

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia:
Mestrado – Área de Concentração em Patologia Médica

**Correlação entre densidade de fibras
nervosas em biópsia de pele e teste de
quantificação da sensibilidade térmica em
pacientes com hanseníase**

Ismael Alves Rodrigues Júnior

Belo Horizonte

2011

ISMAEL ALVES RODRIGUES JÚNIOR

**Correlação entre densidade de fibras
nervosas em biópsia de pele e teste de
quantificação da sensibilidade térmica em
pacientes com hanseníase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia Médica

ORIENTADORA: Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Belo Horizonte

2011

Aos pacientes que aceitaram o convite para participar deste estudo

AGRADECIMENTOS

À professora Rosa Maria Esteves Arantes, que me acolheu em seu laboratório e me fez parte de sua equipe, desde o primeiro dia, a despeito de todas as minhas limitações e inexperiência, exigindo em troca apenas a afirmação de vontade.

À doutora Sandra Lyon, que acreditou na proposta deste trabalho e tanto contribuiu para que cada convite de participação pudesse ser feito aos pacientes.

Ao doutor Manoel Villarroel, que dividiu comigo a sua idéia e me aguçou a percepção da fascinante interação dermatologia-neurologia.

Aos colegas de ICB com quem compartilhei ótimos momentos e aos colegas da pós-graduação em patologia, em especial a amiga Débora Balabram, por sua enorme ajuda na análise estatística.

À equipe do laboratório de neuro-imunopatologia experimental, com quem tanto aprendi.

A Helena, que agendou cada paciente com tanto esmero e paciência.

À equipe do Hospital Eduardo de Menezes, estagiários e residentes, fundamentais.

À professora Lúcia Porto, Luciana Daise, Lourdinha, Margarete, pelo solícito apoio técnico.

A minha esposa Letícia, sempre presente.

RESUMO

Sabe-se que, nas lesões da hanseníase, a perda de sensibilidade tátil, mediada por fibras nervosas grossas mielinizadas tipo A-beta, é precedida pela perda de sensibilidade térmica, mediada por fibras finas mielinizadas tipo A-delta e finas não mielinizadas tipo C, o que faz do exame de sensibilidade térmica de uma lesão suspeita um critério fundamental para que se estabeleça o diagnóstico oportuno de hanseníase. Trabalhos recentes, envolvendo testes sensitivos térmicos, têm empregado modernos instrumentos eletrônicos capazes de perfazer o teste quantitativo de sensibilidade térmica (TQST), método padrão-ouro para a avaliação de sensibilidade térmica. Paralelamente, o estudo morfológico da inervação cutânea por meio de colorações especiais para terminações nervosas finas intraepidérmicas e dérmicas tem se mostrado uma alternativa para a avaliação do acometimento de fibras finas relacionadas à função de sensibilidade térmica. Os poucos trabalhos disponíveis na literatura indexada que empregaram o estudo morfológico de fibras nervosas finas cutâneas em pacientes com hanseníase constataram uma diminuição da densidade das fibras finas dermo-epidérmicas nas lesões da doença e uma associação entre esta redução e o aumento dos limiares de detecção de calor e frio destes pacientes. Tais trabalhos, todavia, não especificaram detalhes importantes sobre a metodologia empregada no teste de quantificação de sensibilidade térmica e empregaram métodos semi-quantitativos de avaliação de densidade de fibras nervosas cutâneas, o que limita sua reprodutibilidade. O presente trabalho tem por objetivo estudar a correlação entre o grau de comprometimento da sensibilidade térmica avaliada por meio do TQST e o grau de diminuição da densidade de fibras nervosas finas na pele de pacientes com hanseníase. Vinte e dois pacientes tiveram lesão e pele contralateral clinicamente normal avaliadas por meio de biópsias e do TQST, realizado com o analisador termo-sensório *Thermal sensory analyzer TSA-II*. As fibras nervosas finas cutâneas foram evidenciadas por coloração imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos anti-PGP 9.5 e quantificadas por morfometria. Houve diferença significativa entre lesões e pele contralateral em relação aos limiares de detecção de frio, calor e dor induzida por frio e calor. A diferença absoluta

média para estes limiares foi de, respectivamente, 9,2°C; 6,0°C; 5,5°C e 4,2°C. A marcação imuno-histoquímica das biópsias de lesões demonstrou uma importante rarefação de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas em relação às biópsias de pele contralateral. Em média, a densidade de fibras subepidérmicas e intraepidérmicas mostrou redução de 79,5% ($DP = 19,6$) e 80,8% ($DP = 24,9$), respectivamente. Foi observada boa correlação entre o déficit de fibras intraepidérmicas e o déficit de fibras subepidérmicas. Todavia, não foi possível detectar a existência de correlação entre as variáveis representativas de déficit de inervação cutânea e as variáveis representativas de déficit de sensibilidade térmica, uma vez que a rarefação de fibras finas cutâneas foi homoganeamente intensa em todos os pacientes, independente do grau de déficit sensitivo apresentado.

Palavras-chave: Hanseníase, pele, patologia, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

It is known that, in lesions of leprosy, loss of tactile sensitivity, mediated by thick myelinated A-beta type nerve fibers, is preceded by the loss of thermal sensitivity, mediated by thin myelinated A-delta type and thin unmyelinated C type thin fibers, which makes the evaluation of the thermal sensitivity of a suspicious lesion a fundamental criterion for the leprosy diagnosis establishment. Recent studies involving thermal sensory testing have employed modern electronic instruments able to complete the quantitative sensory test (QST), the gold-standard method for the assessment of thermal sensitivity. In parallel, the morphological study of cutaneous innervation by means of special stains for intraepidermal and dermal nerve endings has become an alternative for assessing the impairment of these fine fibers involved in the thermal sensitivity. The few studies available in the literature that used the morphological study of thin cutaneous nerve fibers in leprosy patients noted a decrease in the density of dermo-epidermal thin fibers at the lesions of the disease and an association between this reduction and the increased thermal thresholds in the QST. These studies, however, did not specify important details about the methodology used in the QST and employed semi-quantitative methods for the evaluation of the cutaneous nerve fiber density, which limits its reproducibility. The present work aims to study the correlation between the degree of impairment of thermal sensitivity assessed by QST and the degree of decreased density of thin nerve fibers in the skin of leprosy patients. Twenty-two patients had skin lesions and contralateral clinically unaffected skin evaluated by biopsies and TQST, performed with the thermal sensory analyzer *Thermal sensory analyzer TSA-II*. The thin cutaneous nerve fibers were observed by immunohistochemical staining using anti- PGP 9.5 and quantified by morphometry. There were significant differences among lesions and contralateral unaffected skin in relation to cold, heat and pain induced by heat and cold detection thresholds. The mean absolute difference for these thermal thresholds were, respectively, 9.2 ° C, 6.0 ° C, 5.5 ° C and 4.2 ° C. The immunohistochemical staining of biopsies of lesions showed a significant thinning of intraepidermal and subepidermal fibers compared to contralateral unaffected skin biopsies. On average, the density of intraepidermal and

subepidermal fibers showed a reduction of 79.5% ($SD = 19.6$) and 80.8% ($SD = 24.9$), respectively. We observed good correlation between intraepidermal and subepidermal fiber deficits. However, it was not possible to detect the correlation between the variables representing a deficit of cutaneous innervation and the variables representing a deficit of thermal sensitivity, since the thin fibers thinning was homogeneously intense in all patients, regardless of the degree of sensory deficit presented.

Keywords: sensory thresholds, PGP 9.5, leprosy.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Sumário de análise descritiva da população estudada	66
TABELA 2	Classificação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares conforme as classificações de Ridley-Jopling e de Madrid	73
TABELA 3	Classificação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares conforme as classificações de Ridley-Jopling e Operacional da OMS	73
TABELA 4	Distribuição das médias e desvios padrões dos tempos de evolução da doença até o diagnóstico, conforme a sensibilidade tátil aos monofilamentos de Semmes-Weinstein	76
TABELA 5	Comparação dos limiares obtidos no teste quantitativo de sensibilidade térmica entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”	77
TABELA 6	Quantificação da perda de sensibilidade térmica nas lesões em relação à pele contralateral, por meio da média das diferenças entre os valores dos limiares encontrados nos dois sítios	80
TABELA 7	Distribuição da perda de sensibilidade térmica nas lesões em relação à pele contralateral, estimada por meio da diferença absoluta entre os valores dos limiares encontrados nos dois sítios, conforme a sensibilidade tátil na lesão	81
TABELA 8	Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao frio baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão e a baseada em um ponto de corte para o limiar na lesão	82
TABELA 9	Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao calor baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão e a definição baseada em um ponto de corte para o limiar observado na lesão	83

TABELA 10	Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao frio baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão, e uma definição inferida a partir do valor de temperatura recomendada para o teste com tubo de água fria (25°C)	84
TABELA 11	Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao calor baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão, e uma definição inferida a partir do valor de temperatura recomendada para o teste com tubo de água quente (45°C)	84
TABELA 12	Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas comparada entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”	88
TABELA 13	Testes de correlação entre limiares de sensibilidade térmica e quantificação de fibras nervosas intraepidérmicas	91
TABELA 14	Testes de correlação entre limiares de sensibilidade térmica e quantificação de fibras nervosas subepidérmicas	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Índices de detecção de hanseníase por 100.000 habitantes de acordo os dados reportados à Organização Mundial de Saúde no início do ano de 2009, países do mundo	23
FIGURA 2	Índices de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes de acordo os dados reportados à Organização Mundial de Saúde no início do ano de 2009, países do mundo	23
FIGURA 3	Mapa representativo dos dez primeiros aglomerados de casos de hanseníase identificados por meio do coeficiente de detecção de casos novos no período de 2005 a 2007 no Brasil	24
FIGURA 4	Principais nervos acometidos na pela hanseníase	32
FIGURA 5	Estesiômetro	38
FIGURA 6	Pontos testados na avaliação de sensibilidade protetora em mãos e pés	39
FIGURA 7	Estimulador térmico portátil e comparação de seu tamanho com o de pilhas alcalinas pequenas	41
FIGURA 8	Analizador termo-sensório	55
FIGURA 9	Limiar de percepção do calor determinado pelo método dos níveis	57
FIGURA 10	Limiar da percepção do frio determinado pelo método dos níveis	57
FIGURA 11	Microfotografias das lâminas utilizadas para definição da forma de hanseníase conforme a classificação de Ridley-Jopling, pela coloração com hematoxilina-eosina	69
FIGURA 12	Microfotografias das lâminas utilizadas para definição da forma de hanseníase conforme a classificação de Ridley-Jopling, pela coloração com hematoxilina-eosina	70

FIGURA 13	Microfotografias representativas da coloração imuno-histoquímica para PGP 9,5	86
FIGURA 14	Comparação da densidade de fibras evidenciadas por coloração imuno-histoquímica para PGP 9,5 entre pele contralateral e lesão de pacientes com hanseníase	87

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Coeficientes de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, nas regiões e no Brasil, no período de 2001 a 2007	25
GRÁFICO 2	Coeficientes de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, nos estados da Federação em 2007, Brasil	26
GRÁFICO 3	Distribuição das formas de hanseníase apresentadas pelos pacientes participantes conforme a classificação de Ridley-Jopling	67
GRÁFICO 4	Sensibilidade tátil das 22 lesões ao teste com monofilamentos de Semmes-Weinstein	74
GRÁFICO 5	Distribuição do tempo de evolução da doença até o diagnóstico, conforme a sensibilidade tátil aos monofilamentos de Semmes-Weinstein	76
GRÁFICO 6	Distribuição dos limiares de detecção de calor nas lesões de hanseníase, estratificadas em grupos de acordo com o resultado do teste de sensibilidade tátil por meio de monofilamentos	78
GRÁFICO 7	Distribuição dos limiares de detecção de frio nas lesões de hanseníase, estratificadas em grupos de acordo com o resultado do teste de sensibilidade tátil por meio de monofilamentos	79
GRÁFICO 8	Gráfico de dispersão representando os valores das variáveis “déficit de fibras intraepidérmicas” e “déficit de fibras subepidérmicas” para cada um dos pacientes participantes	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	As manifestações clínicas e complicações da neuropatia da hanseníase	33
QUADRO 2	Representação do nível funcional de cada monofilamento	38
QUADRO 3	Classificação de forma clínico-baciloscópica (Madrid) e imuno-histológica (Ridley-Jopling)	71
QUADRO 4	Perfil de sensibilidade tátil das lesões e classificação de Ridley-Jopling	75

