No entanto, na análise histopatológica, foi possível a observação do bacilo em 4% (2/50) das amostras. Nesses casos, a presença do ML estava associada ao processo inflamatório LøMø de leve a moderado no perineuro e/ou infiltrando o endoneuro (figura 11A).



#### **4.2.2.2 Presença de infiltrado inflamatório**

Depois da visualização do bacilo, a presença de infiltrado inflamatório LøMø comprometendo os filetes nervosos é o achado mais significativo para o diagnóstico da hanseníase. A presença do infiltrado inflamatório no endoneuro é muito sugestivo de lesão por hanseníase visto que o ML é o único parasita capaz de infectar células de Schwann preferencialmente não mielinizadas.

O infiltrado inflamatório LøMø comprometendo a região perineural foi observado em 18% (9/50) das amostras, sendo que em 6% (3/50) dos casos a presença do infiltrado LøMø foi observado comprometendo o endoneuro (figura 11B). A formação de granuloma epitelióide comprometendo parcialmente ou totalmente os filetes nervosos foi observado em 4% (2/50) das amostras cutâneas (figura 11C).

#### **4.2.2.3 Presença de fibrose**

Apesar da fibrose do nervo periférico ocorrer em outras neuropatias, quando observado em pacientes sintomáticos é um importante fator indicativo para o diagnóstico de lesões por hanseníase. Está caracterizada pela substituição das fibras nervosas degeneradas pelo processo inflamatório por matriz colagenosa, gerando a perda irreversível da função do segmento afetado.

O processo de fibrose do endoneuro foi observado em 28% (14/50) dos fragmentos cutâneos através das colorações de HE e mais seguramente na coloração de TG (figura 11D). Em um (1/14) destes casos, os filetes nervosos encontraram-se totalmente hialinizados (figura 12A). A substituição do tecido neural por tecido conjuntivo também pode ser observada nos cortes semi-finos (figura 12 B).

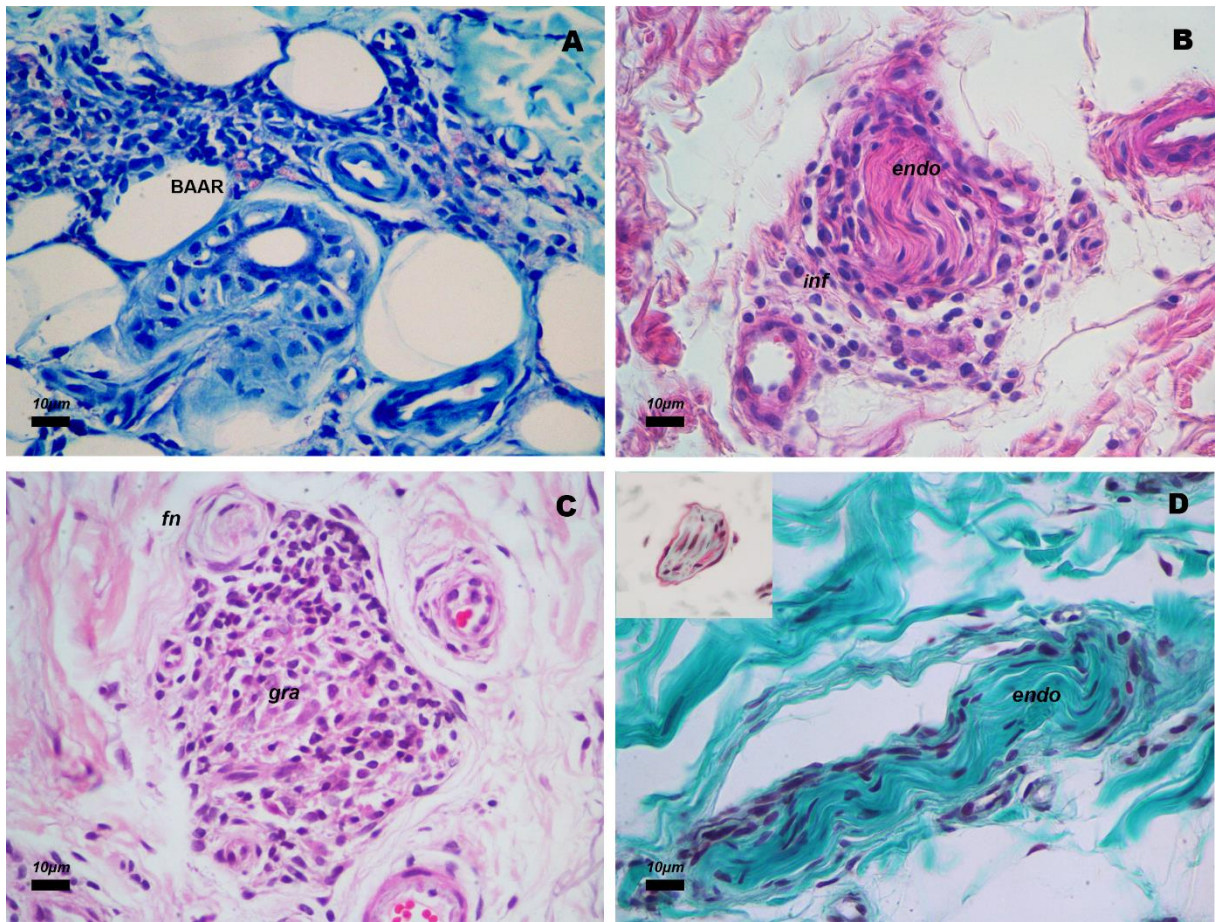
A fibrose do filete nervoso estava associada à presença de infiltrado inflamatório LøMø nos compartimentos neurais em 36% (5/14) dos casos, sendo 5/5 no perineuro e em 3/5 infiltrando o endoneuro. Nas duas amostras cutâneas onde o ML foi identificado, um ou mais filetes nervosos apresentavam o processo de fibrose.

**Tabela 2: Frequência dos achados histopatológicos observados nos filetes nervosos dos fragmentos de pele de paciente com hanseníase neural pura.**

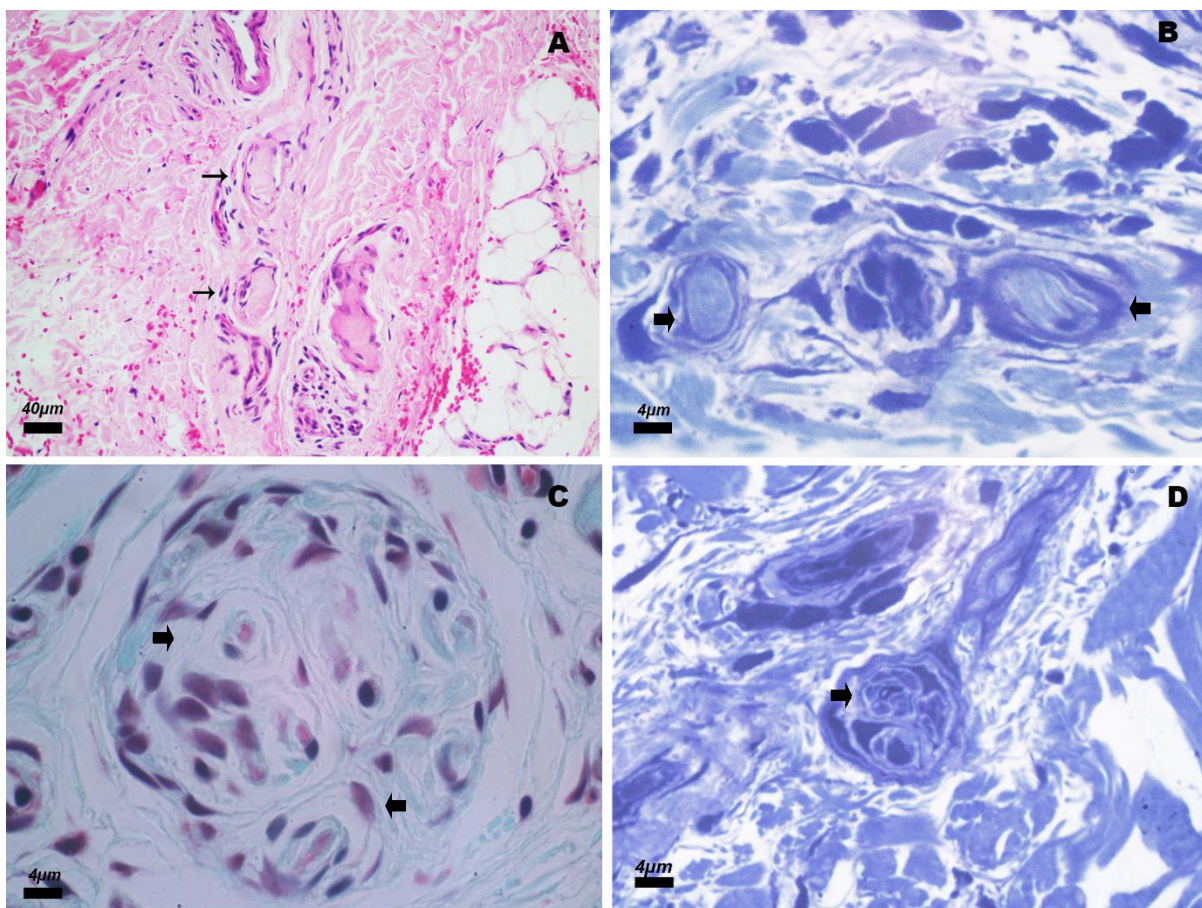
Achados histopatológicos	FNP n (%)
Presença de BAAR	02 (4)
Infiltrado inflamatório LøMø endoneural	03 (6)
Infiltrado inflamatório LøMø perineural	09 (18)
Granuloma epitelióide	02 (4)
Fibrose do endoneuro	14 (28)
Proliferação de células de Schwann	09 (18)
Hiperplasia do perineuro	09 (18)
Microfasciculação	02 (4)
Nervo normal	17 (34)
Total	50 (100)

LøMø= linfócitos e macrófagos

Microfascículos são grupamentos compostos por um número variável de pequenas fibras mielinizadas e não-mielinizadas, circundadas por células perineurais em resposta a uma lesão inflamatória. A microfasciculação foi observada em 4% (2/50) dos fragmentos de pele analisados, demonstrando que a biópsia cutânea pode ser uma ferramenta para identificação do processo de regeneração neural (figura 12 C-D).



**Figura 11: Cortes histológicos dos fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.** A) Presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no interior de macrófagos. Wade; B) Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (inf) comprometendo o perineuro e endoneuro (endo). HE; C) Granuloma epitelióide (gra) comprometendo um filete nervoso. Adjacente observa-se um filete nervoso (fn) em corte transversal com perineuro comprometido parcialmente. HE; D) Corte longitudinal do filete nervoso corado em Tricrômico de Gomori, evidenciando a fibrose do endoneuro (endo). Destaque exhibe um filete nervoso de pele normal corado pela mesma técnica.



**Figura 12: Nervos cutâneos de pacientes com a forma neural pura da hanseníase.** A) Corte histológico mostrando filetes nervosos longitudinais apresentando endoneuro hialinizado (setas) e discreto infiltrado inflamatório linfo-histiocitário perineural e perivascular. HE; B) Corte semi-fino contendo dois filetes nervosos apresentando endoneuro hialinizado (setas). AT; C) Filete nervoso em corte transversal apresentando microfascículos (setas). TG; D) Corte semi-fino de um filete nervoso com formação de microfascículos (seta) englobando axônios mielinizados e amielínicos. AT.

