

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Considerações gerais sobre a hanseníase

A hanseníase é uma doença secular, tendo recebido várias denominações: "morféia", "mal da pele", "mal do sangue", "doença lasarina". "lepra", cuja época exata do aparecimento não é bem conhecida. Os relatos mais antigos que existem sobre a doença datam de 1.100 a.C. na China, 4.266 a.C. no Egito e nos Livros Sagrados da Índia de 500 a 2.000 a.C. (Gay Prieto, 1971).

As antigas civilizações da China, do Egito e da Índia consideravam a doença como uma punição e os doentes eram obrigados a usar trajes especiais que permitissem o seu reconhecimento à longa distância e, também eram expulsos da sociedade. Estas atitudes bárbaras associadas às deformidades e mutilações que a doença provocava, geraram o preconceito e a discriminação que persiste até os dias de hoje.

No Brasil também o preconceito não foi diferente. O "Jornal do Comércio" do Rio de Janeiro, de 16 de novembro de 1840 anunciava a venda de um escravo com "morféia" por 100\$000, enquanto que um escravo sadio valia cerca de 1.880\$000 (Santos Filho, 1977).

Devido ao preconceito e a discriminação, o termo "lepra" e seus derivados caiu em desuso no Brasil, por força da lei nº 9.010 de 29/03/1995 e Rotberg, em 1977 propôs o termo "Mal de Hansen" (MH) , e "hanseníase" para substituição da estigmatizante lepra .

Os primeiros casos de hanseníase no Brasil datam do ano de 1600 na cidade do Rio de Janeiro possivelmente introduzidas pelos portugueses e africanos doentes (Fernando Terra, 1926). Uma vez chegada, a doença propagou-se de tal maneira que no século XVII já era endêmica em certos

estados como Minas Gerais, Espírito Santo, Maranhão e São Paulo.

Em 1920, no Brasil, criou-se o Departamento Nacional de Saúde Pública onde se priorizou a instalação de leprosários e a realização do censo dos pacientes (Yamashita et al., 1996). Nesta época, surgiu o tratamento com o óleo de Chaulmôgra, utilizada na China e na Índia. No Brasil o emprego do Chaulmôgra era polêmico, alguns autores eram favoráveis, outros consideravam pouco útil aos doentes. Rotberg e Bechelli, em 1946 expuseram as suas experiências com o Chaulmôgra como ineficiente. Observaram que havia pouca melhora em pequeno número de doentes, o remédio não atuava nos pacientes virchowianos e a recidiva ocorria em 70% dos casos após dois anos do tratamento. Aqueles que apresentaram melhora eram os tuberculóides em reação, diagnosticados como virchowianos.

Na década de 1940 Cochrane introduz a sulfonoterapia, no tratamento da hanseníase que modificou de modo substancial o quadro da doença em relação ao contágio, a profilaxia e a evolução da doença nos pacientes com a reação de lepromina negativa. Embora não constitua o medicamento ideal, as sulfonas permitiram mudar a situação da doença em relação à transmissão, melhorando as lesões das formas graves da doença e evitando que os pacientes com reação lepronima negativa evoluíssem para os formas virchowianas. No Brasil, Souza Lima, 1948 foi um dos pioneiros a empregar a sulfonoterapia.

Aproximadamente após um período de 20 anos da introdução da sulfonoterapia, observaram-se casos de resistência às sulfonas, possivelmente devido as baixas doses do medicamento, à irregularidade do tratamento ou às mutações do bacilo (Bechelli e Curban, 1988).

A partir de 1986, a Organização Mundial da Saúde - OMS (Brasil — MS, 1994) adota o esquema de poliquimioterapia, associando às sulfonas. outras drogas bactericidas e bacteriostáticas, utilizadas atualmente com administração de doses supervisionadas, para o controle da endemia (WHO, 1995).

O Brasil é considerado pela OMS o segundo país com maior número absoluto de casos, sendo responsável por 85% dos casos das Américas. A taxa de prevalência registrada em 1998 foi de 4,9/10.000 habitantes, variando de 0,53 / 10.000 habitantes no Rio Grande do Sul a 17,39 /10.000 habitantes na Amazônia. A proposta da OMS é alcançar uma taxa de prevalência de menos de 1 doente /

10.000 habitantes e assim eliminar a hanseníase como problema de Saúde Pública. (Brasil-M.S., 1999).

A hanseníase é uma doença infecciosa de curso crônico causada pelo *Mycobacterium leprae* descoberto pelo cientista norueguês Gerhard Henryk Armauer Hansen em 1873, razão pela qual é denominado de bacilo de Hansen e é considerada como a primeira bactéria patógena para o homem (Lombardi et al., 1990). Pertence a família *Mycobacteriaceae*, Ordem *Actinomycetales*, Classe *Schizomycetes*, Gênero *Mycobacterium* e espécie *leprae*. (Sampaio e Rivitti, 2000).

Os bacilos apresentam-se em forma de bastonetes, que se coram em vermelho pelos métodos de Ziehl-Neelsen-Faraco (1882) e Wade (variante do método de Faraco, 1938) e são bacilos álcool ácido resistentes (baar). Apresentam-se isolados ou aglomerados em forma de "globias" (dispostos paralelamente como cigarros em um maço) sendo o único bacilo a apresentar este tipo de disposição. A união entre eles é determinada por uma substância gelatinosa, não corável, denominada de gléia, estudada também por Neves, em 1977.

O *M. leprae* é um microorganismo intracelular obrigatório, que se aloja nos fagolisossomas das células do sistema mononuclear fagocitário, nas células de Schwann e nas células endoteliais. Mede de 1 a 81.1m de comprimento e 0,3µm de largura. A microscopia eletrônica verifica-se que a sua parede apresenta duas camadas, uma interna eletrodensa; a outra externa eletrotransparente e abaixo desta uma membrana plasmática. A camada eletrotransparente que corresponde a cápsula é constituída de dois lipídios: o dimicocerosato de ftiocerol e o outro glicolipídico fenólico (PGL1) que contém um grupamento trissacarídico específico do *M. leprae*. Entre os constituintes do citoplasma existe a enzima difenil oxidase, específica da espécie, e capaz de oxidar o isômero D da dihidroxifenilalanina, sendo a única micobactéria patogênica a apresentar a atividade dopa-oxidase. É através do PGL1 capsular, que se liga ao componente C3 do complemento, e facilita a fagocitose do bacilo pelas células do sistema mononuclear fagocitário através dos receptores CR1, CR3 e CR4 em suas superfícies celulares (Miller, 1998). Após a fagocitose pelas células macrofágicas, duas situações podem ocorrer: se o indivíduo for imunorresistente (fator de resistência natural específica), as células do sistema mononuclear fagocitário digerem os bacilos e

as células fagocitárias transformam-se em células epitelióides; se ao contrário, o paciente for do grupo não resistente, os bacilos causam lise celular parcial e multiplicam-se no interior das células fagocitárias, as quais tornam-se engurgitadas e espumosas. São as células de Virchow, descritas por Virchow, em 1858.