ABREVIATURAS E SIGLAS

CGRP	-	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
DD	-	Dimorfa-dimorfa
DP	-	Desvio-padrão
DT	-	Dimorfa-tuberculóide
DV	-	Dimorfa-virchowiana
FIG.	-	Figura
GFAP	-	Proteína glial fibrilar ácida
GRÁF.	-	Gráfico
HE	-	Hematoxilina-Eosina
ICAM-1	-	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
ICB	-	Instituto de Ciências Biológicas
IPCF	-	Intervalo de percepção de calor e frio
LPC	-	Limiar de percepção de calor
LPF	-	Limiar de percepção de frio
MB	-	Multibacilar
MHC	-	<i>Major histocompatibility complex</i>
MSW	-	Monofilamentos de Semmes-Weinstein
NF	-	Neurofilamento
NGF	-	<i>Nerve growth factor</i>
NGFr	-	<i>Nerve growth factor receptor</i>
NIPE	-	Neuroimunopatologia Experimental
NPY	-	Neuropeptídeo Y
NSE	-	<i>Neuron specific enolase</i>
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PB	-	Paucibacilar
PBS	-	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	-	<i>Polimerase chain reaction</i>
PGL-I	-	<i>Phenolic glycolipid 1</i>
PGP	-	<i>Protein gene product</i>
SNP	-	Sistema nervoso periférico
SP	-	Substância P
TAB.	-	Tabela
TH	-	Tirosina hidroxilase

- TQST - Teste quantitativo de sensibilidade térmica
- TT - Tuberculóide
- UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
- VIP - *Vasoactive intestinal polypeptide*
- VV - Virchowiana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Justificativa	18
1.2	Objetivos	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Epidemiologia	22
2.2	História natural da doença	26
2.3	Formas clínicas	29
2.3.1	<i>Hanseníase indeterminada</i>	29
2.3.2	<i>Hanseníase tuberculóide</i>	29
2.3.3	<i>Hanseníase virchowiana</i>	30
2.3.4	<i>Hanseníase dimorfa</i>	30
2.3.5	<i>Surtos reacionais</i>	31
2.4	Lesão neural na hanseníase	31
2.5	Sistema somatosensitivo periférico	35
2.6	Teste de sensibilidade cutânea	36
2.6.1	<i>Teste de sensibilidade tátil</i>	37
2.6.2	<i>Teste de sensibilidade térmica</i>	40
2.6.3	<i>Teste quantitativo de sensibilidade térmica (TQST)</i>	42
2.6.4	<i>Teste quantitativo de sensibilidade térmica em hanseníase</i>	44
2.7	Avaliação quantitativa de fibras nervosas cutâneas	45
2.7.1	<i>Neuropatia sensitiva de fibras finas</i>	46
2.7.2	<i>Evidenciação de fibras nervosas cutâneas</i>	48
2.7.3	<i>Evidenciação de fibras nervosas cutâneas em pacientes com hanseníase</i>	50
3	MÉTODOS	53
3.1	Seleção de casos	53
3.2	Diagnóstico de hanseníase	54
3.3	Teste quantitativo de sensibilidade térmica	54
3.3.1	<i>Método dos níveis</i>	56
3.3.2	<i>Método dos limites</i>	57
3.4	Biópsia de pele	58
3.5	Processamento dos fragmentos de pele	59
3.6	Estudo morfológico	59
3.7	Estudo imuno-histoquímico	60
3.8	Morfometria	61

3.8.1	Quantificação de fibras intraepidérmicas	62
3.8.2	Quantificação de fibras subepidérmicas	62
3.9	Análise estatística	63
4	RESULTADOS	65
4.1	Análise descritiva da população estudada	65
4.2	Classificação histológica de Ridley-Jopling	67
4.3	Teste de sensibilidade tátil das lesões	74
4.4	Teste quantitativo de sensibilidade térmica	77
4.5	Imuno-histoquímica	85
4.6	Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas	87
4.7	Análises de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais	90
5	DISCUSSÃO	93
5.1	Características da amostra de pacientes participantes	93
5.2	Comparação entre as diferentes formas de classificação	94
5.3	Teste de sensibilidade tátil das lesões	96
5.4	Teste quantitativo de sensibilidade térmica	97
5.5	Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas	101
5.6	Análises de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais	103
6	CONCLUSÃO	106
6.1	Resposta aos objetivos propostos	106
6.2	Perspectivas para pesquisas futuras	106
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICES	116
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de evolução insidiosa, que afeta particularmente a pele e os nervos periféricos e cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*. A lesão neural é a manifestação de maior morbidade, provoca deformidades físicas que podem evoluir para lesões incapacitantes e permanentes e responde pela importância histórica, social e econômica da doença. Apesar de a patogênese da neuropatia na hanseníase ainda não ter sido completamente elucidada, sabe-se que tanto a reação imunológica do doente quanto a agressão direta pela micobactéria podem estar envolvidas.

O diagnóstico da hanseníase nas fases mais incipientes de sua evolução é de fundamental importância para que o tratamento seja iniciado no momento oportuno, visando a evitar tais complicações. Tomando-se como referência as diretrizes do Ministério da Saúde para vigilância, atenção e controle da hanseníase (BRASIL, 2010) o diagnóstico de hanseníase é feito com base na verificação de lesão de pele com alteração da sensibilidade, espessamento de nervos periféricos ou baciloscopia dérmica positiva.

Geralmente, em uma fase inicial, a doença se apresenta apenas como mácula hipocrômica ou placa eritematosa hipoestésica, sem espessamentos neurais e com baciloscopia dérmica negativa. Dessa forma, o exame da sensibilidade da lesão suspeita é um critério fundamental para que se possa estabelecer o almejado diagnóstico precoce.

Para se proceder à avaliação da sensibilidade nas lesões, dispõe-se de diferentes métodos. O mais usado nos ambulatórios é o teste de sensibilidade tátil através dos monofilamentos de Semmes-Weinstein, um conjunto de hastes de nylon padronizadas, de calibres gradualmente mais espessos, que, pressionadas sobre a pele, exercem diferentes pressões. Na lesão hipoestésica da hanseníase, ocorre perda da sensibilidade tátil aos

monofilamentos, configurando a alteração de sensibilidade requerida para o diagnóstico.

Todavia, nas lesões da hanseníase, é sabido que a perda de sensibilidade tátil é precedida por perda de sensibilidade térmica. Apesar de os monofilamentos estarem disponíveis nos ambulatórios e serem de fácil utilização, sabe-se que, em algumas lesões, a sensibilidade tátil, mediada por fibras nervosas grossas mielinizadas tipo A-beta, pode estar preservada, mesmo quando já houve perda de sensibilidade térmica, mediada por fibras finas mielinizadas tipo A-delta e finas não mielinizadas tipo C. Dessa forma, a avaliação da sensibilidade térmica é considerada muito importante para o estabelecimento do diagnóstico precoce de hanseníase.

O emprego do teste não quantitativo de sensibilidade térmica, que envolve a utilização de tubos de água quente e fria, é dificultado na prática ambulatorial por ser de pouca praticidade e difícil padronização. Trabalhos recentes envolvendo testes sensitivos térmicos têm empregado modernos instrumentos eletrônicos capazes quantificar os limiares de percepção de calor e frio dos pacientes. Com estes equipamentos é possível realizar o teste quantitativo de sensibilidade térmica, método padrão-ouro para a avaliação de sensibilidade térmica. Todavia, mas seu emprego em larga escala para a prática ambulatorial é limitado por suas grandes dimensões, pela necessidade de um profissional experiente em sua utilização e por seus preços elevados, cujo valor atinge a faixa de trinta mil dólares.

Uma alternativa para a avaliação do acometimento de fibras finas relacionadas à função de sensibilidade térmica é seu estudo morfológico através da biópsia de pele. Utilizando-se imuno-histoquímica ou imunofluorescência, as terminações nervosas finas intraepidérmicas e dérmicas podem ser analisadas e quantificadas após sua marcação com diferentes anticorpos. O marcador pan-axonal *protein gene product* (PGP 9.5) é largamente utilizado como marcador neuronal em estudos de neuropatias periféricas.

A grande maioria das publicações sobre quantificação de fibras finas em biópsia de pele refere-se a estudos sobre polineuropatias periféricas. Em algumas formas de polineuropatia, como alguns casos de polineuropatia diabética, a quantificação de fibras nervosas finas em biópsia de pele pode ser

fundamental para o diagnóstico, uma vez que os tradicionais estudos de condução dos nervos periféricos, como eletroneuromiografia, que avaliam apenas fibras nervosas grossas, podem encontrar-se inalterados. Estas são as chamadas neuropatias de fibras finas. As atuais diretrizes da Federação Europeia de Sociedades Neurológicas recomendam que mesmo a biópsia de nervo periférico seja preterida em favor da biópsia de pele na propedêutica das neuropatias de fibras finas.

Os poucos trabalhos disponíveis na literatura indexada que empregaram o estudo morfológico de fibras nervosas finas cutâneas em pacientes com hanseníase constataram uma diminuição da densidade das fibras finas dermo-epidérmicas nas lesões da doença e uma associação entre esta redução e o aumento dos limiares de detecção de calor e frio destes pacientes. Tais trabalhos, todavia, não especificaram detalhes importantes sobre a metodologia empregada no teste de quantificação de sensibilidade térmica e empregaram métodos semi-quantitativos de avaliação de densidade de fibras nervosas cutâneas, limitando sua reprodutibilidade. Até o momento não temos conhecimento de estudos que correlacionaram a quantificação objetiva da densidade das fibras finas em lesões de hanseníase com o TQST realizado através de equipamentos eletrônicos.

O crescente interesse em terapias celulares e regenerativas no controle da progressão de lesões nervosas contrasta com o pequeno conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na progressão da neuropatia hansênica e sinaliza a necessidade de pesquisas científicas na área. O estudo do perfil estrutural e imuno-histoquímico de nervos precocemente lesados pode iluminar mecanismos patogénicos de degeneração axonal ou desmielinização, reforçando a relevância de estudar os aspectos histológicos e imuno-histoquímicos relacionados ao perfil imunológico da lesão nervosa associada à perda da sensibilidade térmica.

Este trabalho, aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Eduardo de Menezes (ANEXOS A e B), correlaciona aspectos clínicos e resultados do TQST obtidos por meio de um analisador termo-sensório com a quantificação objetiva da densidade de fibras nervosas finas marcadas por PGP 9.5 em lesões e pele contralateral de 22 pacientes cometidos por hanseníase.

1.2 Objetivos

Objetivo geral:

Estudar a correlação entre o grau de comprometimento da sensibilidade térmica avaliada por meio de teste quantitativo e o grau de diminuição da densidade de fibras nervosas finas na pele de pacientes com hanseníase.

Objetivos específicos:

- Estudar os limiares de detecção de sensibilidade térmica medidos por meio de teste quantitativo de sensibilidade térmica em lesões e pele contralateral de pacientes com hanseníase.
- Estudar a densidade de inervação cutânea por meio de determinação quantitativa morfométrica das fibras nervosas finas epidérmicas e subepidérmicas evidenciadas com coloração imuno-histoquímica para PGP 9.5 em lesões e pele contralateral de pacientes com hanseníase.
- Avaliar a existência de correlação entre o grau de déficit de sensibilidade térmica e o grau de rarefação de fibras nervosas finas epidérmicas e subepidérmicas em pacientes com hanseníase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A tendência atual é considerar a hanseníase como uma doença crônica estável que urge por controle e não como uma doença responsiva a estratégias de eliminação, tendo sido o conceito de eliminação originalmente definido como meta de prevalência menor que um caso por 10.000 pessoas. Os programas de eliminação tiveram mérito em oferecer poliquimioterapia eficiente para o tratamento de hanseníase ao redor de todo o mundo, todavia, apesar deste avanço, a detecção de novos casos tem se mantido estável nos países onde os índices de endemicidade são mais elevados, como Brasil e Índia (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005).

De acordo com informações disponibilizadas pelo Ministério da Saúde, a hanseníase apresenta tendência de estabilização dos coeficientes de detecção no Brasil, todavia em patamares muito elevados nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (BRASIL, 2009b).

A Coordenação do Programa Nacional de Controle da Hanseníase tem por objetivo o controle da doença e realiza seu acompanhamento epidemiológico por meio do coeficiente de detecção de casos novos por grupo de 100.000 habitantes, que alcançou em 2007, no Brasil, o valor de 21,08/100.000 habitantes, sendo o coeficiente de prevalência de 21,94/100.000 habitantes (BRASIL, 2008a).

Os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) evidenciam que Brasil foi um dos países com maiores coeficientes de detecção no mundo e ocupou destaque entre os países de maior prevalência da doença em 2009, como mostram as Figuras 1 e 2 (WHO, 2009).

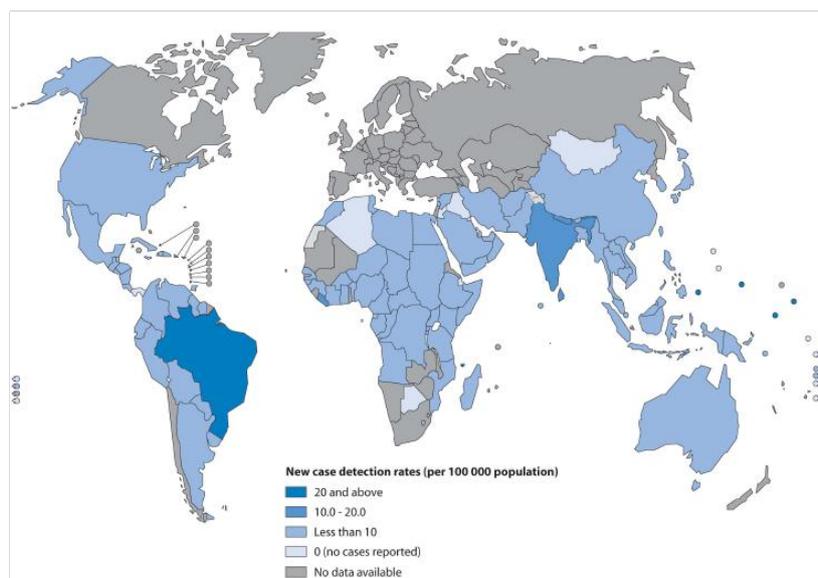


Figura 1: Índices de detecção de hanseníase por 100.000 habitantes de acordo os dados reportados à Organização Mundial de Saúde no início do ano de 2009, países do mundo.

