

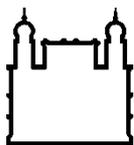
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Correlação entre componentes séricos e alterações histopatológicas em amostras neurais
de pacientes com Hanseníase Neural Pura**

PAULA RANGEL DE SÁ RIBEIRO

Rio de Janeiro
2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Paula Rangel de Sá Ribeiro

Correlação entre componentes séricos e alterações histopatológicas em amostras neurais de
pacientes com Hanseníase Neural Pura

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

2018

Ribeiro, Paula Rangel de Sá.

Correlação entre componentes séricos e alterações histopatológicas em amostras neurais de pacientes com Hanseníase Neural Pura / Paula Rangel de Sá Ribeiro. - Rio de Janeiro, 2018.

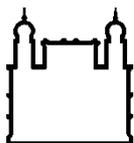
xii, 55f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Euzenir Nunes Sarno.

Bibliografia: f. 43-53

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. Neuropatia periférica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PAULA RANGEL DE SÁ RIBEIRO

**CORRELAÇÃO ENTRE COMPONENTES SÉRICOS E ALTERAÇÕES
HISTOPATOLÓGICAS EM AMOSTRAS NEURAIS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE NEURAL PURA**

ORIENTADOR: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: 30/10/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Márcia de Berrêdo Pinho Moreira – Fiocruz - Presidente

Prof. Dra. Thaís Porto Amadeu – UERJ - Revisora

Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto – UFJF

SUPLENTE

Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo – Fiocruz

Prof. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli – UFRJ

Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2018

AGRADECIMENTOS

À Dra Euzenir Nunes Sarno pelo acolhimento, pela dedicação, sabedoria, incentivo, carinho, paciência, orientação, pela oportunidade do Mestrado e pela preocupação para que tudo terminasse da melhor forma possível. Sem a sua força constante eu não teria conseguido.

À Dra Roberta Olmo Pinheiro pela orientação, otimismo, dedicação e encorajamento frente aos desafios e por toda compreensão e carinho durante o meu Mestrado.

Ao Dr. Sérgio Antunes pela atenção e disponibilidade em compartilhar seu vasto conhecimento.

À Mariana Hacker pela dedicação, carinho, paciência e auxílio nas análises estatísticas do meu trabalho.

À Rhana Prata, Fernanda, Beatriz Junqueira e Mari pelo carinho e auxílio nos experimentos.

À Verônica pelo carinho e atenção desde o meu primeiro dia no laboratório.

Aos meus colegas do laboratório Jéssica Paixão, Thamiris, Helen, Mayara, Bruno Mietto, Bruno Andrade e Eduardo que se mostraram prestativos em todas as situações que precisei de auxílio.

À Coordenação de Pós-graduação em Biologia Parasitária, em especial ao Dr. Rafael Maciel de Freitas, pelo acolhimento e profissionalismo. Sem a credibilidade que vocês depositaram em mim, eu não teria conseguido.

À Rita da seac por toda boa vontade em sanar as minhas dúvidas e pelo carinho.

Ao Augusto pela boa vontade e ajuda sempre que precisei.

A todos do laboratório de hanseníase pelo carinho.

À minha amiga Cláudia Araújo pela participação mais que especial desde o início dessa caminhada no Mestrado.

À minha mãe e meu pai por todo amor, por sempre acreditarem no meu potencial, por serem minha base e exemplo do caminho do bem.

Aos meus irmãos Flávia e Bruno, meus grandes parceiros, por sempre me darem bons exemplos, muito amor e carinho.

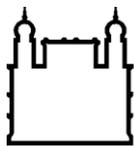
Aos meus filhos Babi, Dudu e Louise, razão da minha vida, e incentivo constante para que eu sempre dê o melhor de mim.

Ao CNPq e ao IOC pelo apoio financeiro.

A Deus que está sempre comigo, me guiando, me ajudando e me protegendo em todos os momentos e escolhas da minha vida.

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”

Clarice Lispector



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

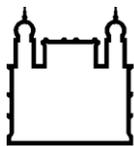
CORRELAÇÃO ENTRE COMPONENTES SÉRICOS E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM AMOSTRAS NEURAIIS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NEURAL PURA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Paula Rangel de Sá Ribeiro

O diagnóstico precoce da Hanseníase Neural Pura (HNP) representa um grande desafio em função da ausência de lesões de pele e da baciloscopia negativa nos pacientes acometidos. A HNP se apresenta como uma neuropatia periférica que muitas vezes se inicia de forma insidiosa e silenciosa, dificultando e atrasando o diagnóstico. Associado a uma apresentação clínica complexa, temos profissionais despreparados e o estigma social que ainda acompanha a Hanseníase, que contribuem para o diagnóstico tardio, o aparecimento de lesões incapacitantes e deformidades que tanto acometem esses pacientes. Em função da existência de diversas doenças que também afetam os nervos periféricos, torna-se necessário a realização do diagnóstico diferencial a fim de se iniciar o mais rápido possível o tratamento com a Poliquimioterapia (PQT) nos pacientes com HNP, interrompendo a cadeia de transmissão da doença e minimizando as lesões neurais. Vários testes complementares já são realizados nos dias de hoje para fins diagnósticos, porém o exame histopatológico da amostra de biópsia neural ainda possui papel de destaque. A partir da análise histopatológica, mesmo que minuciosa e realizada por profissionais competentes, muitas vezes não se consegue a confirmação do diagnóstico, já que na maioria das vezes as amostras não apresentam bacilos (BAAR⁻) e alguns achados são inespecíficos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a existência de marcadores séricos que possam ser indicativos de HNP e que estejam correlacionados com as alterações histopatológicas. Foram selecionadas amostras de 42 pacientes HNP e 36 pacientes com diagnóstico de outras neuropatias não hanseníase (NH), atendidos no Ambulatório Souza Araújo, no período de 2004 a 2014. As concentrações séricas de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 foram avaliadas por ELISA. Em conjunto, foi realizada a sorologia para PGL-1 e PCR para presença de DNA bacteriano na lesão neural. A análise histopatológica demonstrou que a presença de infiltrado inflamatório endoneural ($p=0,001$), fibrose endoneural ($p=0,001$) e granuloma ($p=0,002$) são encontrados com maior frequência na HNP e a remielinização ($p=0,001$) e a perda de fibras ($p=0,026$) na NH. Foi observado um aumento significativo nas concentrações séricas de MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 nos pacientes com HN quando comparado aos pacientes HNP. Dos 42 pacientes com HNP apenas 5 eram PGL-1 positivos e, entre os 30 que realizaram PCR, 12 eram positivos. Não foi possível observar correlação entre a sorologia anti-PGL-1 positiva e a positividade ao PCR com os achados histopatológicos. Nos pacientes com HNP foi possível observar uma correlação positiva entre a ausência de infiltrado e fibrose endoneural com o aumento da concentração sérica de MCP-1/CCL2. Tais achados sugerem que por se tratar de uma doença com um padrão de resposta imune localizado, é possível que na HNP a presença de infiltrado e fibrose endoneural contribua para o aumento de quimiocinas como MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 nas lesões, o que reduz as concentrações séricas desses mediadores nesse grupo.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CORRELATION BETWEEN SERUM MARKERS AND HISTOLOGICAL ALTERATIONS IN NEURAL SAMPLES OF PURE NEURAL LEPROSY PATIENTS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Paula Rangel de Sá Ribeiro

The early diagnosis of Pure Neural Leprosy (PNL) represents a great challenge due to the absence of skin lesions and negative smear microscopy in the patients affected. The PNL, presents as a peripheral neuropathy that often starts insidiously and quietly, hindering and delaying the diagnosis. Besides having a complex clinical presentation, there are many unprepared professionals and also the social stigma that still accompanies leprosy, which contribute to the late diagnosis, the appearance of incapacitating lesions and deformities that so much affect these patients. Due to the existence of several diseases that also affect the peripheral nerves, it is necessary to carry out the differential diagnosis in order to start the Multidrug therapy (MDT) in patients with Pure Neural leprosy (PNL) as soon as possible, interrupting the transmission chain of the disease and minimizing neural lesions. Several complementary tests are already performed for diagnostic purposes, but the histopathological examination of the neural biopsy still has a prominent role. Even with a thorough histopathological analysis it is often not possible to confirm the diagnosis, since most of the samples do not present bacilli (BAAR⁻) and some findings are non-specific. Thus, the present study aimed at investigating the existence of serum markers that may be indicative of PNL and that are correlated with the histopathological alterations. Blood samples of 42 PNL patients and 36 NLN (non-leprosy neuropathy) patients seen at the Ambulatório Souza Araujo, between 2004 and 2014 were selected. The serum concentrations of TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 were evaluated by ELISA. Together, serology was performed for PGL-1 and PCR for the presence of bacterial DNA in the neural lesion. Histopathological analysis showed that the presence of endoneural inflammatory infiltrates ($p = 0.001$), endoneural fibrosis ($p = 0.001$) and granuloma ($p = 0.002$) are found more frequently in PNL and remyelination ($p = 0.001$) and loss of fibers ($p = 0.026$) in NLN. A significant increase in serum concentrations of MCP-1 / CCL2 and IP-10 / CXCL-10 was observed in patients with other neuropathies when compared to PNL patients. Only 5 out of 42 PNL patients were PGL-1⁺ and 12 out of the 30 who performed PCR were positive. It was not possible to observe a correlation between anti-PGL-1 positive serology and PCR positivity with histopathological findings. In PNL patients, it was possible to observe a positive correlation between the absence of infiltrate and endoneural fibrosis with increasing serum concentration of MCP-1 / CCL2. These findings suggest that because it is a disease with a localized immune response pattern, in the PNL the presence of endoneural infiltrate and fibrosis may contribute to the increase of chemokines such as MCP-1 / CCL2 and IP-10 / CXCL-10 in the lesions, which reduces the serum concentrations of these mediators in this group.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Hanseníase.....	1
1.2. Formas clínicas da Hanseníase.....	4
1.3. Epidemiologia e Tratamento.....	6
1.4. Resposta imune na Hanseníase.....	10
1.5. Hanseníase Neural Pura.....	12
1.6. Patogênese do dano neural.....	14
1.7. Diagnóstico histopatológico da Hanseníase Neural Pura.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1. População estudada e seleção dos casos estudados.....	22
3.2. Avaliação histopatológica.....	23
3.3. Parâmetros éticos.....	23
3.4. Processamento e armazenamento de soros.....	24
3.5. Dosagem de mediadores séricos.....	24
3.6. Sorologia para PGL-1.....	24
3.7. PCR em tempo real.....	25
3.8. Análise de dados.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Infiltrado e fibrose endoneural são características histopatológicas em amostras de pacientes com a HNP.....	27
4.2. Avaliação da sorologia PGL-1 e do PCR como parâmetros diagnósticos na HNP.....	30
4.3. Determinação do padrão de citocinas séricas em pacientes com HNP.....	33
5. DISCUSSAO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8. ANEXOS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da parede celular de <i>Mycobacterium leprae</i>	2
Figura 2: Classificação de Ridley & Jopling para as diferentes formas clínicas da Hanseníase.....	5
Figura 3: Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase em 2017.....	7
Figura 4: Histopatologia do Nervo normal.....	18
Figura 5: Histopatologia da Hanseníase Neural Pura.....	19
Figura 6: Histopatologia de biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase.....	30
Figura 7: Reatividade para PGL-1.....	31
Figura 8: Concentrações séricas de citocinas e quimiocinas em pacientes HNP e HN.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos e nervos biopsiados dos pacientes HNP e NH avaliados..	27
Tabela 2: Comparação da presença ou ausência das alterações histopatológicas entre os grupos NHP e NH.....	29
Tabela 3: Correlação entre a positividade do PGL-1 e os achados histopatológicos em HNP.....	32
Tabela 4: Correlação entre a positividade do PCR de pacientes HNP e os achados histopatológicos.....	33
Tabela 5: Comparação das concentrações séricas das citocinas entre os grupos HNP.....	35
Tabela 6: Comparação entre as concentrações séricas das quimiocinas segundo as alterações histopatológicas em HNP e NH.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Ac – Anticorpo
AIL – Associação Indiana de Leprologistas
ASA – Ambulatório Souza Araújo
BAAR – bacilo álcool-ácido resistente
BB – *borderline borderline*
BCG – bacilo Calmette-Guérin
BL – *borderline* lepromatosa
BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine serum albumin*)
BT – *borderline* tuberculoide
CS – célula de Schwann
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DO – densidade óptica
ECN- estudos de condução nervosa
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)
ENH - eritema nodoso hansênico
HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency virus*)
HNP – hanseníase neural pura
I - hanseníase indeterminada
IB – índice baciloscópico
IFG2 – incapacidade física grau 2
IFN γ – interferon gama
IgM – Imunoglobulina M
IL-1 β – interleucina 1 beta
IL-6 – interleucina 6
IL-10 – interleucina 10
IP-10/CXCL-10 – proteína 10 induzida por IFN γ
LAHAN – Laboratório de hanseníase
LAM - Lipoarabinomanana
LL - forma clínica lepromatosa-lepromatosa
LM - lipomanana
MB - Multibacilares
MCP-1/CCL-2 – proteína quimioatrativa de monócitos 1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*)
MDT – Terapia multidrogas (do inglês *Multidrug therapy*)
ML – *mycobacterium leprae*
NaH₂PO₄ – fosfato monossódico
NH - não hanseníase
NK – célula exterminadora natural (do inglês *natural killer*)
NLN – neuropatia não-hansênica (do inglês *non-leprosy neuropathy*)
NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxid*)
OMS – Organização Mundial de Saúde
PB – paucibacilares
PBMC – célula mononuclear do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*)
PBS/T – salina tamponada com fosfato, detergente *tween* (do inglês *Phosphate Buffered Saline With Tween*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase chain reaction*)

PDIMs – ftiocerol dimicocerosatos (do inglês *micocerosaic acids of phthiocerol dimycocerosates*)
PENH – Programa de Erradicação Nacional de Hanseníase
PGL-1 – glicolípido fenólico 1 (do inglês, *Phenolic glycolipid 1*)
PMA – phorbol-12-miristato-13-acetato
PNL – Hanseníase Neural Pura (do inglês *Pure neural leprosy*)
PQT – Poliquimioterapia
 α -SMA – alfa-actina de músculo liso (do inglês *alpha smooth muscle actin*)
RR – reação reversa
TGF β – fator de crescimento transformador beta (do inglês *transforming growth factor beta*)
TMB – tetrametilbenzeno
TMM – monomicolatos de trealose
TNF α – fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor necrosis factor alpha*)
TLR – receptor tipo toll (do inglês, *toll-like receptor*)
TT – Tuberculoide tuberculoide
WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Hanseníase

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico e evolução lenta causada por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), parasito intracelular obrigatório que afeta principalmente os nervos periféricos e a pele (MENDONÇA et al., 2008). É conhecida por apresentar áreas na pele com perda de sensibilidade e é considerada a principal causa de neuropatia periférica em países endêmicos (VITAL et al., 2012).

Mesmo tendo sido o primeiro patógeno bacteriano identificado no homem (HANSEN, 1874), ainda não se conhece todo o processo relacionado ao estabelecimento da infecção pelo *M. leprae* e os mecanismos de imunopatogênese. Tal fato se deve a limitação do estudo em modelos experimentais, uma vez que *M. leprae* não é cultivável *in vitro*. As tentativas de cultivar o *M. leprae* em meios de cultura permanecem frustradas até o momento, mas sua multiplicação é possível por meio do modelo de inoculação no coxim plantar de camundongos (SHEPARD, 1962) ou no tatu (RAVISSE et al., 1984). Após a purificação, os bacilos podem ser usados em pesquisa, vivos por até uma semana ou letalmente irradiados (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

O *M. leprae* parasita predominantemente macrófagos na pele e células de Schwann (CS) no nervo periférico e pode ser observado individualmente ou agrupado, formando “globias” em arranjos paralelos (HUSSAIN, 2007). É um bacilo Gram-positivo que se cora fracamente pelo Gram em função da grande quantidade de lipídios em sua parede, sendo considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen. O bacilo se multiplica preferencialmente em temperaturas mais baixas, o que influencia na localização das lesões em áreas mais frias do corpo (SCOLLARD et al., 2006). Entretanto, sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, onde *M. leprae* pode crescer em locais que apresentem a temperatura corporal elevada, tais como fígado, olhos, testículos, baço e linfonodos (BERNARD; VASQUEZ, 1973).

O período de incubação de *M. leprae* é em média de dois a sete anos, com multiplicação por meio de divisão binária a cada 20 ou 30 dias (RAMBUKKANA, 2004).