#### **4.2.2.4 Outras alterações histopatológicas**

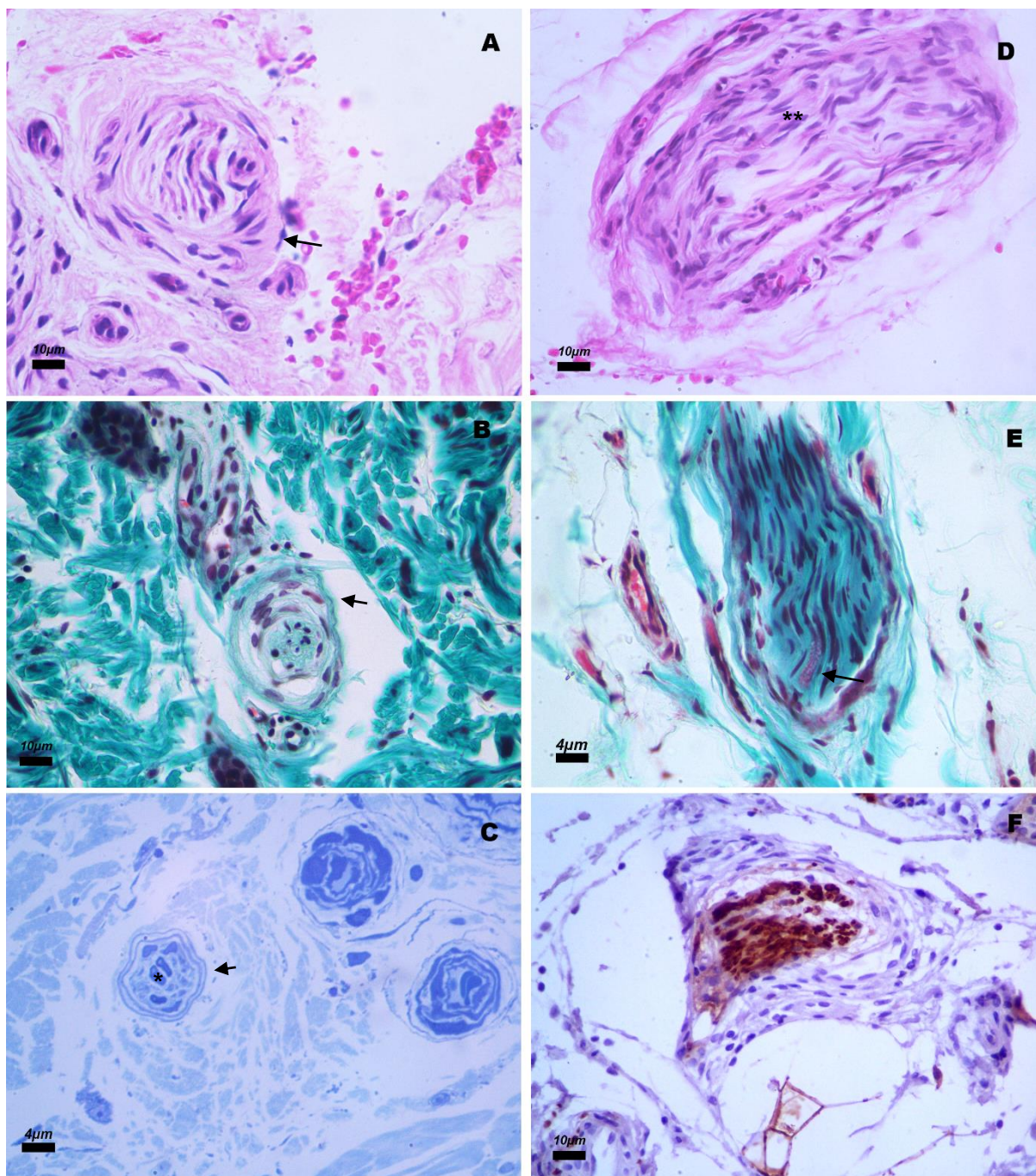
Além dos parâmetros histopatológicos previamente descritos como confirmativos ou fortemente sugestivos de hanseníase, outras alterações consideradas lesões neurais inespecíficas, foram identificadas nos filetes nervosos dos pacientes com FNP. Em 38% (19/50) das amostras cutâneas os filetes nervosos apresentaram lesões neurais inespecíficas e 34% (17/50) das amostras o nervo apresentava aspecto morfológico dentro do normal (Tabela 2).

Dentre os achados morfológicos observados nos filetes nervosos, a hiperplasia do perineuro foi observado em 18% (9/50) das amostras. Essa alteração foi identificada através do aumento no número de camadas celulares nos cortes transversais dos filetes nervosos ou pelo acúmulo de matriz colagenosa no perineuro

(figura 13 A-B). A laminação perineural também foi observada através de cortes semi-finos em filetes nervosos contendo axônios mielinizados e não mielinizados (figura 13C).

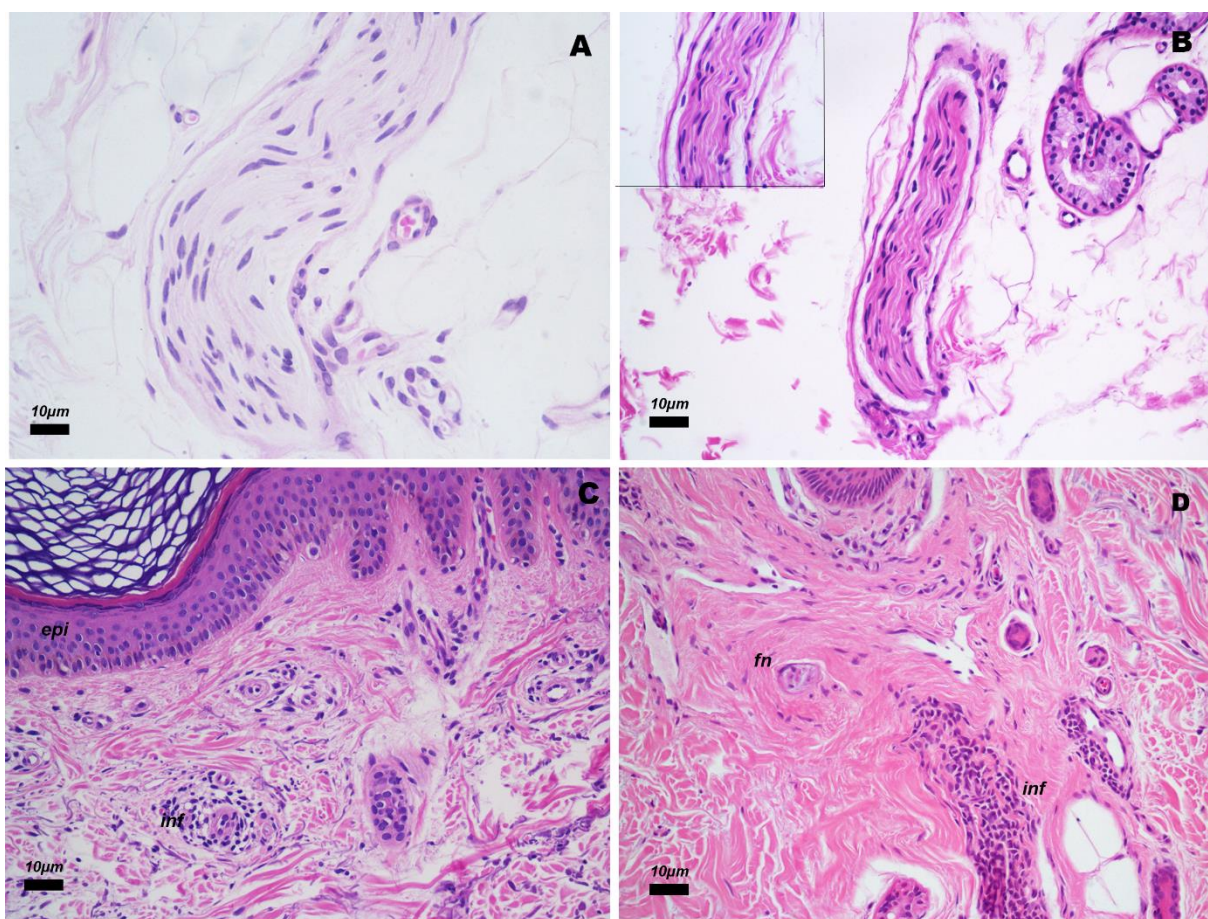
A proliferação de células de Schwann também foi observada em 18% (9/50) das amostras. O número de CS foi considerado aumentado quando foi possível identificar uma sobreposição dos núcleos celulares em corte longitudinais dos filetes nervosos (figura 13D-E). Apesar dos núcleos das CS em filetes nervosos apresentarem semelhança com núcleo de fibroblastos, a marcação imunofenotípica com S-100 confirmou tratarem-se de células neurais (figura 13F).

Em resumo, a análise histopatológica dos fragmentos cutâneos pode fornecer informações relevantes para o auxílio ao diagnóstico de neuropatias periféricas, e a presença destas alterações nos filetes nervosos das amostras de pele de pacientes sintomáticos pode ser sugestiva de lesão por hanseníase.

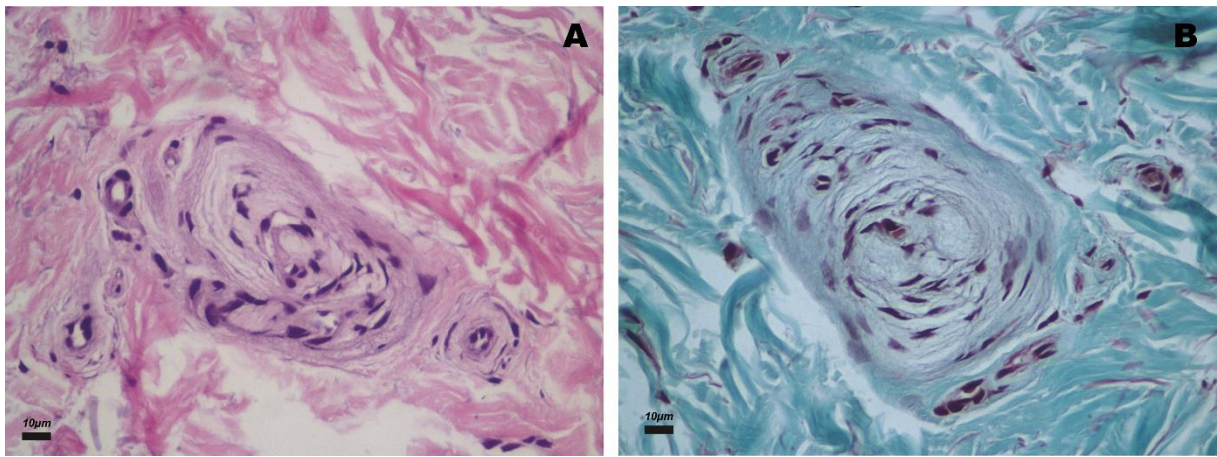


**Figura 13: Alterações histopatológicas nos nervos cutâneos de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.** A-C: Hiperplasia do perineuro. A) Hematoxilina e eosina: filete nervoso em corte transversal exibindo aumento de camada celular do perineuro (seta); B) Tricômico de Gomori: filete nervoso com moderada laminação do perineuro (seta); C) Corte semi-fino: filete nervoso contendo axônios mielinizados (\*) e amielínicos e dupla camada perineural (seta). D-F: Proliferação das células de Schwann. D) Hematoxilina e eosina: filete nervoso em corte longitudinal exibindo aumento e sobreposição dos núcleos das células de Schwann (\*\*); E) Tricrômico de Gomori: filete nervoso em corte longitudinal apresentando sobreposição nuclear e fibras mielinizadas (seta). TG; F) Marcação imuno-histoquímica das células de Schwann pela proteína S-100 para diferenciação dos fibroblastos perineurais.

Em 34% (17/50) dos fragmentos cutâneos os filetes nervosos não apresentaram quaisquer alterações morfológicas, tendo sido considerados nervos normais (figura 14A). Embora o nervo se apresentasse normal, em 4/17 (23%) das amostras foi possível identificar um aumento no espaço subperineurial com discreta presença de fibrina, sugestivo de edema (figura 14B). Quanto à presença de alterações inflamatórias, foi observado que todos os fragmentos exibiram um leve a moderado aumento no infiltrado LøMø da derme superficial, 41% (7/17) das amostras apresentaram um leve aumento do infiltrado inflamatório LøMø ao redor de vasos próximo aos filetes nervosos, e 29% (5/17) das amostras exibiram aumento no infiltrado inflamatório LøMø ao redor dos anexos cutâneos e perivascular na hipoderme (figura 14 C-D). Em um dos fragmentos de pele foi possível identificar o corpúsculo de Pacini na derme profunda (figura 15 A-B).