Legenda: “*New case detection rates rates (per 100.000 population)*”: Taxa de detecção de casos novos (para cada 100.000 habitantes). “*20 and above*”: Maior ou igual a 20. “*Less than 10*”: menor que 10. “*0 (no cases reported)*”: 0 (nenhum caso notificado). “*No data available*”: dados não disponíveis.

Fonte: Organização Mundial de Saúde – Mapas de hanseníase. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/prevalence/en/index.html>. Acesso em: 27 jul. 2010.

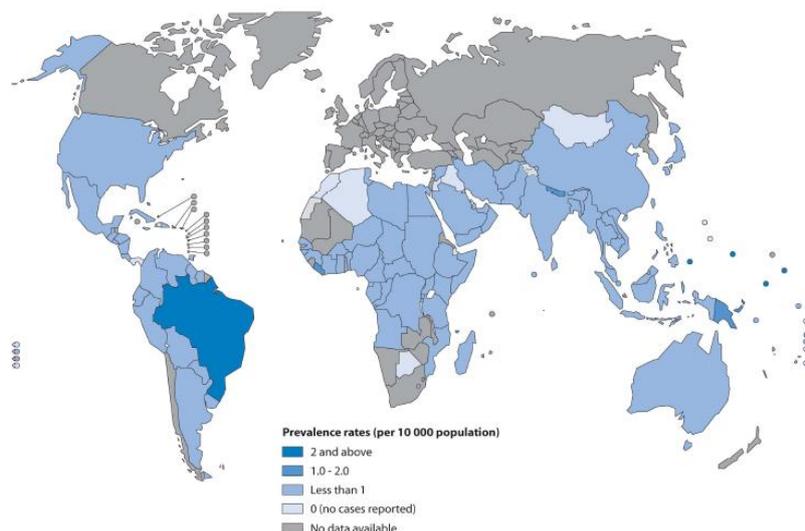


Figura 2: Índices de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes de acordo os dados reportados à Organização Mundial de Saúde no início do ano de 2009, países do mundo.

Legenda: “*Prevalence rates (per 10.000 population)*”: Taxa de prevalência (para cada 10.000 habitantes). “*2 and above*”: Maior ou igual a 2. “*Less than 1*”: menor que 1. “*0 (no cases reported)*”: 0 (nenhum caso notificado). “*No data available*”: dados não disponíveis.

Fonte: Organização Mundial de Saúde – Mapas de hanseníase. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/prevalence/en/index.html>. Acesso em: 27 jul. 2010.

O foco do Ministério da Saúde é a atenção integral e uma ação integrada em regiões, estados e municípios envolvidos em *clusters* identificados, visando a reduzir as fontes de transmissão. *Clusters* ou aglomerados definem áreas com maior risco de transmissão e onde é encontrada a maioria dos casos. Sua identificação permite a orientação do programa de controle com enfoque em espaços geograficamente contínuos e com maior efetividade epidemiológica. Tal abordagem evita que sejam ignoradas áreas onde tenham sido levantados índices de detecção falsamente baixos devido a esforço insuficiente na detecção ou que se priorizem municípios com muitos casos em virtude do tamanho de sua população e não devido ao maior risco (BRASIL, 2008a). Os 10 aglomerados mais prováveis incluem 1.173 municípios, representando apenas 17,5% da população do país, mas respondendo por 53,5% dos casos novos detectados em 2007 (FIG. 3).

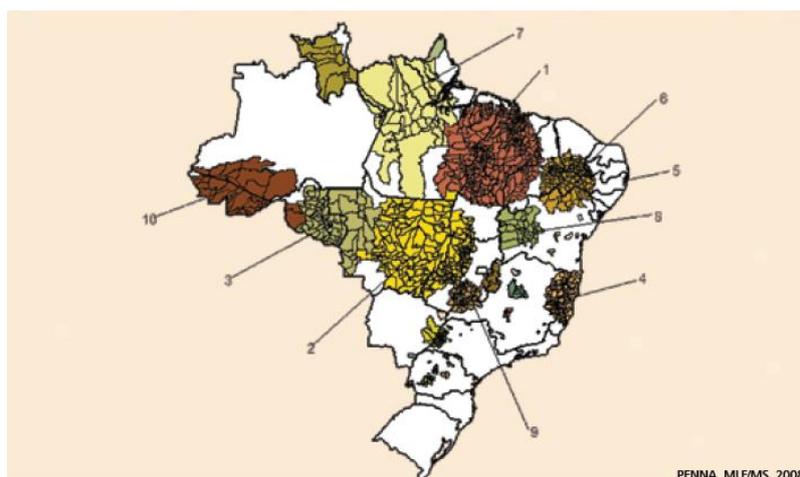


Figura 3: Mapa representativo dos dez primeiros aglomerados de casos de hanseníase identificados por meio do coeficiente de detecção de casos novos no período de 2005 a 2007 no Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde – Boletim Hanseníase Novembro 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_hanse_portugues_nov_2008.pdf Acesso em: 27 jul. 2010.

No período de 2001 a 2007 observou-se maior ocorrência de casos nas regiões Norte e Centro-Oeste, seguidas da região Nordeste. O coeficiente médio de detecção neste período nestas regiões foi de 69,40; 60,77 e 35,48/100.000 habitantes, respectivamente. Na região Sudeste o coeficiente decresceu de 14,06/100.000 em 2001, para 9,75/100.000 habitantes, em 2007.

Na região Sul, foram registrados os valores mais baixos do país, 7,44/100.000 em 2001 e 6,45/100.000 habitantes em 2007 (GRÁF. 1).

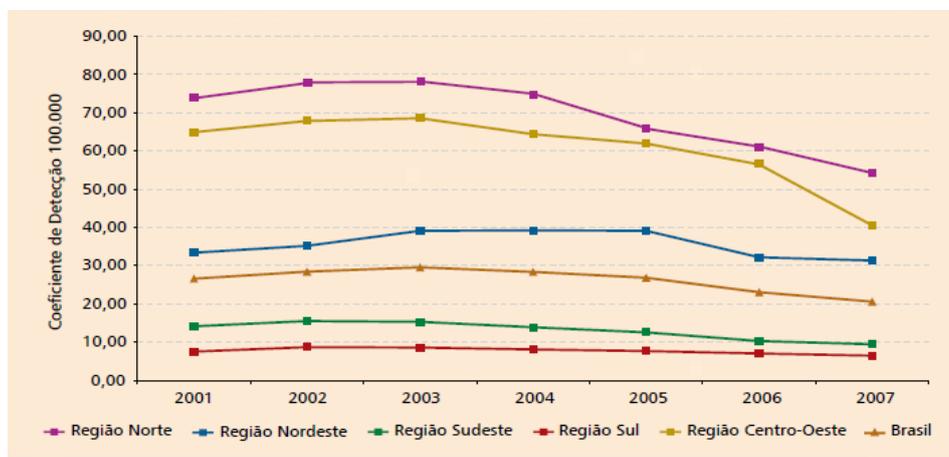


Gráfico 1: Coeficientes de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, nas regiões e no Brasil, no período de 2001 a 2007.

Fonte: Ministério da Saúde – Boletim Hanseníase Novembro 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_hanse_portugues_nov_2008.pdf
Acesso em: 27 jul. 2010.

A avaliação dos coeficientes de detecção por estados evidencia a situação da região da Amazônia Legal em relação à doença. Correspondendo a 12,9% da população do Brasil, a região concentrou 38,9% (15.532) dos casos novos detectados no país em 2007. O estado de Mato Grosso, na região Centro-Oeste, apresentou o mais elevado coeficiente de detecção em 2007, 100,27/100.000 habitantes (GRÁF. 2).

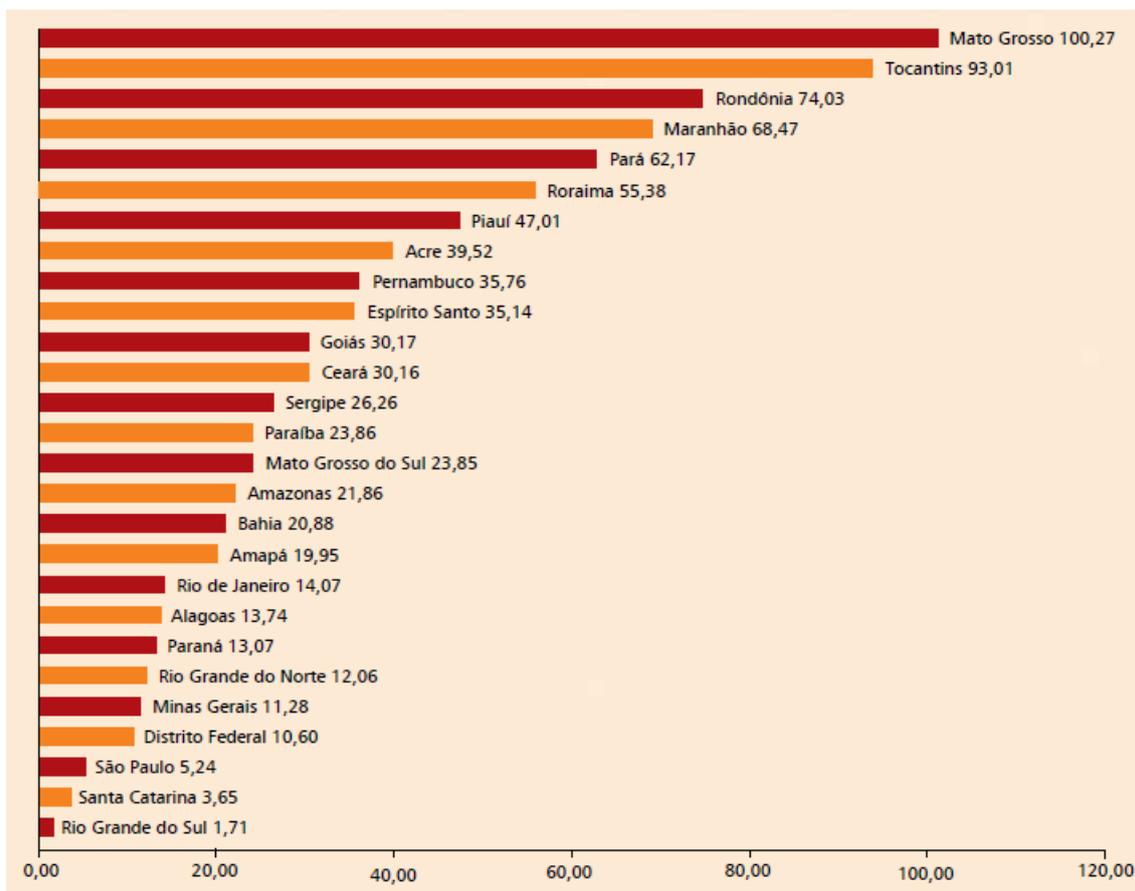


Gráfico 2: Coeficientes de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, nos estados da Federação em 2007, Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde – Boletim Hanseníase Novembro 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_hanse_portugues_nov_2008.pdf
Acesso em: 27 jul. 2010.

2.2 História natural da doença

Hanseníase é uma doença infecciosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo que apresenta alta infectividade, porém baixa patogenicidade, uma vez que apenas alguns indivíduos infectados adoecem (ARAÚJO, 2003). Envolve primariamente a pele e os nervos periféricos, mas ocasionalmente pode acometer outros órgãos (BRASIL, 2002; 2009a). A neuropatia periférica é sua principal manifestação e responde por seu potencial para causar incapacidades e deformidades físicas (WALKER; LOCKWOOD, 2007; BRASIL, 2008b).

As diferentes apresentações clínicas da doença estão correlacionadas com padrões distintos de resposta imunológica e variam de uma forma localizada e não-contagiosa, caracterizada por vigorosa resposta imune celular, até uma forma difusa e contagiosa, caracterizada substituição de resposta imune celular específica por exuberante resposta humoral. Entre esses extremos, formas clínicas intermediárias traduzem um espectro de variações deste balanço celular-humoral da resposta imunológica suscitada pela micobactéria, dependendo do hospedeiro em que se encontra. Classificar a hanseníase conforme estas nuances é fundamental para a programação do tratamento e permite ainda prognosticar a evolução dos pacientes, avaliar seu potencial para disseminação da doença e padronizar a elaboração e divulgação de estudos científicos e epidemiológicos (LOCKWOOD *et al*, 2007). Com este intuito, diferentes classificações foram propostas ao longo dos anos.