A parede celular de *M. leprae* possui estrutura química semelhante à de outras micobactérias. Compartilha características como a abundância de lipídios na forma de

(Ac), representou um grande avanço nas pesquisas em Hanseníase (PAYNE et al., 1982).

A conclusão do sequenciamento genômico do *M. leprae* foi um marco nos estudos referentes a este bacilo (COLE et al., 2001). Ficou evidenciada uma grande perda de genes funcionais quando comparado ao genoma de *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998). Somente 49% do genoma de *M. leprae* contêm genes que codificam proteínas. Acredita-se que a perda maciça de genes e as mutações em genes associados as vias metabólicas sejam a causa do insucesso no cultivo do bacilo, assim como poderiam explicar o seu crescimento lento (VISSA; BRENNAM, 2001). Tal evolução reductiva severa ocasionou a eliminação de vários caminhos metabólicos, inclusive genes da cadeia respiratória, de sistemas regulatórios e catabólicos e houve a manutenção de genes bem específicos para a sobrevivência do *M. leprae* (COLE et al., 2001). É provável que o ambiente intracelular extremamente estável, rico em substratos dentro de um nicho especializado de macrófagos e CS tenha favorecido essa adaptação do *M. leprae* (WILLIAMS et al., 2007).

O mecanismo de transmissão do *M. leprae* ainda não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que a principal rota de transmissão seja o trato respiratório (SCOLLARD et al., 2006). O contágio ocorre por contato pessoa a pessoa, convívio próximo entre doentes multibacilares (MB) sem tratamento com os indivíduos susceptíveis. Já está estabelecido e aceito que a principal fonte de infecção são os pacientes multibacilares (MOURA et al., 2008).

Estudos isolados sugerem fortemente que a transmissão ocorra também por trauma, casos zoonóticos por contato com tatus (BRATSCHI et al., 2015) e reservatórios ambientais, como fontes de água e cistos de ameba (WHEAT et al., 2014).

O *M. leprae* apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade. Estima-se que aproximadamente 95% dos indivíduos expostos sejam resistentes e capazes de montar uma resposta imunológica inata eficaz impedindo o estabelecimento da doença (SCOLLARD et al., 2006). Entretanto, nos indivíduos susceptíveis, a doença irá evoluir para uma das formas do espectro de apresentações clínicas da Hanseníase, dependendo de fatores como sexo, idade, susceptibilidade genética, associados também a fatores referentes às coletividades, como as condições geográficas e socioeconômicas (TALHARI et al., 2014).

1.2. Formas clínicas da Hanseníase

A Hanseníase se caracteriza por ser uma doença espectral onde as diferentes formas clínicas apresentadas estão relacionadas com a resposta imune específica do indivíduo frente ao *M. leprae* (SCOLLARD, 2008).

Ridley & Jopling (1966) desenvolveram uma classificação que se baseia na apresentação clínica, em combinação com os achados bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos, permitindo a caracterização de cinco formas clínicas: dois grupos polares opostos que são estáveis, tuberculoide polar (TT) e lepromatoso polar (LL) e as formas ditas intermediárias, “borderline” tuberculoide (BT), “borderline borderline” (BB) e “borderline” lepromatosa (BL), que se caracterizam por apresentar uma resposta imune instável com uma redução progressiva da resposta imune celular a medida que se aproximam do polo lepromatoso. Uma sexta classificação, a Hanseníase indeterminada (I) também foi descrita e pode ser considerada uma manifestação inicial da Hanseníase onde ainda não se consegue obter uma classificação específica já que a resposta do hospedeiro está insuficientemente diferenciada (MARIA; GOULART; GERAIS, 2014) (Figura 2).

O diagnóstico clínico da Hanseníase, segundo a classificação operacional da Organização Mundial de Saúde (OMS), baseia-se no número de lesões de pele, onde até cinco lesões é considerado paucibacilar (PB) e, com seis ou mais lesões é classificado como multibacilar (MB) (WHO, 1982). De acordo com essa classificação, quando disponível, recomenda-se a baciloscopia de pele como exame complementar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Durante o curso natural da doença, os pacientes podem sofrer os chamados estados reacionais, que são episódios de inflamação aguda ou subaguda com comprometimento neurológico, cutâneo ou sistêmico, associados com mudanças na resposta imunológica que irão variar em cada caso e, dependendo do tipo de reação. Esses episódios podem se manifestar durante o tratamento e até mesmo após o seu término, quando o paciente é considerado curado bacteriologicamente (SARNO; SAMPAIO, 1996). Os episódios reacionais são classificados como Reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e Reação do Tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). A neurite também pode ser considerada um tipo de episódio reacional, podendo ocorrer de forma isolada ou no contexto da RR ou ENH (ANDRADE et al., 2015). A RR caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), infiltração,

alterações de cor e edema nas lesões antigas. A Reação Tipo 2, caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos subcutâneos dolorosos, acompanhados ou não de febre, dores articulares e mal-estar generalizado. Em ambos os casos podem ocorrer ou não, espessamento e dor em nervos periféricos (neurite) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

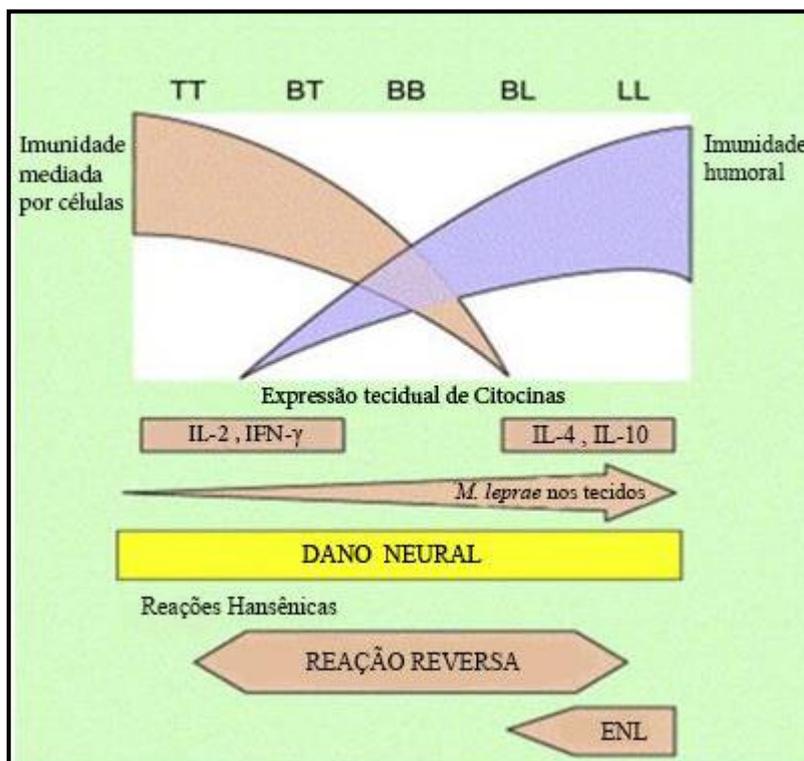


Figura 2: Classificação de Ridley e Jopling para as diferentes formas clínicas da Hanseníase. TT: tuberculose tuberculose; BT: *borderline* tuberculose; BB: *borderline borderline*; BL: *borderline* lepromatosa; LL: lepromatosa; ENL: eritema nodoso lepromatosa. Fonte: LOCKWOOD; SAUNDERSON, 2012.

Independente da forma clínica, os pacientes podem apresentar neuropatias em qualquer estágio da doença. A neuropatia frequentemente progride de forma silenciosa, o que impossibilita de forma contundente o diagnóstico precoce e a prevenção dos danos permanentes e incapacitantes da Hanseníase (MONTAGNA et al, 2005).

Existe ainda, um subgrupo à parte, a Hanseníase Neural Pura (HNP), que é caracterizada por apresentar exclusivamente neuropatia periférica sem alterações dermatológicas (JARDIM et al., 2003). Como não há a lesão de pele, sinal cardinal da Hanseníase e a baciloscopia é negativa, existe uma grande dificuldade na identificação da doença (GARBINO et al., 2013). Os critérios utilizados de modo complementar à clínica no diagnóstico da HNP são os achados imunológicos e histopatológicos, que demandam uma longa investigação, bem como os achados dos Estudos de Condução Nervosa (ECN), porém são poucos os locais com esta instrumentação biomédica

disponível (GARBINO et al., 2011; JARDIM et al., 2005). A eletroneuromiografia além de avaliar a distribuição da neuropatia, também auxilia na escolha do nervo e local a ser biopsiado (GARBINO et al., 2004).

1.3. Epidemiologia e Tratamento

A Hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. A doença e as deformidades visíveis a ela associadas são responsáveis pelo grande estigma social e pela discriminação contra os pacientes e suas famílias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O diagnóstico precoce e início imediato do tratamento com a Poliquimioterapia (PQT) dos casos de Hanseníase representam a estratégia básica no controle da doença. Em abril de 2016, a OMS lançou “5 anos de estratégia global para eliminação da Hanseníase” tendo como meta principal a redução da carga da doença a ser alcançada em 2020, baseada em três pilares: fortalecimento do controle e parceria governamental, redução a zero de novos casos de deformidades físicas visíveis e permanentes, conhecidas como incapacidades físicas grau 2 (IFG2) e zero países com legislação ativa que permita discriminação e a promoção da inclusão social dos indivíduos acometidos pela Hanseníase (WHO, 2017).

Classifica-se o caso de Hanseníase como incapacidade física grau 0, quando a força muscular e a sensibilidade desses segmentos estão preservadas; grau 1, quando há diminuição da força muscular e/ou diminuição de sensibilidade; e grau 2, quando há deformidade visível nas mãos e/ou pés e/ou olhos (Ministério da Saúde, 2016). Em 2016, 143 países de todas as regiões da OMS preencheram os relatórios, obtendo-se a informação de que 171.948 casos foram registrados em tratamento com a PQT com uma taxa de prevalência global de 0.23 por 10 mil habitantes. Essa taxa foi um pouco menor do que a de 2015, onde foram registrados 176.176 casos com uma taxa de prevalência de 0.27 por 10 mil habitantes. Entretanto, em 2017 foram registrados 192.713 casos em tratamento, representando uma taxa de prevalência de 0,25 a cada 10.000 habitantes, um aumento de 20.713 casos em relação a 2016 (WHO, 2018). Durante esse mesmo período foram notificados 210.671 novos casos, contabilizando uma taxa de detecção de 2,77 casos a cada 100.000 habitantes no mundo.

Apesar da distribuição dos novos casos ser bastante heterogênea, como mostra a Figura 3, o Brasil, a Índia e a Indonésia continuam sendo os países com o maior número de ocorrências notificadas (WHO, 2018).

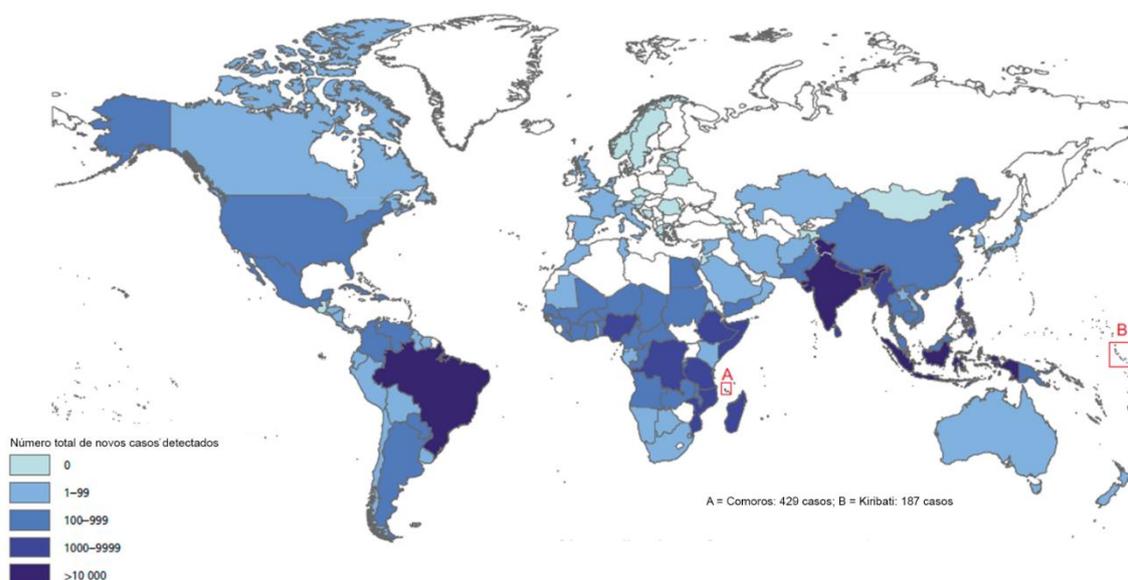


Figura 3: Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase no ano de 2017. Fonte: Adaptado de WHO, 2018.

No Brasil, em 2016, foram notificados 25.218 casos novos, perfazendo uma taxa de detecção de 12,2 por 100 mil habitantes. Esses parâmetros classificam o país como de alta carga para a doença, sendo o segundo com o maior número de casos novos registrados no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Segundo análises do Boletim epidemiológico de 2018, no período de 2012- 2016 a taxa de detecção no Brasil foi maior no sexo masculino (55,6% do total) em todas as faixas etárias, assim como os homens também representaram o maior número de casos MB e maior número dos que apresentaram IFG2. Todos esses dados relatados no Brasil ressaltam a importância de se realizar um planejamento de atividades focado principalmente nos aspectos relacionados à educação em saúde, sobretudo na abordagem do autocuidado (NICKEL; SCHNEIDER; TRAEBERT, 2014).

De acordo com estudos indianos, a prevalência da HNP varia entre 4-18% de todas as formas clínicas da Hanseníase (SHARMA, 2008). Essa proporção irá variar de acordo com a população estudada. Estudos no Brasil evidenciaram uma taxa que variou

entre 5,5-22,1% (JARDIM et al., 2003; GARBINO et al., 2011; GARBINO et al., 2013; SANTOS et al., 2017).

A introdução da PQT, uma combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona em meados de 1980 resultou em uma redução significativa na prevalência global da Hanseníase de 5,4 milhões de indivíduos para milhares em 2015 (WHO, 2016).

O tratamento deve ser iniciado já na primeira consulta, após a definição do diagnóstico, nos casos que não tenham contraindicações, como alergia a sulfa e à rifampicina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Para pacientes PB, somente rifampicina (600 mg, uma dose supervisionada por mês) e dapsona (100 mg por dia, em casa) são empregados por um período de seis meses. Caso a dapsona precise ser suspensa, deverá ser substituída pela clofazimina 50 mg por dia, e o paciente tomará também 300 mg da mesma uma vez por mês na dose supervisionada. Para pacientes MB, cujo tratamento dura um ano, serão utilizados uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina, 100 mg de dapsona e de 300 mg de clofazimina. Em casa, o paciente tomará 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina diariamente. Caso a dapsona precise ser suspensa, deverá ser substituída pela ofloxacina 400 mg (na dose supervisionada e diariamente) ou pela minociclina 100 mg (na dose supervisionada e diariamente) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Pacientes que desenvolvem os estados reacionais necessitam de diagnóstico e tratamento precoce, pois constituem a maior causa de lesões nervosas periféricas e aumento das incapacidades. Nos pacientes com a reação tipo 1 utiliza-se prednisona, 1mg/kg/dia via oral (pela manhã, no café da manhã) ou dexametasona 0,15 mg/kg/dia em casos de doentes hipertensos ou cardiopatas. Deve-se associar antidepressivo tricíclico em dose baixa (amitriptilina, 25 mg por dia), associado a clorpromazina 5 gotas (5 mg) duas vezes ao dia, ou a carbamazepina, 200 a 400 mg por dia nos casos de dor neural. Nos pacientes que desenvolvem a reação tipo 2 utiliza-se a talidomida, 100 a 400 mg/dia via oral (de preferência à noite, pela possibilidade de sonolência), de acordo com a gravidade do caso. Como alternativa, para mulheres em idade fértil ou em pacientes com contraindicações a talidomida, pode-se utilizar a pentoxifilina na dosagem de 400 mg três vezes ao dia, ou anti-inflamatórios não hormonais. É indicado associar prednisona 1 mg/kg/dia via oral pela manhã quando houver comprometimento dos nervos, de outros órgãos como testículos, olhos e se houver ulcerações extensas da pele. No caso de necessidade de associar talidomida e corticoides, deve-se fazer o uso

profilático de ácido acetilsalicílico para se evitar tromboembolismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Para os indivíduos que desenvolvem a HNP ainda não existe um protocolo de tratamento estabelecido pela OMS baseado no número de nervos acometidos (HANDA; DOGRA, 2003). Entretanto, muitos especialistas classificam a HNP como PB para fins terapêuticos, já que todos são BAAR negativos no esfregaço cutâneo e a grande maioria apresenta reação de Mitsuda positiva (RAO; SUNEETHA, 2016). Essa é a conduta preconizada no Ambulatório Souza Araújo (ASA) assim como também foi a recomendação do Programa de Erradicação Nacional da Hanseníase (PENH) da Índia em 1987, que inseria a HNP no grupo PB.