**Figura 14: Corte histológico de fragmentos cutâneos de pacientes com a forma neural pura da hanseníase.** A) Corte longitudinal de filete nervoso normal. HE; B) Filete nervoso apresentando edema no espaço subperineurial com presença de fibrina (detalhe em maior aumento). HE; C) Derme superficial com leve infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (inf) perivascular. HE; D) Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário (inf) próximo ao filete nervosa (fn) e ao redor dos anexos cutâneos. HE.



**Figura 15: Corpúsculo de Pacini em fragmento cutâneo de pacientes com hanseníase.** A-B) Hematoxilina & eosina e tricrômico de Gomori, respectivamente. Cápula formada por lâminas concêntricas de tecido conjuntivo ao redor do axônio.

#### **4.3 Imuno-histoquímica dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico de forma neural pura da hanseníase**

A fim de confirmar se as estruturas analisadas eram de fato estruturas neurais e qual fenótipo de células de Schwann estava sendo expresso, foram realizadas marcações imunofenótípicas utilizando os anticorpos anti-S100 para o reconhecimento das CS, anti-GFAP para identificação das CS não mielinizadas.

A marcação com anti-S100 foi expresso na maioria dos filetes nervosos. A proteína S-100 é uma substância ubíqua expressa em diferentes tipos de células e por células de Schwann, e mostrou grande valor na identificação dos pequenos filetes nervosos da pele (figura 16A). A marcação anti-S100 foi expressa intensamente nos filetes nervosos que apresentaram proliferação de CS e mostrou-se eficaz para diferenciação dos fibroblastos do perineuro (figura 13F).

A expressão do anticorpo anti-GFAP esteve presente em alguns filetes nervosos (figura 16B). As CS não mielinizadas estão presentes em axônios de pequeno calibre (fibras C) e são os principais componentes do sistema sensitivo cutâneo.



#### **4.4 Análise dos cortes semi-finos dos fragmentos cutâneos dos pacientes com diagnóstico de forma neural pura da hanseníase**

Numa tentativa de identificar outras alterações morfológicas nas fibras nervosas não exibidas através da técnica histológica de rotina, foram incluídos no estudo os cortes semi-finos de sete fragmentos cutâneos processados para análise de microscopia eletrônica.

Em 14% (1/7) das amostras foi identificada a presença de fibras mielinizadas nos filetes nervosos, sugerindo ou a integridade da fibra ou uma remielinização (figura 13C e 16C).

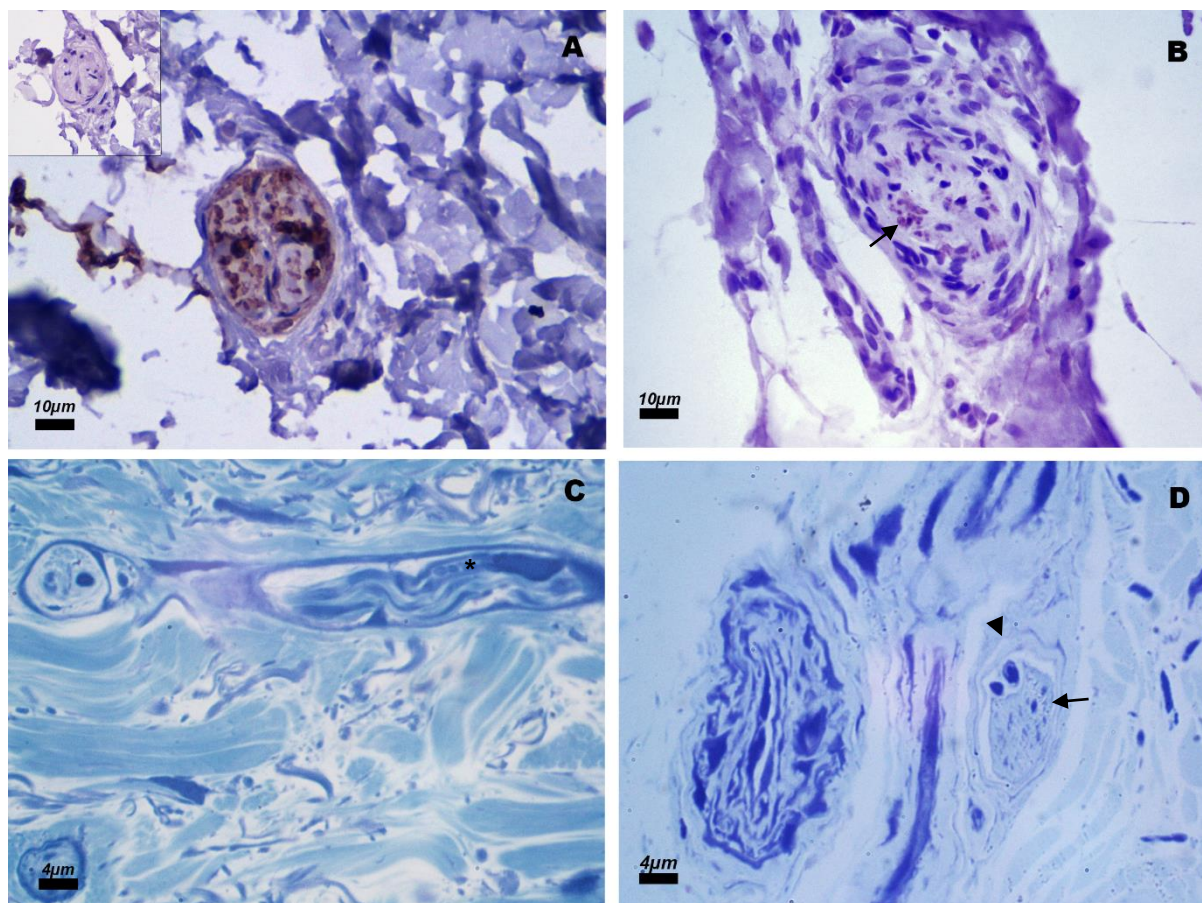
Foi observado que a depleção das células de Schwann ocorreu em 43% (3/7) das amostras. A depleção das células de Schwann foi identificada através da redução do número de fibras mielinizadas em cortes longitudinais ou transversais dos filetes nervosos, visualizada com melhor eficiência através da técnica de cortes semi-finos (figura 16D).

Foi possível observar que 43% (3/7) dos fragmentos apresentavam filetes dérmicos com fibrose no endoneuro e em 14% (1/7) dos fragmentos o endoneuro estava totalmente hialinizado (figura 12B).

A lesão do nervo vem geralmente acompanhada por um processo de regeneração que em alguns casos se apresenta como microfascículos. Nos casos examinados por corte semi-fino, em 14% (1/7) dos fragmentos foi observado a formação de microfascículos (figura 12D).

A hiperplasia do perineuro observado em 57% (4/7) das amostras cutâneas foi identificado através do aumento no número de camadas celulares ao redor do nervo em corte transversais (figura 13C).

As alterações morfológicas que foram observadas através dos cortes semi-finos também foram identificadas através da histopatologia convencional. Ou seja, os achados em semi-fino, neste estudo, não aumentaram a capacidade da biópsia de pele como ferramenta diagnóstica, porém confirmaram as observações da análise histopatológica.



**Figura 16: Imunomarcção e corte semi-fino em nervo cutâneo de paciente diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.** A-B: Imunomarcção: A) Células de Schwann marcado com a proteína S-100 em filete nervoso dérmico. Em destaque está o controle negativo da reação; B) Mesma amostra. Corte transversal de filete nervoso apresentando marcação de células de Schwann amielínicas através do anticorpo GFAP (seta); C-D: Cortes semi-finos. C) Filete nervoso mielinizado (\*) em corte longitudinal; D) Filete nervoso em corte transversal apresentando depleção das células de Schwann (seta) e bicamada perineural (cabeça de seta) AT.

#### 4.5 Seleção dos fragmentos de nervo periférico de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase

Após a análise histopatológica dos fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticados com FNP, os fragmentos dos nervos periféricos destes pacientes foram revisados para verificar a presença das mesmas alterações histopatológicas analisadas nas amostras de pele. Os critérios morfológicos descritos e selecionados foram identificados através das colorações histoquímicas de HE e TG.

Desta forma, através da análise histopatológica, foi observado que 14% (7/50) das amostras apresentaram BAAR, confirmando o diagnóstico de hanseníase. Das alterações sugestivas de lesão por hanseníase, foi observado que 52% (26/50) das amostras apresentaram infiltrado inflamatório LøMø no interior do endoneuro, em 30%

(15/50) das amostras houve a formação de granuloma epitelióide comprometendo os compartimentos neurais e 48% (24/50) dos fragmentos neurais apresentavam fibrose no compartimento endoneural (tabela 4).

As demais alterações histopatológicas observadas nos fragmentos dos nervos periféricos foram a presença do infiltrado inflamatório LøMø nos demais compartimentos neurais, onde em 58% (29/50) das amostras comprometia o perineuro e em 70% (35/50) das amostras comprometia o epineuro. A fibrose do perineuro foi observada em 48% (24/50) dos fragmentos neurais e do epineuro, observado em 60% (30/50) dos fragmentos neurais.

A proliferação das células de Schwann foi caracterizada pela sobreposição de núcleos de fibras mielinizadas nos cortes longitudinais e esteve presente em 24% (12/50) das amostras, a hiperplasia do perineuro foi caracterizada pelo aumento de camadas celulares ou depósito de matriz colagenosa nas camadas celulares e foi observada em 54% (27/50) dos casos. A microfasciculação, conforme descrito por Antunes *et al.* (2011), foi observada em 17% (7/50) dos fragmentos de nervo periférico (Tabela 4).

O exame de PCR foi realizado em 39/50 (78%) amostras com resultado positivo em 32% (16/50) e negativo em 46% (23/50).

**Tabela 3: Frequência dos achados histopatológicos observados nos nervos periféricos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase**

Histopatologia dos fragmentos de nervo FNP	n(%)
Presença de BAAR	7 (14)
Infiltrado inflamatório endoneural	26 (52)
Infiltrado inflamatório perineural	29 (58)
Infiltrado inflamatório epineural	35 (70)
Granuloma epitelióide	15 (30)
Fibrose do endoneuro	24 (48)
Fibrose perineural	30 (60)
Fibrose epineural	24 (48)
Proliferação de células de Schwann	12 (24)
Hiperplasia do perineuro	27 (54)
Microfasciculação	07 (14)
PCR positivo	16 (32)
PCR negativo	23 (46)
PCR N/R	11 (22)

PCR= reação de cadeia em polimerase; N/R= não realizado

A partir da análise histopatológica foi verificado que 64% (32/50) das amostras de nervo exibiam parâmetros histopatológicos confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase. Trinta e seis por cento (18/50) das amostras não apresentavam nenhum desses parâmetros, mas exibiram outras alterações morfológicas de lesão neural consideradas inespecíficas. O diagnóstico de FNP dessas amostras se deu a partir da associação entre os achados de microscopia e os exames de PCR, avaliação clínica e ENMG conforme descrito por Jardim *et al.* 2003.

#### **4.6 Análise histopatológica comparativa entre os fragmentos cutâneos e dos nervos periféricos correspondentes dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase**

Para verificar se havia alguma semelhança entre os achados histopatológicos observados nos nervos periféricos e os achados histopatológicos observados nos filetes nervosos dos fragmentos de pele coletados no dermatomo do nervo afetado, as amostras dos pacientes que obtiveram o diagnóstico final de FNP foram comparadas levando em consideração os parâmetros histológicos que, quando observados nas amostras de nervo periférico são confirmativos (presença de BAAR) ou sugestivos (presença de infiltrado inflamatório LøMø no interior do endoneuro, formação de granuloma epitelióide e presença de fibrose do endoneuro) de lesão por ML.

A comparação foi realizada utilizando as proporções de concordância quanto à ausência de qualquer um dos quatro parâmetros, a presença de pelo menos um dos quatro parâmetros e a presença de dois ou mais desses quatro parâmetros (tabela 5).