A classificação de Madrid, apresentada no VI Congresso Internacional de Hanseníase de Madrid em 1953, leva em conta morfologia das lesões cutâneas, manifestações neurológicas e baciloscopia dérmica (FERNÁNDEZ, 1954). Esta classificação, ainda usada em muitos serviços, divide a doença em duas formas polares estáveis, tuberculóide e virchowiana, e duas formas instáveis, indeterminada e dimorfa, que podem evoluir para uma das formas polares na dependência da resposta imunológica do doente.

A classificação de Ridley e Jopling de 1966 estreita a correlação entre as manifestações clínico-patológicas e o estado da resposta imunológica dos doentes e visa à padronização das classificações para fins de pesquisa (RIDLEY, 1974; GOULART; GOULART, 2008). Marca dois grupos polares estáveis, tuberculóide polar (TT) e virchowiano polar (VV), e subdivide os grupos intermediários imunologicamente instáveis em tuberculóide subpolar (TTs), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano subpolar (VVs).

Desde 1998, a Organização Mundial da Saúde propõe uma classificação operacional, essencialmente clínica, dividindo os pacientes em paucibacilares (PB), quando apresentam até cinco lesões cutâneas e multibacilares (MB), quando apresentam mais que cinco lesões (CHANDNA *et al*, 2008; MOSCHELLA, 2004). Em 2002, o Ministério da Saúde recomendou esta classificação em seu Guia para o Controle da Hanseníase, o que foi mantido

em seu mais recente Guia de Vigilância Epidemiológica de hanseníase. O exame baciloscópico foi considerado opcional e sua positividade classificaria o paciente como MB, independente do número de lesões (BRASIL, 2002; 2009a).

Mais recentemente, a pesquisa, no soro, de anticorpos tipo IgM contra o antígeno fenólico glicolípido específico para *M. leprae* PGL-I (*phenolic glycolipid 1*), denominada teste *ML flow*, tem sido promissora para a classificação dos pacientes atendidos nas unidades de saúde da atenção básica por ser capaz de indicar os pacientes multibacilares. Em um estudo que incluiu 135 pacientes recém-diagnosticados em um centro de referência de Belo Horizonte, a positividade do *ML flow* teve associação positiva com presença de mais que cinco lesões cutâneas, presença de incapacidade física grau I e baciloscopia dérmica positiva. Dentre os pacientes com baciloscopia negativa e menos que cinco lesões de pele, que seriam inicialmente classificados e tratados como paucibacilares, 37,8% tiveram *ML flow* positivo e tiveram de ser reclassificados como multibacilares. Como vantagens em relação à baciloscopia dérmica, o teste apresenta facilidade de realização em unidades de atenção básica em saúde por dispensar a necessidade de laboratórios e examinadores especializados (LYON, 2005; LYON *et al*, 2008).

O diagnóstico precoce possibilita o tratamento oportuno dos pacientes com poliquimioterapia e é fundamental para a prevenção das incapacidades físicas da hanseníase (BRASIL, 2009d). De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, o diagnóstico de hanseníase é feito na presença de um de três sinais cardinais: lesões de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de nervos com espessamento neural, baciloscopia positiva (BRASIL, 2010).

Uma vez que o espessamento neural tende a aparecer mais tardiamente que as lesões cutâneas e que a baciloscopia dérmica só é positiva em cerca de 10 a 50% dos casos (MOSCHELLA, 2004), depreende-se que para se alcançar o objetivo de diagnóstico precoce, depende-se, sobretudo, do exame clínico dermatológico minucioso dos pacientes, incluindo o teste de sensibilidade das lesões de pele encontradas.

2.3 Formas clínicas

2.3.1 *Hanseníase indeterminada*

Nesta forma clínica, as lesões são máculas hipocrômicas com alteração de sensibilidade ou apenas áreas de hipoestesia na pele sem alterações à ectoscopia. As lesões são encontradas em pequeno número e freqüentemente somente a sensibilidade térmica encontra-se alterada. Não há comprometimento de nervos periféricos. A baciloscopia dérmica é negativa. É considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase e, após período que varia de poucos meses a anos, ocorre evolução para cura, em até 75% dos casos, ou para outra forma clínica (ARAÚJO, 2003; AGRAWAL *et al*, 2005; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

2.3.2 *Hanseníase tuberculóide*

Nesta forma, há lesões de margens bem delimitadas, em número reduzido, anestésicas e de distribuição assimétrica. Geralmente tomam a forma de placas compactas ou formas anulares em que as bordas são papulosas e o centro eritematoso ou hipocrômico. O espessamento dos nervos periféricos é precoce e pode evoluir com dano neural precoce e grave. Geralmente os nervos afetados situam-se em regiões próximas às lesões. A baciloscopia é negativa. As formas tuberculóide e indeterminada constituem as formas paucibacilares da hanseníase (MOSCHELLA, 2004; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

2.3.3 Hanseníase virchowiana

Esta forma multibacilar corresponde ao polo de baixa resistência, em que os pacientes apresentam imunidade celular deprimida para *M. leprae*. Acredita-se que possa evoluir da forma indeterminada ou se apresentar como tal desde o início. Há infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos e mesmo de outros órgãos como linfonodos, fígado e baço. Observam-se pápulas, nódulos e máculas. A pele torna-se brilhante, xerótica e pode adquirir tonalidade semelhante à do cobre. Há rarefação dos cílios e supercílios. O acometimento de nervos periféricos é lento, simétrico e progressivo e os pacientes não tratados sofrerão deficiências funcionais e sequelas tardias. A baciloscopia dérmica é fortemente positiva (ARAÚJO, 2003; MOSCHELLA, 2004).

2.3.4 Hanseníase dimorfa

Representa a forma de instabilidade imunológica, o que se traduz em grande variação de manifestações clínicas. As lesões são numerosas e sua morfologia mescla aspectos das formas polares, tuberculóide e virchowiana. Geralmente os pacientes apresentam placas eritematosas, máculas hipocrômicas de bordas ferruginosas, máculas eritematosas ou acastanhadas. As lesões anulares costumam apresentar delimitação interna nítida e delimitação externa imprecisa e são chamadas foveolares. A neuropatia é precoce, assimétrica e as incapacidades físicas decorrentes são comuns. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva (MOSCHELLA, 2004; LOCKWOOD *et al*, 2007).

2.3.5 Surtos reacionais

Surtos reacionais são reações inflamatórias sofridas pelos doentes durante o curso crônico da hanseníase. Podem assumir diferentes características. Os tipos mais importantes são reação reversa ou reação do tipo 1 e eritema nodoso da hanseníase ou reação do tipo 2. Podem ser desencadeados por infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, medicamentos, estresse físico ou psicológico. Podem anteceder o diagnóstico de hanseníase, surgir durante o tratamento ou mesmo após a alta do paciente.

A reação do tipo 1, mais comum na forma dimorfa, é mediada por imunidade celular e se caracteriza por piora das lesões pré-existentes, que se tornam mais edemaciadas e eritematosas. Podem surgir lesões novas à distância e neurites são freqüentes, podendo até mesmo ser a única manifestação clínica.

A reação do tipo 2, que ocorre nas formas virchowiana e dimorfa, é mediada por imunidade humoral e desencadeada por deposição de imunocomplexos. A lesão cutânea típica é o eritema nodoso hansênico, caracterizado por nódulos eritematosos dolorosos localizados em qualquer região da pele. Pode haver neurite e lesões em outros órgãos, como orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, linfadenite, proteinúria e dano hepático.

2.4 Lesão neural na hanseníase

Didaticamente, o acometimento de nervos acontece de duas maneiras: neuropatia periférica e acometimento de fibras nervosas cutâneas. Os nervos periféricos mais afetados incluem nervo auricular, nervo ulnar, nervo radial, nervo mediano, nervo fibular e nervo tibial, geralmente acometidos em seu trajeto superficial próximo à pele (FIG. 4). Os nervos acometidos apresentam espessamento, doloroso ou não, acompanhado de perda de inervação motora ou sensitiva no território correspondente. A neuropatia periférica é iniciada pela infecção e pela resposta imunológica a ela relacionada, mas seu curso e

seqüelas se estendem por muitos anos após a cura e podem provocar importantes limitações físicas, sociais e psicológicas como exposto no Quadro 1 (AGRAWAL *et al*, 2005; SCOLLARD *et al*, 2006).

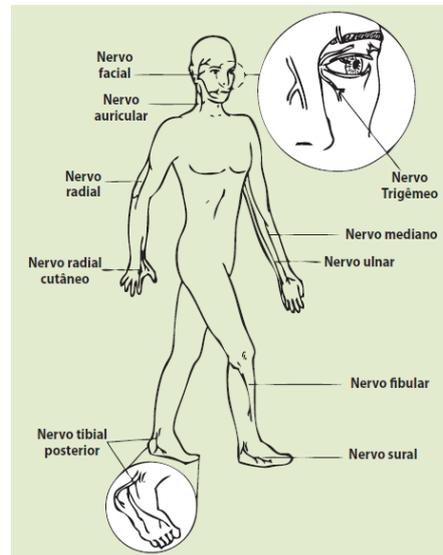


Figura 4: Principais nervos acometidos na leishmaniose.

Fonte: Ministério da Saúde – Manual de Prevenção de Incapacidades – Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=30688. Acesso em: 27 jul. 2010.



Quadro 1: As manifestações clínicas e complicações da neuropatia da hanseníase.

Fonte: Ministério da Saúde – Manual de Prevenção de Incapacidades – Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=30688. Acesso em: 27 jul. 2010.

O acometimento das fibras nervosas cutâneas sensitivas ou autonômicas cursa com hipoestesia e anidrose na área das lesões cutâneas ou mesmo com hipoestesia em um padrão em “meias e luvas” nos pacientes com a forma virchowiana da doença.

Há uma forma especial, denominada hanseníase neural pura, que acontece em cerca de 5-10% dos casos e cursa com neuropatia periférica assimétrica sem lesões cutâneas. O diagnóstico desta forma exige a exclusão de outras doenças neurológicas e pode ser confirmado por exame anátomo-patológico de nervo periférico (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Pouco se sabe sobre os mecanismos da injúria aos nervos na hanseníase. Os estudos sobre a patogênese da neuropatia hanseníase são dificultados pela carência de um bom modelo experimental e pela dificuldade em se biopsiar nervos periféricos acometidos. Considera-se que a lesão neural

seja o resultado de vários fatores, incluindo localização do bacilo dentro dos nervos periféricos, infecção das células de Schwann e resposta imunológica.

Acredita-se que o *M. leprae* infecte o nervo de fora para dentro, chegando a ele através dos capilares linfáticos e sanguíneos do epineuro e penetrando no endoneuro para então chegar às células de Schwann. Tanto as células de Schwann mielinizadas quanto as não mielinizadas são infectadas, mas evidências apontam uma preferência pelas últimas. Os mecanismos de aderência às células de Schwann não estão completamente esclarecidos, mas a capacidade de ligação da micobactéria à $\alpha 2$ -laminina, proteína constituinte da parede celular da célula de Schwann, demonstra fundamental importância. A fagocitose pela célula de Schwann não é seguida por destruição da micobactéria, que interfere no processo de maturação endocítica. Desta forma, as células de Schwann provêm um ambiente adequado à preservação e proliferação do *M. leprae* (SCOLLARD *et al*, 2006).

Os estudos dos efeitos sobre a célula de Schwann são conflitantes, mas há evidências de que a ligação de uma lipoproteína específica da micobactéria ao receptor *toll-like receptor 2* destas células seja capaz de induzi-las à apoptose. Além disso, sabe-se que ocorre alteração de expressão de alguns de seus genes, como os que codificam a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), o fator transformador de crescimento $\beta 1$, NCAM, ICAM, N-caderina e L1.

Alguns trabalhos demonstraram ainda que a aderência do *M. leprae* à célula de Schwann pode causar rápida desmielinização mesmo na ausência de células inflamatórias, postulando um mecanismo dependente de contato relacionado ao antígeno de superfície PGL-I (SCOLLARD *et al*, 2006).

No desencadeamento da resposta imunológica, as células de Schwann têm habilidade de processar e apresentar antígenos do *M. leprae* aos linfócitos T CD4⁺. Além de expressar moléculas de superfície envolvidas na apresentação de antígenos, como MHC de classe I e II, ICAM-1 e CD80, as células de Schwann parecem atuar como alvos para clones de linfócitos T citotóxicos obtidos experimentalmente de pacientes com hanseníase. Como consequência destes papéis ativos e de outros ainda não esclarecidos, as células de Schwann acabam sendo lesadas ou destruídas nos nervos acometidos, produzindo neuropatia desmielinizante ou lesão das fibras nervosas amielínicas.

2.5 Sistema somatosensitivo periférico

No sistema nervoso periférico (SNP) as fibras sensitivas, motoras e autonômicas têm íntima relação com as células de Schwann. Estas células têm a capacidade de se enrolar em torno de um axônio, conferindo a ele o aspecto mielinizado. Embora um neurônio seja mielinizado por várias células de Schwann, cada célula mieliniza somente um axônio. As fibras finas aferentes que não apresentam mielina, ou fibras amielínicas, são sustentadas e protegidas por células de Schwann que acomodam vários axônios individualmente, invaginados nos sulcos de seu citoplasma (JESSEN; MIRSKY, 2005).