O teste de Mitsuda consiste na inoculação intradérmica de uma solução de bacilos de *M. leprae* mortos pelo calor, e quatro semanas após, é realizada a leitura onde o aparecimento de uma lesão pápulo-nodular ≥ 5 mm confere positividade ao teste, o que representa na histologia um padrão de resposta granulomatosa característica da forma tuberculoide da Hanseníase (MITSUDA, 1953; PROJETO DIRETRIZES, 2011). A maioria da população em área endêmica apresenta positividade no teste de Mitsuda, quando infectada pelo *M. leprae*, e pode evoluir para as formas PB, não transmissível (RIDLEY; JOPLING, 1966). Segundo dados coletados para o Projeto de Diretrizes de 2011, o teste de Mitsuda poderá ser útil e colaborar na classificação do paciente com HNP em PB ou MB, quando analisado em conjunto com os dados clínicos, sorológicos e histológicos.

Sabe-se que em alguns casos a amostra neural pode apresentar características das formas *borderline* ou lepromatosa contendo bacilos ou até mesmo não apresentar anormalidades no exame histopatológico. Além disso, nem sempre é viável a realização da biópsia. Baseado nesses aspectos e de acordo com o guia atual do PENH da Índia e do Projeto Diretrizes de 2011 em HNP, quando não se tem acesso ao exame histopatológico da amostra de biópsia neural ou o exame não apresenta anormalidades, recomenda-se utilizar o número de nervos acometidos, onde somente um nervo acometido é considerado PB e mais de um nervo acometido é considerado MB, como critério clínico em conjunto com os achados imunológicos na classificação da HNP e assim definir o tratamento de PQT para cada forma. O tratamento da HNP pode ser realizado com o esquema MB caso sejam encontrados bacilos na biópsia de nervo ou caso o teste Mitsuda seja negativo. Caso o BAAR seja negativo e seja observada a

presença de resposta imune do tipo celular, pelo teste de Mitsuda, deve-se tratar os pacientes com o esquema PB (GARBINO et al., 2011). O tratamento da HNP requer a PQT acompanhada por uma dose adequada de corticoesteroides sistêmicos tanto nos casos de neurite silenciosa como neurite aguda (RAO; SUNEETHA, 2016).

Mesmo após o término do tratamento, é necessário que os pacientes tenham acompanhamento regular tendo em vista o risco de desenvolvimento tardio dos episódios reacionais e, conseqüentemente, déficit neurológico permanente (SCOLLARD, 2008).

1.4. Resposta Imune na Hanseníase

As diferentes formas clínicas da Hanseníase são determinadas pela resposta imune frente ao *M. leprae*, onde o predomínio da imunidade mediada por células está relacionado com a forma clínica tuberculoide, localizada e mais branda e a sua ausência com a forma clínica mais grave, lepromatosa e disseminada (MENDONÇA et al., 2008). A polarização da resposta imune é importante tanto na patogênese como na determinação das manifestações clínicas na Hanseníase (FONSECA et al., 2017). Nos pacientes PB (TT e BT) há o predomínio da imunidade celular com vigorosa resposta Th1 ao *M. leprae*, com predomínio de linfócitos T CD4⁺ secretores de IFN- γ , IL-2, IL-15 e fator de necrose tumoral (TNF), com formação de granulomas bem definidos e eliminação dos bacilos, apresentando uma resposta humoral reduzida (BHAT; PRAKASH, 2012; SALGAME et al., 1992). Em contraste, os pacientes LL apresentam um perfil predominante de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) sugerindo susceptibilidade à doença (YAMAMURA et al., 1991). Há ativação de células T reguladoras (T *regs*), produção significativa de anticorpos, mas que não conferem proteção, acarretando na proliferação e disseminação de *M. leprae*. Em comparação com pacientes TT, as lesões são deficientes de linfócitos T CD4⁺ porém apresentam numerosas células T CD8⁺ e macrófagos espumosos (macrófagos carregados de lipídeos) (SALGAME et al., 1992; YAMAMURA et al., 1991; YAMAMURA et al., 1992). A citocina IL-10 apresenta correlação positiva como o índice baciloscópio (IB) e é detectada em altas concentrações séricas em pacientes LL (MOUBASHER et al., 1998).

Estudos anteriores já demonstraram que a imunidade inata, pela ativação de receptores do tipo Toll (TLR), desempenha grande influência na resposta imune

adquirida e como consequência na diversidade de apresentações clínicas. O *M. leprae* ativa predominantemente o heterodímero TLR 2/1 expresso em macrófagos de pele, ocasionando a ativação celular, iniciando a eliminação do bacilo (JARDIM et al, 2007; KRUTZIK et al., 2003; KRUTZIK et al., 2005; MAEDA et al., 2005). Os TLR 2 e 4 reconhecem o bacilo, ativam monócitos e liberam IL-12, que induz a produção de citocinas inflamatórias e eliminação dos bacilos (BOCHUD; HAUM; ADEREM, 2003; KRUTZIK et al., 2003; KANG et al., 2002). Já foi descrita a diminuição da expressão de TLR 2 nos monócitos pela ação de IL-4 na forma LL (BRIGHTBILL et al., 1999). As CS também expressam TLR2 e a sua ativação contribui para o dano neural na hanseníase (OLIVEIRA et al., 2003).

Além das respostas Th1 e Th2, outras subpopulações de linfócitos T têm sido identificadas desempenhando papel importante na resposta imune ao *M. leprae*. Foi demonstrado que células Th17 são encontradas com maior frequência em pacientes TT e BT quando comparados com os pacientes BL e LL e essas células estimulam a produção de IFN γ e inibem a produção de IL-10 pelas células T *regs* (SADHU et al., 2016), o que sugere uma ação protetora das células Th17 contra *M. leprae* (Salgame et al., 1992). As células Th17 produtoras de citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 ativam macrófagos, levam a inflamação e destruição tecidual, recrutam neutrófilos e aumentam a ativação de células Th1 efetoras. Em contraste, as células T*regs* FoxP3⁺ produtoras de TGF- β podem suprimir a função das células T efetoras e estão aumentadas em pacientes LL, o que sugere estar relacionado a anergia associada a essa apresentação clínica da hanseníase (SADHU et al., 2016).

Nas formas intermediárias (BT, BB e BL) a resposta imune é instável e esta se apresenta com uma redução progressiva na imunidade celular à medida que migra para o polo lepromatoso (RIDLEY & JOPLING, 1996).

A avaliação de mediadores plasmáticos em pacientes com episódios reacionais hansênicos demonstrou que tanto IL-6 como CXCL-10 estão associados com a ocorrência de RR sendo considerados marcadores sistêmicos promissores da RR (STEFANI et al., 2009). Outro estudo publicado recentemente demonstrou que pacientes MB que desenvolveram um quadro de RR tiveram um aumento significativo da concentração sérica de IL-1 β quando comparados a pacientes que não tiveram reação, sugerindo que o padrão de resposta imune inata possa prever a ocorrência do episódio reacional (BARBOSA et al., 2018).

1.5. Hanseníase Neural Pura

A HNP, também conhecida como hanseníase neurítica pura, foi primeiramente reconhecida e incluída em uma classificação oficial pela Associação Indiana de Leprologistas (AIL) em 1955 e era chamada de hanseníase polineurítica. Em 1982 a AIL alterou o nome para forma neurítica pura da Hanseníase pelo fato do termo poli ser referente ao número de nervos (RAO; SUNEETHA, 2016). Essa forma clínica é mais comum no subcontinente indiano comparado a outros países no mundo (PRASAD, 2005). Vários outros nomes têm sido usados como sinônimos, por exemplo, Hanseníase neural, neurítica, neural pura, neural primária, neurítica primária, neural puramente ou ainda polineurítica (MAHAJAN; JOGAIKAR; MEHTA, 1996).

A HNP é caracterizada pela ausência de lesões na pele e baciloscopia negativa apresentando hipoestesia, déficit motor e autonômico, espessamento neural e presença ou não de dor como sintomas clínicos comumente encontrados (JARDIM et al., 2005).

Jardim e colaboradores (2003) estabeleceram critérios gerais na determinação da HNP a partir da interpretação de achados clínicos, epidemiológicos em conjunto com a eletroneuromiografia, testes laboratoriais e achados histopatológicos de biópsias neurais. Os testes utilizados no diagnóstico da HNP buscam a demonstração direta através da presença do bacilo nas amostras de biópsias, indireta (via testes sorológicos) ou ainda a ocorrência de possíveis biomarcadores que surgem decorrentes das alterações de resposta inflamatória (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Na suspeita de HNP, a realização da biópsia de pele de áreas hipoestésicas pode auxiliar o diagnóstico (MENICUCCI et al., 2005) assim como nas áreas próximas ao nervo acometido no caso de não terem sido detectadas áreas de hipoestesia cutânea (SUNEETHA et al., 2000). A confirmação inequívoca do diagnóstico de HNP requer a demonstração do BAAR na amostra de qualquer nervo sensitivo acometido (ANTUNES et al., 2012). Baseado em estudos anteriores, a frequência que o bacilo é identificado varia de 12,5% (Jardim et al., 2003) a 33% (Garbino, 2004). Na ausência do bacilo, as alterações histopatológicas sugestivas de Hanseníase como infiltrado inflamatório, presença de granuloma, fibrose, entre outras, juntamente com a detecção do DNA de *M. leprae* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e/ou elevados níveis séricos de anticorpos IgM anti- PGL-1 irão direcionar o clínico para um diagnóstico provável

ou possível (JARDIM et al., 2005). Estudos anteriores confirmam a alta sensibilidade e especificidade do teste de identificação do DNA de *M. leprae* via PCR (JARDIM et al., 2003). A PCR tem valor especial em situações de difícil diagnóstico como nos casos de HNP, PB e pacientes com apresentações clínicas atípicas, porém com características histopatológicas características de Hanseníase (MARTINEZ et al., 2014). Tais testes complementares buscam aumentar a precisão diagnóstica da HNP e terão utilidade num contexto clínico altamente sugestivo numa área endêmica (ANTUNES et al., 2012).

Em pacientes com suspeita de HNP é recomendado que a eletroneuromiografia seja realizada no momento da avaliação diagnóstica para definição do quadro da neuropatia e para o auxílio da escolha do nervo que será biopsiado (GARBINO et al., 2011). A biópsia do nervo deve ser realizada exclusivamente em nervos sensitivos ou ramos sensitivos de nervos mistos (GARBINO et al., 2011). Este teste complementar é muito importante para o diagnóstico precoce da HNP uma vez que um grande percentual de contatos domiciliares é diagnosticado com essa forma clínica e estes nem sempre apresentam espessamento neural e outros sinais de neuropatia (SANTOS et al., 2017).

Em áreas endêmicas, mesmo que os achados histopatológicos sejam inconclusivos e que o PCR para *M. leprae* seja negativo, quando se tem uma suspeita inicial de neuropatia periférica confirmada com a eletroneuromiografia e o paciente apresenta soropositividade ao PGL-1, o paciente é diagnosticado com a HNP e será tratado. Vale ressaltar que um resultado negativo para PGL-1 não exclui a possibilidade do paciente apreenar HNP (JARDIM et al., 2005).

As incapacidades físicas na Hanseníase são importantes sinalizadores do diagnóstico tardio e manifestam-se por perda de sensibilidade protetora, diminuição da força muscular e/ou surgimento de deformidades visíveis. Ocorrem nas mãos e/ou nos pés e/ou nos olhos. A detecção de IFG2 durante o diagnóstico da HNP reforça a complexidade dessa forma clínica, levando a demora ao tratamento, onde o dano neural é muito mais agressivo que o dano observado em outras formas clínicas da Hanseníase (SANTOS et al., 2017).

1.6. Patogênese do dano neural

A Neuropatia causada por *M. leprae* é considerada a neuropatia periférica de origem infecciosa mais comum no mundo, representando ainda um problema grave de saúde pública devido ao grande potencial incapacitante, discriminação social e estigma associados à Hanseníase (YAWALKAR, 2002).

Uma neuropatia “silenciosa”, insidiosa, progressiva e lenta pode ocorrer nos pacientes em todas as formas clínicas da Hanseníase (SCOLLAR; TRUMAN; EBENEZER, 2015). A progressão da lesão nervosa pode ocorrer mesmo após o tratamento com a PQT e a cura bacteriana clínica ser estabelecida (WILDER-SMITH; VAN BRAKEL, 2008). Resultados dos estudos de Ng e colaboradores, (2000) sugerem que *M. leprae* mesmo morto e o PGL-1 têm a capacidade de acarretar efeitos profundos na CS, o que levaria à contínua ativação e desregulação das delicadas funções neurais pela retenção da bactéria morta e restos de sua parede celular nos tecidos neurais após efetiva PQT. Logo, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com o intuito de se interromper a interação *M. leprae*-CS são importantes, tanto na prevenção como na continuidade do dano neural (RAMBUKKANA et al., 1997).

A atrofia axonal tem sido descrita nas lesões neurais na Hanseníase e foi observada num estudo em camundongos (SCOLLARD et al., 2015). A hipofosforilação das proteínas neurofilamentares nos nervos ciáticos não infectados dos camundongos inoculados com *M. leprae* no coxim plantar, sugerem que alterações bioquímicas ocorram precocemente e anteriormente às alterações estruturais nas fibras mielínicas (SCOLLARD et al., 2015).

A infecção lenta e prolongada do nervo periférico pelo *M. leprae* aparenta ser determinante para que a destruição neural ocorra. Porém, mesmo após o término do tratamento com PQT há evolução da lesão nervosa acarretando fibrose severa, sugerindo que células fibrogênicas deem continuidade ao processo de fibrose resultando em deformidades e paralisias incapacitantes responsáveis pelo grande estigma que envolve a doença (PETITO et al., 2013).

A fibrose tem sido descrita em 60% das biópsias neurais de pacientes hansênicos (CHIMELLI et al., 1997) e a principal célula envolvida no reparo fibrogênico continua sendo objeto de pesquisa. Já é amplamente aceito que os miofibroblastos alfa-actina de músculo liso (α -SMA) positivas têm posição de destaque no processo fibrogênico,

atuando como células com atividades pró-inflamatórias, assim como produtoras de colágeno.

No estudo realizado por Petito e colaboradores (2013), a presença de células α -SMA positivas e de “*stress fibers*”(feixes de actina contrátil) em culturas de linhagens de CS estimuladas com *M. leprae* e/ou TGF- β 1 sugeriu a ocorrência de transdiferenciação da CS em miofibroblasto sob o estímulo de TGF- β 1, o que poderia ser um dos mecanismos envolvidos na fibrose neural na Hanseníase.

A barreira hematoneural propicia que os nervos sejam sítios protegidos da atuação do sistema imune. Quando lesionados ou a partir da infecção por *M. leprae*, essa barreira pode ser quebrada (RAO; SUNEETHA, 2016). Evidências clínicas e histopatológicas já demonstraram que as CS são o principal alvo do *M. leprae* (MUKHERJEE; ANTIA, 1986). A presença de *M. leprae* dentro das CS provocam, inicialmente, uma resposta inflamatória leve, porém, após poucos meses à anos os produtos antigênicos de *M. leprae* disparam o reconhecimento e a resposta imune (RAO; SUNEETHA, 2016).

Apesar do *M. leprae* ser capaz de infectar tanto CS mielínicas como amielínicas, as CS amielínicas apresentam maior susceptibilidade frente ao bacilo, funcionando como o ambiente ideal tanto para a proliferação do bacilo como também para sua proteção contra a resposta imune do hospedeiro (RAMBUKKANA et al., 2002). A CS é incapaz de destruir o bacilo que reside no interior da célula e o acesso de agentes terapêuticos é limitado devido à barreira hematoneural, o que possibilita um microambiente favorável ao *M. leprae* em termos de sobrevivência e proliferação (RAMBUKKANA; SALZER; YURCHENCO; TUOMANEN, 1997). Foi demonstrado que as CS adultas após invasão de *M. leprae* são reprogramadas em células tronco-progenitoras, fornecendo condições mais favoráveis à permanência do bacilo na célula, assim como sua disseminação e colonização de outras células e tecidos (MASAKI et al., 2013).