**Tabela 4: Frequência de concordância quanto a ausência de qualquer parâmetro (0), à presença de um dos parâmetros (1) e à presença de dois ou mais parâmetros (2) nos fragmentos de pele e de nervo periférico.**

		PELE n(%)			Total
		0	1	2	
NERVO n(%)	0	17 (34)	1 (2)	0 (0)	18
	1	5 (10)	3 (6)	0 (0)	8
	2	14 (28)	5 (10)	5 (10)	24
Total		36	9	5	50

Na análise pode-se observar que em 34% (17/50) dos casos, houve concordância com relação à ausência de qualquer um dos parâmetros histológicos selecionados para análise tanto ao nervo periférico, quanto à pele, sugerindo que a análise histopatológica baseada somente nesses quatro parâmetros não é suficiente para a conclusão do diagnóstico da FNP.

A presença de um parâmetro (9/50) ou a presença de dois ou mais parâmetros (5/50) não mostrou diferença significativa na frequência de casos comprometidos. Isso pode sugerir que a observação de um dos parâmetros histológico na pele de paciente sintomático pode auxiliar ao diagnóstico da FNP. Na análise do nervo periférico, a presença de dois ou mais parâmetros (24/50) mostrou ser mais eficiente para o diagnóstico da FNP.

Em 6% (3/50) dos casos houve concordância quanto à presença de um dos quatro parâmetros tanto no nervo periférico, quanto na pele e em 10% (5/50) dos casos, foi observada a concordância quanto à presença de dois ou mais parâmetros tanto no nervo periférico quanto na pele.

A partir desses resultados, calculamos separadamente as proporções de presença e ausência de cada um dos parâmetros no nervo e na pele, dos 50 casos diagnosticados com FNP (Tabela 6 e anexo I-tabela 8).

#### **4.6.1 Presença de ML**

É sabido que a presença de BAAR no interior das CS ou de macrófagos é patognomônica para o diagnóstico da hanseníase quando observados tanto no nervo periférico quanto na pele.

Quando comparamos a presença desse parâmetro entre as amostras dos 50 pacientes com diagnóstico final de FNP, observamos que houve concordância em 86% (43/50) dos casos quanto a ausência do bacilo tanto no nervo quanto na pele, e em 4% (2/50) houve concordância quanto à sua presença (figura 17A-B). Em nenhuma amostra a presença do bacilo foi observado somente na pele, enquanto que em 5 casos (10%), a presença do bacilo foi observada somente no nervo.

Dessa forma, podemos supor que, apesar da presença de bacilo ser o padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase, é um parâmetro pouco confiável quanto analisado individualmente.

#### **4.6.2 Presença do infiltrado inflamatório no endoneuro**

Na análise comparativa quanto à presença de infiltrado inflamatório LøMø no endoneuro, observamos que em 48% (24/50) dos casos houve a concordância quanto à ausência de inflamação tanto no nervo quanto na pele e 6% (3/50) dos casos concordavam quanto à sua presença (figura 17C-D). Em nenhuma amostra a inflamação endoneural foi observada somente na pele, enquanto que em 23/50 amostras (46%), a presença do infiltrado inflamatório foi observada somente no nervo.

A presença do infiltrado inflamatório no endoneuro dos nervos periféricos é um parâmetro fortemente associado a lesão por hanseníase. No entanto, a ausência deste, tanto no nervo, quanto na pele, não pode ser um parâmetro de descarte para a presença da enfermidade. Na pele, a presença de infiltrado inflamatório LøMø é um parâmetro pouco confiável quando analisado individualmente.

#### **4.6.3 Presença de granuloma epitelióide**

Na avaliação da formação de granuloma epitelióide comprometendo o endoneuro, observamos que em 70% (35/50) dos casos houve concordância quanto à ausência desse parâmetro tanto no nervo periférico quanto na pele, e em 4% (2/50) dos casos houve concordância quanto à sua presença em ambos os compartimentos. Em nenhuma amostra houve formação de granuloma epitelióide somente na pele, enquanto que em 26% (13/50) das amostras este parâmetro pode ser observado somente no nervo (figura E-F).

A formação de granuloma epitelióide comprometendo os nervos é um forte indicativo de lesão por hanseníase, no entanto, a ausência deste, tanto no nervo, quanto na pele, não pode ser um parâmetro de descarte para a presença da infecção. Na pele, é um parâmetro pouco confiável quando analisado individualmente.

#### **4.6.4 Presença de fibrose no endoneuro**

A presença de fibrose nos fragmentos de nervo periférico é um achado histopatológico comum nas lesões neurais por hanseníase. A análise comparativa quanto à presença de fibrose no endoneuro dos fragmentos de nervo periférico e nos filetes nervosos da pele concordou em 42% (21/50) quanto à ausência de fibrose em

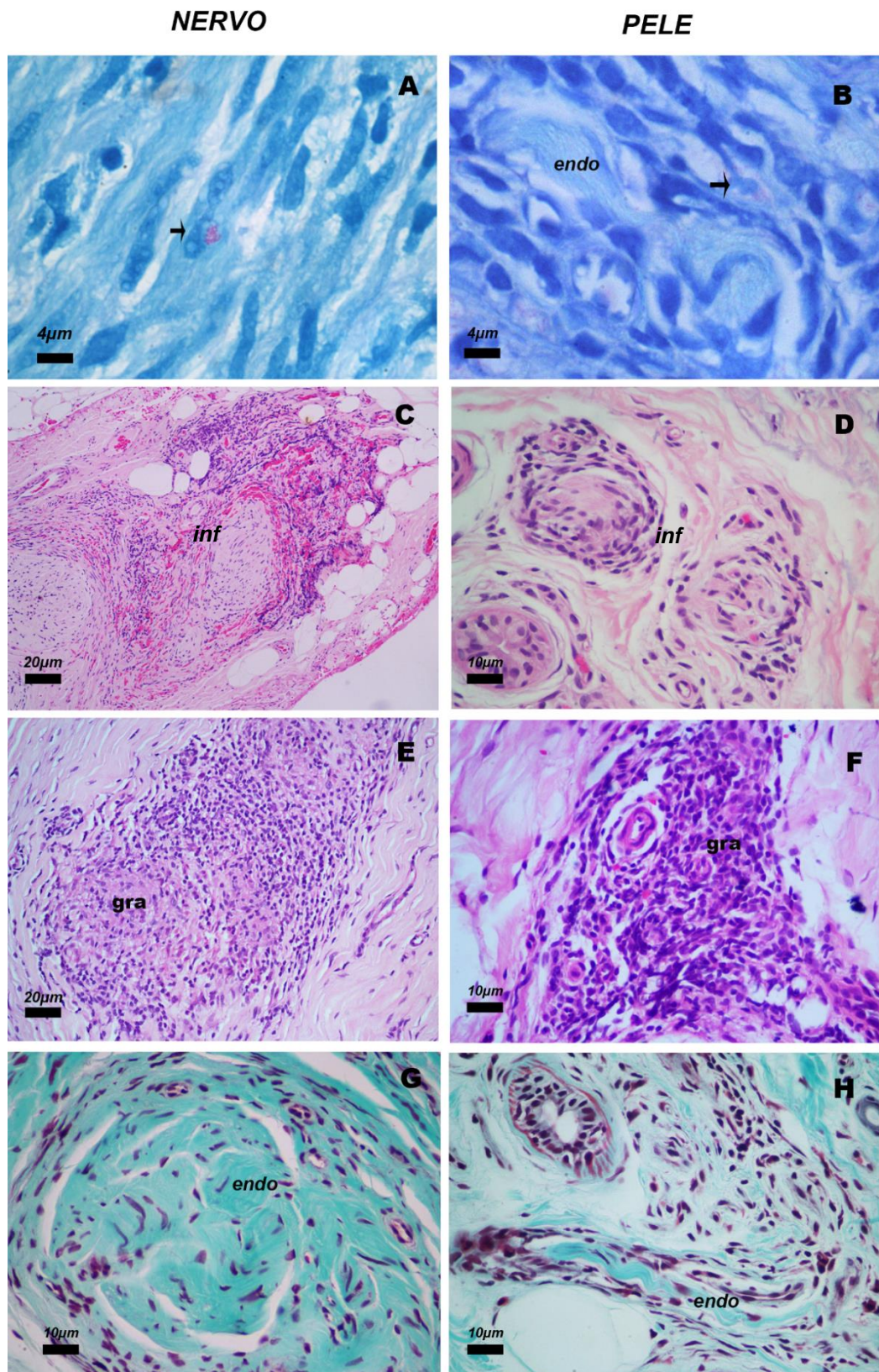
ambos os compartimentos, e em 18% (9/50) quanto à presença de fibrose tanto no nervo quanto na pele. Em 10% (5/50) a presença de fibrose foi observada somente nos filetes nervosos da pele, enquanto que em 30% (15/50) a fibrose neural esteve presente somente no nervo (figura 17 G-H).

Dessa forma, podemos sugerir que a presença de fibrose nos filetes nervosos é um parâmetro sugestivo para o diagnóstico da FNP da hanseníase quando observado nos fragmentos de pele.

**Tabela 5: Frequência dos parâmetros histopatológicos nos fragmentos de pele e de nervo periférico de pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.**

n=50	Presença		Ausência	
	Pele n(%)	Nervo n(%)	total n(%)	
Presença de BAAR	2 (4)	7 (14)	43 (86)	<i>p=0,17</i>
Infiltrado LøMø endoneuro	3 (6)	26 (52)	24 (48)	<i>p=0,23</i>
Granuloma epitelióide	2 (4)	15 (30)	35 (70)	<i>p=0,09</i>
Fibrose endoneuro	14 (28)	24 (48)	21 (42)	<i>p=0,21</i>

BAAR= bacilo álcool-ácido resistentes; LøMø= linfócitos e macrófagos



**Figura 17: Cortes histológicos dos fragmentos dos nervos periféricos e de pele dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase.** A-B) Presença do bacilos álcool-ácido resistentes (setas) no interior de células de Schwann e macrófago dérmico, respectivamente. Fragmento cutâneo apresentando o filete nervoso (endo) no centro do infiltrado inflamatório. Wade; C-D) Infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário (inf) perineural e endoneural. Fragmento cutâneo apresentando dos filetes nervosos comprometidos por linfócitos. HE; E-F) Granuloma epitelióide (gra) no endoneuro do tronco nervoso e fibrose no perineuro. Na derme o granuloma comprometia totalmente o filete nervoso. HE; G-H) Fibrose no endoneuro (endo) com leve infiltrado inflamatório mononuclear na região perineural. TG.



#### 4.7 Análise histopatológica dos fragmentos cutâneos de pacientes com diagnóstico final de outras neuropatias

As alterações histopatológicas observadas nos filetes nervosos das 50 amostras cutâneas analisadas dos pacientes com outras neuropatias não hansênicas (ON) estão descritas na tabela 3.

Nenhuma amostra exibiu bacilo ou apresentou infiltrado inflamatório LøMø no endoneuro. A formação de granuloma epitelióide foi observado em uma das amostras, próximo aos vasos da derme profunda. Apesar da biópsia de nervo ter sido inconclusiva neste caso, a presença do granuloma na pele levanta a possibilidade de este ser um caso de hanseníase não confirmado onde deverá ser realizada uma nova investigação.

Em 14% (7/50) das amostras um ou mais filetes exibiam fibrose do endoneuro. No entanto, a presença de fibrose nos filetes nervosos mostrou ser menos prevalente em fragmentos cutâneos dos pacientes com ON do que nos fragmentos cutâneos dos pacientes com FNP.

Um leve infiltrado LøMø pode ser observado ao redor de estruturas neurais em 6% (3/50) dos fragmentos cutâneos.