Os axônios do SNP podem ser classificados em função de seus diâmetros e velocidades de condução em três grandes grupos A, B e C. O grupo A é constituído por fibras mielinizadas grossas e finas. Subdivide-se em subgrupos $A\alpha$ (A-alfa), $A\beta$ (A-beta), $A\gamma$ (A-gama) e $A\delta$ (A-delta). Os subgrupos $A\alpha$ e $A\gamma$ correspondem a fibras nervosas de função motora. Os subgrupos $A\beta$ e $A\delta$ correspondem a fibras sensitivas, sendo as fibras $A\beta$ relacionadas a tato e pressão e as fibras $A\delta$ relacionadas a dor e temperatura. O grupo B representa fibras finas com funções autonômicas, enquanto o grupo C engloba fibras finas amielínicas de funções sensitivas, responsáveis pela condução de estímulos relacionados a dor e temperatura (MANZANO *et al*, 2008).

A sensação de frio é conduzida principalmente por fibras finas mielinizadas $A\delta$, enquanto a sensação de calor é conduzida por fibras finas não-mielinizadas C. Aproximadamente 70% das fibras que compõem nervos periféricos são fibras finas mielinizadas ou fibras não-mielinizadas (CHAKOUR *et al*, 1996).

Todos os axônios aferentes encontram-se associados a receptores periféricos. Estes mecanorreceptores e termorreceptores cutâneos dividem-se em corpúsculos de Meissner, associados a tato ou pressão vibratória; corpúsculos de Merkel, associados a tato ou pressão estática; corpúsculos de Paccini, relacionados a pressão vibratória; corpúsculos de Ruffini, relacionados a percepção de calor; corpúsculos de Krause, de função ainda incerta; e

terminações nervosas livres, associadas principalmente a temperatura e dor (MUNGER; IDE, 1988).

Os mecanorreceptores e termorreceptores cutâneos são especializações morfofuncionais características, com alta sensibilidade para determinada forma de energia, o que lhes permite a transdução de sensação de eventos mecânicos, térmicos, químicos e eletromagnéticos até o sistema nervoso central através de axônios aferentes. Os estímulos externos raramente ativam um único tipo de mecanoreceptor ou termoreceptor, mas quase sempre diferentes combinações destes atuam em conjunto (SCHEPERS; RINGKAMP, 2010).

Enquanto as fibras mielinizadas grossas se relacionam com estruturas receptoras encapsuladas, a maior parte das fibras finas mielinizadas A δ e todas as fibras não mielinizadas C constituem terminações nervosas livres. Na derme, as terminações nervosas livres mantêm-se próximas aos plexos capilares, aos músculos piloerectores e folículos pilossebáceos e apresentam seus axônios envolvidos por células de Schwann ou prolongamentos de seu citoplasma. Quando as fibras tipo C atravessam a membrana basal e ascendem rumo à superfície epidérmica, perdem este envoltório de células de Schwann ou seus prolongamentos (DALSGAARD *et al*, 1989).

2.6 Teste de sensibilidade cutânea

A avaliação dermatológica identifica lesões de pele próprias da hanseníase e se completa com a pesquisa de sensibilidade nas mesmas. As áreas onde as lesões ocorrem com maior frequência são: face, orelhas, nádegas, braços, pernas e dorso. Devem ser realizadas as pesquisas de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, as quais se complementam.

2.6.1 Teste de sensibilidade tátil

A sensibilidade tátil pode ser pesquisada de diferentes maneiras e pode ser dividida em sensibilidade tátil propriamente dita, e sensibilidade protetora. O Guia para Controle da Hanseníase de 2002 orienta que se realize a pesquisa de sensibilidade tátil nas lesões para fins de diagnóstico e que a pesquisa de sensibilidade protetora nas lesões e também nas mãos e pés dos pacientes seja realizada para fins de prevenção de incapacidades físicas. De acordo com este manual, a pesquisa da sensibilidade tátil para fins diagnósticos deve ser feita tocando-se as lesões levemente com uma mecha fina de algodão seco. Deve-se tocar, alternadamente, uma área de pele livre de lesões próxima à lesão para comparação. Já para pesquisa de sensibilidade protetora, deve-se tocar levemente lesão, mãos e pés com uma caneta esferográfica (BRASIL, 2002).

Todavia, o manual de prevenção de incapacidades de 2001 já orientava a substituição da caneta esferográfica pelos monofilamentos de Semmes-Weinstein (MSW) para a realização do teste de sensibilidade protetora em mãos e pés, recomendação mantida em sua nova versão, lançada em 2008. Os MSW, também chamados de estesiômetro, são um conjunto de filamentos de nylon especial, de cores e calibres diferentes (FIG. 5). Cada filamento exerce sobre a pele uma pressão diferente, de valor pré-estimado, quando pressionado adequadamente. Os diferentes calibres, de espessura progressiva, permitem ao examinador obter uma gradação da sensibilidade tátil do local testado.

Enquanto o estesiômetro original, descrito nos trabalhos de Semmes e Weinstein em 1960, era composto por uma série de vinte filamentos de náilon, o estesiômetro em uso no Brasil compreende seis filamentos, que exercem sobre a pele pesos equivalentes a 0,05; 0,2; 2,0; 4,0; 10,0 e 300,0 gramas, como exposto na Figura 5 e no Quadro 2. A simplificação do modelo clássico demonstrou reprodutibilidade e confiabilidade. Convencionou-se que o filamento verde, de 0,05 gramas, representa a sensibilidade tátil normal em qualquer área do corpo, exceto região plantar, onde a capacidade de sentir o

filamento azul, de 0,2 gramas, é considerada como padrão de normalidade (BELLKROTOSKI; TOMANCIK, 1987).

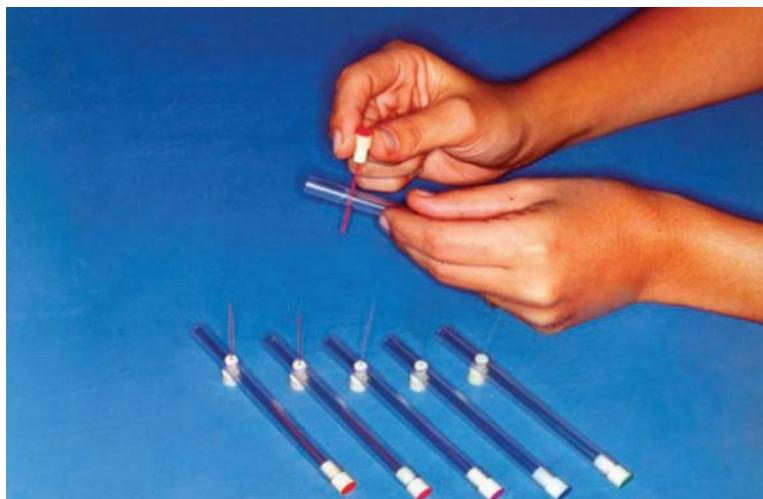


Figura 5: Estesiômetro.

Fonte: Ministério da Saúde – Manual de Prevenção de Incapacidades – Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=30688. Acesso em: 27 jul. 2010.

Verde	●	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
Azul	●	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
Violeta	●	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
Vermelho (fechado)	●	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
Vermelho (marcar com x)	⊗	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
Vermelho (circular)	○	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
Preto	●	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

Quadro 2: Representação do nível funcional de cada monofilamento.

Fonte: Ministério da Saúde – Manual de Prevenção de Incapacidades – Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=30688. Acesso em: 27 jul. 2010.

Inicia-se o teste com o monofilamento mais fino, verde, de 0,05 gramas. Se o paciente não for capaz de senti-lo, passa-se sucessivamente aos monofilamentos mais calibrosos. O teste em uma área da pele é terminado quando o paciente sente um dos monofilamentos testados seqüencialmente ou

até que se chegue ao monofilamento mais calibroso. Para a avaliação de sensibilidade protetora em mãos e pés aplica-se o teste em pontos específicos padronizados (FIG. 6).

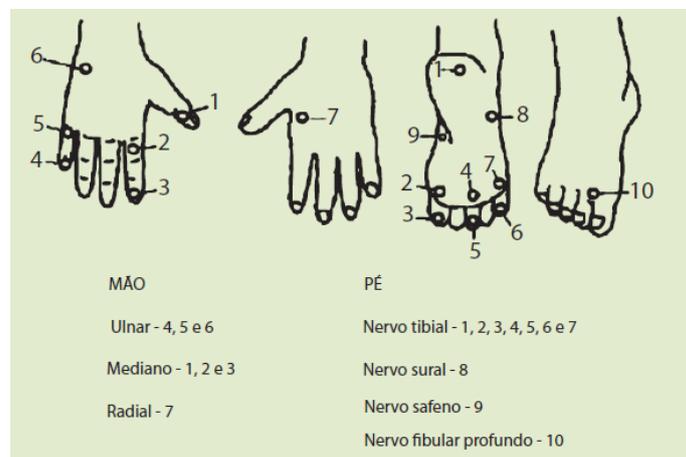


Figura 6: Pontos testados na avaliação de sensibilidade protetora em mãos e pés.

Fonte: Ministério da Saúde – Manual de Prevenção de Incapacidades – Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=30688. Acesso em: 27 jul. 2010.

Como cada um dos monofilamentos é pintado com uma cor característica, o resultado do teste com o estesiômetro, em palmas e plantas, pode ser registrado utilizando-se pincéis atômicos para se colorir pontos específicos presentes em representações impressas nos prontuários dos pacientes. Considera-se perda de sensibilidade protetora em mãos e pés a incapacidade de sentir o monofilamento lilás, de 2,0 gramas (BRASIL, 2008b).

Para o restante da pele, considera-se perda de sensibilidade tátil a incapacidade de sentir o monofilamento mais fino do estesiômetro, o verde (0,05 gramas), desde que a sensibilidade da pele contralateral ao redor da lesão esteja preservada para este filamento.

Para realização da pesquisa de sensibilidade tátil é necessário que se explique ao paciente como o exame será realizado e que o examinador certifique-se de sua compreensão. Com o campo de visão do paciente ocluído, seleciona-se aleatoriamente uma seqüência de pontos a serem testados e toca-se a pele com o monofilamento, deixando-o em contato por tempo suficiente para que o paciente responda.

2.6.2 Testes de sensibilidade térmica

A importância do teste de sensibilidade térmica reside no fato de que, por ordem cronológica, ocorre nas lesões de hanseníase inicialmente perda de sensibilidade térmica, seguida de perda de sensibilidade dolorosa e finalmente perda de sensibilidade tátil. Desse modo, na fase inicial de uma lesão pode haver perda de sensibilidade térmica associada à manutenção de sensibilidade das modalidades tátil e dolorosa (VAN BRAKEL *et al*, 2005; VAN BRAKEL *et al*, 2008).

Conforme as recomendações do Guia para Controle da Hanseníase de 2002 a pesquisa de sensibilidade térmica nas lesões suspeitas deve ser realizada sempre que possível. Preconiza-se que o teste seja feito com dois tubos de vidro contendo água fria e aquecida. Recomenda-se que se cuide para que o tubo com água aquecida não esteja em temperatura superior a 45°C, pois acima deste limite o estímulo térmico poderia causar sensação de dor e não de calor. A temperatura ideal para a água quente e fria dos tubos é de 45°C e 25°C.

Pele sã e a área suspeita devem ser tocadas alternadamente com a extremidade fechada dos tubos para que o paciente identifique as sensações de frio e de calor. Mesmo respostas como “menos frio” ou “menos quente” devem ser valorizadas no teste, indicando redução de sensibilidade térmica na lesão. Na impossibilidade de se fazer o teste com água quente e fria, o Ministério da Saúde recomenda que se utilize alternativamente um algodão embebido em éter.

A prova do éter se baseia no fato de este líquido entrar em ebulição à temperatura de 35°C, praticamente a mesma temperatura da pele humana. Ao fazê-lo retira energia térmica da pele e provoca nítida sensação de frio ou gelado. A limitação deste teste é não avaliar a sensibilidade ao calor (ALMEIDA, 1983).

A despeito da vantagem de favorecer a detecção de perda de sensibilidade em momentos mais incipientes do desenvolvimento das lesões, o teste de sensibilidade térmica com tubos de água quente e fria não é rotineiramente feito, pois o preparo e o controle de temperatura da água dos

tubos dependem tempo e são de difícil implementação em serviços que utilizam este teste esporadicamente (ALMEIDA, 1983; SRINIVASAN; STUMPE, 1989). Além disso, o teste com tubos com água e a prova do éter não permitem a quantificação da sensibilidade térmica (ZASLANSKY; YARNITSKY, 1998).

A OMS tem estimulado o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos capazes de testar a sensibilidade térmica nas condições de trabalho de campo, nas unidades básicas de saúde ou junto a populações afastadas de centros de referência. Como pré-requisitos o aparelho deve ser leve, fácil de ser carregado e resistente, capaz de atingir a temperatura de base em pouco tempo e consumir pouca energia. O primeiro protótipo foi testado na África, Ásia e América do Sul. O segundo protótipo, aprimorado, foi testado apenas em pequenas populações. Os resultados destas experiências permitiram a elaboração de um terceiro protótipo, testado em alguns centros da África e da Índia (FIG. 7).