O estudo da relação entre o bacilo e a resposta imune do hospedeiro surge a partir de 1923 quando Mitsuda introduziu a intradermoreação que avalia a hipersensibilidade tardia específica nos pacientes. Baseada na intensidade desta reação, os pacientes foram classificados em imunopositivos e imunonegativos. O número de lesões e a forma da doença depende da resistência ou da imunidade específica do paciente; quanto maior a resistência, menor o número de lesões de forma circunscrita e assimétricas; enquanto que para uma menor resistência há inúmeras lesões disseminadas e simétricas (Rabello e Fraga, 1970).

A transmissão da hanseníase ocorre principalmente pelos doentes bacilíferos não tratados que eliminam os bacilos pelas vias aéreas superiores durante a convivência domiciliar. Quanto mais íntimo e prolongado for o contacto, maior será a possibilidade de contrair a infecção (Shepar, 1962; Schaffer, 1989). Outra forma de contágio pode ser pelos hansenomas ulcerados e o contacto com a pele erodada; contestada por uns e defendida por outros (Talhari e Neves, 1997).

Job et al., em 1994, observaram que alguns animais apresentavam vários espinhos incrustados nas orelhas, narinas, nas patas e sugeriram a possibilidade do contágio da hanseníase ocorrer por estas vias de inoculação. Inocularam espinhos de cactus infectados com *M. leprae* nas patas de camundongos que foram sacrificados e necropsiados após 15 a 17 meses. A análise histopatológica revelou células virchowianas disseminadas em vários órgãos. Diante destes achados, acredita-se que a transmissão possa ocorrer através da solução de continuidade da região plantar, num país onde muitas pessoas caminham descalças. Como o tempo de incubação da hanseníase é longo, os pacientes não associam pequenas lesões ocorridas nos pés com o aparecimento da doença.

As vias de eliminação dos bacilos, além das vias aéreas superiores e da pele erodada, são pela urina, fezes, suor, secreções vaginais e esperma. O bacilo de Hansen permanece viável no meio ambiente de 36 horas a 9 dias em

condições favoráveis de temperatura (em torno de 36,7°C) e com umidade média de 77,6%, tendo preferência pelas áreas mais frias do corpo. (Sampaio e Rivitti, 2000)

Quanto à influência de fatores ambientais na transmissão da doença, tem-se descrito que é uma endemia, só existente nos países tropicais, coincidindo com o subdesenvolvimento, cuja pobreza configura-se como fator de risco. Entretanto não se sabe da importância do estado nutricional, aglomeração domiciliar ou presença de outras doenças concomitantes no desencadeamento da hanseníase. Porém, é fundamental a interação entre os fatores intrínsecos do indivíduo (susceptibilidade genética) e os fatores ambientais. O mecanismo da resistência genética da população ainda é desconhecida e aproximadamente cerca de 90% da população não desenvolve a doença. O bacilo de Hansen apesar de alta infectabilidade possui baixa patogenicidade e virulência. (Rabello e Fraga, 1970).

Até recentemente, acreditava-se que a doença era exclusiva na espécie humana, mas há relatos de achados dessas micobactérias nos musgos da Costa de Marfim e da Noruega, e em tatus e macacos naturalmente infectados (Sampaio e Rivitti, 2000).

Em 1960, Shepard relatou a multiplicação do *M.leprae* utilizando coxim da pata de camundongo. Posteriormente, Kirchheimer e Storrs (1971) publicaram os resultados da inoculação experimental do bacilo em tatu (*Dasypus novencinctus*), produzindo lesões semelhantes às do homem. No Brasil, até o momento não se tem relatos de animais selvagens infectados.

Classificação

Um dos pioneiros a estabelecer o conceito de polaridade da doença foi Rabello, em 1937. Fundamentado no número de bacilos, grau de resistência do hospedeiro e na estrutura histológica, classificou numa extremidade o pólo imunopositivo - hanseníase tuberculóide (HT), com tendência a fazer lesões localizadas, poucos bacilos e histologicamente, presença de células epitelióides no seio dos granulomas. Na outra extremidade, o pólo imunonegativo - hanseníase virchowiana (HV), com tendência à difusão das lesões distribuídas simetricamente, com abundância de bacilos e presença de histiócitos grandes e vacuolados (hansenócitos). Quebrando esta dualidade, o autor admitia a forma

instável - hanseníase indeterminada (HI), com tendência a evoluir para um dos pólos. Logo a seguir acrescentou ao esquema tripartida, a variante "dimorfa" (HD), descrita por Wade e Rodrigues em 1940, como forma interpolar. Esta classificação foi reconhecida no Congresso de Leprologia de Madri, em 1953 (Madri Congress, 1953). Portanto, segundo Rabello (1970), "a hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de curso crônico, determinada por um bacilo de baixo poder patogênico — o *Mycobacterium leprae*. São frequentes os estados de infecção subclínicas, e, igualmente freqüentes as formas benignas. É uma doença que afeta predominantemente pele e nervos, mas também pode comprometer os órgãos sistêmicos. As manifestações clínicas e anátomo-clínicas, dependem muito mais das reações desencadeadas pelo hospedeiro do que pela capacidade de penetração e multiplicação dos bacilos". (Rabello e Fraga, 1970)

Hoje, a classificação proposta por Ridley e Jopling (1962) é adotada mundialmente e se baseia no espectro imunológico do paciente em relação ao *M. leprae*. São definidos cinco grupos espectrais da doença, de acordo com a ordem decrescente da resposta imune. As formas polares de Rabello (1937) foram mantidas: HT no extremo imunopositivo e HV no extremo imunonegativo. Entre estas formas, o grupo central instável, imunologicamente variável: hanseníase dimorfa-tuberculóide (HOT); hanseníase dimorfa-dimorfa (HDD) e hanseníase dimorfa-virchowiana (HDV).