Ainda não há uma opinião em comum se o dano neural causado na Hanseníase ocorra como resultado da entrada de *M. leprae* na CS ou em função do infiltrado inflamatório (Pinheiro et al., 2018). Em pacientes TT, o dano neural apresenta correlação positiva com IFN γ (RIENECK et al., 1993). A subpopulação Th1 ativada e a robusta resposta imune celular contribuem para a formação de granulomas e necrose caseosa, podendo culminar com a total destruição do nervo (SCOLLARD, 2006). Em

contrapartida, os pacientes LL apresentam resposta Th2 e sugere-se que a neuropatia esteja diretamente relacionada com a infecção por *M. leprae* (FONSECA et al., 2017).

De acordo com Medeiros e colaboradores (2015), há indícios que o comprometimento neural possa ocorrer primariamente com a entrada de *M. leprae* no compartimento do nervo, de forma assintomática, com posterior detecção de *M. leprae* pelo sistema imunológico, ocasionando um processo inflamatório exacerbado e, como consequência, o dano neural. Em modelo experimental de dano neural na hanseníase foi observado aumento de metaloproteinases de matriz (MMPs) que parecem ser produzidas por macrófagos e CS. Os níveis mais altos de expressão de mRNA MMP-2 e MMP-9 foram encontrados em nervos de pacientes com inflamação endoneural (OLIVEIRA et al., 2010). Sugere-se que as MMPs estejam envolvidas na alteração da permeabilidade da barreira hematoneural, na desmielinização e degeneração axonal, assim como na presença de fibrose (MEDEIROS et al., 2015).

Segundo Ng e colaboradores (2000), a interação *M. leprae*-CS via ligação do PGL-1 com o domínio G da cadeia $\alpha 2$ laminina representa um papel chave na indução da desmielinização e degeneração axonal. Também foi demonstrado em sistemas de cultura usando Schwannomas que o PGL-1 possui papel crítico para a interiorização de *M. leprae* e posterior desmielinização (RAMBUKKANA, 2004). Outro estudo, in vitro, sugeriu um modelo onde *M. leprae* causa desmielinização diretamente a partir da infecção e desdiferenciação da CS (TRUMAN et al., 2014). Entretanto, esses modelos não conseguem explicar o dano neural nos casos PB, onde o bacilo é raramente encontrado nas lesões (SHETTY; ANTIA, 1996).

Estudos recentes utilizando o modelo *Mycobacterium marinum*-larvas de peixe zebra, no qual a interação patógeno-hospedeiro pode ser vista em tempo real, descreveram um novo mecanismo onde se sugere que o dano neural e a desmielinização não são iniciados diretamente por *M. leprae*, mas sim por macrófagos infectados que patrulham os axônios (MADIGAN et al, 2017). O autor demonstrou que a destruição da mielina, edema axonal e a toxicidade mitocondrial axonal resultaram do aumento da expressão de óxido nítrico sintase derivada da intoxicação dos macrófagos perineurais pelo PGL-1. Outro estudo conduzido por Cambier e colaboradores (2017) demonstrou um mecanismo de evasão mediado especificamente pelo PGL-1 de *M. marinum*. Nesse estudo, os autores utilizaram o ventrículo do “hindbrain” do peixe zebra, que é protegido pela barreira hematoneural. Foi demonstrado que a expressão de PGL-1 nos

macrófagos residentes que fagocitam a micobactéria, promove a secreção de CCL2/MCP-1 que sinaliza e recruta monócitos naive que não são bactericidas e oferecem um ambiente seguro, permitindo a proliferação da micobactéria.

Um dos sintomas clínicos mais precoces da hanseníase é a perda sensitiva que pode ter origem na resposta imuno mediada aos antígenos liberados de *M. leprae* a partir das CS infectadas. Tal fato pode ser explicado pela proximidade entre os axônios sensitivos e as CS amielínicas. Macrófagos e linfócitos T podem secretar citocinas inflamatórias em resposta à liberação de antígenos do *M. leprae* a partir de CS amielínicas. Tanto as CS mielínicas como amielínicas são atacadas comprometendo os nervos periféricos podendo ocasionar a perda sensorial e motora (JOHNSON, 1997; JOB, 1989).

Oliveira e colaboradores (2005) demonstraram que o TLR2 é ativado por lipopeptídeos liberados a partir da degradação do *M. leprae* e expresso em CS podendo induzir a apoptose, contribuindo para a lesão neurológica característica da hanseníase.

1.7. Diagnóstico histopatológico da Hanseníase neural pura

O padrão ouro para a confirmação diagnóstica da HNP é a biópsia de nervo (Figura 4, 5) (RAO; SUNEETHA, 2016). O *M. leprae* é a única bactéria que infecta a CS, logo a demonstração do bacilo dentro do nervo periférico é patognomônico para o diagnóstico da hanseníase (SCOLLARD, 2008). Quando o *M. leprae* não é encontrado na amostra de biópsia neural, uma análise minuciosa das alterações histopatológicas torna-se necessária para se chegar a um diagnóstico provável (ANTUNES et al., 2012).

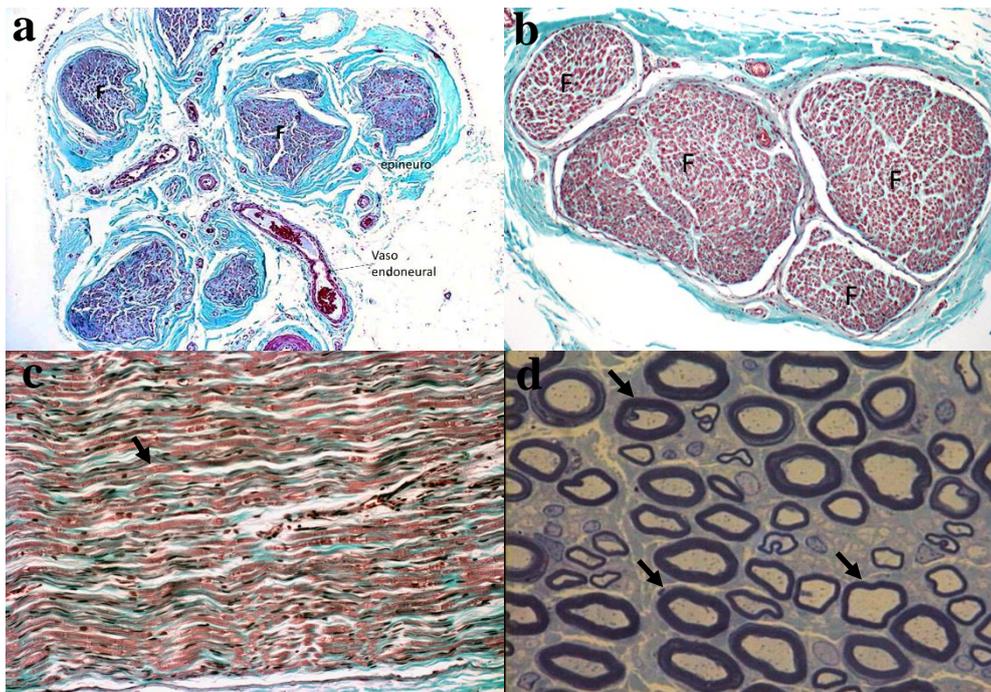


Figura 4: Histopatologia do nervo normal. Em (a): Corte transversal de nervo periférico mostrando grande quantidade fibras nervosas mielinizadas coradas em cor vinhosa (setas) dispostas ao longo do fascículo nervoso (F). Epineuro ao redor dos fascículos corado em verde. Tricromática de Gomori. Barra = 320 micrômetros. (b): Corte histológico transverso de nervo periférico com quatro fascículos nervosos (F) com aparência normal. As fibras mielinizadas se coram em tom avermelhado. Tricromática de Gomori. Barra = 320 micrômetros. (c): Corte longitudinal de nervo periférico mostrando grande quantidade fibras nervosas mielinizadas coradas em cor vinhosa (seta) dispostas ao longo do fascículo nervoso. Tricromática de Gomori. Barra = 160 micrômetros. (d): Corte transversal de um fascículo nervoso periférico mostrando fibras nervosas mielinizadas com bainha de mielina corada em azul (setas) de variados tamanhos formando feixes de fibras no interior do fascículo nervoso. Corte semifino (0,5 µm de espessura). Azul de toluidina. Barra = 48 micrômetros.

Dentre os achados inespecíficos, porém fortemente sugestivos de lesão por hanseníase, estão o infiltrado inflamatório crônico, não granulomatoso, envolvendo os compartimentos neurais epi-, peri- e endoneuro, 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; FREITAS; NASCIMENTO, 1997).

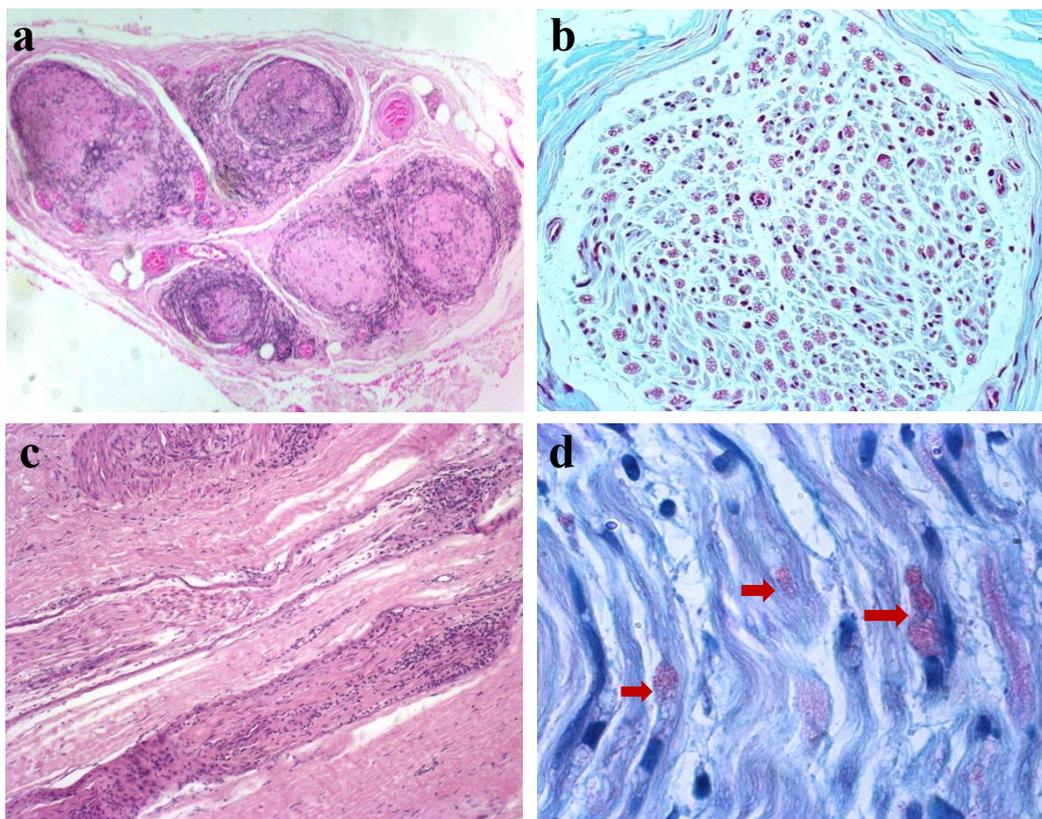


Figura 5: Histopatologia da Hanseníase neural pura. Em (a) Observa-se fibrose e infiltrado inflamatório em diferentes intensidades nos fascículos do nervo periférico (Aumento 10x, coloração HE). Em (b) Observa-se também a redução do número de fibras mielinizadas, sem infiltrado inflamatório significativo (aumento 20x, coloração Gomori). No plano transversal (c), observa-se o reduzido infiltrado inflamatório (aumento 10x, Coloração HE). Em (d) ilustra-se a presença de ML no interior da célula de Schwann (aumento 40x, coloração WADE).

É importante enfatizar que as amostras de nervo de pacientes HNP se apresentam normalmente em estágios avançados de destruição neural com perda severa de fibras, infiltrado inflamatório e/ou fibrose endoneural (ANTUNES et al., 2012). Foi demonstrado que a fibrose foi a alteração histopatológica não inflamatória mais consistente na HNP tanto em amostras BAAR⁺ como BAAR⁻, sugerindo então que tal achado no nervo é digno de suspeita de Hanseníase (Antunes et al., 2012). A lesão neural pode afetar fibras sensitivas, motoras e autônomas. Apresenta um infiltrado inflamatório contendo células epitelióides ou macrófagos contendo ML no interior, podendo ocupar o endoneuro, perineuro e epineuro (CHIMELLI; FREITAS; NASCIMENTO, 1997). A biópsia de nervo representa uma ferramenta eficiente no diagnóstico da HNP e no diagnóstico diferencial com NH (HUI et al., 2015). Mesmo com todas as limitações da biópsia, ela continua tendo papel relevante no diagnóstico da forma neural pura da hanseníase (JARDIM et al., 2005). Vale destacar que a amostra

de biópsia neural perde seu valor se não for avaliada por um patologista treinado (RAO; SUNEETHA, 2016).

Um estudo recente demonstrou a partir de imuno-histoquímica que MCP-1/CCL2 estava presente em amostras de nervo de pacientes com HNP estando esta quimiocina também associada com o depósito de matriz extracelular (MEDEIROS et al., 2015).

Existe uma lista ampla de doenças como, por exemplo, vasculites, polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CDIP), sarcoidose neural, AIDS, doenças hereditárias, reações à drogas entre outras que podem causar dano aos nervos periféricos. Testes complementares à avaliação clínica devem ser feitos para se estabelecer um diagnóstico diferencial entre a HNP e as neuropatias não Hanseníase (NH) (ANTUNES et al., 2012).

Os achados histopatológicos das neuropatias periféricas não hanseníase (NH) podem mostrar-se similares às alterações neurais na Hanseníase dificultando a confirmação diagnóstica quando o bacilo não é encontrado na amostra (WEIS et al, 2012). A presença de granuloma epitelióide, particularmente no endoneuro, é altamente sugestivo de Hanseníase, porém necessita-se realizar um diagnóstico diferencial com a sarcoidose neural apesar de ser rara, nas amostras neurais BAAR⁺. Na presença de inflamação endoneural, porém com a ausência de um granuloma bem definido, as vasculites e a polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (CDIP) devem ser consideradas no diagnóstico diferencial (HUI et al., 2015).

Uma vez que há limitações no diagnóstico histopatológico diferencial de HNP e NH, há a necessidade de investigar novos alvos a serem utilizados de modo complementar ao diagnóstico clínico. A identificação de um marcador, que possa ser utilizado na avaliação sérica e/ou plasmática poderá contribuir em muito para reduzir o desconforto que a realização da biópsia causa no paciente e mesmo para aumentar a efetividade do diagnóstico complementar da HNP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a existência de marcadores séricos que possam ser indicativos de HNP e que estejam correlacionados com as alterações histopatológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as alterações histopatológicas presentes nas amostras de biópsias neurais entre a HNP e NH;
- Correlacionar a positividade sérica do PGL-1 e as alterações histopatológicas observadas na HNP;
- Correlacionar a positividade do PCR das amostras de biópsias neurais e as alterações histopatológicas na HNP;
- Comparar as concentrações séricas de mediadores inflamatórios entre a HNP e NH;
- Correlacionar os níveis de quimiocinas séricas com os achados histopatológicos em ambos os grupos de estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. População estudada e seleção dos casos estudados

A população estudada foi recrutada no Ambulatório Souza Araújo (ASA), unidade de referência em hanseníase do Ministério da Saúde. No período entre 2004-2014, foram diagnosticados 78 casos de pacientes com a Hanseníase Neural Pura (HNP), o que correspondeu a 6,4% de todos os casos de Hanseníase diagnosticados nesse período nesta unidade. Para o presente estudo, selecionamos randomicamente 42 pacientes com HNP e 36 pacientes com diagnóstico de outras neuropatias não hanseníase (NH). Todos os pacientes desse estudo realizaram a coleta de soro no mesmo dia ou data próxima a realização da biópsia de nervo para análise histopatológica.

Os prontuários foram avaliados e, amostras de pacientes com idade inferior a 18 anos, diabéticos, portadores de infecções causadas por outras micobactérias e, aqueles co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), foram excluídas. Em conjunto, amostras de pacientes em uso de corticosteroides foram excluídas.