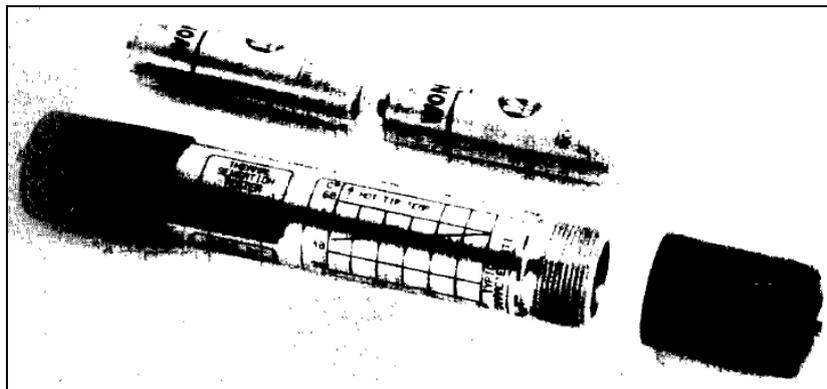


Figura 7: Estimulador térmico portátil e comparação de seu tamanho com o de pilhas alcalinas pequenas.

Fonte: (SRINIVASAN; STUMPE, 1989)

Utilizando este equipamento em 204 pacientes, pesquisadores demonstraram que, de 72 pacientes nos quais os testes de sensibilidade tátil e dolorosa haviam sido normais, 24 pacientes (33%) apresentavam alteração de sensibilidade térmica. Sem o teste de sensibilidade térmica estes pacientes não teriam sido prontamente diagnosticados (SRINIVASAN; STUMPE, 1989).

Trata-se de um equipamento barato e promissor, porém há apenas duas publicações sobre os resultados de sua fase de testes, incluindo número limitado de pacientes. Além destas duas publicações não foram encontradas outras referências ao dispositivo. Mesmo na página da OMS na internet não foram encontradas mais informações.

2.6.3 Testes quantitativos de sensibilidade térmica (TQST)

Em 1976 foi desenvolvido o *Marstock testing system*, aparelho de base computadorizada acoplado a um estimulador termoelétrico. Utilizando frio e calor como estímulo sensitivo, foram determinados o limiar de percepção de calor (LPC), o limiar de percepção de frio (LPF) e os limiares de percepção de dor induzida por calor e frio. Estas variáveis permitiram a demonstração de hipofunção sensitiva, na forma de hipoestesia e hipoalgesia, bem como hiperfunção sensitiva na forma de hiperalgesia a calor e frio, tornando o TQST útil para avaliação de fibras nervosas finas e receptores cutâneos em neuropatias periféricas de qualquer etiologia (FRUHSTORFER *et al*, 1976).

Ao longo dos anos, outros equipamentos foram desenvolvidos para aprimoramento do TQST. São dispositivos que requerem microprocessadores e devem estar sempre bem calibrados, de modo a garantir que os estímulos termoelétricos produzidos sejam bem controlados em duração, frequência e intensidade, garantindo a reprodutibilidade do teste (DYCK; O'BRIEN, 1999). Atualmente, são disponíveis para compra o *Marstock stimulator*, o *CASE IV thermal testing probe*, o *Glasgow system*, o *MiBBlesex Hospital thermal testing system*, o *Thermal sensitivity tester*, o *Thermal sensory analyzer TSA-2001* e o *PATH-tester MPI 100* (AMERICAN ASSOCIATION OF ELECTRODIAGNOSTIC TECHNOLOGISTS, 2004).

Foram publicados diferentes trabalhos sobre os valores de referência para o TQST, todavia sabe-se que somente quando são utilizados mesmo tipo de equipamento e mesma metodologia e algoritmo de teste é que se pode comparar os resultados destes diferentes estudos. Tal compatibilidade também é necessária quando se objetiva utilizar os valores de referência destes

trabalhos na prática clínica. Vários fatores podem interferir na medida dos limiares de detecção de sensibilidade térmica (HILZ *et al*, 1999; ROLKE *et al*, 2006).

Segundo Yarnitsky (1995), para se determinar um limiar de detecção térmico pode-se utilizar método que inclua ou exclua o tempo de reação. A técnica que exclui o tempo de reação é feita com estímulos termoelétricos de intensidade pré-determinada, ao final dos quais o paciente refere se percebeu a sensação estudada. Já a técnica que inclui o tempo de reação baseia-se em estímulos que aumentam de intensidade a partir de uma temperatura inicial. O paciente deve interromper a progressão da intensidade do estímulo no momento em que perceber a sensação estudada. Depreende-se que, no intervalo de tempo entre a percepção da sensação pelo paciente e a interrupção do teste pelo paciente ou pelo examinador, o estímulo terá aumentado de intensidade. Desse modo, esse intervalo de tempo, denominado tempo de reação, fará com que se registrem valores mais elevados para limiares de detecção de calor e mais baixos para limiares de detecção de frio (HILZ *et al*, 1995; YARNITSKY *et al*, 1995).

Apesar desta diferença, não há evidência que recomende a preferência de um método sobre o outro, quando comparadas sensibilidade e especificidade. A aparente desvantagem do método que inclui o tempo de reação é compensada por menor tempo de execução e possibilidade de avaliar mais detalhadamente hiperalgesia a calor e frio (YARNITSKY; SPRECHER, 1994; SHY *et al*, 2003).

É sabido também que o tamanho do estimulador que se acopla à pele dos pacientes interfere na medida dos limiares de detecção. Foi observada relação inversa entre tamanho do estimulador e os LPC e LPF. Quanto maior a área do estimulador, menor é a intensidade de estímulo termoelétrico necessária para se atingir os LPC e LPF registrados, devido ao fenômeno de somação espacial de fibras cutâneas na área estimulada (DYCK *et al*, 1993; VILLARROEL *et al*, 2007).

Hilz e colaboradores (1995) apontaram que outro fator determinante dos valores de limiares medidos é a temperatura inicial, ou temperatura de adaptação, do estimulador térmico. Usando diferentes temperaturas de adaptação, os autores obtiveram diferentes limiares de detecção térmica e

demonstraram que quanto mais baixa a temperatura de adaptação do dispositivo, mais elevado seria o LPC e mais baixo seria o LPF detectado. É recomendada temperatura de adaptação de 32°C.

Sabe-se ainda que diferenças na velocidade de variação da temperatura do estimulador determinam diferenças dos limiares de detecção medidos. Esta velocidade de variação de temperatura é a velocidade de aumento do estímulo termoelétrico produzido pelo equipamento. Foi demonstrado que o LPC e LPF obtidos com velocidade de variação de temperatura de 3,0°C por segundo são maiores que os registrados com velocidade de variação de temperatura de 1,0°C por segundo. É recomendada velocidade de variação de temperatura de 1,0°C por segundo (DYCK *et al*, 1993).

Os limiares de detecção de sensibilidade térmica variam conforme a região do corpo estudada. Limiares obtidos em face foram menores que os registrados em mãos, os quais foram menores que os registrados em pernas e pés. Todavia, não foi demonstrada diferença na comparação de limiares de regiões simétricas contralaterais ou áreas próximas no mesmo segmento do corpo (MEH; DENISLIC, 1994; HAGANDER *et al*, 2000).

Apesar de haver pequena discordância entre autores, a maioria dos estudos indica que idade e sexo não são fatores determinantes dos limiares de detecção de sensibilidade térmica (BARTLETT *et al*, 1998).

2.6.4 Teste quantitativo de sensibilidade térmica em hanseníase

O déficit de sensibilidade térmica relacionado à hanseníase já foi demonstrado por TQST. Em estudo realizado em Belo Horizonte foi demonstrado que em lesões de hanseníase os valores médios de LPC e LPF são significativamente diferentes dos valores obtidos em lesões de outras etiologias. Em trabalho que incluiu 82 pacientes com hanseníase e 26 pacientes com outras condições dermatológicas, os autores utilizaram curva ROC para definir valores de corte para diagnóstico de hanseníase utilizando os limiares de sensibilidade térmica obtidos por TQST. Para LPC e LPF, respectivamente, os valores de 35,1°C e 28,9°C demonstraram sensibilidade

de cerca de 90% e especificidade de 100% para o diagnóstico de hanseníase (VILLARROEL *et al*, 2007).

Os mesmos pesquisadores demonstraram que 18,3% dos pacientes com hanseníase acompanhados apresentavam sensibilidade tátil das lesões cutâneas preservada para o monofilamento verde, de 0,05 gramas. Todavia, todos apresentavam LPC e LPF alterados ao TQST. Os autores ressaltaram que dentre os pacientes com sensibilidade tátil preservada, 6,1% apresentavam LPC normal e 3,7% apresentavam LPF normal. Nenhum paciente apresentou simultaneamente LPC e LPF normais. Os autores propuseram que o TQST também fosse usado para se estimar o valor do intervalo de percepção de calor e frio (IPCF) nas lesões de hanseníase. O IPCF representa tanto LPC quanto LPF, sendo calculado como a diferença entre os valores absolutos destes dois limiares de percepção térmica. De valor sempre positivo, o IPCF será tanto maior quanto mais elevado o LPC e mais baixo o LPF; portanto, quanto maior for o comprometimento de sensibilidade térmica da lesão de hanseníase. Em todos os pacientes com sensibilidade tátil preservada em que o LPC ou o LPF foram normais, os pesquisadores encontraram alteração de IPCF. Seu valor de corte para diagnóstico de hanseníase foi calculado em 6,1°C (VILLARROEL *et al*, 2007).

2.7 Avaliação quantitativa de fibras nervosas cutâneas

Há alguns anos, considerava-se que a inervação cutânea consistia de plexos de fibras nervosas localizados em derme reticular profunda e uma quantidade menor de fibras em plexos mais superficiais em derme papilar. Devido às limitações das técnicas então utilizadas, como coloração com azul de metileno, colinesterase e prata, acreditava-se que fosse rara a penetração de fibras nervosas na epiderme, além da camada basal (MOURA *et al*, 2004). Com o advento de colorações especiais para fibras finas, pode-se quantificá-las e visualizar seu trajeto ao longo de toda a epiderme (MCCARTHY *et al*, 1995). A grande maioria das pesquisas sobre a quantificação de fibras finas em biópsia de pele refere-se ao estudo das polineuropatias periféricas.

2.7.1 Neuropatia sensitiva de fibras finas

A neuropatia sensitiva de fibras finas é uma forma de neuropatia periférica que pode ser idiopática ou surgir como complicação de doenças sistêmicas como diabetes melito, infecção por HIV, amiloidose, hipotireoidismo, doenças hereditárias, doenças metabólicas, alcoolismo ou pelo uso de medicações neurotóxicas como quimioterápicos e antirretrovirais (MOURA *et al*, 2004; KOSKINEN *et al*, 2005). A prevalência de neuropatia sensitiva no diabetes melito é de 66% e a incidência anual em portadores do vírus HIV é de 7% (HOLLAND *et al*, 1997; SMITH *et al*, 2001). As fibras nervosas envolvidas são predominantemente fibras finas do tipo C ou A δ , cuja lesão causa dor neuropática ou perda de sensibilidade protetora nas mãos, nos pés ou nos olhos. Os sintomas sensitivos geralmente iniciam distalmente em pés e progredem lentamente em sentido proximal, em um padrão descrito como comprimento-dependente. Pode haver também comprometimento autonômico, com anidrose e impotência sexual (MCCARTHY *et al*, 1995; HOLLAND *et al*, 1997).

Os pacientes com neuropatia sensitiva de fibras finas apresentam poucos sinais clínicos objetivos e só demonstram alterações nos estudos de condução neural quando há envolvimento concomitante de fibras nervosas de grosso calibre, o que só ocorre em cerca de 50% a 60% dos casos. Não há um exame único que seja universalmente aceito para diagnosticar a neuropatia sensitiva de fibras finas ou estimar sua gravidade (PERIQUET *et al*, 1999). O teste quantitativo de sensibilidade térmica e vibratória pode ser útil por se mostrar alterado em cerca de 60% a 70% dos pacientes, mas é considerado um método subjetivo e, sobretudo, ineficaz para avaliar a gravidade da neuropatia (HOLLAND *et al*, 1997; KOSKINEN *et al*, 2005).

Diversos trabalhos demonstraram que a quantificação de fibras intraepidérmicas na pele dos pacientes configura um teste útil para o diagnóstico de neuropatia sensitiva de fibras finas, particularmente naqueles em que os testes de condução são normais (PERIQUET *et al*, 1999). Nestes pacientes ocorre uma redução de fibras intraepidérmicas, acompanhada por diminuição menos intensa da quantidade de fibras em derme papilar. Entre as

remanescentes na derme papilar, podem ser vistas fibras com aumento de varicosidades e segmentadas, representantes de degeneração neuronal em progressão (MCCARTHY *et al*, 1995; CHIANG *et al*, 2002; MOURA *et al*, 2004; KOSKINEN, HIETAHARJU *et al.*, 2005).