Ridley e Waters, em 1969 propuseram uma subdivisão da HV: casos definidos de HV desde o início da doença, que denominaram HV polar (HVp) e outros com evolução de HDD para HV e que denominaram de HV subpolar (HVs). Não incluídos no espectro, os autores consideram um grupo indeterminado (HI), como forma inicial ou lesão recente da doença, que ainda não se polarizou.

Para fins operacionais, visando o emprego da poliquimioterapia a OMS, (Brasil - MS, 1994) vem adotando uma classificação baseada na baciloscopia e no número de lesões. Segundo esse critério, a hanseníase é classificada em paucibacilar (PB) e em multibacilar (MB). No grupo PB encontram-se, os pacientes com baciloscopia negativa e com menos de cinco lesões cutâneas (HI, HT e a grande maioria de HOT). No grupo MB encontram-se aqueles pacientes que apresentam baciloscopia positiva ou mais de cinco lesões (alguns casos de HOT, HDD, HDV e HV).

No curso natural da doença e frequentemente durante a sua regressão, com o uso da poliquimioterapia surgem episódios inflamatórios agudos, de origem imunológica, denominados de reação hansênica. Estes episódios são classificados em reação tipo 1 (Jopling, 1959) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico, descrito, em 1912, por Murata.

2.2 - Diagnóstico clínico e histopatológico

Existe uma estreita relação entre as manifestações clínicas da hanseníase e as alterações histopatológicas encontradas nos tecidos, motivo pelo qual é interessante a análise em conjunto.

Os cortes histológicos já descrito por Portugal em 1947 devem ser submetidos a coloração pela hematoxilina-eosina (HE) — (Michalany, 1980) para o estudo morfológico das células e pela coloração específica para baar (Wade ou similar) (Michalany, 1980). A correlação anátomo/clínica/laboratorial e imunológica é importante e decisiva no diagnóstico da hanseníase quando não se encontram os bacilos no material examinado (Ridley e Jopling, 1966). Recentemente diversos trabalhos vêm propondo o uso de métodos da Biologia Molecular com a finalidade de investigar a presença do DNA do *M. leprae* em pacientes com ausência de bacilos no material examinado da linfa e da pele, mas com suspeita clínica de hanseníase. (Yoon, et al., 1993; Richter et al., 1994; Santos et al., 1997)

Hanseníase Indeterminada: nesta fase, a lesão cutânea pode permanecer durante meses ou anos: Caracteriza-se por mancha hipocrômica ou levemente eritematosa com bordas imprecisas. Geralmente lesão única e quando múltiplas são assimétricas. Surge em qualquer área do tegumento, tendo preferência para as áreas cobertas do corpo. O comprometimento neural é discreto, acometendo geralmente um filete nervoso, que pode provocar discreta hipoestesia na lesão cutânea.

O **exame histopatológico** da lesão mostra a presença do infiltrado linfocitário não específico.

Ridley, em 1988, descreve três fases evolutivas na HI.

- Fase 1: os cortes histológicos da pele permanecem praticamente normais

- Fase 2: presença do infiltrado constituído por linfócitos e macrófagos envolvendo feixes nervosos, músculo eretor do pêlo, glândulas sudoríparas e seus ductos. As vezes há exocitose. Nesta fase, há possibilidade do encontro de raros bacilos nas áreas com infiltração linfo-histiocitária.

- Fase 3: formação granulomatosa, próxima aos feixes nervosos, ductos das glândulas sudoríparas, músculo eretor do pêlo. Os granulomas ainda não são totalmente completos, contém poucas células epitelióides e células gigantes solitárias. O encontro do baar é pouco frequente.

Fleury, em 1983, descreve como quadro histopatológico altamente sugestivo de hanseníase a presença de:

- Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário contornando ou penetrando nos filetes nervosos.

- Infiltrado inflamatório contornando filetes nervosos e desarranjo das células de Schwann ou delaminação do perineuro.

- Encontro de bacilos nos filetes nervosos, nos histiócitos ou em outras estruturas cutâneas.

Hanseníase tuberculóide: os portadores da forma HT já apresentam comprometimento neuro-cutâneo. As lesões cutâneas se apresentam em placas eritematosas, circunscritas, numulares ou anulares, delimitadas, com leve atrofia central e ligeira descamação; outras vezes, são lesões papulosas, assimétricas, hipo ou anestésicas-é anidróticas. Esta forma apresenta uma variante nodular infantil, geralmente lesão única, localizada frequentemente na face, antebraço, região glútea ou coxa, por vezes apresentando regressão espontânea. Esta forma de hanseníase foi descrita por Souza Campos, em 1937, como hanseníase nodular infantil. Outra variante é a forma neurítica pura, sem lesão cutânea (Jopling e Mc Dougall, 1991).

O exame histopatológico mostra granuloma tipo tuberculóide com células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, circundada por células epitelióides e contornada por halo denso constituído de linfócitos, entremeadas por fibras reticulares. Os granulomas se localizam ao nível das glândulas sudoríparas, e/ou no trajeto dos filetes nervosos, provocam erosão da camada basal e destruição das fibras neurais. O bacilo raramente é identificado nas estruturas neurais, mas o

encontro de restos de filetes nervosos no interior do granuloma tuberculóide sugere fortemente o diagnóstico de hanseníase.

Hanseníase dimorfa - tuberculóide: os pacientes apresentam lesões em grandes placas, bem delimitadas, de bordas irregulares e papulosas; lesões múltiplas com tendência à simetria, de crescimento centrifugo e com regressão na área central. Surgem também lesões satélites com comprometimento de vários troncos nervosos.

O **exame histopatológico** mostra granulomas do tipo interpolar, o infiltrado de linfócitos fazendo parte do granuloma, com algumas células gigantes do tipo Langhans. A predominância do granuloma em polar ou subpolar vai depender da tendência espectral para HT ou HDD. O granuloma é formado por células epitelióides imaturas, alguns macrófagos ativados e ausência de células epitelióides maduras. Pode ou não ser encontrado o baar.