Foram utilizadas amostras do biorrepositório de soros do Laboratório de Hanseníase (LAHAN) e os dados histopatológicos foram obtidos pelo Banco de Dados do serviço de Patologia do LAHAN, coordenado pelo Dr. Sérgio Antunes.

Para fins diagnósticos, a HNP foi classificada de acordo com os seguintes critérios previamente descritos por Jardim e colaboradores (2003):

- Avaliação clínica detalhada dos indivíduos, detectando o número e distribuição de nervos afetados, presença de espessamento e/ou dor neural, diminuição de sensibilidade tátil e/ou térmica, disfunção autonômica, déficit motor e presença de incapacidades e deformidades físicas;
- Estudo de condução nervosa (eletro-neuromiografia) e dados epidemiológicos, que juntos direcionaram para a suspeita de HNP e para a escolha do nervo biopsiado e;
- Avaliação histopatológica.

A biópsia é importante na confirmação do diagnóstico da HNP, principalmente quando observada a presença de infiltrado inflamatório com BAAR⁺ ou granuloma epitelióide.

A presença de alterações inespecíficas como infiltrado inflamatório e a fibrose

tornam o diagnóstico provável. Os achados histopatológicos sugestivos de HNP em conjunto com a detecção do DNA de ML por PCR e/ou com a positividade sérica de anticorpo (Ac) anti glicolípido fenólico- 1 (PGL-1) são úteis na determinação do diagnóstico da HNP, quando associados à avaliação clínica e eletroneurofisiológica de neuropatia periférica numa área endêmica para Hanseníase (Antunes et al., 2012).

3.2. Avaliação histopatológica

A análise histopatológica foi realizada pelo Dr. Sérgio Antunes, neuropatologista do LAHAN, que preencheu todas as informações em um banco de dados e disponibilizou para o presente estudo. Tendo em vista que na grande maioria das vezes as amostras neurais são BAAR negativas, as alterações histopatológicas selecionadas no presente trabalho basearam-se no estudo realizado por Antunes e colaboradores em 2012.

Foram avaliadas as seguintes alterações histopatológicas nas amostras de biópsias neurais: infiltrado inflamatório endoneural, fibrose endoneural, remielinização, perda de fibras mielínicas e granuloma. Foi utilizado um sistema de cruzes para avaliar a ausência e presença dos achados histopatológicos na amostra: onde 0 (zero) representou ausência da alteração e 1, 2, 3 e 4 cruzes representaram a presença da alteração com um aumento gradual de intensidade. No presente estudo, em relação ao infiltrado inflamatório, remielinização e granuloma consideramos zero como ausência e 1, 2, 3 e 4 como presença; em relação à perda de fibras, 0 e 1 cruz corresponderam à ausência e 2, 3, e 4 com a presença da alteração e, em relação à fibrose endoneural: 0 = sem fibrose, 1 e 2 = pouca fibrose e, 3 e 4 = muita fibrose.

3.3. Parâmetros éticos

O presente estudo possui aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, sob o número de parecer 2.227.887, de 20 de agosto de 2017.

3.4. Processamento e armazenamento de soro

Os soros utilizados para o presente estudo fazem parte do biorrepositório de soros do LAHAN. Em resumo, para a obtenção dos soros foram seguidos os seguintes procedimentos: 10 mL de sangue total sem anticoagulantes foram coletados, após 10 minutos, necessários para a formação do coágulo, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 313 *xg*. Ao término da centrifugação, o soro foi coletado, aliquotado e armazenado a - 20°C para posterior utilização.

3.5. Dosagem de mediadores séricos

As citocinas e quimiocinas séricas foram avaliadas pelo método de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática). Foram avaliadas as concentrações séricas das seguintes citocinas: TNF, IL-1 β , IL-6, e IL-10 e das quimiocinas: MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10, nos soros de pacientes HNP e NH, utilizando os kits comerciais, conforme as especificações dos fabricantes (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1/CCL-2: eBioscience[®], EUA; IP-10/CXCL-10: PreproTech[®], EUA). O limite de detecção dos kits foi de 4 pg/mL para TNF, 2 pg/mL para IL-1 β , 2 pg/mL para IL-6, 2 pg/mL para IL-10, 7 pg/mL para MCP-1/CCL-2 e 16 pg/mL para IP-10/CXCL-10, conforme descrito nas fichas técnicas dos fabricantes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplaca (Spectra Max-Molecular Device, EUA) com filtro de 450 nm e a análise dos resultados pelo *software* específico (SOFTmax Pro v5.3, Molecular Devices, EUA). Para a quantificação da concentração sérica das diferentes citocinas, a medida de absorbância (450 nm) obtida foi comparada com os padrões pela correlação matemática por regressão linear dos dados da curva padrão. A análise dos resultados foi feita a partir da construção de uma curva padrão onde no eixo X colocou-se a concentração dos padrões e no eixo Y a média da densidade ótica (DO) de cada ponto padrão, desenhando uma melhor curva pelos pontos no gráfico. Os valores das amostras foram atribuídos em relação à curva padrão.

3.6. Sorologia para PGL-1

A sorologia por ELISA foi realizada essencialmente conforme descrito por Duthie et al. (2007). As amostras de soro foram avaliadas para a quantificação de IgM anti-glicolípido fenólico 1 (anti-PGL-1), utilizando o anticorpo anti-PGL-1 (*goat anti-*

human IgM (μ -*chainspecific*), AO420, do laboratório Sigma). Em resumo, em uma microplaca de 96 poços com fundo chato foi feita a adsorção do D-BSA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) adicionando-se 50 μL /poço do antígeno previamente diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,5, incubando-se a microplaca na geladeira por no mínimo 24 horas. Ao término da incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 200 μL de tampão fosfato de sódio (PBS)-tween 20 a 0,3% (PBS/T) e então bloqueados com soro albumina bovina (BSA) 3% em TBS/T por 1 hora a 37°C. Os poços foram novamente lavados 3 vezes com 200 μL de TBS/T. Adicionou-se 50 μL de soro diluído 1:200 em BSA 1%, incubando-se a 37°C por 1 hora. Após nova lavagem dos poços com PBS/T, adicionou-se o conjugado anti-IgM (Sigma), previamente diluído 5000 vezes (1:5000) em solução PBS-T com 1 % de BSA. Após incubação a 37°C por 1 hora, os poços foram lavados 4 vezes com PBS/T, adicionando-se 100 μL do substrato (tetrametilbenzeno) TMB (Sigma). A reação foi finalizada com 50 μL de ácido sulfúrico a 2,5 N e a leitura a 450 nm em leitor de microplacas. A densidade óptica (DO) de cada poço foi lida a 450 nm e o valor de corte para a positividade foi $\text{DO}_{450} = 0,25$.

3.7. PCR em tempo real

Para a detecção de DNA de ML pela reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras neurais foram processadas de acordo com as recomendações de Chemoulli *et al.* (1996), com poucas modificações. Um pequeno pedaço (1mm³) da amostra foi incubado com 50 μl NaOH em temperatura ambiente por 10 minutos, neutralizado com 1M NaH₂PO₄ e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 100 μl de 60 mM do tampão tris pH 8,8. Em seguida as amostras foram tratadas com 60 μg de proteinase K à 50°C por 30 minutos, seguido pela inativação enzimática à 95°C por 5 minutos. As amostras foram então submetidas ao procedimento de choque térmico, que consiste em três ciclos de 10 minutos de aquecimento e congelamento-descongelamento. A amplificação do DNA e as condições de hibridização foram realizados conforme Santos e colaboradores (1993).

3.8. Análise de dados

Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico SPSS[®], versão 22. A análise descritiva foi realizada com os dados demográficos (sexo e idade). Para a comparação das médias de idade foi utilizado o teste T e na análise comparativa do sexo, utilizamos o teste qui-quadrado. As concentrações das citocinas foram expressas como mediana, valor mínimo e máximo.

A normalidade das variáveis foi calculada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Como as citocinas não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para comparar as concentrações séricas entre os grupos HNP e NH, segundo as alterações histopatológicas na análise bivariada.

A frequência de alterações histopatológicas, PCR e PGL-1 entre os grupos foi comparada por meio dos testes de qui-quadrado e exato de Fisher.

Foram considerados significativos resultados cujo $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Infiltrado e fibrose endoneural são características histopatológicas em amostras de pacientes com a forma neural pura da hanseníase (HNP).

Com o objetivo de investigarmos diferenças no padrão histopatológico de lesões de nervo entre pacientes HNP e NH, foram utilizadas amostras de 42 pacientes HNP, atendidos no ASA no período de 2004 a 2014 e, de 36 pacientes NH. Conforme descrito na Tabela 1, houve um predomínio de pacientes do sexo masculino nos dois grupos avaliados. Na coorte utilizada nesse estudo (2004-2014), os casos de HNP representaram 6,4% de todos os casos diagnosticados de Hanseníase no ASA. A faixa etária no grupo NH foi significativamente maior do que no grupo HNP e os nervos utilizados para o diagnóstico histopatológico encontram-se listados na Tabela 1.

TABELA 1. Análise comparativa entre os dados demográficos e nervos biopsiados dos pacientes HNP e NH avaliados.

DADOS CADASTRAIS		GRUPOS (n=78)		
		HNP n = 42 (53,8%)	NH n = 36 (46,2%)	p - valor
SEXO	Masculino	31 (73,8%)	22(61,1%)	0,231
	Feminino	11 (26,2%)	14(38,9%)	
IDADE	Média	49,8	59	0,009*
	Desvio padrão	16,4	12,2	
NERVO	Fibular	3(7,14%)	4 (11,1%)	
	Sural	15(35,71%)	13 (36,1%)	
	Ulnar	21(50,0%)	18 (50%)	
	Mediano	3(7,14%)	1 (2,8%)	

*p≤0,05.

Entre os pacientes com HNP, 8 apresentaram neurite, 8 apresentaram dor neuropática e 6 apresentaram neuropatia troncular. Entre os pacientes com NH, 19 apresentaram neuropatia troncular. Não foi possível identificar o diagnóstico de todos os pacientes do grupo HN. Uma vez descartada a possibilidade de Hanseníase, os pacientes foram encaminhados para outras unidades de saúde e o desfecho diagnóstico se apresenta desconhecido no ASA.

Dos 42 pacientes com HNP, 25 foram avaliados quanto ao grau de incapacidade física. Destes, 16 (64%) apresentaram Grau II de incapacidade física, dois (8%) apresentaram Grau I e 16 (28%) não apresentaram incapacidade física.

Antunes e colaboradores (2012) demonstraram que a presença de granuloma epitelióide direciona para um diagnóstico definitivo de HNP, porém, na sua ausência, a presença de infiltrado inflamatório mononuclear é um achado inespecífico, assim como a remielinização e a perda de fibras nervosas, necessitando de um diagnóstico diferencial com outras neuropatias periféricas. Tanto em amostras BAAR⁺ como BAAR⁻, a fibrose representou a alteração não inflamatória mais consistente com a HNP de modo que, no presente estudo, selecionamos as seguintes alterações histopatológicas para avaliação: infiltrado inflamatório endoneural, fibrose endoneural, remielinização, perda de fibras e granuloma.

A análise das alterações histopatológicas nos dois grupos estudados demonstrou um maior percentual de pacientes HNP com a presença de infiltrado inflamatório endoneural, fibrose endoneural e granuloma. Por outro lado, um maior percentual de pacientes NH apresentou remielinização. Com relação ao parâmetro perda de fibras, 100% das amostras de pacientes NH apresentaram perda de fibras versus 84,6% das amostras de pacientes HNP (Tabela 2, Figura 5).

Tabela 2. Comparação da presença ou ausência das alterações histopatológicas, entre os grupos HNP e NH.

EXAMES COMPLEMENTARES		GRUPOS		p-Valor
		HNP (n=42)	NH (n=36)	
INFILTRADO INFLAMATÓRIO ENDONEURAL	SEM	19(45,2%)	34(94,4%)	0,001*
	COM	23(54,8%)	2(5,6%)	
FIBROSE ENDONEURAL	SEM	19(45,2%)	23(63,9%)	0,001*
	POUCA	5(11,9%)	12(33,3%)	
	MUITA	18(42,9%)	1(2,8%)	
REMIELINIZAÇÃO	SEM	28(73,7%)	11(30,6%)	0,001*
	COM	10(26,3%)	25(69,4%)	
	S.I.* (n=4)	4	0	
PERDA DE FIBRAS	SEM	6(15,4%)	0(0%)	0,026*
	COM	33(84,6)	35(100%)	
	S.I. (n=4)	3	1	
GRANULOMA	SEM	30(71,4%)	35(97,2%)	0,002*
	COM	12(28,6%)	1(2,8%)	

*p≤0,05

S.I.= sem informação. Os casos sem informação não foram considerados para a análise estatística

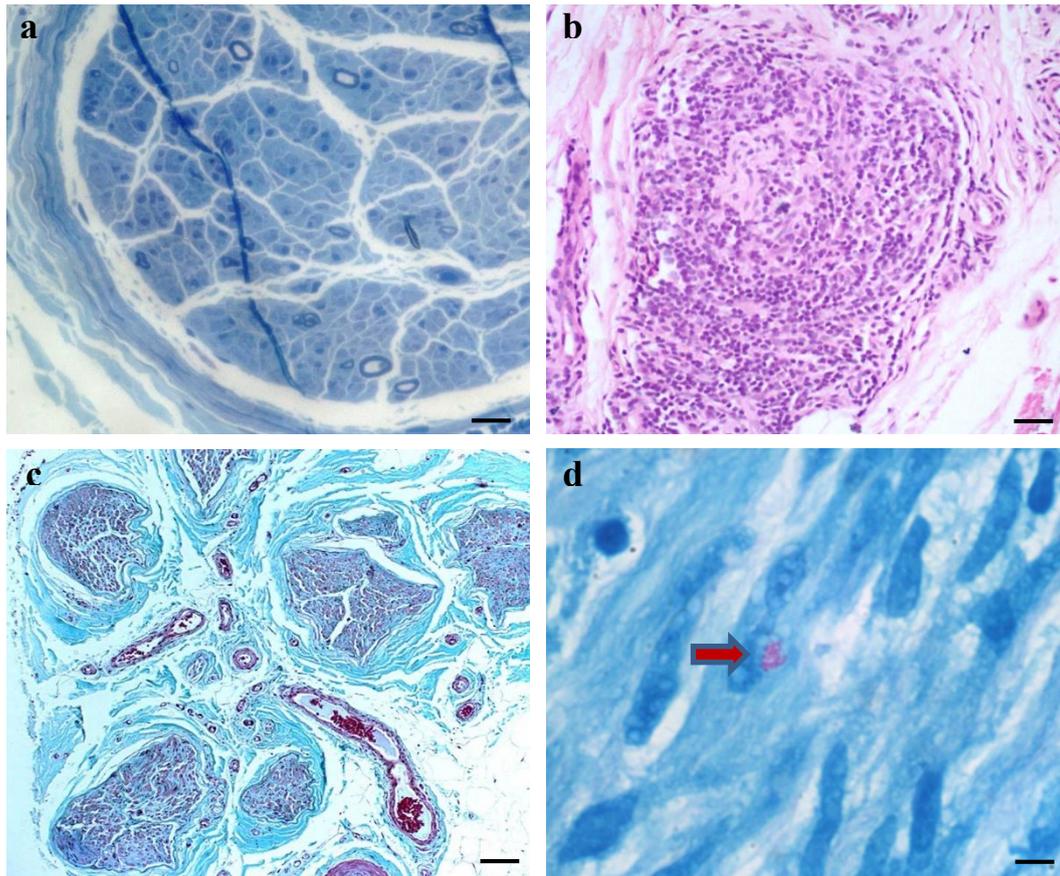


Figura 6: Histopatologia de amostras de biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase Neural Pura (HNP). Em (a) pode ser observada intensa perda de fibras (corte semifino; coloração azul de toluidina; aumento 40x). Em (b) observa-se intenso infiltrado inflamatório e destruição total do nervo (coloração hematoxilina e eosina; aumento 20x). Em (c) é possível identificar fibrose perineural e endoneural (coloração Gomori; aumento 10x). E em (d) observa-se em vermelho a presença de ML no interior da célula de Schwann (Coloração WADE).

4.2. Avaliação da sorologia PGL-1 e do PCR como parâmetros diagnósticos na HNP.

A sorologia anti-PGL-1 já foi descrita como possível ferramenta diagnóstica de infecção subclínica em pacientes com hanseníase (MOURA et al., 2008; DESFORGES et al., 1989). Com o intuito de observar se a sorologia anti-PGL-1 pode ser um bom parâmetro para o diagnóstico complementar na clínica, amostras dos dois grupos foram avaliadas quanto a positividade para PGL-1, conforme descrito na seção Metodologia.