Comparando a quantificação de fibras intraepidérmicas nas biópsias de pele feitas nos dois sítios tradicionalmente usados para estudo de neuropatias periféricas, proximal em coxa e distal em perna, Holland *et al* confirmaram que a redução de fibras cutâneas acompanha o padrão distal-proximal de progressão clínica das neuropatias sensitivas. Em fases precoces da evolução da doença, com sintomas restritos às extremidades distais dos membros inferiores, apenas a biópsia de sítio distal da perna mostra-se alterada. Já nos pacientes com neuropatia mais grave, em que os sintomas acometem toda a extensão de membros inferiores, as biópsias de ambos os sítios demonstram redução de fibras intraepidérmicas. Além disso, os autores demonstraram que a intensidade da redução de fibras intraepidérmicas está associada diretamente à intensidade da dor neuropática, propondo que o método seja útil para estadiamento dos pacientes e seu acompanhamento em estudos terapêuticos (HOLLAND *et al*, 1997).

Nos estudos das neuropatias sensitivas, toda a atenção está voltada para a quantificação das fibras intraepidérmicas, registrada como uma relação do número de fibras por milímetro de epiderme. A densidade média de fibras intraepidérmicas em voluntários sadios é estimada em 21,1/mm na face lateral proximal da coxa e 13,8/mm na face lateral distal da perna. Foi demonstrado que a redução da densidade de fibras na região distal da perna apresenta valor preditivo positivo de 75% e valor preditivo negativo de 90% para o diagnóstico de neuropatia sensitiva de fibras finas (MCARTHUR *et al*, 1998).

A recomendação atual é que a contagem de fibras nervosas finas em biópsia de nervo periférico seja preterida em favor da biópsia cutânea para o estudo das neuropatias sensitivas de fibras finas. A biópsia de nervo periférico causa maior desconforto, demanda maior tempo operatório, apresenta maior risco de infecção e pode causar perda permanente de sensibilidade regional. Além disso, a biópsia cutânea evidencia a redução das fibras nervosas finas mais precocemente e pode ainda ser repetida, permitindo o acompanhamento dos pacientes ao longo do tratamento (CRUCCU *et al*, 2004).

2.7.2 Evidenciação de fibras nervosas cutâneas

O anticorpo mais utilizado para a evidenciação de fibras finas em biópsias de pele é a imunoglobulina anti-PGP 9.5. A sigla PGP 9.5 diz respeito a uma proteína isolada de extratos de cérebro humano por eletroforese, em 1981. Encontrada difusamente no citoplasma neuronal, apresenta peso molecular de 27.000 e mobilidade de 9.5 cm em placa de gel de poliacrilamida. Também é encontrada em células neuroendócrinas (GULBENKIAN *et al*, 1987).

Os primeiros estudos que empregaram imuno-histoquímica para visualização de fibras nervosas em diferentes tecidos já demonstravam que a sensibilidade da marcação para PGP 9.5 era maior que a sensibilidade da marcação para outras proteínas, como enolase neuronal específica (NSE, abreviatura de *neuron-specific enolase*), neurofilamento (NF), tirosina hidroxilase (TH), neuropeptídeo Y (NPY), substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, abreviatura de *calcitonin gene-related peptide*) e S100. A coloração para PGP mostra-se capaz de marcar efetivamente tanto as fibras nervosas isoladas quanto as em feixes, enquanto as demais marcações se mostram apenas razoáveis para fibras dispostas em feixes e ruins para as fibras isoladas (GULBENKIAN *et al*, 1987; MCCARTHY *et al*, 1995).

A PGP 9.5 é uma proteína panaxonal que marca todos os tipos de fibras nervosas, enquanto as demais proteínas predominam em tipos especiais de fibras (LAURIA, 2007). A inervação autonômica é bem evidenciada pelas marcações para TH e NPY e a inervação sensitiva é bem visualizada pelas marcações para NF, SP e CGRP. A marcação para NF tem a particularidade de não evidenciar bem as fibras nervosas mais finas, em que há predominância de microtúbulos sobre neurofilamentos (GULBENKIAN *et al*, 1987). A coloração para S100, que marca bem células de Schwann e células de Langerhans, é interrompida quando as fibras nervosas atravessam a junção dermo-epidérmica, confirmando que, ao atravessarem entre os ceratinócitos, estas fibras perdem seu envoltório de células de Schwann (MCCARTHY *et al*, 1995).

A marcação das fibras nervosas cutâneas direcionada ao receptor do fator de crescimento neuronal (NGFr, abreviatura de *nerve growth factor receptor*) já foi descrita utilizando-se imunofluorescência e microscopia eletrônica. Este tipo de marcação é importante, uma vez que o desenvolvimento normal e os processos regenerativos do sistema nervoso periférico são dependentes de fatores tróficos, dentre os quais se destaca o fator de crescimento neuronal (NGF). O complexo de receptores de NGF pode ser dividido em uma família de receptores de alta afinidade, a família *Trk*, e o receptor de baixa afinidade P75. As fibras nervosas dérmicas são fortemente positivas à marcação direcionada ao NGFr-P75, particularmente a membrana das células de Schwann e a membrana axonal, mas as fibras intraepidérmicas não são bem evidenciadas (ANAND, 1996; LIANG; JOHANSSON, 1998).

A inervação cutânea consiste em fibras autonômicas simpáticas e fibras sensitivas. As fibras sensitivas são essencialmente peptidérgicas, enquanto as fibras autonômicas simpáticas apresentam variação de seu conteúdo protéico. Há uma maioria composta por fibras simpáticas adrenérgicas, que contém NPY e uma minoria representada por fibras simpáticas colinérgicas, que contém polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP, abreviatura de *vasoactive intestinal polypeptide*) e CGRP. A marcação para PGP 9.5 permite estudar tanto as fibras sensitivas quanto as fibras autonômicas simpáticas da pele humana (DALSGAARD *et al*, 1989; LAURIA, 2007).

As fibras nervosas marcadas para PGP 9.5 localizam-se abundantemente na epiderme e derme como terminações nervosas livres, em corpúsculos de Meissner e associadas a células de Merkel na camada basal. Na derme, feixes de fibras cruzam da derme reticular para formar plexos subpapilares que se dispõem em paralelo com a epiderme. É mais freqüentemente da ponta das papilas dérmicas que partem fibras finas varicosas que penetram a epiderme, atravessam-na verticalmente emitindo ramificações e, pouco antes de atingir a superfície, mudam seu curso e se posicionam paralelamente abaixo ou dentro da camada córnea. As fibras intraepidérmicas geralmente terminam em extremidades bulbosas livres. Fibras nervosas são encontradas ainda ao redor de glândulas sudoríparas, folículos pilosos, musculatura piloerectora e vasos sanguíneos (DALSGAARD *et al*, 1989; MCCARTHY *et al*, 1995; LAURIA, 2007).

Quando se compara a coloração de fibras nervosas cutâneas humanas com anticorpo anti-PGP 9.5 através de imunofluorescência, com a coloração para outros marcadores, percebe-se que a marcação para NSE evidencia fibras nas mesmas localizações, mas em menor intensidade de coloração. A marcação para NF e CGRP demonstra apenas parte das fibras sensitivas. A marcação para VIP é intensa apenas nas fibras autonômicas em torno de glândulas sudoríparas ou vasos sanguíneos e a marcação para NPY predomina ao redor destes últimos (DALSGAARD *et al*, 1989).

A densidade de fibras nervosas intraepidérmicas varia conforme o local da pele avaliado. Há um gradiente de concentração crânio-caudal, sendo a densidade de fibras maior no tronco que nos membros e maior na região proximal destes que em sua extremidade distal (MOURA *et al*, 2004; LAURIA, 2007). Além disso, os valores de referência, usados para diagnóstico de neuropatias de fibras finas, podem variar conforme a idade, sendo a densidade de fibras intraepidérmicas menor em pacientes com mais de 60 anos (PERIQUET *et al*, 1999). A maioria dos autores acredita que não há variação conforme o sexo ou a raça (MOURA *et al*, 2004).

2.7.3 Evidenciação de fibras nervosas cutâneas em pacientes com hanseníase

Poucos trabalhos disponíveis na literatura indexada empregaram as colorações especiais para fibras nervosas cutâneas em pacientes com hanseníase.

Karant et al (1989) estudaram biópsias de pele de 100 pacientes com hanseníase, de todas as formas do espectro clínico da doença. Realizando coloração por imunofluorescência por meio de anticorpos para NF, PGP 9.5 e para os neuropeptídeos SP, CGRP, VIP e NPY, os autores demonstraram que a inervação cutânea das lesões de hanseníase sofre redução quantitativa e depleção de neuropeptídeos.

Neste estudo, a redução da quantidade de fibras nervosas cutâneas visualizadas pela coloração para PGP 9.5 variou de acordo com a forma clínica

dos pacientes, sendo que na forma tuberculóide a desnervação foi mais intensa que nas demais formas. Comparada a biópsias de pele obtida de pacientes saudáveis, as biópsias obtidas de pacientes portadores da forma indeterminada apresentaram perda importante de fibras intraepidérmicas, mas preservação da inervação dérmica e hipodérmica. Fibras intraepidérmicas foram visualizadas em apenas uma das 100 amostras de lesões e se tratava de uma biópsia da forma indeterminada.

Por outro lado, não houve variação da intensidade de marcação com anticorpos para os neuropeptídeos SP, CGRP, VIP e NPY uma vez que, em quase todas as 100 amostras de lesões, a coloração para estes neuropeptídeos foi negativa. Como as fibras tipo C são evidenciadas por anticorpos para SP e CGRP e as fibras nervosas autonômicas por anticorpos para VIP e NPY, este achado corroborou o conhecimento advindo da prática clínica. Nas lesões de hanseníase, ocorre, precocemente, perda de sensibilidade térmica e dolorosa mediada pelas fibras amielínicas tipo C, além de anidrose e comprometimento da tríplice reação de Lewis, mantidas pelas fibras autonômicas que inervam vasos e glândulas sudoríparas.

Achados semelhantes foram publicados por Antunes et al., que demonstraram redução na quantidade de fibras neuronais reativas para PGP 9.5 e NSE em biópsias de lesões de onze pacientes com hanseníase, quando comparadas à pele contralateral de voluntários saudáveis. Neste trabalho, os autores observaram que a marcação para NGFr foi positiva tanto nas biópsias de lesões de hanseníase quanto nas amostras de pele contralateral. Em cortes seqüenciais consecutivos, as biópsias de lesões mostravam marcação positiva para NGFr e negativa para PGP 9.5 e NSE, levando-os a postular que não haveria evidência de alteração neurotrófica nas lesões da doença (ANTUNES *et al*, 1997).

Neste mesmo estudo, os autores apontaram que não foi percebida qualquer correspondência topográfica entre as regiões de depleção de fibras neuronais marcadas para PGP 9.5 ou NSE e as regiões ocupadas pelo infiltrado inflamatório característico da hanseníase, observação interpretada como evidência da existência de mecanismos patogênicos que não estariam relacionados diretamente à auto-agressão imunológica.

Em 1998, Facer et al. publicaram um trabalho em que 28 pacientes com hanseníase foram submetidos ao TQST e a biópsias de pele de lesão e área sadia contralateral para avaliação semiquantitativa de fibras nervosas cutâneas. A inervação intraepidérmica e subepidérmica na lesão foi quantificada como “abundante”, quando semelhante à da pele contralateral, “diminuída” ou “ausente”. Os limiares de detecção de sensibilidade térmica correlacionaram-se com a avaliação semiquantitativa de inervação das lesões (FACER *et al*, 1998).

Os autores ressaltaram o fato de as fibras nervosas intraepidérmicas não terem sido visualizadas nas amostras de pele contralateral de 16 dos 28 participantes da pesquisa, apesar de os testes clínicos não terem demonstrado alterações de função neural nos sítios de pele contralateral. Para explicar este achado, lembraram que, na pele de pacientes com hanseníase, com ou sem lesão, já havia sido demonstrada redução de NGF.

Em continuação aos seus trabalhos de 1997, Antunes et al. publicaram um trabalho, em 2003, no qual demonstraram não ter sido detectada diferença na quantificação de fibras nervosas cutâneas coradas para PGP 9.5 e NGFr na pele de seis pacientes de hanseníase durante um surto reacional e após sua resolução. Neste artigo, os autores corrigiram parte de suas conclusões publicadas no trabalho de 1997, ao afirmarem que a manutenção da marcação para NGFr observada nas lesões iniciais de hanseníase dos pacientes incluídos naquele trabalho seria devida simplesmente à persistência de células de Schwann, coráveis para NGFr, apesar da depleção axonal evidenciada pelas colorações para PGP 9.5 e NSE (ANTUNES *et al*, 2003).

3 MÉTODOS

3.1 Seleção de casos

Os vinte e dois pacientes participantes deste estudo foram selecionados entre os pacientes com diagnóstico de hanseníase atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

O convite para participação foi feito no mesmo dia do diagnóstico ou até trinta dias após o início do tratamento. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado em conformidade com as determinações da resolução 196/96 (itens IV e V) do Conselho Nacional de Saúde (APÊNDICE A).

Para inclusão no estudo era necessário que o participante tivesse diagnóstico de hanseníase estabelecido, estivesse em tratamento por no máximo trinta dias e apresentasse pelo menos uma lesão cutânea com diâmetro mínimo de três centímetros, capaz de oferecer área de acoplamento adequada ao estimulador térmico utilizado.