Hanseníase dimorfa - dimorfa: as lesões são em placas extensas, por vezes cobrindo grande área do tronco ou do membro. A parte central da lesão mostra pele normal com a borda infiltrada de limite interno bem definido e o limite externo impreciso. A cor é eritematosa ou ferruginosa, originando o aspecto "fovelar" ou em "queijo suíço". Coexistem lesões papulosas, infiltração difusa, e espessamento unilateral do lobo da orelha. Pode-se encontrar comprometimento de vários troncos nervosos periféricos, alguns dos quais muito acometidos.

No **exame histopatológico** observa-se presença de granulomas formados por células epitelióides imaturas ou de macrófagos ativados, poucos linfócitos, células epitelióides entre as laminações do perineuro, ausência de células gigantes do tipo Langhans e presença de edema. A presença do baar é frequente.

Hanseníase dimorfa — virchowiana: é a forma peri-virchowiana. As lesões são placas extensas de cor violáceo-ferruginosa com bordas externas infiltradas e limites internos não tão definidos como na forma HDD. É freqüente o comprometimento troncular nervoso e quando não adequadamente tratado leva a um grau elevado de incapacidade.

O **exame histopatológico** mostra o padrão morfológico muito próximo ao do observado na HV. Os granulomas são formados por macrófagos com citoplasma moderadamente frouxo. O perineuro se apresenta entumecido, de aspecto laminado, conhecido como "casca de cebola". Os bacilos estão presentes em grande número e formando pequenas globias.

Fleury, em 1983, descreve histologicamente a evolução da HDT para HDD:

- os granulomas tomam-se mais extensos frouxos e deixam de atingir a camada basal da epiderme.
- redução progressiva do número de linfócitos.
- redução do comprometimento dos filetes nervosos pelos granulomas, à medida que o quadro se aproxima da forma HV.
- a célula epitelióide vai perdendo a sua característica, o citoplasma vai se tomando mais frouxo e vesiculoso.
- aumento progressivo de bacilos. Pode-se encontrar também quadro histopatológico intermediário com predomínio de granulomas frouxos constituídos por macrófagos, ainda com algumas características das células epitelióides.

Hanseníase virchowiana: as lesões se caracterizam por manchas eritemato-ferruginosas com infiltração difusa, de aspecto brilhante e com limites mal definidos. Surgem também lesões pápulo-tuberosas e nodulares em todo o tegumento. Ocorre espessamento e infiltração das orelhas, infiltração difusa dos sulcos naturais da face e da fronte, madarose (alopécia na parte externa dos supercílios), dando o aspecto de "fascies leonina". As lesões são difusas, múltiplas e com distribuição bilateral e simétrica. O edema e a infiltração das mãos dão o aspecto úmido e brilhante conhecido como "mãos suculentas". As lesões surgem nas áreas mais frias do tegumento. Sem tratamento pode ocorrer o comprometimento da laringe e da faringe provocando a voz "rouca" e o comprometimento da mucosa nasal pode levar a perfuração do septo que configura o aspecto de "nariz de tapir". As lesões neurais consistem no espessamento dos nervos acompanhado de disfunção motora ou sensitiva. A HV é considerada uma doença sistêmica quando chega a comprometer órgãos internos como: câmara anterior do olho, linfonodos, fígado, testículos, rins e

ossos. A rinite crônica (coriza com obstrução nasal) e o edema bilateral das pernas no final do dia podem preceder as lesões cutâneas por muito tempo. Estas duas alterações geralmente passam despercebidas pelo doente e pelo médico. (Jopling e Mc Dougall, 1991).

A forma HV apresenta duas variantes:

- a primeira denominada de forma "difusa" descrita por Latapi e Zamora, em 1948, em que ocorre discreta infiltração generalizada do tegumento em contraste com a riqueza bacilar.

a outra variedade históide, individualizada por Wade, 1963, caracteriza-se por lesões tuberosas ou nodulares, delimitadas, brilhantes, com aspecto de quelóides ou dermatofibromas.

No **exame histopatológico** a epiderme é atrófica, geralmente retificada, separada pela faixa de Unna. O infiltrado celular ocupa toda a derme estendendo-se para o tecido subcutâneo, constituído predominantemente de macrófagos, com citoplasma espumoso, contendo lipídios (célula de Virchow) e grande quantidade de bacilos. Há poucos linfócitos e ausência de células de Langhans. Os filetes nervosos geralmente estão edemaciados e entumecidos. O perineuro se apresenta cheio de laminações em "casca de cebola" (Ridley, 1988).

Estados reacionais da hanseníase

Os estados reacionais são intercorrências comuns no curso da hanseníase, e se manifestam como síndromes inflamatórias agudas ou subagudas. Tem como fator básica a resposta imunológica do indivíduo, tanto em relação à atividade da doença, como sua regressão. Geralmente ocorre durante ou após o tratamento específico. Esta reação ocorre em 25% dos pacientes com HDT e HDD e em 40% nos HDV e HV (Azulay, 1999).

Jopling, em 1959, propôs a classificação em reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 cuja lesão mais frequente é o eritema nodoso hansênico, descrita pela primeira vez por Murata, 1912.

A reação tipo 1 caracteriza-se pela ativação das lesões pré-existentes, com eritema, edema, hiperestesia local e/ou aparecimento de lesões novas. Geralmente são acompanhadas do edema das extremidades e neurite. Esta reação decorre da hipersensibilidade tardia tipo IV (Gell e Coombs, 1975).

Quando esta reação for em consequência do aumento rápido da imunidade celular específica é reconhecida como reação ascendente ou reversa. Ao contrário, se houver baixa da imunidade celular é uma reação descendente. A reação tipo 1 ocorre em pacientes HDT, HDD e HDV. A reação tipo 2 envolve a reação de imunocomplexos circulantes e ocorre em pacientes HV e em alguns casos de HDV (Jopling e Mc Dougall, 1991). Esta reação geralmente é acompanhada de febre, mal estar, mialgias, edema e dores articulares. Na pele, surgem múltiplos nódulos inflamatórios de vários tamanhos e de distribuição simétrica em qualquer região do corpo as quais podem sofrer ulceração e necrose por obliteração da luz vascular, resultando o eritema nodoso necrotizante.