Conforme observado na Figura 5, dos 42 soros avaliados no grupo HNP, apenas 5 apresentaram sorologia positiva para PGL-1. No grupo NH nenhuma amostra foi

reagente. Assim, pôde-se observar que a sorologia anti-PGL-1 apresenta 100% de especificidade, no entanto com baixa sensibilidade (11,9%) para o diagnóstico da HNP.

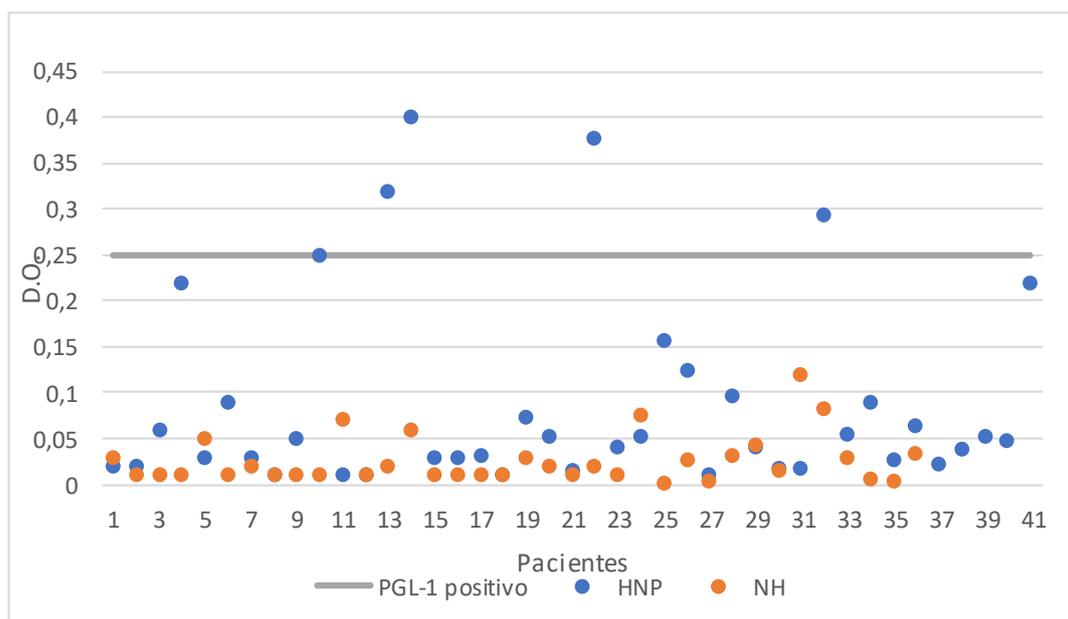


Figura 7: Reatividade para PGL-1. Soros de pacientes HNP (n=42) e NH (n=36) foram testados quanto à positividade para PGL-1. Os títulos iguais e superiores a 0,25 (D.O) foram considerados positivos.

Com o intuito de avaliar uma possível correlação entre a positividade ao PGL-1 e as alterações histopatológicas nas lesões neurais de pacientes HNP, avaliamos o percentual de pacientes PGL-1⁺ que apresentavam ou não as alterações histopatológicas descritas como importantes para o diagnóstico da neuropatia. Como observado na Tabela 3, as amostras de lesão neural dos cinco pacientes PGL-1⁺ apresentavam perda de fibras, mas não apresentavam granuloma. Quatro (80%) amostras dos cinco pacientes PGL-1⁺ apresentaram infiltrado inflamatório endoneural.

TABELA 3: Correlação entre a positividade do PGL-1 e os achados histopatológicos em HNP

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS		GRUPOS		p-Valor
		PGL-1 ⁻ (n=37)	PGL-1 ⁺ (n=5)	
INFILTRADO INFLAMATÓRIO ENDONEURAL	SEM	18(48,6%)	1(20%)	0,356
	COM	19(51,4%)	4(80%)	
FIBROSE ENDONEURAL	SEM	17(45,9%)	2(40%)	0,836
	POUCA	4(10,8%)	1(20,0%)	
	MUITA	16(43,2%)	2(40,0%)	
REMIELINIZAÇÃO	SEM	25(75,8%)	3(60%)	0,592
	COM	8(24,2%)	2(40%)	
	S.I. (n=4)	4	0	
PERDA DE FIBRAS	SEM	6(17,6%)	0(0%)	0,574
	COM	28(82,4%)	5(100%)	
	S.I. (n=3)	3	0	
GRANULOMA	SEM	25(67,5%)	5(100%)	0,298
	COM	12(32,5%)	0(%)	

No presente estudo, dos 42 pacientes do grupo HNP, 30 realizaram o teste para PCR e 12 (40%) foram PCR⁺. Os pacientes sem informação referente ao exame do PCR não entraram na análise estatística. Não foi possível estabelecer uma correlação entre a positividade do PCR e as alterações histopatológicas nas lesões neurais (Tabela 4).

Dos 12 pacientes PCR⁺, apenas um paciente era PGL-1⁺. Vale ressaltar que dois pacientes no presente estudo eram BAAR⁺, sendo os dois PCR⁺ e PGL-1⁻. Nos achados histopatológicos destes dois pacientes BAAR⁺ podemos observar que ambos apresentaram infiltrado inflamatório endoneural, granuloma e perda de fibras, nenhum deles apresentou remielinização e apenas um apresentou fibrose endoneural.

TABELA 4. Correlação entre a positividade do PCR de pacientes HNP e os achados histopatológicos

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS		PACIENTES TESTADOS(n=30)		p-Valor
		PCR ⁻ (n=18)	PCR ⁺ (n=12)	
INFILTRADO INFLAMATÓRIO ENDONEURAL	SEM	9(50,0%)	6(50,0%)	1,00
	COM	9(50,0%)	6(50,0%)	
FIBROSE ENDONEURAL	SEM	8(44,4%)	7(58,3%)	0,105
	POUCA	1(5,6%)	3(25,0%)	
	MUITA	9(50,0%)	2(16,7%)	
REMIELINIZAÇÃO	SEM	12 (80,0%)	7(63,6%)	0,407
	COM	3 (20,0%)	4(36,4%)	
	S.I. (n=4)	3	1	
PERDA DE FIBRAS	SEM	3(20,0%)	2(16,7%)	1,00
	COM	12(80,0%)	10(83,3%)	
	S.I. (n=3)	3	0	
GRANULOMA	SEM	12(66,7%)	8(66,7%)	1,00
	COM	6(33,3%)	4(33,3%)	

4.3. Determinação do padrão de citocinas séricas em pacientes com HNP.

Com o objetivo de investigar a possibilidade de discriminar HNP e NH pelo ensaio sorológico, selecionamos amostras de 42 pacientes HNP e 36 pacientes NH e avaliamos os seguintes mediadores: TNF, IL-6, IL-10, IL-1 β , IP-10/CXCL-10 e MCP-1/CCL2. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de IL-6, IL-10, TNF e IL-1 β nos dois grupos estudados (Figura 7, Tabela 5). No entanto, a

análise das concentrações séricas de IP-10/CXCL-10 e MCP-1/CCL2 demonstrou um aumento significativo no grupo NH com relação ao HNP (Figura 7, Tabela 5).

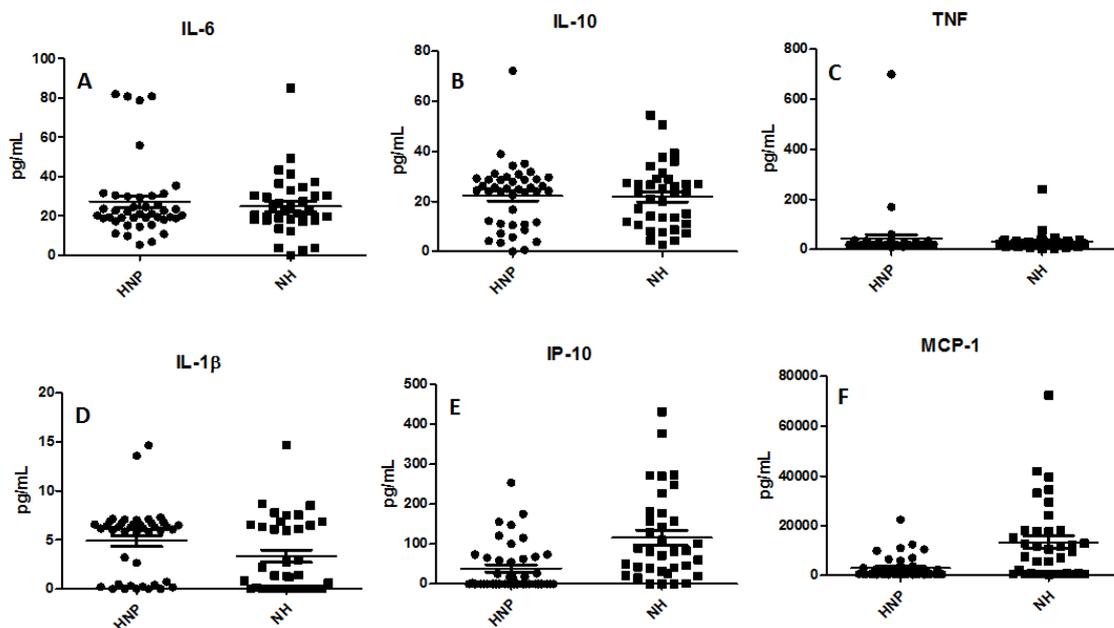


Figura 8: Concentrações séricas de citocinas e quimiocinas em pacientes HNP e NH. Os soros de pacientes com HNP (n=42) e NH (n=36) foram avaliados quanto às concentrações séricas de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF (C), IL-1 β (D), IP-10/CXCL-10 (E) e CCL2/MCP-1 (F) por ELISA, conforme descrito na Metodologia. A análise estatística dos dados está apresentada na Tabela 5.

TABELA 5. Comparação das concentrações séricas das citocinas entre os grupos HNP e NH.

	GRUPOS		
	HNP (n=42)	NH (n=36)	
	Mediana (mínimo-máximo)		
IL-6 (pg/mL)	21,16 (5,4-82,07)	21,91 (0-85,09)	0,912
IL-10 (pg/mL)	24,65 (0-72,23)	23,29 (2,62-54,48)	0,837
TNF (pg/mL)	20,96 (9,55-700,18)	22,30 (2,68-240,68)	0,873
IL-1β (pg/mL)	6,19 (0-14,66)	1,40 (0-14,68)	0,101
IP-10 (pg/mL)	0 (0-254)	82,78 (0-1.688,23)	$\leq 0,0001^*$
MCP-1 (pg/mL)	857,72 (504,59-22428,08)	10105,93 (511,73-72292,91)	$\leq 0,0001^*$

/

Como IP-10/CXCL-10 e MCP-1/CCL2 foram as duas quimiocinas que apresentaram diferenças significativas quando comparamos os grupos HNP e NH, fomos investigar a correlação entre as concentrações séricas e as alterações histopatológicas utilizadas como critério diagnóstico pela patologia.

Como observado na Tabela 6, em pacientes com HNP as concentrações séricas de MCP-1/CCL2 estavam aumentadas de forma significativa no grupo sem infiltrado e sem fibrose quando comparadas com as concentrações séricas dos pacientes com infiltrado e fibrose endoneural.

TABELA 6. Comparação entre as concentrações séricas das quimiocinas segundo as alterações histopatológicas em HNP e NH.

Alterações Histopatológicas	HNP		NH	
	IP-10	CCL2/MCP-1	IP-10	CCL2/MCP-1
Inf. Endoneural				
Sem	0 (0-156,12)	1487,63 (538,87-22428,08)	82,78 (0-1688,22)	8538,25 (511,72-72292,91)
Com	0 (0-254,01)	714,18 (504,58-11006,53)	71,34 (0-142,68)	28601,01 (17671,97-39530,05)
p-Valor	0,997	0,017*	0,721	0,225
Fibrose endoneural				
Sem	0 (0-254,01)	1487,63 (529,12-22428,08)	81,92 (0-431,94)	5689,16 (511,72-72292,91)
Pouca	0 (0-175,71)	554,12 (505,53-760,37)	0 (0-175,71)	554,12 (505,53-760,37)
Muita	1,39 (0-147,99)	825,94 (504,58-11006,53)	46,41 (46,41-46,41)	5630,32 (5630,32-5630,32)
p-Valor	0,795	0,042*	0,495	0,133
Remielinização				
Sem	0 (0-121,30)	709,34 (504,58- 11006,53)	101,23 (20,20-273,95)	11672,05 (563,23- 34484,28)
Com	0 (0-175,71)	1460,22 (514,71-22428,08)	81,92 (0- 1688,22)	9589,00 (511,72- 72292,91)
p-Valor	0,716	0,068	0,611	0,946
Perda de fibras				
Sem	27,58 (0-254,01)	1096,06 (538,87-7080,18)	101,23 (101,23-101,23)	34484,28 (34484,28-34484,28)
Com	0 (0-175,71)	816,72 (504,58-22428,08)	81,93 (0-1688,22)	9589,00 (511,72-72292,91)
p-Valor	0,635	0,955	****	****
Granuloma				
Sem	0 (0- 254,01)	848,49 (508,12-22428,08)	81,93 (0-1688,22)	9589,00 (511,72-72292,91)
Com	9,19 (0-147,99)	857,79 (504,58-3778,31)	89,84 (89,84-89,84)	12296,23 (12296,23-12296,23)
p-Valor	0,945	0,433	0,944	0,833

Legenda: o teste estatístico utilizado foi o teste Mann-Whitney para todas as alterações histopatológicas com exceção em relação à Fibrose, onde utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. *= p-valor estatisticamente significativo. ****= não foi realizada análise estatística já que todas as amostras apresentavam perda de fibras.

5. DISCUSSÃO

A HNP é caracterizada pela ausência de lesões de pele e ausência concomitante de bacilos na baciloscopia (ANTUNES et al., 2012; UPLEKAR; ANTIA, 1986). O exame clínico e eletrofisiológico do nervo periférico bem como a biópsia de nervo permanecem as únicas ferramentas no diagnóstico da HNP. A HNP ocorre em aproximadamente 1,5 a 8,1% dos pacientes com hanseníase (CHHABRA et al., 2015; PRASAD, 1998) e pode se apresentar como uma neuropatia periférica na forma de mononeuropatia ou como múltiplas mononeuropatias. A análise da biópsia de nervo tem um papel relevante no diagnóstico de HNP e na classificação desses casos (KULSHRESHTHA et al., 2018; SANTOS et al., 2017; TIWARI et al., 2017; HUI et al., 2015).

Apesar de ser útil para o diagnóstico de algumas neuropatias periféricas, em alguns casos é difícil chegar a um diagnóstico em função da pouca especificidade do achado das fibras neurais (Revisto por BATISTA et al., 2009). O diagnóstico de hanseníase pode ser feito pela biópsia de nervo nas formas neurais em 37% dos casos (BATISTA et al., 2009). Além disso, complicações decorrentes do procedimento já foram descritas, como neuroma, alodínia, desconforto e áreas de hipoestesia ou anestesia (PERRY; BRIL, 1994; POBURSKI et al., 1985; SOLDERS, 1988). Embora controverso, alguns autores afirmam que deve-se utilizar preferencialmente o nervo sural para o estudo, por ser exclusivamente sensitivo e fácil acesso devido a sua localização superficial. Os nervos ulnar, mediano, fibular comum, tibial, facial, radial cutâneo e auricular maior são os nervos mais frequentemente relatados (GARBINO et al., 2011; GARBINO et al., 2013; GIRDHAR, 1996; JARDIM *et al.*, 2004). Essa variabilidade dos nervos escolhidos pode ser devida aos diferentes protocolos de eletroneuromiografia utilizados, enfatizando a importância de uma avaliação extensa e cuidadosa da neuropatia da hanseníase, principalmente por meio de uma análise ampliada das conduções motoras e sensoriais, incluindo nervos que não são avaliados na rotina (SANTOS et al., 2017). No presente estudo foram utilizados os nervos ulnar, sural, fibular e mediano, de acordo com as evidências de alterações clínicas no território nervoso e na condução motora, bem como distúrbios de sensibilidade no tronco, como descrito previamente por Antunes e colaboradores (2012).