**Tabela 6: Frequência dos achados histopatológicos observados nos filetes nervoso das amostras cutâneas de pacientes diagnosticados com outras neuropatias não hansênica.**

Achados histopatológicos	n (%)
Infiltrado inflamatório LøMø perineural	3 (6)
Fibrose do endoneuro	7 (14)
Proliferação de células de Schwann	4 (8)
Hiperplasia do perineuro	4 (8)
Granuloma	1 (2)
Nervo normal	37 (74)

LøMø= linfócitos e macrófagos

#### 4.8 Valor da biópsia cutânea no diagnóstico da forma neural pura da hanseníase

Em posse dos resultados da análise histopatológica dos fragmentos cutâneos e dos achados comparativos com os fragmentos dos nervos periféricos e da análise histopatológica das peles de paciente diagnosticados com outras neuropatias não hanseníacas, fomos verificar o valor da biópsia de pele como ferramenta para o diagnóstico da FNP através do cálculo do valor preditivo positivo (VPP). O cálculo foi baseado nos parâmetros histopatológicos que são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase.

Foi relatado anteriormente que 28% dos casos diagnosticados com FNP apresentavam alterações histopatológicas sugestivas de hanseníase, enquanto que 16% dos casos diagnosticados como ON apresentavam algum dos mesmos parâmetros histopatológicos. No entanto, quando todos os parâmetros histopatológicos foram analisados, pode-se perceber que os pacientes com FNP apresentavam o dobro ou mais de casos apresentando alterações sugestivas de hanseníase enquanto que os pacientes diagnosticados com ON apresentavam o mais do dobro de casos onde os nervos estavam normais (tabela 7).

**Tabela 7: Frequência dos parâmetros histopatológicos nos fragmentos cutâneos de pacientes diagnosticadas com forma neural pura da hanseníase e de pacientes diagnosticados com outras neuropatias não hanseníacas.**

Achados histopatológicos	ON n (%)	FNP n (%)
Presença de BAAR	0 (0)	2 (4)
Infiltrado inflamatório LøMø endoneuro	0 (0)	3(6)
Infiltrado inflamatório LøMø perineuro	03 (6)	09 (18)
Granuloma	01 (2)	02 (4)
Fibrose do endoneuro	07 (14)	14 (28)
Proliferação de células de Schwann	04 (8)	9 (18)
Hiperplasia do perineuro	5 (8)	9 (18)
Nervo normal	37 (74)	17 (34)
Total	50 (100)	50 (100)

FNP= forma neural pura; ON= outras neuropatias; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente; LøMø= linfocítico-histiocitário

A presença de bacilo nas amostras cutâneas é confirmativa de lesão por hanseníase, mesmo quando não observado no nervo periférico e um parâmetro de exclusão para outras neuropatias.

Foram então analisados os parâmetros que são sugestivos de hanseníase, mas que também são observados em outras neuropatias (Tabela 8). O VPP nas amostras de pele de pacientes com FNP da presença de infiltrado inflamatório LøMø no endoneuro foi de 100%. No entanto, é necessário aumentar o número de casos com a realização de biópsias em pacientes com FNP para que esse parâmetro, sozinho, possa ser sugestivo de lesão por ML. O mesmo ocorre com a formação de granuloma epitelióide comprometendo os filetes nervosos. A formação de granuloma sem a observação do ML necessita de maiores informações para confirmação ou exclusão de hanseníase.

A fibrose do endoneuro mostrou ser um importante parâmetro histológico de confiabilidade nas amostras cutâneas de pacientes com FNP. Apesar de ser observado em outras neuropatias, a sua frequência foi duas vezes maior nos pacientes com FNP. A presença de fibrose nas amostras cutâneas dos pacientes com FNP obteve um valor preditivo de 67%, o que nos permite especular que sua presença, mesmo quando observado individualmente, pode ser sugestiva de FNP.

**Tabela 8: Frequência detalhada da presença (1) e ausência (0) dos parâmetros histopatológicos que são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase nos fragmentos dos pacientes diagnosticados com a forma neural pura da hanseníase e com outras neuropatias não hansenicas para o cálculo do valor preditivo positivo.**

	FNP n(%)	ON n(%)	Total n(%)	P valor
BAAR				
0	48 (49)	50 (51)	98 (100)	<i>p=0,49</i>
1	2 (100)	0 (0)	2 (100)	
Infiltrado LøMø endoneuro				
0	47 (48,5)	50 (51,5)	97 (100)	<i>p=0,24</i>
1	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Granuloma epitelióide				
0	48 (49,5)	49 (50,5)	97 (100)	<i>p=0,56</i>
1	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)	
Fibrose				
0	36 (45,6)	43 (54,4)	79 (100)	<i>p=0,14</i>
1	14 (66,7)	7 (33,3)	21 (100)	
Total n(%)	50 (50)	50 (50)	100 (100)	

FNP= forma neural pura; ON= outras neuropatias; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente; LøMø= linfocítico-histiocitário

Considerando a presença de pelo menos um dos quatro parâmetros selecionados, o VPP da amostra de pele para o diagnóstico da FNP foi de 68,2%.

## 5 DISCUSSÃO

A hanseníase, denominação brasileira para a lepra, continua a ser um desafio à ciência moderna no contexto dos próprios fundamentos de uma doença infecciosa, destacando a impossibilidade de identificação do bacilo em um grupo de pacientes acometidos pela doença. Dentre estes, os denominados paucibacilares, a forma neural pura (FNP) é a de mais difícil diagnóstico, visto que, além da dificuldade de identificação do bacilo, as lesões cutâneas típicas da doença estão ausentes (Jopling & Morgan-Hughes, 1965; Uplekar, Antia, 1986). A doença se apresenta então como uma neuropatia periférica que faz diagnóstico diferencial com outras enfermidades.

Embora as características clínicas e eletrofisiológicas possam ser indicativas da doença quando examinadas por especialistas experientes, somente a análise do fragmento do nervo coletado por procedimento de biópsia pode confirmar o diagnóstico na maioria dos casos (Jacob & Mathai, 1988; Chimelli *et al.*, 1997). Esta dificuldade em diagnosticar a FNP poderia explicar a baixa prevalência desta forma clínica e a alta prevalência das deficiências e incapacidades físicas observadas nessa forma clínica (BRASIL, 2008b). Segundo Garbino (2007) em estudo realizado em um centro de referência em São Paulo, a incidência foi de cerca de dois casos ao ano. No Ambulatório Souza Araújo os pacientes diagnosticados com FNP correspondiam a 15% do total de pacientes que realizaram biópsia de nervo durante o período deste estudo e, apesar do serviço funcionar como centro de referência para o município e estado do Rio de Janeiro, este valor pode não representar a real frequência de casos dentro do contexto da doença.

Tendo em vista a dificuldade de se identificar o bacilo no nervo biopsiado, métodos moleculares, utilizando sequências específicas do ML, como a reação de cadeia por polimerase (PCR), foram adicionados como auxílio ao diagnóstico (Martinez *et al.*, 2014), contribuindo assim na confirmação da FNP em 32% (16/50) dos casos analisados no presente estudo. Infelizmente, embora o PCR seja um método com alta especificidade e sensibilidade, não consegue confirmar todos os casos paucibacilares mesmo aqueles apresentando lesão cutânea (Barbieri *et al.*, 2014).

A análise histopatológica dos fragmentos de nervo periférico é extremamente heterogênea na FNP variando de lesões inflamatórias graves à total fibrose do tecido. Apesar de ser considerada a principal ferramenta para o diagnóstico da FNP, Chimelli *et al.* (1997) chamam a atenção ao fato de que, num mesmo nervo, pode acontecer

que somente um dos fascículos esteja microscopicamente alterado, visto que o ML é capaz de parasitar somente um fascículo poupando os demais. Este aspecto, quase patognomônico da hanseníase, se expressa na ENMG como uma dispersão temporal, também bastante sugestiva da doença. Nestes casos, somente a correlação entre o quadro clínico, epidemiológico e a ENMG podem confirmar o diagnóstico (Jardim *et al.*, 2004; 2015).

Os achados clínicos na FNP também são variáveis. São observadas alterações sensitivas e motoras de modo semelhante ao que ocorre nas lesões neurais observadas nas formas clínicas onde as lesões dermatológicas estão presentes (Sckacel *et al.*, 2000; Pimentel *et al.*, 2004; Jardim *et al.*, 2015). Os nervos acometidos são geralmente os mesmos que nos pacientes com lesões cutâneas, sendo os membros superiores os mais acometidos. Neste estudo, em 50% dos casos da FNP houve o comprometimento do nervo ulnar, em 36% do nervo sural, em 6% dos nervos fibular e mediano e em 2% do nervo radial, achado semelhante aos de outros autores (Nascimento *et al.*, 2013; Sarker *et al.*, 2015). No entanto, Vital *et al.*, (2013) indicaram que a neuropatia do nervo mediano pode ser o primeiro sintoma da hanseníase.

Embora a análise do fragmento do nervo obtido por procedimento de biópsia tenha um papel chave no diagnóstico da FNP, este procedimento só pode ser realizado em centros especializados, obedecendo as normas de pequenas cirurgias, e no estado do Rio de Janeiro se limita aos hospitais gerais e excepcionalmente ao Ambulatório Souza Araújo-Fiocruz, creditado pelo *International Joint Commission-IJC*.

A biópsia cutânea é uma técnica segura, pouco invasiva e de fácil realização. As amostras cutâneas são capazes de fornecer informações sobre fibras nervosas não identificadas nos testes neurofisiológicos de rotina (Lauria & Denigilli, 2007).

Neste contexto fomos analisar o valor da biópsia cutânea ao diagnóstico da FNP através da histopatologia de rotina, inserida em um grupo de neuropatias periféricas.

As neuropatias periféricas apresentam causas heterogêneas que variam de genéticas a danos traumáticos ou inflamatórios, e estão associadas a uma variedade de sintomas clínicos com alterações motoras, sensitivas ou disfunções autonômicas. Visto que as alterações morfológicas, a degeneração axonal e os processos regenerativos ocorrem nos nervos cutâneos antes do aparecimento dos sintomas clínicos no curso das neuropatias periféricas, a biópsia cutânea parece ser uma ferramenta promissora no diagnóstico, no acompanhamento da resposta ao tratamento (Lauria *et al.*, 2009).

A investigação mais comum nas amostras cutâneas de pacientes com neuropatias periféricas é a densidade das fibras nervosas intraepidérmicas, visto que pacientes com neuropatias apresentam uma significativa redução destas fibras nervosas (Wendelschafer-Crabb *et al.*, 2006; Lauria *et al.*, 2005; Heij *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de serem as primeiras a sofrerem alterações nas doenças neuropáticas, elas requerem a utilização de técnicas de detecção e observação avançadas que só estão disponíveis em centros de pesquisa.

É amplamente relatado que a penetração do *M. leprae* nas células de Schwann induz a desmielinização (Rambukanna *et al.*, 1997) o que justificaria os achados eletroneuromiográficos de lesões desmielinizantes em um grande número de pacientes, principalmente durante os estados reacionais (Vital, 2005). Entretanto sabe-se que o ML se aloja principalmente nas fibras amielínicas ou pequenas fibras levando, inicialmente, a alterações autonômicas, térmicas e da sensação de dor. Durante a evolução, o processo inflamatório atinge as fibras de maiores calibres, levando ao quadro de desmielinização e lesão axonal, por vezes, definitivas (Jardim *et al.*, 2015). A abordagem das fibras amielínicas requer técnicas especiais e não foi foco deste estudo. Entretanto, os filetes cutâneos, ramos dos troncos nervosos afetados de pacientes com sintomatologia sensitiva e motora podem ser úteis à avaliação do grau de comprometimento daqueles nervos, favorecendo o diagnóstico da FNP.

Neste estudo foram observados filetes nervosos em 91% das amostras cutâneas analisadas. Estas estruturas foram observadas em microscopia óptica, após identificação do endoneuro e do perineuro e confirmadas pela marcação imunofenotípica da proteína S-100. Destas amostras, em 41% foi possível identificar alguma alteração morfológica nos nervos. A maioria dos casos que apresentaram alterações nos nervos dérmicos e/ou hipodérmicos eram pacientes com FNP. Nestes pacientes, 89% das amostras cutâneas apresentavam nervos passíveis de análise, confirmando o papel da análise de fragmentos de pele no diagnóstico da hanseníase. Entretanto em 34% das amostras, os nervos cutâneos não apresentaram alterações morfológicas relevantes.