A neurite é sempre mais intensa e quando não tratada adequadamente leva a um maior grau de deformidade incapacitante, por isso a detecção precoce da reação e a instituição imediata da terapêutica é de fundamental importância para a prevenção das deformidades e das incapacidades principalmente para aquelas que são de caráter permanente.

Exame histopatológico: Reação tipo 1 - apresenta edema extracelular, redução da carga bacilar e aumento de linfócitos, células epitelióides e células gigantes. Na reação descendente, há o aumento do número de bacilos e a diminuição das células epitelióides, dos linfócitos e dos gigantócitos além do aumento de macrófagos de citoplasma vacuolados. Pode ocorrer degeneração das fibras elásticas e colágenas, focos de necrose nos granulomas e necrose fibrinóide no colágeno. Reação tipo 2 - presença de infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares, com aglomerado de macrófagos degenerados. aumento de eosinófilos, entumescimento endotelial com vasculite, edema e hemorragia. No eritema nodoso necrotizante observa-se vasculite, angeite obliterante e endoarterite.

2.3 - Métodos complementares de diagnóstico

Testes semiotécnicos no paciente, exames laboratoriais, estudo de imagens, além de outros exames complementares podem auxiliar na definição de um caso de hanseníase.

Pesquisa da sensibilidade cutânea

A pesquisa da sensibilidade tem como finalidade verificar a integridade das

terminações nervosas responsáveis pela sensibilidade cutânea. Esta sensibilidade é fundamental para a preservação e função protetora principalmente dos olhos, das mãos e dos pés.

Em geral por ordem de aparecimento, a primeira sensibilidade alterada é a térmica, seguida da sensibilidade dolorosa e da táctil, porém a sensibilidade normal não exclui o diagnóstico (Brasil — MS, 1994).

Prova da histamina - A prova da histamina foi introduzida por Pierini (1931), Rodrigues e Plantilha (1931). Baseia-se na observação da integridade dos ramúsculos nervosos periféricos. A resposta á ação da histamina provoca a dilatação dos capilares levando á formação do eritema reflexo, que configura a tríplice reação de Lewis, quando alterada a prova de histamina é incompleta.

Prova da pilocarpina - A prova da pilocarpina tem o mesmo principio da prova da histamina e identifica as áreas de anidrose, evento comum nas lesões hansênicas. Prefere-se esta prova nas pessoas melanodérmicas pela dificuldade de se verificar o eritema, produzido com a histamina (Brasil — MS, 1994).

Intradermoreação de Mitsuda

A intradermoreação de Mitsuda (1923) é uma reação de hipersensibilidade tardia e mede a resistência imunológica específica para o *M. leprae* ou a seus antígenos. Embora não seja um teste de diagnóstico ela tem valor prognóstico comprovado nos estudos realizados por Dharmendra (1942), Bechelli et al., (1945) e Rotberg (1986). Estes autores observaram que nos pacientes com a reação positiva desenvolveram as formas benignas, inclusive com algumas formas abortivas rias doenças e os que apresentaram reação negativa desenvolveram a forma mais grave.

Baciloscopia

A baciloscopia realizada em amostras obtidas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase tem como finalidade o diagnóstico e a classificação da doença, pela identificação do baar nos esfregaços de linfa, e/ou, material cutâneo. O esfregaço é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen ou similar (Michalany, 1980). O encontro de bacilos permite definir o índice baciloscópico (IB), proposto por Ridley e Jopling (1962), e que tem sido utilizado em trabalhos de investigação científica. Shepard e Mc Rae (1968) estimam que para obter o exame baciloscópico positivo, o material examinado deverá conter

aproximadamente 10^4 bacilos por mL.

Eletroneuromiografia e ultrassonografia

A eletroneuromiografia estuda a velocidade de condução elétrica no músculo e no nervo e tem a finalidade de verificar o comprometimento neural periférico na hanseníase. É útil para o acompanhamento terapêutico nos estados reacionais conforme citado no trabalho de Brasil Neto, (1992).

A ultrassonografia pode auxiliar na avaliação do calibre dos nervos, já que as alterações neurais na hanseníase manifestam-se pelo seu espessamento. Formaje, (1988); Taneja et al., (1992).

Sorologia com antígeno microbiano

Ainda visando o aprimoramento do diagnóstico da hanseníase, vários testes continuaram a ser introduzidos. Brennau e Barrow, (1980) descreveram um método sorológico utilizando antígeno micobacteriano, onde o antígeno PGL1 específico do *M. leprae* foi o mais estudado. Estes autores demonstraram a formação de anticorpos relacionados com o nível espectral da doença sendo os pacientes virchowianos os que apresentaram títulos maiores de IgM e menores de IgG.

Payne et. al, (1982), incorporaram o antígeno interior dos lipossomas e demonstraram pela técnica de imunodifusão em gel a presença de anticorpos específicos nos soros de pacientes virchowianos.

No Brasil, Saad et al., (1990) e Foss et al., (1993), realizaram o estudo Virchowianos.

Técnica de histoquímica e imunohistoquímica

Neves, em 1977, utilizou a coloração de Sudan III para identificar o depósito de lipídios nos cortes congelados de fragmentos de lesões de pele dos pacientes hansenianos. Esta técnica permite diferenciar as estruturas vesiculares das células de Virchow daquelas da degeneração hidrópica do citoplasma celular nos estados reacionais.

Outro recurso no diagnóstico da hanseníase é o emprego de técnicas de imunohistoquímica, utilizando anticorpos mono ou policlonais. Os primeiros pesquisadores a empregarem os anticorpos monoclonais contra o PGL1, foram Huerre et al., em 1989.

Em 1991, Goto e Izumi conseguiram identificar o antígeno PGL1 em quatro pacientes HDD de cinco casos estudados.

Wang et al. (1992), utilizando o anticorpo policlonal contra o PGL1, descreveram cinco padrões de achados imunohistoquímicos: solitário, granular, com distribuição irregular, vacuolar e amorfo. Esta técnica demonstrou a diferenciação entre as vesículas intracelulares decorrente de acúmulo de lipídios, daquelas decorrentes da degeneração hidrópica. No exame histopatológico, estas estruturas são semelhantes mas na imunohistoquímica a vesícula dos lipídios aparece com a margem acastanhada com conteúdo no seu interior, enquanto que na degeneração hidrópica permanece incolor e transparente.