Uma limitação do presente estudo deve-se ao fato de que não foi possível ter acesso ao diagnóstico dos casos classificados como não hanseníase (NH). Ocorre que as amostras clínicas foram obtidas de pacientes que realizaram triagem no ASA para investigar hanseníase e, uma vez que a avaliação clínica, histopatológica, sorologia e PCR descartaram, esses pacientes receberam o diagnóstico de outras neuropatias no prontuário e, foram encaminhados para outras unidades de saúde. Desse modo, no presente estudo concentramos em avaliar características que possam discriminar a HNP de NH, independente do diagnóstico final de NH.

Um dos parâmetros avaliados foi o grau de incapacidade física dos pacientes. Quando não diagnosticada e tratada precocemente, a hanseníase pode evoluir com diferentes tipos e graus de incapacidades físicas (PIMENTEL et al., 2002). Em 1961, a Organização Mundial de Saúde padronizou um instrumento de avaliação das incapacidades, considerando como incapacidades somente as lesões em mãos, pés e olhos, por serem mais severas para as atividades cotidianas e de diagnóstico mais simples. De acordo com a gravidade, as lesões incapacitantes dessas regiões foram graduadas em leve, moderada e grave. A atual classificação dos graus de incapacidade foi implementada pelo Ministério da Saúde em 2002, unindo os casos anteriormente classificados como graves aos casos moderados, de modo a facilitar a avaliação nos centros de atenção básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Assim, o grau 0 corresponde a ausência de incapacidade, o grau I corresponde a diminuição ou perda de sensibilidade em olhos, mãos e pés e o grau II se refere a anormalidades nos olhos, mãos ou pés ou visíveis deformidades (ALVES et al., 2010).

Morais e Furtado (2018) demonstraram que alterações no grau de incapacidade são mais comumente observadas em pacientes com a forma multibacilar e neural pura da hanseníase. Em conjunto, eles discutem que um percentual de 10% de pacientes com grau II de incapacidade é considerado alto. No presente estudo, dos 42 pacientes com HNP, apenas 25 apresentavam informações sobre o grau de incapacidade preenchidas em prontuário e, destes, 64% apresentaram grau II de incapacidade. A princípio, a análise de tal percentual poderia ser indicativo de um atendimento tardio desses casos, no entanto, o fato de 17 pacientes com HNP não terem sido avaliados gera um viés na análise desse dado, não sendo possível concluir se realmente o percentual de indivíduos com grau II de incapacidade no nosso estudo estava acima da média encontrada em outras populações.

A análise de biópsias de nervo se revela uma importante estratégia para o diagnóstico da forma HNP, no entanto, a mesma se apresenta uma ferramenta eficaz em casos BAAR+, no entanto, nos casos onde não são observados bacilos, o diagnóstico histopatológico torna-se extremamente difícil e não deve ser utilizado como parâmetro único.

Na ausência de bacilos, a presença de granuloma epitelióide no nervo sinaliza uma alta probabilidade de hanseníase, principalmente quando o granuloma se encontra no compartimento endoneural (ANTUNES et al., 2012). No entanto, no presente estudo, 28,6% das amostras dos pacientes diagnosticados com HNP apresentaram granuloma versus 2,8% dos pacientes NH. Assim, apesar de apresentar uma especificidade de 97,2%, a presença de granuloma na biópsia se mostrou pouco sensível para o diagnóstico da HNP (28,6%) nos pacientes incluídos no presente estudo.

De acordo com Antunes e colaboradores (2012), outras alterações histopatológicas tornam o diagnóstico de HNP provável. Alterações não específicas como fibrose e edema endoneural tornam o diagnóstico provável. Já foi descrito que a hanseníase leva a uma densa fibrose durante os estágios finais do dano neural (JUNQUEIRA et al., 1980) e a fibrose tem sido relatada como a alteração não inflamatória mais comum em pacientes com HNP (ANTUNES et al., 2012). Um aumento no infiltrado inflamatório e na fibrose endoneural foi observado em 54,8% dos pacientes, no entanto 45,2% das amostras dos pacientes HNP não apresentaram tais alterações, sugerindo que apenas a análise histopatológica não permite discriminar com precisão HNP e NH.

Devido à dificuldade de diagnóstico em amostras BAAR negativas e a invasividade do procedimento para realização da biópsia de nervo, testes complementares têm sido avaliados. A identificação de anticorpos anti-PGL-1 em amostras de pacientes com neuropatia periférica pode ser considerada uma estratégia complementar importante para o diagnóstico da HNP (JARDIM et al., 2005). No presente estudo, apenas 5 (11,9%) soros de pacientes HNP apresentaram reatividade contra PGL-1, um percentual abaixo de 21%, encontrado em estudo anterior de Jardim e colaboradores (2005).

Uma vez que isoladamente os parâmetros não foram suficientes para o diagnóstico de HNP, investigamos a possibilidade de existir correlação entre a positividade à sorologia anti-PGL-1 e as alterações histopatológicas. Apesar do tamanho

amostral do grupo PGL-1 positivo ser pequeno, comparamos o padrão de alterações histopatológicas nas lesões de nervo em pacientes HNP com sorologia positiva e negativa para PGL-1, não sendo possível observar nenhuma correlação entre a positividade ao PGL-1 e a histopatologia.

O uso do PCR tem sido utilizado como mais um teste auxiliar no diagnóstico da HNP. Estudos anteriores demonstraram que o PCR, em conjunto com os resultados clínicos e neurológicos pode ser uma ferramenta poderosa para identificar e confirmar o resultado da HNP (JARDIM et al., 2003). Jardim e colaboradores (2003) demonstraram que 47% dos pacientes HNP apresentaram positividade no PCR para *M. leprae*. Em conjunto, Bezerra da Cunha e colaboradores (2006) demonstraram, em uma coorte de 58 pacientes, que mais de um terço dos pacientes com HNP BAAR⁻ tiveram o diagnóstico confirmado pelo PCR. No presente estudo, foi realizado o PCR de 30 pacientes HNP, dos quais 40% apresentaram positividade, corroborando dados anteriores.

De modo análogo ao observado na sorologia anti-PGL-1, não foi possível estabelecer uma correlação entre o PCR e as alterações histopatológicas. Tal observação pode sugerir que distintos mecanismos podem estar associados à imunopatogênese da HNP no nervo e sistemicamente.

Uma vez que o procedimento de realização da biópsia de nervo é extremamente invasivo, uma possibilidade seria a identificação de um marcador sérico que pudesse prever a neuropatia hansênica, independente da realização da biópsia de nervo. Assim, realizamos levantamento de estudos que tenham avaliado mediadores inflamatórios na neuropatia hansênica e/ ou nos episódios reacionais e selecionamos as citocinas: IL-6, IL-10, TNF e IL-1 β , bem como as quimiocinas: IP-10/CXCL-10 e CCL2/MCP-1 para o presente estudo.

Não foi possível observar diferença significativa nas concentrações séricas das citocinas avaliadas entre as amostras dos pacientes HNP e NH. No entanto, houve um aumento significativo nas concentrações séricas de IP-10/CXCL-10 e CCL2/MCP-1 no grupo NH quando comparado ao grupo HNP.

A modulação negativa da expressão de CCL2/MCP-1 foi demonstrada em experimentos nos quais células da linhagem monocítica humana, THP-1, diferenciadas com PMA (phorbol-12-miristato-13-acetato), foram estimuladas com *M. leprae*

(GUERREIRO et al., 2013). Em conjunto, neste mesmo estudo, Guerreiro e colaboradores (2013) demonstraram um aumento na expressão gênica de *CCL2* em amostras de lesão de nervo de pacientes NH quando comparadas às amostras de lesão de nervo de pacientes HNP.

Ao contrário da modulação negativa de *CCL2* descrita por Guerreiro e colaboradores (2013), foi demonstrado um aumento da expressão de *CCL2/MCP-1* em lesões de nervo de pacientes HNP quando comparados aos pacientes NH (MEDEIROS et al., 2015). O aumento de *CCL-2/MCP-1* foi observado principalmente nas regiões com infiltrado de macrófagos e células de Schwann e, o aumento de *CCL-2/MCP-1* correlacionou positivamente com a fibrose (MEDEIROS et al., 2005). No presente estudo, foi possível observar o aumento na concentração sérica de *CCL2/MCP-1* nos soros de pacientes HNP sem fibrose e sem infiltrado.

É possível que a redução das concentrações séricas de *CCL2/MCP-1* tenham contribuído para a disseminação do bacilo nos pacientes HNP, mesmo nos casos em que não foi possível encontrar o bacilo na biópsia. Dados anteriores demonstraram que a reduzida concentração de *CCL2*, associada à redução da concentração sérica de TNF, leva ao crescimento irrestrito e disseminado da micobactéria (HASAN et al., 2006). De modo análogo, já foi demonstrada a correlação positiva entre a concentração sérica de *CCL2/MCP-1* e elevados índices baciloscópicos (LEW et al., 2002).

O papel da quimiocina *CXCL10/IP-10* na imunopatogênese da hanseníase tem sido bastante estudado, inclusive tendo sido descrito o seu potencial como marcador plasmático do estabelecimento de episódio reacional tipo 1 (STEFANI et al., 2009). De modo similar ao observado para *CCL2/MCP-1*, as concentrações séricas de *CXCL10/MCP-1* estavam aumentadas nas amostras de pacientes NH quando comparados aos pacientes HNP. Não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre os achados da histopatologia com as concentrações séricas de *CXCL10/IP-10*.

Em conjunto, os dados apresentados sugerem que pacientes NH apresentam concentrações séricas aumentadas de *CCL2/MCP-1* e *CXCL10/IP-10* quando comparados aos pacientes HNP. O estudo dos mecanismos de regulação da produção dessas quimiocinas poderá contribuir para elucidar o papel dessas moléculas na patogênese da neuropatia hansênica.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo podemos concluir que:

- A presença do infiltrado inflamatório endoneural e da fibrose nas amostras de biópsias neurais, mesmo sendo consideradas alterações histopatológicas inespecíficas, estavam associadas de forma significativa ao grupo HNP no presente estudo, podendo representar importante auxílio na confirmação do diagnóstico nos casos onde os achados clínicos e eletromiográficos sejam sugestivos de HNP, mas que no teste sorológico de pesquisa de Ac anti- PGL-1 e no PCR foram negativos.
- Os pacientes que apresentaram sorologia positiva para PGL-1(n=5) não apresentaram granuloma nas biópsias neurais, o que poderia estar correlacionado a uma baixa resposta imune celular nesses pacientes.
- Apesar de não ter sido encontrada correlação significativa entre os achados histopatológicos e a sorologia Ac anti-PGL-1, este teste complementar apresentou 100% de especificidade apesar de baixa sensibilidade no presente estudo.
- Apesar de não ter sido possível correlacionar os achados histopatológicos com o teste do PCR, essa técnica se mostrou uma importante ferramenta no diagnóstico de pacientes com achados clínicos e/ou histopatológicos inespecíficos. Apresenta alta especificidade e sensibilidade.
- Não foi possível estabelecer correlação significativa entre as alterações histopatológicas das amostras de biópsias neurais com as citocinas estudadas.
- A concentração sérica aumentada de forma significativa das quimiocinas MCP-1/CCL2 e CXCL-10/IP-10 nos pacientes HN em comparação aos pacientes HNP, e a associação de concentrações séricas mais elevadas de forma significativa de MCP-1/CCL2 nos pacientes HNP que apresentavam ausência de infiltrado inflamatório endoneural e fibrose, pode sugerir que a presença do infiltrado inflamatório e fibrose contribuam para o aumento dessa quimiocina nas lesões neurais, o que reduziria as concentrações séricas desse mediador.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. J. M., et al. Avaliação do grau de incapacidade dos pacientes com diagnóstico de hanseníase em serviço de dermatologia do estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** [Internet]. Aug [cited 2017 Fev 1] v 43, n 4, p 460-461, 2010.
- ANDRADE, P. R. et al. Type 1 reaction in leprosy: A model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. **Expert Review of Clinical Immunology**, 2015.
- ANTUNES, S. L. G. et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: Obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n 2, p 246–253, 2012.
- BATISTA, K. T.; ARAÚJO, H. J.; JUNIOR, A. C. P. Biópsia do nervo sural: técnica, indicações e resultados. **Rev Bras Cir Plást**, v 24 n 2, p 158-16, 2009.
- BERNARD, J. C.; VAZQUEZ, C. A. Visceral lesions in lepromatous leprosy. Study of sixty necropsies. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v 41, n 1, p 94-101, 1973.
- BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Int J Infect Dis**, p 181-89, 2012.
- BOCHUD, P. Y.; HAWN, T. R., ADEREM, A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **J Immunol**. v 170, p 3451-3454, 2003.
- BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission: a systematic literature review. **Leprosy Review**, v 86, n 2, p 142–155, 2015.
- BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v 285, p 732-736, 1999.
- CAMBIER, C. J. et al. Phenolic glycolipid facilitates mycobacterial escape from a microbicidal population of tissue resident macrophages. **Immunity**, 2017 in press.

- CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptative immunity, and disease outcome. **Future Microbiol**, v 6 n 5, p 533-549, 2011.
- CHHABRA, N. et al. Leprosy sce-nario at a tertiary level hospital in Delhi: a 5-year retrospective study. **Indian J Dermatol**, v 60, n 1, p 55-59.13, 2015.
- CHEMOULLI, P.; WOODS, S.; SAID, G. et al. Detection of Mycobacterium leprae in nerve lesions by way of the polymerase chain reaction. **Int J Lepr**, v 64 p 1-5, 1996.
- 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. **Journal of Neurology**, v 244, n 5, p 318–323, 1997.
- COLE, S. T. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. v 409, n 6823, p 1007–1011, 2001.
- COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**. v 393, p 537-544, 1998.
- CROFT, R. P. et al. A clinical prediction rule for nerve-function impairment in leprosy patients. **Lancet**, v 355, n 9215, p 1603–1606, 2000.
- DA CUNHA, Francisco M. Bezerra. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Valor diagnóstico na hanseníase neural pura.2003.141f.Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DE SOUZA, V. N. B. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. **Clinics in Dermatology**, v 34, n 1, p 82–95, 2016.
- DIANA, N.; LOCKWOOD, Paul R. Saunderson. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers, **International Health**, v 4 n 2, 1 p 77–85, june 2012.
- FONSECA, A. B. de L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, 2017.

- GARBINO, J. A. et al. Hanseníase neural primária: revisão sistemática. **Arq Neuropsiquiatr**, p 397-404, 2013.
- GARBINO, J. A. Clinical and diagnostic aspects of the primarily neural leprosy 1 Aspectos clínicos e diagnósticos da hanseníase primariamente neural **Neurophysiologic study**, p 130–136, 2004.
- GARBINO, J. A., et al. Hanseníase Neural Primária. **Projeto Diretrizes (AMBCFM)** p 1–26, 2011.
- GIRDHAR, B. K. Neuritic leprosy. **Indian Journal of Leprosy**. v 68, p 35-42, 1996.
- GUERREIRO, L. T. et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. **Plos One**. v 14, n 8(6) e64748, jun 2013.
- HANDA, S; DOGRA, S. Hot topics in leprosy. **Lepr Rev**, v 74, p 87-88, 2003.
- HANSEN, G.H.A. Investigations concerning the etiology of leprosy. **Nosk Magazin for Laegevidenskaben**, v 4, p 1-88, 1874.
- HASAN, Z. et al. Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced Mycobacterium induced response leads to disease dissemination in leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v 63, p 241-247, 2006.
- HUI, M. et al. Pure neuritic leprosy: Resolving diagnostic issues in acid fast bacilli (AFB)-negative nervebiopsies: A single centre experience from South India. **Ann Indian Acad Neurol**. Jul-Sep; v18, n 3, p 292-7, 2015.
- HUNTER, S.W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v 147, n 3, p 728–735, 1981.
- HUSSAIN, T. Leprosy and tuberculosis: An insight-review. **Critical Reviews in Microbiology**, 2007.
- JARDIM, M. R. et al, Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J Neurol**, v 250, p 806–809, 2003.

JARDIM, M. R. et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. **Leprosy Review**, v 76, n 3, p 232–240, 2005.

JARDIM, M. R. et al. Estudos clínicos, eletroneuromiográficos e morfológicos da hanseníase neural pura em um centro de referência brasileiro. **Leprosy Rev**, v 75, p 242–253, 2004.

JARDIM, M. R. et al. Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression. **Arq Neuropsiquiatr**, v 65 p 969–73, 2007.

JOB, C. K. Nerve damage in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v 57, p 532-539, 1989.

JOHNSON, P. C. Peripheral nerve pathology. **In the text book of Neuropathology**, 3rd Ed. RL Davis and DM Roberson, eds.(Baltimore, MD, William and Wilkins). p. 1233-1323, 1997.