O diagnóstico da hanseníase é conduzido através de alterações histopatológicas ditas como confirmativas (presença do BAAR) ou fortemente sugestivas da doença (presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocítico no endoneuro, presença de granuloma epitelióide e fibrose). Em 28% das amostras

cutâneas dos pacientes com FNP analisadas, pelo menos uma destas alterações esteve presente.

A pesquisa do BAAR foi positiva em 4% das amostras cutâneas, tendo sido confirmativa no diagnóstico de hanseníase. Alguns autores também encontraram BAAR em fragmentos de pele hipoestésicas de paciente com FNP (Kumar *et al.*, 1996; Suneetha *et al.*, 1998; Menicucci *et al.*, 2005). No entanto, outros autores afirmam que o diagnóstico dessa forma clínica só é possível através da biópsia do nervo periférico (Jacob & Mathai, 1988; Kaur *et al.*, 1991).

Nos nervos periféricos destes mesmos pacientes foram observados BAAR em 14% das amostras. Sabe-se que as lesões nos nervos tendem a ter mais bacilos que as lesões cutâneas, visto que o nervo periférico é considerado um sítio protetor para o agente da infecção (Ridley & Ridley, 1986). Apesar do fragmento de nervo se apresentar mais suscetível à detecção do BAAR, 86% das amostras tiveram concordância quanto a ausência do BAAR tanto na pele, quanto no nervo.

Em estudo com 45 pacientes, Weng *et al.* (2000) afirmaram que a sensibilidade para a detecção do bacilo na pele aumentou significativamente quando foram analisados 30 cortes seriados da amostra. Da mesma maneira, Job *et al.* (1997), realizaram 145 cortes seriados de amostras de pacientes diagnosticados com hanseníase indeterminada, identificando bacilo em todos os fragmentos analisados. O número de cortes seriados para investigação do bacilo deste estudo foi de três a cinco cortes. Este costuma ser o número de cortes analisados na rotina diagnóstica. Estabelecer um número adequado de cortes histológicos poderia aumentar a possibilidade de observação dos BAAR nas amostras cutâneas da FNP.

O grande desafio ao diagnóstico conclusivo da FNP é o alto índice de amostras onde os bacilos não são observados. Nessa circunstância a presença do infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e do granuloma epitelióide no endoneuro sinalizam uma grande possibilidade de ser hanseníase (Antunes *et al.*, 2012; Hui *et al.*, 2015).

Em 18% dos fragmentos cutâneos foi observado o infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e histiócitos ao redor ou comprometendo um ou mais filetes nervosos na derme profunda. O granuloma epitelióide esteve presente em 4% dos casos. Estes dados são semelhantes aos observados por outros autores em amostras de pele hipoestésica de pacientes com FNP (Kumar *et al.*, 1996; Suneetha *et al.*, 1998; Menicucci *et al.*, 2005).

A alteração inflamatória está presente em todo o espectro das lesões por hanseníase. O papel neuroinflamatório desempenhado pelas células de Schwann

atrai para elas o papel de moduladora da resposta imunológica através da expressão de antígenos e a produção de citocinas e quimiocinas (Ydens *et al.*, 2013; Masaki *et al.*, 2014). Nos indivíduos classificados como paucibacilares, a formação do granuloma é orquestrada por diferentes mediadores químicos importantes para a ativação dos linfócitos do tipo Th1 e dos macrófagos efetores (Briton, 1993; Modling, 1994; Nath *et al.*, 2015). Como descrito anteriormente, este achado no nervo periférico é altamente sugestivo de hanseníase.

Quando analisamos os nervos periféricos dos mesmos pacientes, foi observado que mais da metade das amostras apresentava o processo inflamatório no endoneuro e em 30% dos casos foi observada a formação de granuloma epitelióide. Microscopicamente, o granuloma estava formado por células epitelióides diferenciadas, circundadas por uma população de linfócitos. No entanto, apesar do granuloma epitelióide no endoneuro, na ausência do bacilo, ser o achado mais sugestivo de lesão por hanseníase (Antunes *et al.*, 2012; Hui *et al.*, 2015), em 70% das amostras houve concordância quanto à ausência desta alteração inflamatória tanto na pele quanto no nervo periférico dos pacientes com FNP.

Somente em três pacientes o infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário no endoneuro esteve presente tanto no fragmento cutâneo, quanto no fragmento de nervo. Este número se estende para nove se for considerado o infiltrado inflamatório no perineuro dos nervos dérmicos. Estudos comparando a amostra de pele com a amostra de nervo em paciente com FNP também mostraram baixa concordância quando foi analisada somente a presença de infiltrado inflamatório comprometendo o endoneuro (Jenkins *et al.*, 1990; Menicucci *et al.*, 2005). Desta forma, podemos concluir que o infiltrado inflamatório na pele não é um parâmetro histológico confiável quando analisado individualmente.

Depois da presença do bacilo álcool-ácido resistente e do infiltrado inflamatório comprometendo os compartimentos neurais, a fibrose do endoneuro é a alteração mais significativa e sugestiva de lesão por hanseníase. Está caracterizada pela substituição do tecido neural por matriz colagenosa. A fibrose do endoneuro foi o achado mais significativo observado nas amostras cutâneas, comprometendo 28% dos casos. No nervo periférico, a fibrose é um achado comum na hanseníase, consequência da intensa neurite que acompanha a doença (Antunes *et al.*, 2012) e responsável pelas deformidades físicas irreversíveis (Miko *et al.*, 1993). Quarenta e oito por cento das amostras de nervo periférico analisadas apresentava fibrose no endoneuro. Esse número se ampliava para 84% (42/50) quando os demais



compartimentos neurais eram considerados. Ainda não é bem explicitado como ocorre esta substituição do tecido nervoso pela matriz colagenosa, mas já foi descrito o importante papel das metaloproteinases MMP-2, MMP-9 secretadas pelas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* no estímulo à produção do colágeno (Oliveira *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2015).

O processo de fibrose nos nervos cutâneos também é descrito em outras neuropatias periféricas, como no diabetes. Nas amostras cutâneas de pacientes diagnosticados com neuropatias não hansênicas analisadas neste estudo, a fibrose do endoneuro foi observada em 14% das amostras. Comparativamente, este número é 50% menor do que nas amostras de pacientes com FNP.

A microfasciculação ocorre no nervo periférico em resposta ao dano ao tecido neural e pode ser observada em neuropatias por diabetes (Dyck, Windebank, 2002) e por hanseníase (Vallat *et al.*, 1991). Histologicamente os microfascículos são aglomerados de axônios predominantemente amielínicos e de células de Schwann denervadas, envoltos por fibroblastos do perineuro que com o tempo serão substituídos por matriz extracelular (Antunes *et al.*, 2011).

Neste estudo foi possível observar a formação de microfascículo nos nervos dérmicos em 4% das amostras cutâneas. Este achado sugere a possibilidade do estudo dos nervos dérmicos para identificação de lesão do nervo periférico e seu processo de regeneração. Em estudo com total de 164 fragmentos de nervos de paciente com hanseníase neural pura, a microfasciculação foi observada em 10% das amostras, sendo mais frequente naquelas contendo bacilo (Antunes *et al.*, 2011). No presente estudo, a presença de BAAR não foi observada nas amostras cutâneas ou de nervo contendo os microfascículos. Nestes casos, o diagnóstico foi definido através da positividade do PCR.

Em posse dos resultados da análise comparativa, podemos sugerir que a presença da fibrose, mesmo quando analisada individualmente, pode ser sugestiva de lesão por hanseníase em pacientes sintomáticos. As demais alterações histopatológicas não devem ser consideradas padrão quando observadas individualmente. A observação de um (9/50) ou a presença de dois ou mais parâmetros considerados chaves ao diagnóstico da hanseníase, não mostraram diferença significativa na frequência dos casos comprometidos.

Além das alterações consideradas confirmativas ou fortemente sugestivas de lesão por hanseníase, o fragmento de nervo periférico pode também apresentar alterações histológicas consideradas inespecíficas, como o aumento no espaço

subperineural (edema), o espessamento do perineuro e a neoformação vascular, visualizadas com maior frequência na hanseníase do que em outras neuropatias (Chimelli *et al.*, 1997; Antunes *et al.*, 2012). Desta forma, fomos verificar se também era possível observar algumas destas alterações nos filetes nervosos cutâneos dos pacientes com FNP.

Nossos resultados mostram que alterações morfológicas consideradas inespecíficas foram observadas em 38% das amostras cutâneas. Destas, 18% exibiam laminação do perineuro. A hiperplasia do perineuro estava predominantemente associada a presença de infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário comprometendo os filetes nervosos ou ao redor de vasos perineurais. Os nervos periféricos correspondentes das amostras cutâneas apresentavam de moderado a acentuado infiltrado inflamatório linfocítico-histiocitário comprometendo todos os compartimentos neurais. Esta alteração morfológica também foi observada em fragmentos cutâneos de área hipoestésica de pacientes diagnosticados com FNP, onde após reanálise histopatológica, foram consideradas como forma indeterminada da hanseníase (Menicucci *et al.*, 2005), mesmo na ausência de lesão dermatológica que caracteriza a forma indeterminada.

Este fato levanta um ponto de discussão bastante polêmico de que poderia haver um comprometimento histopatológico cutâneo antes do aparecimento das lesões dermatológicas justificando a realização de biópsias cutâneas em contatos de pacientes multibacilares (comunicação pessoal, Dra. Euzenir Sarno). Por outro lado, discute-se ainda se a FNP não seria preliminar às formas clínicas dermatológicas. Contra esta hipótese há relatos de casos que permaneceram somente com a lesão neural por toda a vida na era pré-tratamento (Cochrane, 1964). Há ainda relatos de casos em que após anos houve o desenvolvimento de lesão dermatológica. Em estudo realizado por Skacel *et al.*, (2000), que acompanharam 40 pacientes com neuropatias periféricas por até quatro anos, três se mantiveram com a FNP, seis desenvolveram quadros reacionais e um desenvolveu a forma lepromatosa. Este estudo sugere que lesões neuropáticas podem sim, anteceder por anos as lesões dermatológicas.

O aumento no número de células de Schwann foi detectado quando observada a sobreposição de núcleos nos cortes longitudinais dos filetes nervosos. Embora este achado esteja submetido a crítica, pois depende da espessura do corte, a padronização adotada no nosso laboratório afasta essa possibilidade. Em 18% das amostras cutâneas foi observada a proliferação das células de Schwann nos filetes

nervosos. A intensa marcação pela proteína S-100 confirmou tratarem-se de células neurais e não fibroblastos. Antunes *et al.*, (2012) no entanto, mostraram que a proliferação das células de Schwann está mais presente nas amostras de nervo de pacientes com neuropatias não hansênicas.

A microscopia de cortes semi-finos costuma ser essencial na análise nos nervos periféricos pois permite a observação de alterações em estruturas não visualizadas na histologia tradicional (Chimelli *et al.*, 1997; Garbino *et al.*, 2011). Nas amostras de pele deste estudo todas as alterações morfológicas observadas através dos cortes semi-finos foram identificadas na histopatologia tradicional, ou seja, o uso desta técnica não aumentou a sensibilidade da análise do fragmento cutâneo como ferramenta diagnóstica. Entretanto o número de biópsias examinadas foi pequeno, devendo ser ampliado o grupo para possibilitar uma análise conclusiva.

Em resumo, podemos concluir que 66% das amostras cutâneas da FNP apresentaram alguma alteração morfológica em um ou mais filetes nervosos, e que a análise minuciosa dos nervos dérmicos e/ou hipodérmicos pode fornecer informações relevantes no auxílio ao diagnóstico da doença. As alterações histopatológicas nos nervos dérmicos não costumam ser alvo de investigação em neuropatias periféricas, incluindo a hanseníase. Entretanto, o resultado desse trabalho traduz a importância da histopatologia básica detalhada de todas as estruturas e ressaltou a importância do tricrômico de Gomori também na análise dos fragmentos cutâneos.