Narayama et al. (1985) utilizaram os anticorpos ML04 para detectar o antígeno MY2 e ML06 para o antígeno MY1. Identificaram estes antígenos tanto nos pacientes PB como nos MB. Os pacientes MB com grande quantidade de bacilos, não apresentaram detecção nas áreas com intenso infiltrado inflamatório.

Fleury e Bacchi, em 1987, utilizaram a proteína S-100 no diagnóstico de hanseníase tuberculóide e indeterminada. Esta técnica permitiu fazer a distinção entre a morfologia quase intacta do nervo na forma indeterminada e fragmentos de nervos danificados na forma tuberculóide.

Mendonça, em 1987, empregou a técnica com a proteína S-100 nos materiais de biopsias fixadas em formol e emblocadas em parafina, de pacientes com várias formas da hanseníase. Demonstrou que esta técnica permite identificar pequenas, agressões neurais não demonstradas na coloração de hematoxilina-eosina. Demonstrou ainda que a proteína S-100 pode ser utilizada como marcador das células de Langhans.

Khanolkar et al., (1989) realizaram estudos com cinco anticorpos monoclonais: SL12 (65kDa), F47-9 (36kDa), SA1B11H (28kDa), SL5 (18kDa), ML06 (12kDa) com imunodeteção pela peroxidase. Observaram o caráter intracitoplasmático e granular nos doentes multibacilares. Os anticorpos monoclonais que produziram a reação mais intensa foram aqueles contra a proteína 65kDa e a lipoarabinomanana. Nos pacientes paucibacilares a imunodeteção foi fraca ou inexistente.

Takahashi et al., (1991), estudaram 42 doentes com hanseníase indeterminada pela técnica da imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais

anti-BCG e encontraram positividade em 67% dos casos, resultado superior àquele encontrado pela histopatologia e coloração para o baar, que foi de 45%. Neste caso a ligação foi cruzada e inespecífica. Observaram maior quantidade de antígenos próximos aos filetes nervosos, no citoplasma dos histiócitos perivasculares e ao redor dos músculos eretores dos pelos.

2.4 - Reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O desenvolvimento da técnica de amplificação dos ácidos nucléicos utilizando a PCR abriu grandes perspectivas para a detecção de vários agentes etiológicos. O método permitiu amplificar *in vitro* uma determinada região do DNA em milhões de vezes e em poucas horas, utilizando-se basicamente uma reação enzimática catalizada pela Taq DNA polimerase (enzima termoestável) cuja atividade depende de ions Mg⁺⁺. O resultado da amplificação pode ser visibilizado em gel de agarose. A especificidade da reação é determinada pela escolha adequada de "primers" ou iniciadores (segmentos de DNA), que são pequenos fragmentos sintetizados e que complementam a sequência do fragmento do DNA a ser amplificado (Saiki et al., 1985).

A PCR utilizando DNA polimerase termoestável foi introduzida por Mullis e Faloona, em 1987. No campo da biologia molecular, a PCR é uma ferramenta tão poderosa que tem sido utilizada de forma multidisciplinar para a pesquisa de bactérias patogénicas (*M. tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria meningitidis*, espécies, de *Shigella* e *E. coli*, *Helicobacter pylori* e outros); para a pesquisa de _viras (HIV I, Hepatite B, RNA da Hepatite C, Epstein-Barr, Rubéola, Herpesvirus varicellae e outros); para pesquisa de parasitos (*Trypanossoma cruzi*, *Leishmania sp*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii* e outros); para detecção de locus de resistência a antibióticos; no diagnóstico de doenças genéticas e aplicação em medicina forense (Hirata e Hirata, 1995).

Aperfeiçoando a técnica da PCR, Saiki et al., em 1988, elaboraram três etapas ou ciclos de amplificação: 1) desnaturaçãõ ou "melting", que consiste na separaçãõ da fita dupla de DNA em duas fitas simples numa temperatura elevada (90 a 95°C); 2) hibridizaçãõ ou "annealing" que consiste na ligaçãõ entre o iniciador e o DNA alvo; 3) polimerizaçãõ ou "extension" a DNA polimerase liga os nucleotídeos entre si, sintetizando as novas cadeias, as quais servem de moldes

para a produção sintética de novas fitas com os ciclos subseqüentes (reação em cadeia).

Hance et al., (1989) aplicaram a PCR como alternativa para identificação de doenças provocadas por várias micobactérias, especialmente naquelas que não são facilmente cultiváveis *in vitro*, ou as que tem crescimento lento. Com esta finalidade foram elaborados alguns tipos de iniciadores para detectar gênero e espécies de micobactérias como o gene *groEL* que codifica a proteína de choque térmico 65 kDa.

Shibata et al., (1988) testaram a extração do DNA de tecidos fixados em formol tamponado, emblocados em parafina e armazenados em temperatura ambiente durante 41 anos. Selecionaram 25 materiais para detectar o papiloma vírus humano (HPV) amplificando o gene *E* de HPV 16 e 18 e conseguiram sinais fortemente positivos. Os autores concluíram que o DNA de materiais fixados em formol e emblocados em parafina, armazenados durante muitos anos pode ser detectado mesmo que apresente algum sinal de degradação.

Hartskell et al., (1989) foram alguns dos primeiros a apresentar trabalhos de PCR com DNA polimerase termoestável para a detecção do *M. leprae* em material fresco para amplificar o gene *groEL*, utilizando "primers" S13 e S62 com base na sequência do gene 36 kDa e 65 kDa respectivamente, com bacilo purificado, isolado do baço de tatu e macado, experimentalmente infectados. Conseguiram amplificar o fragmento 530pb e verificaram a possibilidade de amplificar material contendo de 1 a 20 bacilos.

Clark-Curtis e Docherty, (1989) observaram a sequência repetitiva de pelo menos 19 vezes no cromossomo do *M. leprae*, enquanto que Woods e Cole, (1989) verificaram que uma das cópias da sequência localizada no gene *groEL* repetia-se cerca de 23 vezes no cromossomo, mesmo com a dificuldade de extração do DNA do bacilo, devido a difícil lisa celular.