KANG, T. J.; LEE, S. B.; CHAE, G. T. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**. v 20, p 56-62, 2002.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypos novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis**, v 39, n 3, p 693–702, sep 1971.

KIRKALDY, A. A. et al. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions.. **Clinical Exp Immunol**, v 134, n 3, p 447-453, dec 2003.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-likereceptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med**, v 9, p 525–32, 2003.

KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**, v 11, p 653–60, 2005.

KULSHRESHTHA, D. et al. Mandating nerve biopsy: A step towards personalizing therapy in pure neuritic leprosy. **J Peripher Nerv Syst**, aug 2018

LÁZARO, F. P. et al. A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hyperendemic Isolated Population from North of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, 2010.

LEW, W. et al. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** v 70, n 2, p 129-31, jun 2002.

MADIGAN, C. A. et al. A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenolic initiates nerve damage in leprosy. **Cell**, v 170, n 5, p 973-985.e10, aug 2017.

MAEDA, Y. et al. Identification of an immunomodulation agent from *mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v 73, p 2744-2750, 2005.

MAHAJAN, P. M.; JOGAIKAR D. G.; MEHTA, J. M. A study of pure neuritic leprosy: Clinical experience. **Indian J Lepr**, v 68, p 137-141, 1996.

MARIA, I.; GOULART, B.; GERAIS, M. Imunopatologia da hanseníase: A complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 35, n 4, p 365-375, jul-ago, 2002.

MARTINEZ, N. A. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: From the laboratory to the clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v 8, n 4, e2655, 2014.

MASAKI, T. et al. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, v 152, n 1–2, p 51–67, 2013.

MEDEIROS, M. F. et al. CXCL-10, MCP-1, and other immunologic markers involved in Neural Leprosy. **Appl Immunohistocheml Mol Morphol**, v 23, n 3, p 220-229, mar 2015.

MENDONÇA, V. A. et al. Leprosy immunology. **An Bras Dermatol**, v 83, p 343-350, 2008.

MENICUCI, L. A. et al. Microscopy leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v 52, n 4, p 648-652, apr 2005.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). DATASUS. Informação em Saúde. Epidemiológica morbidade. Hanseníase [Internet]. 2017 [citado 2017 jan 17]. Disponível em www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=31032752.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Epidemiológica. Manual de prevenção de incapacidades. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2008 [citado 2018 jan 15]. 135 p. (Cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase, n. 1). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_prevencao_incapacidades.pdf
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Controle da Hanseníase. 3ª ed. Brasília; 2002. Brasil.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n° 3.125, de 7 de outubro de 2010.
- MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. **Int J Lepr**, v 21, p 347-358, 1953.
- MONTAGNA, N. A. et al. Leprosy: Contribution of mast cells to epineural collagenization. **Clin Neuropathol**, v 24, p 284-290, 2005.
- MORAIS, J. R.; FURTADO, E. Z. L. Grau de Incapacidade Física de pacientes com Hanseníase. **J Nurs UFPE online.**, Recife, v 12, n 6, p 1625-32, June, 2018
- MOUBASHER, A. D. et al. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **Int. J. Dermatol**, v 37, n 10, p 733–40, oct 1998.
- MOURA, R. S. D. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 41 (Suplemento II), p 11-18, 2008.

- MUKHERJEE, R.; ANTIA, N. H. Host-parasite interrelationship between *M. leprae* and Schwann cells in vitro. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v 54, p 632-638, 1986.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v 33, n 1, p 90–98, 2015.
- NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v 103, n 3, p 511–524, 2000.
- NICKEL, D. A.; SCHNEIDER, I. J. C.; TRAEBERT, J. Carga das doenças infecciosas relacionadas à pobreza no Brasil. In: **Ministério da Saúde (BR)**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014 [citado 2018 jan 15]. p. 227-253. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2013_analise_situacao_saude.pdf
- OLIVEIRA, A. L. et al. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v 69, p 27-39, 2010.
- OLIVEIRA, M. L. W.; PENNA, G. O.; TELHARI, S. Role of dermatologists in leprosy elimination and post-elimination era: the Brazilian contribution. **Lepr.Rev**, p 41–42, 2007.
- OLIVEIRA, R. B. et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun**. v 71, p 1427-1433, 2003.
- OLIVEIRA, R. B, et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol** v 64, n 10, p 882-890, oct 2005.
- PAYNE, S. N.; DRAPER, P.; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases**, v 50, p 220-221, 1982.
- PERRY, J. R. et al. Complications of sural nerve biopsy in diabetic versus non-diabetic patients. **Can J Neurol Sci**, v 21, n 1, p 34-37, feb 1994.

PETITO, R. B. et al. Transforming Growth Factor- β May Be a Key Mediator of the Fibrogenic Properties of Neural Cells in Leprosy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v 72, n 4, p 351–365, 2013.

PIMENTEL, M. I. F. et al. Influência do tempo de evolução prévio ao diagnóstico inicial incapacidades presentes no exame inicial de pacientes portadores de hanseníase multibacilar. **Hansen Int**, v 27, p 77-82, 2002.

PINHEIRO, R. O. et al. Innate immune responses in leprosy. **Frontiers in Immunology**, v 9. n 518, p 1–15, mar 2018.

POBURSKI, R.; MALIN, J. P.; STARK E. Sequelae of sural nerve biopsies. **Clin Neurol Neurosurg**, v 87, n 3, p 193-198, 1985.

PRASAD, P. V. S. editor. All about Leprosy. New Delhi: **Jeypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd**, 2005.

PRASAD, P. V. S. Childhood leprosy in a rural hospital. **Indian J Pediatr**. v 65, p 751-754, 1998.

RAMBUKKANA, A. How does Mycobacterium leprae target the peripheral nervous system? **Trends in Microbiology**, 2000.

RAMBUKKANA, A. Mycobacterium leprae-induced demyelination: A model for early nerve degeneration. **Current Opinion in Immunology**, v 16, n 4, p 511–518, 2004.

RAMBUKKANA, A. et al. Contact-Dependent Demyelination by Mycobacterium leprae in the Absence of Immune Cells. **Science**, vol 296, p 927-931, 2002.

RAMBUKKANA A. et al.. Neural targeting of Mycobacterium leprae mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. **Cell**, v 88, n 6, 811–821, 1997.

- RAO, P. N.; SUNEETHA, S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v 82, p 252-261, 2016.
- RAVISSE P. et al. Experimental leprosy in the armadillo and nude mice: comparative histobacteriology and ultrastructure. **Acta Leprol**, v 2, n 2-4, p 327-339, 1984.
- RIENECK K. et al. In vivo immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunol Lett**, v 37, p 131-138, 1993.
- REES, R. F. W., & YONG, D. B. The microbiology of leprosy. In: **Hasting R. C. Leprosy**. 2th Edinburg: Churchil Livingstone; p 49-83, 1994.
- RODRIGUES, L. C., & LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v 11, n 6, p 464–470, 2011.
- SADHU S et al. Reciprocity between Regulatory T cells and Th17 cells: Relevance to polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v 10, n 1, 2016.
- SALGAME P. et al. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. **Chem Immunol Allergy**, v 54, p 44–59, 1992.
- SANTOS, A. R., De Miranda A. B.; Sarno E. M.; Suffys P. N.; Degraive W. N. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol** 1993; 39: 298-304.
- SANTOS, D. F. DOS. et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v 11, n 11, p 1–14, 2017.
- SARNO, E. M.; SAMPAIO, E. P. Role of inflammatory cytokines in tissue injury in leprosy. **Int J Lepr**, v 64, p 569-574, 1996.
- SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Leprosy Review**. (2008); 79(3), 242–253.

- SCOLLARD, D. M. et al. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**. v 19, n 2, p 338–381, 2006.
- SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in Dermatology**, v 33, n 1, p 46–54, 2015.
- SHEPARD, C. C. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse, **Int J Lepr**, v 30, p 291-306, 1962.
- SHETTY, V.; ANTIA, N. A semi quantitative analysis of bacterial load in different cell types in leprosy nerves using transmission electron microscope. **Indian Journal of Leprosy**. v 68, p 105-108, 1996.
- SOLDERS, G. Discomfort after fascicular sural nerve biopsy. **Acta Neurol Scand**, v 77, n 6, p 503-4, 1988.
- STEFANI, M. M, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect Dis**, v 9, n 75, p 1-8, 2009.
- TALHARI, S. Hanseníase. 5. ed. São Paulo: **Di Livros Editora**, p 217, 2014.
- TIWARI, V. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in nerve biopsy specimens of patients with Hansen's disease. **J Neurol Sci**, v 15, n 380, p 187-190, sep 2017.
- TRICCAS, J. A. et al. Molecular and immunological analyses of the *Mycobacterium avium* homolog of the immunodominant *Mycobacterium leprae* 35-kilodalton protein. **Infection and Immunity**, v 66, n 6, p 2684–2690, 1998.
- UPLEKAR, M. W.; ANTIA, N. H. Clinical and histopathological observations on pure neuritic leprosy. **Indian J Lepr**. v 58, n 4, p 513-521, 1986.
- VIRMOND, M.; GRZYBOWSKI, A.; VIRMOND, L. Leprosy: A glossary. **Clinics in Dermatology**, v 33, n 1, 8–18, 2015.
- VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. Minireview: The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genoma biology**, v 2, n 8, p 1–8, set 2001.

- VITAL, R. T. et al., Progression of leprosy neuropathy: A case series study. **Brain and Behavior**, v 2, n 3,, 249–255, 2012.
- WHEAT, W. H., Casali, A. L., Thomas, V., Spencer, J. S., Lahiri, R., Williams, D. L., Jackson, M. Long-term Survival and Virulence of *Mycobacterium leprae* in Amoebal Cysts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v 8, n 12, 2014.
- WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **Technical Report Series**. Geneva, 675, 1982.
- WHO, Leprosy: weekly epidemiological record. World Health Organisation. Weekly Epidemiological Record, v 9, n 35, p 405–420, 2016.
- WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record: Global leprosy update: acceleration reduction of disease burden, v 92, n 35, p 501-520, sep 2017.
- WHILDER-SMITH, E. P.; VAN BRAKEL, W. H. Nerve damage in leprosy and its management. **Nature Clinical Practice Neurology**, v 4 n ,12, p 656-663, dec 2008.
- WILLIAMS, D. L. et al. Molecular basis of the defective heat stress response in *Mycobacterium leprae*. **Journal of Bacteriology**, v 189, n 24, p 8818–8827, 2007.
- YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v 254, n 5029, p 277–9, oct 1991.
- YAMAMURA, M. et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **J. Immunol.** v 15, n 149(4), p 1470–1475, aug 1992.
- YAWALKAR, S. J. Leprosy: for medical practitioners and paramedical workers. 7th ed. Basle, Novartis Foundation for Sustainable Development; 2002.
- YOUNG, D. B.; BUCHANAN, T. M. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. **Science**, v9, n 221(4615), p 1057–1059, 1983.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I

Legenda: NE: não encontrado; inflaendo: infiltrado inflamatório endoneural; fibroendo: fibrose endoneural; rem: remielinização. Nas colunas do PCR, PGL-1, o (-) e o (+) representam positivo e negativo respectivamente. Nas colunas de inflaendo, granuloma, perda de fibras, rem e BAAR, (-) e (+) representam ausência e presença da alteração histopatológica respectivamente. Na coluna de fibroendo, o (-) representa ausência de fibrose, o (+) e (++) representam pouca fibrose e (+++), (++++) representam muita fibrose.

PACIENTE	PCR	PGL-1	HISTOPATOLOGIA					
			Inflaendo	granuloma	fibroendo	perda de fibras	rem	BAAR
1.HNP	-	-	+	-	++++	NE	NE	-
2.HNP	NE	-	-	-	-	+	-	-
3.HNP	+	-	-	-	-	-	-	-
4.HNP	-	-	-	-	-	-	-	-
5.HNP	-	-	-	-	-	+	-	-
6.HNP	-	-	-	-	-	-	+	NE
7.HNP	+	-	+	-	-	+	NE	-
8.HNP	-	-	-	-	-	+	-	-
9.HNP	+	-	-	-	+++	+	-	-
10.HNP	-	-	-	-	+++	+	-	-
11.HNP	-	-	-	-	++++	+	-	-
12.HNP	-	-	-	-	-	+	+	-
13.HNP	-	-	-	-	-	+	+	-
14.HNP	NE	-	-	-	-	+	+	-
15.HNP	NE	+	-	-	-	+	+	-
16.HNP	NE	-	-	-	-	+	+	-
17.HNP	+	-	-	-	-	+	+	-
18.HNP	+	-	-	-	-	+	+	-
19.HNP	+	-	-	-	-	+	+	-
20.HNP	-	+	+	-	-	+	-	-
21.HNP	NE	-	+	-	+++	+	-	-
22.HNP	NE	-	+	-	+++	+	-	-
23.HNP	NE	-	+	-	+++	+	-	-
24.HNP	NE	-	+	-	++++	+	-	-
25.HNP	+	-	+	-	+++	+	-	NE
26.HNP	-	+	+	-	++++	+	-	-
27.HNP	-	-	+	-	++++	+	-	NE
28.HNP	NE	-	+	-	+++	+	-	-
29.HNP	NE	+	+	-	+++	+	-	NE
30.HNP	+	+	+	-	+	+	+	-
31.HNP	-	-	+	+	+++	NE	NE	-
32.HNP	-	-	+	+	+++	NE	NE	NE
33.HNP	+	-	-	+	-	+	-	-
34.HNP	-	-	-	+	-	+	-	-
35.HNP	+	-	+	+	-	+	-	+
36.HNP	+	-	+	+	++	+	-	+
37.HNP	+	-	+	+	++	+	-	-
38.HNP	-	-	+	+	++	+	-	-
39.HNP	NE	-	+	+	+	+	-	NE
40.HNP	-	-	+	+	+++	+	-	-
41.HNP	NE	-	+	+	+++	+	-	-
42.HNP	-	-	+	+	++++	+	-	-

8.2 ANEXO II

Legenda: NE: não encontrado; inflaendo: infiltrado inflamatório endoneural; fibroendo: fibrose endoneural; rem: remielinização. Nas colunas do PCR, PGL-1, o (-) e o (+) representam positivo e negativo respectivamente. Nas colunas de inflaendo, granuloma, perdafibras, rem e BAAR, (-) e (+) representam ausência e presença da alteração histopatológica respectivamente. Na coluna de fibendo, o (-) representa ausência de fibrose, o (+) e (++) representam pouca fibrose e (+++), (++++) representam muita fibrose.

PACIENTE	PCR	PGL-1	HISTOPATOLOGIA					
			Inflaendo	granuloma	fibroendo	perdafibras	rem	BAAR
1.NH	NE	-	-	-	+	NE	-	-
2.NH	NE	-	-	-	-	+	-	-
3.NH	-	-	-	-	-	+	-	-
4.NH	-	-	-	-	-	+	-	NE
5.NH	-	-	-	-	-	+	-	NE
6.NH	NE	-	-	-	-	+	-	NE
7.NH	NE	-	-	-	++	+	-	-
8.NH	-	-	-	-	++	+	-	-
9.NH	NE	-	-	-	++	+	-	-
10.NH	NE	-	-	-	+	+	-	-
11.NH	NE	-	-	-	+++	+	-	-
12.NH	NE	-	-	-	-	+	+	-
13.NH	NE	-	-	-	-	+	+	-
14.NH	NE	-	-	-	-	+	+	-
15.NH	-	-	-	-	-	+	+	-
16.NH	NE	-	-	-	-	+	+	-
17.NH	-	-	-	-	-	+	+	-
18.NH	NE	-	-	-	-	+	+	-
19.NH	-	-	-	-	-	+	+	-
20.NH	-	-	-	-	-	+	+	NE
21.NH	-	-	-	-	-	+	+	NE
22.NH	-	-	-	-	-	+	+	-
23.NH	NE	-	-	-	-	+	+	NE
24.NH	NE	-	-	-	-	+	+	NE
25.NH	NE	-	-	-	-	+	+	NE
26.NH	NE	-	-	-	-	+	+	NE
27.NH	NE	-	-	-	-	+	+	NE
28.NH	NE	-	-	-	+	+	+	-
29.NH	-	-	-	-	+	+	+	-
30.NH	NE	-	-	-	+	+	+	-
31.NH	NE	-	-	-	+	+	+	-
32.NH	NE	-	-	-	++	+	+	NE
33.NH	NE	-	-	-	++	+	+	NE
34.NH	NE	-	+	-	-	+	+	-
35.NH	NE	-	+	-	+	+	+	-
36.NH	-	-	+	+	-	+	+	-