Já foi descrito na literatura que o estudo dos fragmentos cutâneos é uma importante ferramenta de auxílio ao diagnóstico de neuropatia periférica por diabetes (Kennedy *et al.*, 1996), idiopática (Wendelschafer-Crabb & Kennedy & Walk, 2006) e por hanseníase (Antunes *et al.*, 2003). A grande vantagem da coleta do fragmento de pele e seu estudo é a possibilidade de quantificar as fibras intraepidérmicas, especialmente estudadas devido à sua relação com a dor neuropática e para fazer análise morfológica dos nervos dérmicos; além disso é possível utilizar a amostra para a reação de PCR, análise ultraestrutural e imunológica (Ebenezer *et al.*, 2007).

A etapa final deste estudo foi a avaliação do valor preditivo positivo do fragmento cutâneo coletado por biópsia para o diagnóstico da hanseníase neural pura através da análise histopatológica dos nervos dérmicos e/ou hipodérmicos. Neste contexto, foi observado que a amostra cutânea dos pacientes diagnosticados com FNP mostrou um valor preditivo positivo de 68,2%, quando foi considerado a presença de parâmetros histológicos confirmativos ou sugestivos de lesão por hanseníase. Isto sugere que a biópsia cutânea realizada no dermatomo do nervo afetado, assume um

importante valor para o diagnóstico da FNP visto que parâmetros histopatológicos sugestivos da hanseníase podem ser observados na pele mesmo sem lesão cutânea. O fato de que em dez casos diagnosticados com a FNP não terem sido observados nervos nos fragmentos cutâneos levanta a questão das limitações da técnica histopatológica na rotina diagnóstica já que o nervo dérmico é sinuoso e pode não estar presente no corte analisado.

No entanto, estes achados contribuem para a ampliação do espectro de possibilidades da utilização da biópsia cutânea para o diagnóstico das neuropatias periféricas.

## 6 CONCLUSÕES

As amostras cutâneas possuem estruturas neurais que permitem o diagnóstico das neuropatias periféricas.

Em 28% das amostras estudadas foram observados achados que são confirmativos ou sugestivos da hanseníase e dentre estes a fibrose foi o achado mais frequente, comprometendo 28% dos casos analisados.

Outros achados, embora considerados inespecíficos, também estiveram presentes nas amostras cutâneas desprovidas dos parâmetros característicos da hanseníase, que incluem a presença do bacilo, presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário no endoneuro e granuloma epitelióide.

A comparação das amostras cutâneas com o tronco nervoso correspondente mostrou que o padrão-ouro do diagnóstico da hanseníase, ou seja, a visualização do bacilo álcool-ácido resistente, é encontrado em poucos casos tanto na pele (4%) quanto no nervo correspondente (14%).

O valor preditivo positivo do fragmento cutâneo para o diagnóstico da hanseníase neural pura foi de 68,2% reforçando o valor da biópsia de pele como ferramenta de auxílio ao diagnóstico dessa forma clínica.

A análise dos filetes nervosos no dermatomo acometido pode vir a ser uma importante ferramenta de auxílio ao diagnóstico da hanseníase neural pura na rede básica de saúde desde que sejam encaminhadas para os centros de referência e analisadas por patologistas especializados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin Neurol Neurosurg.* 2005;107(6):445-54.
- Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG, Moraes MO, Jardim MR, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(3):391-407.
- Antunes SL, Medeiros MF, Corte-Real S, Jardim MR, Nery JA, Hacker MA, Valentim Vda C, Amadeu TP, Sarno EN. Microfasciculation: a morphological pattern in leprosy nerve damage. *Histopathology.* 2011; 58(2):304-11.
- Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, Corte-Real S, Hacker MA, Sarno EN. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Mar;107(2):246-53.
- Antunes SL, Liang Y, Neri JA, Haak-Frendscho M, Johansson O. The expression of NGF and PGP 9.5 in leprosy reactional cutaneous lesions: an assessment of the nerve fiber status using immunostaining. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003; 61(2B):346-52.
- Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Ver soc Bras Med trop.* 2003; 36:373-82.
- Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JA, Moreira SJ, Sarno EN, Machado Ade M, Bozza FA. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(7):944-7.
- Bennett DL. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. *Neuroscientist.* 2001; 7(1):13-7.
- Bernard JC, Vazquez CA. Visceral lesions in lepromatous leprosy. Study of sixty necropsies. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1973; 41(1):94-101
- Bezerra Da Cunha FM, Werneck MC, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of polymerase chain reaction. *Muscle nerve.* 2006; 33:409-414.
- Boddington J. Ultrastructural and histophysiological studies on the blood-nerve barrier and perineurial barrier in leprosy neuropathy. *Acta Neuropathol.* 1984; 64(4):282-96.
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Prevenção de Incapacidades. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008; 140 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de prevenção de incapacidades. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Available from: [www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br). Acesso em 12 de fevereiro de 2016.
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995, 64:29-63.

- Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet* 2004; 363:1209-19.
- Britton WJ. Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87(5):508-14.
- Browne SG. Some less common neurological findings in leprosy. *J Neurol Sci.* 1965; 2:253-61.
- Bührer-Sékula S, Illarramendi X, Teles RB, Penna ML, Nery JA, Sales AM, Oskam L, Sampaio EP, Sarno EN. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. *Acta Trop.* 2009;111(2):172-6.
- Butnaru CA, Kanitakis J. Structure of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(6):II-IV.
- Chacha JJ, Sotto MN, Peters L, Lourenço S, Rivitti EA, Melnikov P. Sistema nervoso periférico e pressupostos da agressão neural na hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2009; 84(5):495-500.
- Chaitanya VS, Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Horo I, Sengupta U, Jadhav RS. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunol Lett.* 2013;156(1-2):159-67.
- Chen TS, Drutz DJ, Whelan GE. Hepatic granulomas in leprosy. Their relation to bacteremia. *Arch Pathol Lab Med.* 1976;100(4):182-5.
- Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30:209-33.
- Chimelli L, Freitas M, Nascimento O. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. *J Neurol.* 1997; 244(5):318-23.
- Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(1):138-42.
- Cochrane RG, Davey FT. *Leprosy in theory and practice.* Bristol: John Wright & Sons LTD., 1964, 2<sup>nd</sup> ed, p.272-8.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in leprosy bacillus. *Nature.* 2001; 409:1007-11.
- de-Freitas MR, Nascimento OJ, de Freitas MR, Hahn MD. Isolated superficial peroneal nerve lesion in pure neural leprosy: case report. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004; 62(2B):535-9.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003; 6(11):1127-34.
- Dyck PJ, Windebank AJ. Diabetic and nondiabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathies: new insights into pathophysiology and treatment. *Muscle Nerve.* 2002; 25(4):477-91.
- Ebenezer GJ, Hauer P, Gibbons C, McArthur, JC, Polydefkis M. Assessment of epidermal nerve fiber: a new diagnostic and predictive tool for peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neuro.* 2007; 66(12):1059-1073.
- Fleury RN, Bacchi CE. S-100 protein and immunoperoxidase technique as an aid in the histopathologic diagnosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1987; 55(2): 338-44.
- Fortman GJ, Winkelmann RK. A merckel cell nuclear inclusion. *J Invest Dermatol.* 1973 Dec;61(6):334-8.

- Freitas MGR, Nascimento OJM, Chimelli L, Freitas GR. Doença de Charco-Marie-Tooth: estudo da biópsia do nervo sural em 41 pacientes. *Arq Neuropsiquiatr*. 1995; 53(3-B):560-69.
- Garbino JA, Jardim MR, Marques JR W, Antunes SL, Soares CT, Heise CO, Floriano MC, Barreto JA, Nery JA, Trindade MAB, Barreira AA, Carvalho NB, Andrada NC. Hanseníase Neural Primária. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2011; 1-26.
- Garbino JA, Ura S, Belone AFF, Marciano LHSC, Fleury RN. Aspectos clínicos e diagnóstico da hanseníase primariamente neural. *Hansen Int* 2004; 29(2): 124-129.
- Garbino JA. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. *Hansen Int*. 2007; 32:203-6.
- Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *J Infect*. 2015 ;71(4):413-21. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.06.006.
- Girdhar BK. Neuritic leprosy. *Indian J Lepr*. 1996; 68(1):35-42.
- Gómez-Valero L, Rocha EP, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Res*. 2007;17(8):1178-85.1(4):413-21.
- Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):365-75.
- Griffin JW, McArthur JC, Polydefkis M. Assessment of cutaneous innervation by skin biopsies. *Curr Opin Neurol*. 2001;14(5):655-9.
- Gupta SK, Nigam S, Mandal AK, Kumar V. S-10 as a useful auxiliary diagnostic id in tuberculoid leprosy. *J Cutan Pathol* 2006; 33(7):482-6.
- Hansen GHA. Investigations concerning the etiology of leprosy. *Nosk Magazin for Laegevidenskaben*. 1874; 4:1-88.
- Heij L, Dahan A, Hoitsma E. Sarcoidosis and pain caused by small-fiber neuropathy. *Pain Res Treat*. 2012; ID:256024.
- Hui M, Uppin MS, Challa S, Meena AK, Kaul S. Pure neuritic leprosy: Resolving diagnostic issues in acid fast bacilli (AFB)-negative nerve biopsies: A single centre experience from South India. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015; 18(3):292-7.
- Hussain T. leprosy and tuberculosis: an insight review. *Critical rev in microbial*. 2007; 33(1):15-66.
- Illarramendi X, Rangel E, Miranda AM, Castro AC, Magalhães Gde O, Antunes SL. Cutaneous lesions sensory impairment recovery and nerve regeneration in leprosy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:68-73.
- Jacob M, Mathai R. Diagnostic efficacy of cutaneous nerve biopsy in primary neuritic leprosy. *Int J lepr Other Mycobact Dis*. 1988; 56(1):56-60.
- Jardim MR, Antunes SLG, Santos AR, Nascimento OJM, Nery JAC, Sales AM, Illarramendi X, Duppre N, Chimelli L, Sampaio E, Sarno E. Criteria for diagnosis of purê neural leprosy. *J Neurol*. 2003; 250(7): 806-809.
- Jardim MR, Chimelli L, Farria SC, Fernandes PV, Nery JAC, Sales AM, Sarno EM, Antunes SLG. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies if pure neural leprosy in a Brazilian referral center. *Lepr Rev*. 2004; 75(3):242-53.



- Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, Moraes MO, Martinez AN, Oskam L, Faber WR, Sarno EN, Sampaio EP, Bühler-Sékula S. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev.* 2005;76(3):232-40.
- Jardim MR, Vital R, Hacker MA, Nascimento M, Balassiano SL, Sarno EN, Illarramendi X. Leprosy neuropathy evaluated by NCS is independent of the patient's infectious state. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015; 131:5-10.
- Jenkins D, Papp K, Jakubovic HR, Shiffman N. Leprotic involvement of peripheral nerves in the absence of skin lesions. Case report and literature review. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 23(5pt2):1023-1026.
- Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(3):518-21.
- Job CK, Baskaran B, Jayakumar J, Aschhoff M. Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1997;65(4):443-9.
- Job CK. Nerve damage in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1989; 57(2): 532-539.
- Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury.* 2005;36 Suppl 4: S24-9.
- Jopling WH, Morgan-Hughes JA. Pure neural tuberculoid leprosy. *Br Med J.* 1965 2;2(5465):799-800.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
- Kaur G, Girdhar BK, Girdhar A, Malaviya GN, Mukherjee A, Sengupta U, Desikan KV. A clinical, immunological, and histological study of neuritic leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1991;59(3):385-91.
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology.* 1996;47(4):1042-8.
- Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol.* 2006;19(5):437-45.
- Krutzik SR1, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9(5):525-32.
- Kumar B, Kaur I, Dogra S, Kumaran MS. Pure neuritic leprosy in India: an appraisal. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72(3):284-90.
- Kumar SK, Reddy BSN, Ratnakar C. Correlation of skin and nerve histopathology on leprosy. *Lepr Rev* 1996;67(2):119-125.
- Lauria G, Devigili G. Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3(10):546-57.
- Lauria G, Lombardi R, Camozzi F, Devigili G. Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology.* 2009;54(3):273-85.
- Mahajan PM, Jogaikar DG, Mehta JM. A study of pure neuritic leprosy: clinical experience. *Indian J Lepr.* 1996;68(2):137-41.