Willians et al., (1990) utilizaram material de biópsia de pele a fresco de três pacientes com hanseníase e bacilos isolados e purificados extraídos de baço de tatu infectado para análise em PCR. Obtiveram boa especificidade no gene *groEL* com amplificação de produto com 360pb, sendo observado banda positiva em gel de agarose. Estas amostras continham menos que 10^4 bacilos. Obtiveram 100% de positividade em 5 materiais estudados.

Plikaytis et al., (1990), utilizaram material fresco de tatu infectado com *M. leprae* e três amostras de hanseníase virchowiana. Na primeira etapa da PCR obtiveram um produto de 578pb e na segunda etapa da PCR obtiveram um produto 347pb, correspondendo a porção do gene groEL de *M. leprae*, também denominada de gene 65 kDa. Para confirmar que o produto da segunda etapa de amplificação é realmente o fragmento do *M. leprae* (groEL) os autores digeriram com as enzimas de restrição PstI e RsaI e obtiveram os produtos: 254 e 93pb, e 193, 154pb, respectivamente. Estes fragmentos são previstos na sequência do do gene de *M. leprae*.

Kallio et al., (1991) aplicaram a PCR para amplificação do DNA isolado de material parafinado e obtiveram melhor extração do DNA através da fervura. Heller et al., (1991) extraíram o DNA pela sonificação com bons resultados.

Volkenandt et al., (1991), analisaram os resultados falsos positivos que podem ocorrer pela contaminação de DNA exógeno, durante a microtomia, a preparação das reações pré ou pós PCR e os resultados falsos negativos devido a baixa qualidade do DNA, em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina. Os autores sugerem o uso de etanol como fixador e acreditam que a otimização da técnica possibilita a detecção de DNA na presença de pequena parte do genoma do microorganismo. Sugerem processar a PCR em áreas isoladas.

De Wit et al., (1991) demonstraram a correlação inversa entre a densidade do infiltrado celular, principalmente de linfócitos e o grau de positividade da PCR. Nos doentes com as formas PB, o infiltrado celular poderia secretar substâncias capazes de inibir a PCR. enquanto que a presença de bacilos potencialmente viáveis, presentes na forma MB, resulta numa amplificação positiva.

Ghossein et al., (1992) descreveram o método da PCR para detecção de micobactérias em tecidos emblocados em parafina e conseguiram detectar espécies de *M. tuberculosis*, *avium* e *saprófitas* utilizando PCR e enzimas de restrição.

Perosio e Frank, em 1992, elaboraram um método para aumentar a sensibilidade da técnica de PCR realizando-a em duas etapas "nested-PCR", que propicia a detecção e amplificação no gene groEL em amostras que contém de quatro a oito micobactérias, diferente da *M. leprae*.

Arnoldi et al., (1992), realizaram a amplificação enzimática do genoma DNA para a identificação da espécie específica do *M. leprae* em biópsias de pele congeladas obtendo fragmento de 990pb, no gene groEL.

Telenti et al., (1993) utilizaram como enzima de restrição *Bst*, *EII* e *Hae III* obtidos de iniciadores comuns a várias micobactérias, amplificando gene groEL que codifica o antígeno 65kDa.

Yoon et al., em 1993, utilizaram 102 casos de biópsias de peles congeladas e "imprint" do mesmo material para extração do DNA e amplificação pela PCR do gene 36 kDa, 18 kDa e 65 kDa. Utilizaram o protocolo de Plikaytis et al. (1990) com pequenas modificações, e usaram os dois iniciadores R, e R2 originalmente projetados por Woods e Cole (1989 e 1990). Obtiveram especificidade com 372pb do DNA de *M. leprae* numa sequência repetitiva de 28 vezes no cromossomo. Obtiveram resultados positivos em 85% dos casos PB e 86,5% nos MB de material cutâneo. No "imprint" a positividade foi de 60% em PB e 95% em MB.

Sung et al., (1993) realizaram PCR de material parafinado em cinco casos de MB e três de PB com 100% de positividade. Conseguiram amplificação no gene 18 kDa em material contendo um único bacilo.

Jamil et al., (1993) realizaram a PCR em materiais de lesão de pele, a fresco, obtidos de pacientes PB (9) e MB (8) obtiveram 100% de positividade naqueles com IB de 1 a 5 e 33.3% nos casos com IB menor que 1, amplificando o gene 18 kDa, 36 kDa e 65 kDa.

No Brasil, Santos et al., (1993) utilizaram a PCR em biópsias de pele fresca, sangue e linfa de pacientes com hanseníase. Obtiveram em 27 materiais 76% de positividade em pele fresca, 21 % de positividade na linfa e 53% de positividade no sangue. Os autores acreditam que o sangue possa conter inibidores (células mononucleares) que podem interferir na amplificação e sugerem realizar um pré-tratamento do material com NaOH. Relatam a possibilidade de conseguir a amplificação no gene groEL de 372pb na presença de 1/10 do genoma bacilar.

Pattyn et al., em 1993, realizaram a PCR de material do esfregaço nasal dos comunicantes de pacientes com hanseníase PB e MB e obtiveram

positividade de 1,9% e 7,9%, respectivamente. Os autores sugerem a importância da PCR nos trabalhos de controle epidemiológico da doença.

De Wit et al., (1993) realizaram análise de esfregaço nasal aplicando a PCR em pacientes com hanseníase não tratados, de controles endêmicos, não endêmicos e de contactos ocupacionais. Ao mesmo tempo realizaram o teste sorológico com anticorpo anti PGL1 do *M. leprae*. A amplificação ocorreu em 55% dos pacientes não tratados, em 19% dos contactos ocupacionais, 12% em controles endêmicos e em nenhum caso de controle não endêmico. Amplificaram fragmento 531pb do gene "encoding" que codifica o *M. leprae* e obtiveram sensibilidade de 120 fentograma de DNA bacilar, enquanto que o menor número de bacilos detectado pelo teste de ensaio imunoenzimático foi de 10^4 .

Jamil et al., (1994) aplicaram a PCR com o método colorimétrico para a detecção de *M. leprae* em fragmentos de pele congelados. Concluíram que: o método colorimétrico tem a mesma eficácia que o gel de agarose; que é necessária a PCR em sequência repetitiva nas formas PB; que a sensibilidade ocorre em um fragmento de DNA genômico purificado do bacilo e que a PCR é eficaz no controle terapêutico da doença. Obtiveram positividade em 100% nos materiais, de pacientes MB com IB ≥ 2 (70%); nos MB com IB = 1 e 69% em PB com IB = 0%.

Nishimura et al., (1994), realizaram a PCR em amostras parafinadas de 39 biópsias de pele obtidas de 30 pacientes, sendo 10 amostras de PB e 29 amostras de MB, para amplificar o gene groEL e fragmento de 372 pb.

Richter et al., (1994) desenvolveram um protocolo de PCR simples, baseado em três iniciadores capazes de detectar micobactérias de crescimento lento que possui a sequência 16S (rRNA). Este método amplifica o fragmento 479pb das micobactérias e após o emprego do segundo "primer antisense" (pL) amplifica o fragmento 204pb, específica do *M. leprae*. Utilizaram fígado fresco de tatu infectado.

Cook et al., (1994) desenvolveram um protocolo de PCR para detecção de diversas espécies de micobactérias pelo método de reamplificação da "nested-PCR". Os autores utilizaram 126 culturas puras de micobactérias utilizando iniciadores específicos para o gene groEL de 65 kDa. Os produtos da PCR foram tratados com três enzimas de restrição *HhaI*, *Mbol* e *BstUI*. Das 126 amostras,

103 positivaram e detectara Twenty-two points, plus triple-word-score, plus fifty points for using all my letters. Game's over. I'm outta here.m algumas espécies de micobactérias, mas nenhuma detectou o *M. leprae*. Submeteram o resultado da segunda PCR sob a ação da AluI (específica para *M. leprae*), e conseguiram positividade em um material fixado e embocado em parafina contendo a espécie *leprae*.

Van Beer et al., (1994) realizaram o estudo epidemiológico utilizando a PCR em esfregaço nasal, numa área endémica no sul da Indonésia, em 1.228 pacientes incluindo contato intradomiciliar e extradomiciliar. Utilizaram o protocolo de De Wit et al. (1993) e obtiveram amplificação no fragmento 531pb do gene PRA em 7,8%. Este estudo indica que os indivíduos podem ser infectados pelo bacilo sem apresentar sinais da doença. Comparou a PCR com os exames sorológicos obtendo os seguintes resultados: aglutinação de partículas de gelatina (MLPA) 32% de positividade, com método de ensaio imunoenzimático indireto (IgM-PGL) foi positivo em 30,8%, com antiarabinomanana (IgG-LAM) 11,6% e o exame menos sensível foi a sorologia com IgG-PGL com 6,7% de positividade.

Rafi et al, (1995) analisaram pela PCR 44 amostras de "imprint" de pele e escarro de pacientes submetidos a monoterapia e amplificaram fragmento 530pb no gene groEL que expressa 36kDa de *M. leprae*. Obtiveram 4,5% de positividade no escarro e 38,1% no material de "imprint" com maior positividade nos PB.

Wichitwechkarn et al., (1995) testaram a sensibilidade da PCR com quantidades conhecidas de DNA purificado de *M. leprae* e amplificaram fragmento de 531pb que codifica 36 kDa, visível com 3.125 fentogramas do DNA (equivalente a meio bacilo). O resultado foi mais positivo nos casos MB (87,1%) que em PB (36,4%). O exame microscópico de rotina apresentou IB = O nos 36,4% de PB, amplificado pela PCR. Um caso de MB não amplificado correspondia a forma virchowiana com IB = 5.

Misra et al., (1995) analisaram 67 amostras de "imprint" de pele, 45 fragmentos de pele fresca e 4 biópsias de pessoas sadias. Obtiveram os seguintes resultados: dos 67 "imprint", 46 foram da forma PB com 26% casos positivos e 21 da forma MB com 57% positivos. Em 45 fragmentos de pele, 24 da forma PB, somente 4% amplificaram e dos 21 casos de MB, 66,7% amplificaram.

Santos et al., (1995) ensaiaram um método diagnóstico de hanseníase com procedimentos não invasivos realizando a PCR em 33 amostras (26 MB e 7 PB) de secreção nasal com 63% de positividade e do bulbo de pêlos de diferentes áreas, com positividade de 72% nos MB e 28% nos PB. Observaram que o infiltrado inflamatório pode inibir a amplificação da PCR, coincidindo com as suposições de Yoon et al., (1993) e De Wit, (1991). A positividade na secreção nasal não significa necessariamente doença, principalmente numa região endêmica, este achado pode indicar transporte passivo do bacilo.

Corvalán, (1996) utilizou a PCR em amostra parafinada e sugeriu não amplificar fragmentos maiores que 600pb e recomendou utilizar amplificação em fragmentos até 200pb, devido a fragmentação do DNA no material parafinado.

Chemouilli et al., (1996) utilizaram a PCR em material de biópsias de nervos de 03 pacientes PB e 07 MB com neuropatia hansênica e verificaram que a extração do DNA de amostras contendo fibrose se torna difícil. A sensibilidade da técnica melhorou com o tratamento pela "proteínase K" em substituição à "colagenase/dispase", que possivelmente continha inibidores de "Taq DNA polymerase". Obtiveram resultados positivos em 100% dos pacientes MB e em 80% nos pacientes PB. Este trabalho mostra a importância da PCR para diferenciar a hanseníase de outras neuropatias inflamatórias.

Santos et al., em 1997, publicaram o estudo de um paciente que apresentava lesão hipocrômica no braço sem alteração da sensibilidade na lesão e parestesia da região ulnar sem lesões cutâneas. Os exames para o diagnóstico de hanseníase, incluindo-sorologia para detectar antígeno PGL1 de *M. leprae*, ultrassonografia do nervo e eletroneuromiografia foram inconclusivos. Aplicaram a PCR da secreção nasal, do sangue e bulbo piloso da lesão cutânea com intervalo de um mês. A 1ª PCR resultou positiva somente no material da secreção nasal. A 2ª PCR positivou amostras da secreção nasal e no sangue, concluindo o diagnóstico de hanseníase.