- Malinovsky L. Sensory nerve formations in the skin and their classification. *Microsc Res Tech.* 1996; 34(4):283-301.
- Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based technique form leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLOS Negl Trop Dis.* 2014; 8(4): e2655.
- Martini R, Wilson H. Neuroinflammation in the peripheral nerve: cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia.* 2015; 00: 1-12.
- Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes Mycobacterium leprae-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cell Reprogram.* 2014;16(1):9-17.
- Masaki T, McGlinchey A, Tomlinson SR, Qu J, Rambukkana A. Reprogramming diminishes retention of Mycobacterium leprae in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. *Version 3. F1000Res.* 2013 Sep 25.
- Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of lepromatous skin biopsy. *Clinics in dermatol* 2015; 33:38-45.
- Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, da Costa Nery JA, Sales AM, de Andrea Hacker M, Ferreira H, Chimelli L, Sarno EN, Antunes SL. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015; 23(3):220-9.
- Mendell LM, Albers KM, Davis BM. Neurotrophins, nociceptors, and pain. *Microsc Res Tech.* 1999; 45(4-5):252-61.
- Menicucci LA, Miranda A, Antunes SL, Jardim MR, da Costa Nery JA, Sales AM, Sarno EN. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52(4):648-52
- Miko TL, Le Maitre C, Kinfu Y. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. *Lancet.* 1993; 342(8870):521-5.
- Misch EA, Berrington WR, Vary JC Jr, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):589-620.
- Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):828-32.
- Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol.* 1999; 50(5):541-9.
- Mukherjee R, Antia NH. Host-parasite interrelationship between M. leprae and Schwann cells in vitro. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1986; 54(4):632-8.
- Nascimento OJ. Leprosy neuropathy: clinical presentations. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013; 71(9B):661-6.
- Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in dermatol.* 2015; 33:90-98.
- Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem.* 2008;110(3):182-95
- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40(6):363-70.

- Oliveira AL, Antunes SL, Teles RM, Costa da Silva AC, Silva TP, Brandão Teles R, Ferreira Medeiros M, Britto C, Jardim MR, Pereira Sampaio E, Nunes Sarno E. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69(1):27-39.
- Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, Antas PR, Sarno EN. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(10):882-90.
- Ooi WW, Srinivasan J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. *Muscle Nerve*. 2004;30(4):393-409.
- Pannikar VK, Arunthanthi S, Chacko CJG, Fritchi EP. A clinico-pathological study of primary neuritic leprosy. *Lep India* 1983; 55:212-21.
- Pedley JC. Bacterial load in nasal mucosa of leprosy patients. *Lepr Rev*. 1975 Mar;46(1):87-8.
- Penna ML, de Oliveira ML, Penna GO. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. *Lepr Ver* 2009; 80(3): 332-44.
- Pimentel MI, Nery JA, Borges E, Gonçalves RR, Sarno EN. Impairments in multibacillary leprosy; a study from Brazil. *Lepr Rev*. 2004;75(2):143-52.
- Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by G domain in the laminin- $\alpha$ 2 chain. *Cell*. 1997; 88(6):811-21.
- Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 3;296(5569):927-31.
- Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends in Microbiol* 2000; 8(1): 23-28.
- Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol*. 2001; 4(1):21-7.
- Ramos JM, Alonso-Castañeda B, Eshetu D, Lemma D, Reyes F, Belinchón I, Górgolas M. Prevalence and characteristics of neuropathic pain in leprosy patients treated years ago. *Pathog Glob Health*. 2014;108(4):186-90.
- Ravisse P, Rastogi N, David HL, Guelpa-Lauras CC. Experimental leprosy in the armadillo and nude mice: comparative histobacteriology and ultrastructure. *Acta Leprol*. 1984;2(2-4):327-39.
- Rees RJ, Waters MF. Recent trends in leprosy research. *Br Med Bull*. 1972; 28(1):16-21.
- Reilly DM, Ferdinando D, Johnston C, Shaw C, Buchanan KD, Green MR. The human epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations. *Br J Dermatol*. 1997; 137: 163-170.
- Richard L, Topilko P, Magy L, Decouvelaere AV, Charnay P, Funalot B, Vallat JM. Endoneurial fibroblast-like cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Nov;71(11):938-47.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mucobact Dis*. 1966; 34(3):255-73.

- Ridley DS, Ridley MJ. Classification of nerves is modified by the delayed recognition of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1986; 54(4):596-606.
- Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ*. 1974; 51(5):451-65.
- Rodriguez G, Sanches W, Chalela JG, Soto J. Primary neuritic leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29:1050-1052.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1309-79.
- Sarker UK, Uddin MJ, Chowdhury R, Roy N, Bhattacharjee M, Roy J. Clinical Profile of Peripheral Neuropathy in Leprosy. *Mymensingh Med J*. 2015;24(4):671-8.
- Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosyreactional states. *Clin Exp Immunol*. 1991;84(1):103-8.
- Sarno EN, Santos AR, Jardim MR, Suffys PN, Almeida AS, Nery JA, Vieira LM, Sampaio EP. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF alpha. *Lepr Rev*. 2000;71 Suppl: S154-8.
- Sarno EN. Alteração histopatológica da pele de contatos de pacientes multibacilares [comunicação pessoal]. [comunicado em 2016 fev 25].
- Scollard DM, Adams LB, Gilis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Wilias DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Ver*. 2006; 19(2): 338/81.
- Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse, *Int J Lepr*. 1962; 30:291-306.
- Shetty VP. Structure of the normal peripheral nerve. In: Antia NH, Shetty VP. *The peripheral nerve in leprosy and other neuropathies*. Delhi: Oxford University Press;1997. P.45-56. Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(5):533-40.
- Simons M; Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol*. 2007; 17(5):533-40.
- Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011;6(1):57-71.
- Skacel M, Antunes SL, Rodrigues MM, Nery JA, Valentim VD, Morais RP, Sarno EN. The diagnosis of leprosy among patients with symptoms of peripheral neuropathy without cutaneous lesions: a follow-up study. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000; 58(3B):800-7.
- Souza. C. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Simpósio: HANSENÍASE. Medicina, Ribeirão Preto, 1997; 30: 325-334.
- Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):76-102.
- Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003; 139(11):1479-88.
- Sternini C. Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1997; 2:1-7.
- Sugaya M1. Chemokines and skin diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(2):109-15.

- Suneetha S, Arunthathi S, Chandi S, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the apparently normal skin. *Lepr Rev.* 1998; 69(4):351-7.
- Suneetha S, Sigamoni A, Kurian N, Chacko CJ. The development of cutaneous lesions during follow-up of patients with primary neuritic leprosy. *Int J Dermatol.* 2005;44(3):224-9.
- Suster S, Cabello-Inchausti B, Robinson MJ. Nongranulomatous involvement of the bone marrow in lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92(6):797-801.
- Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol.* 2015 ;33(1):26-37. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002.
- Tolentino JG. Acute manifestations of leprosy. *Int J Lepr.* 1965; 33(3): Suppl:570-7.
- Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TP, Cole ST. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med.* 2011; 364(17):1626-33.
- Uplekar MW, Antia NH. Clinical and histopathological observations on pure neuritic leprosy. *Indian J Lepr.* 1986; 58(4):513-21.
- Ura S, Barreto JA. Papel da biópsia cutânea no diagnóstico de hanseníase. *Hansen Int.* 2004; 29(2):141-144.
- Vallat JM, Leboutet MJ, Henry P, Millan J, Dumas M. Endoneurial proliferation of perineurial cells in leprosy. *Acta Neuropathol.* 1991; 81(3):336-8.
- Vallat JM, Ouvrier RA, Pollard JD, Magdelaine C, Zhu D, Nicholson GA, Grew S, Ryan MM, Funalot B. Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008; 67(11):1097-102.
- van Brakel WH, Khawas IB. Nerve damage in leprosy: an epidemiological and clinical study of 396 patients in west Nepal—Part 1. Definitions, methods and frequencies. *Lepr Rev.* 1994; 65:204–221.
- Vieira LM, Sampaio EP, Nery JA, Duppre NC, Albuquerque EC, Scheinberg MA, Sarno EN. Immunological status of ENL (erythema nodosum leprosum) patients: its relationship to bacterial load and levels of circulating IL-2R. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996; 38(2):103-11.
- Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001; 2(8): REVIEWS1023.
- Vital RT, Illarramendi X, Antunes SL, Nascimento M, Da Costa Nery JA, Nascimento O, Sarno EN, Jardim MR. Isolated median neuropathy as the first symptom of leprosy. *Muscle Nerve.* 2013; 48(2):179-84.
- Vital RT, Illarramendi X, Nascimento O, Hacker MA, Sarno EN, Jardim MR. Progression of leprosy neuropathy: a case series study. *Brain Behav.* 2012;2(3):249-55.
- Vital RT. Avaliação da neuropatia ulna hanseniana através do estudo da condução nervosa. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense; 2005.
- Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull.* 2006; 77-78:103-21.
- Walker SL, Lockwood DN. Leprosy. *Clin Dermatol.* 2007; 25(2):165-72.

- Weis J, Brandner S, Lammens M, Sommer C, Vallat JM. Processing of nerve biopsies: a practical guide for neuropathologists. *Clin Neuropathol*. 2012; 31(1):7-23.
- Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet*. 1969 1;2(7627):933-5.
- Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Walk D. Morphological features of nerves in skin biopsies. *J Neurol Sci*. 2006; 15; 242(1-2):15-21.
- Weng XM, Chen SY, Ran SP, Zhang CH, Li HY. Immuno-histopathology in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000; 68(4):426-33.
- Werneck LC. Biópsias de nervos periféricos: Análise de 89 casos. *Arq. Neuro-Psiquiat*. 1988; 46(1):22-28.
- WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Leprosy. 2002; 1:77.
- WHO-World Health Organizatio. WHO Model prescribing information: Drug used in leprosy, 1998.
- WHO-World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2014; 36 (89): 389-400.
- Williams DL, Pittman TL, Deshotel M, Oby-Robinson S, Smith I, Husson R. Molecular basis of the defective heat stress response in *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol*. 2007;189(24):8818-27.
- Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008; 1;56(14):1481-90. DOI: 10.1002/glia.20723.
- Yamamura M1, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992; 15;149(4):1470-5.
- Ydens E, Lornet G, Smits V, Goethals S, Timmerman V, Janssens S. The neuroinflammatory role of Schwann cells in disease. *Neurobiol Dis*. 2013; 55:95-103.

## ANEXO I

**Tabela 9: Frequência detalhada da concordância e discordância dos parâmetros histopatológicos que são confirmativos ou fortemente sugestivos de lesão por hanseníase na análise comparativa entre fragmentos cutâneos e os fragmentos de nervo dos pacientes diagnosticados com hanseníase neural pura.**

	Pele n=50	Nervo n=50	Concordância n(%)		Discordância n(%)		Concordância total	Discordância total
			P+N+	P-N-	P+N-	P-N+		
<b>Presença de BAAR</b>	2	7	2 (4)	43 (86)	0 (0)	5 (10)	45 (90)	5 (10)
<b>Infiltrado LøMø endoneuro</b>	3	26	3 (6)	24 (48)	0 (0)	23 (46)	27 (54)	23 (46)
<b>Granuloma epitelióide</b>	2	15	2 (4)	35 (70)	0 (0)	13 (26)	37 (74)	13 (26)
<b>Fibrose endoneuro</b>	14	24	9 (18)	21 (42)	5 (10)	15 (30)	30 (60)	20 (40)

P+N+= Presença na pele e presença no nervo; P+N- = presença na pele e ausência no nervo; P-N+ = ausência na pele e presença no nervo; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente; LøMø= linfo-histiocitário.