Foram excluídos pacientes cujas lesões a serem estudadas se localizavam em regiões do corpo que pudessem apresentar alteração de sensibilidade em virtude de neuropatia de nervos periféricos decorrente de hanseníase ou de outras doenças causadoras de neuropatias periféricas como alcoolismo, diabetes, infecção por vírus da imunodeficiência humana, tireoidopatia, distúrbios metabólicos ou vasculites sistêmicas. Também foram excluídos aqueles pacientes que não demonstraram capacidade cognitiva para responder adequadamente ao TQST e os pacientes em que cicatrizes de biópsias prévias para elucidação diagnóstica comprometiam a área mínima exigida para acoplamento do estimulador térmico.

3.2 Diagnóstico de hanseníase

O diagnóstico de hanseníase dos pacientes convidados a participar do estudo foi feito pelos dermatologistas e médicos residentes do ambulatório de dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. O estabelecimento do diagnóstico baseia-se em ectoscopia da pele, teste de sensibilidade tátil das lesões com monofilamentos de Semmes-Weinstein, TQST com estimulador termo-sensório, teste de sensibilidade à dor com agulhas, palpação de nervos periféricos e teste de sensibilidade tátil em mãos e pés com monofilamentos. Conforme as particularidades de cada caso, ainda podem ser realizados teste da histamina, teste sorológico ML-Flow, baciloscopia de raspado dérmico e exame histológico das lesões suspeitas.

3.3 Teste quantitativo de sensibilidade térmica

O autor desta dissertação de mestrado, responsável por realizar o TQST, foi previamente treinado pelo neurologista e neurofisiologista Dr. Manoel Villarroel, colaborador deste estudo. O teste foi realizado em uma sala privativa do ambulatório de dermatologia, contando com ambiente tranquilo e silencioso. Utilizou-se um analisador termo-sensório com área de estimulação térmica correspondente a 30x30mm. Antes do início dos testes os pacientes receberam informações básicas sobre o método e foram submetidos a testes preliminares, para familiarização com os estímulos aplicados.

Para determinação dos limiares de sensibilidade térmica, o estimulador térmico foi acoplado levemente à pele do paciente sem pressão excessiva e assim mantido durante todo o teste. Foi tomado o devido cuidado para se evitar o contato entre o estimulador e a pele situada fora da região que se desejava examinar. Durante o exame os pacientes não tiveram contato visual com o monitor do computador ao qual o analisador é conectado.

No exame de cada paciente realizou-se a mesma seqüência de testes de limiares (APÊNDICE B). Para cada um dos quatro limiares determinados, a

lesão foi testada logo após a pele contralateral. Pelo método dos níveis, fez-se a determinação do limiar de percepção ao frio (LPF) e, em seguida, ao calor (LPC). Então, pelo método dos limites, seguiram-se a determinação do limiar de percepção de dor provocada por frio (LPDF) e, finalmente, por calor (LPDC).

O analisador termo-sensório utilizado foi o *Thermal sensory analyzer TSA-II* (Medoc, Israel, FIG. 8) programado com temperatura basal de estimulador de 32,0°C, variação linear da temperatura de 1°C por segundo e retorno à linha de base a 0,8°C por segundo. O intervalo interestímulo programado foi de quatro a seis segundos.

Para o LPF obtiveram-se valores abaixo de 32,0°C com limite inferior de 0,0°C. Para o LPC registraram-se valores acima de 32,0°C com limite superior de 50,0°C. Nos casos em que os pacientes não perceberam frio em 0,0°C ou calor em 50,0°C, esses valores limites foram os valores registrados, de modo a permitir a análise estatística.



Figura 8: Analisador termo-sensório. Fonte: manual de instruções.

3.3.1 Método dos níveis

Trata-se de um método de determinação de limiares de sensibilidade térmica que utiliza uma série de estímulos de intensidade precalculada, aos quais o paciente responde sim ou não, de acordo com sua percepção do estímulo. Avaliando a resposta do paciente a múltiplos estímulos seqüenciais, o programa de computador fornece o limiar de sensibilidade térmica desejado. A Figura 9 demonstra a aplicação do método dos níveis para determinação do LPC de um paciente voluntário. Partindo da temperatura basal de 32,0°C, o aparelho produz um estímulo que eleva a temperatura em mais 4 graus centígrados, o que foi sentido pelo paciente (percebe-se na figura a letra “y” referente à resposta “yes” ou “SIM” em frente ao valor “36°C”). Em seguida, calculando que o limiar de percepção do paciente encontra-se entre 32°C e 36°C, o analisador produz um segundo estímulo, que eleva a temperatura do estimulador até 34°C (elevação suficiente para produzir uma temperatura média entre a basal e a do primeiro estímulo). Desta vez o paciente não sente o estímulo (nota-se “n” simbolizando a resposta “NÃO” em frente ao valor 34°C). O programa calcula então que seu limiar situa-se entre 34°C e 36°C. O terceiro estímulo é suficiente para produzir a temperatura de 35°C, média entre estes dos valores. Seguindo as respostas do paciente os estímulos continuam automaticamente sendo feitos, até que se registre uma diferença de 0,1°C entre as respostas “SIM” e “NÃO”. O valor anotado como o limiar é o referente ao “SIM” quando o intervalo entre perceber ou não o estímulo foi de 0,1°C. A Figura 10 demonstra a aplicação do método para a determinação do LPF.

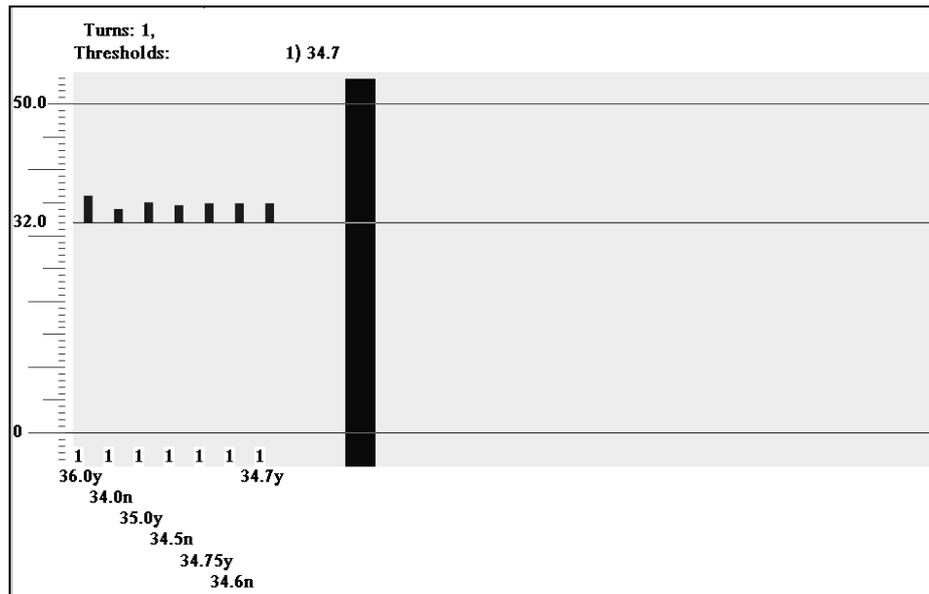


Figura 9. Limiar de percepção do calor determinado pelo método dos níveis.

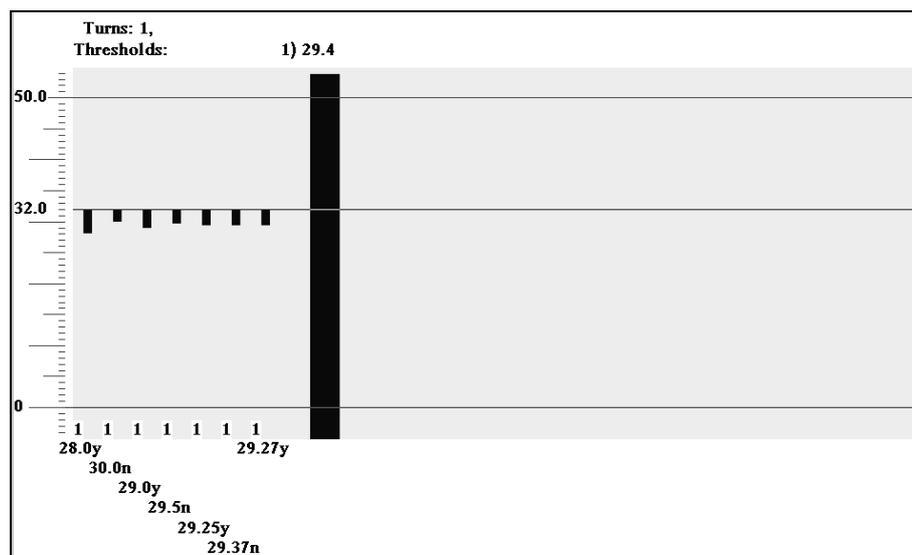


Figura 10. Limiar da percepção do frio determinado pelo método dos níveis

3.3.2 Método dos limites

Neste método de determinação de limiares de sensibilidade térmica utiliza-se um estímulo contínuo e progressivo a partir da temperatura de base, que é interrompido quando o paciente anuncia sua percepção. Neste momento,

o examinador dá comando para que o aparelho interrompa a progressão do estímulo e grave a temperatura em que houve sua percepção pelo paciente. São realizados três estímulos sucessivos, intercalados apenas pelo tempo necessário para que o estimulador térmico retorne à temperatura de base. O programa de computador fornece automaticamente uma média aritmética das três medidas, determinando o limiar de percepção térmica desejado. Percebe-se que o método dos limites é dependente de um atraso, que inclui o tempo necessário para que o paciente manifeste verbalmente sua percepção do estímulo e o tempo necessário para que o examinador comande a interrupção da progressão do estímulo pelo aparelho. Esse intervalo entre a percepção do estímulo pelo paciente e a interrupção do estímulo faz que o método dos limites tenda a superestimar os valores dos limiares de percepção térmica. Em nosso trabalho, optamos por utilizar o método dos limites para estudo dos limiares de percepção de dor induzida por calor e frio, uma vez que seus valores são elevados e tempo excessivo seria gasto se o método dos níveis fosse empregado.

3.4 Biópsia de pele

Após a determinação dos limiares de percepção térmica na pele lesada e na pele contralateral, todos os pacientes participantes foram submetidos a biópsia dos dois sítios testados, realizada pelo autor deste trabalho, na sala de cirurgia dermatológica do mesmo ambulatório.

O procedimento foi realizado sob antissepsia rigorosa e anestesia local com infiltração de lidocaína na concentração de 2%. Para a retirada dos fragmentos de pele foi utilizado *punch* de cinco milímetros de diâmetro e para síntese foi realizada sutura com um ponto simples. Foram retirados um fragmento da pele lesada e um da pele contralateral. As áreas a serem estudadas foram marcadas com pincel atômico antes do TQST e esta marcação indicou também o local exato a ser biopsiado. Para estudo da densidade de fibras finas em lesões de hanseníase é imprescindível que se tenha como parâmetro de normalidade a densidade de fibras na pele

contralateral correspondente. Neste trabalho, a redução da densidade de fibras finas na lesão de hanseníase foi calculada em relação à densidade de inervação da pele contralateral “em espelho”.

Ambos os fragmentos foram encaminhados ao Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG) em frascos com solução tamponada de formol concentrado a 10%.

3.5 Processamento dos fragmentos de pele

As amostras de pele foram fixadas em solução tamponada de formol concentrado a 10% por um período de dois a sete dias. Cada fragmento cilíndrico de pele foi seccionado longitudinalmente em duas metades antes de ser processado rotineiramente e embocado em parafina, com o cuidado adequado para posicionamento correto da superfície de corte das duas metades do fragmento dentro do bloco de parafina. De cada bloco, foram feitos cortes histológicos seqüenciais de 10 µm de espessura que foram dispostos em lâminas silanizadas numeradas. Em cada lâmina foram colocados dois cortes histológicos seqüenciais.

Lâminas seqüenciais foram destinadas a coloração com hematoxilina-eosina (HE), coloração pela técnica de Wade para bacilos álcool-ácido resistentes e coloração imuno-histoquímica.

3.6 Estudo morfológico

O estudo histopatológico das lâminas coradas em HE permitiu a classificação histológica dos casos de hanseníase. Foram seguidos os algoritmos descritos para classificação histológica segundo Ridley (1974). O estudo morfológico permitiu ainda avaliar o estado da pele contralateral dos participantes. Trata-se de um importante detalhe, uma vez que para pacientes

multibacilares e com múltiplas lesões de pele poderia ser difícil afirmar com certeza que a pele contralateral biopsiada não continha lesão.

A coloração pela técnica de Wade permitiu o cálculo do índice baciloscópico histológico, importante para complementação da classificação histológica de Ridley-Jopling.

3.7 Estudo imuno-histoquímico

Para evidenciar as fibras nervosas da pele, foi feita coloração imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos anti-PGP 9.5, conforme técnica padronizada do NIPE. As lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por doze horas para derretimento da parafina. Foram desparafinizadas em soluções de xylol (vinte minutos em cada uma de três soluções), reidratadas em soluções de álcool etílico em concentrações decrescentes (cinco minutos em cada uma de três soluções com álcool absoluto e soluções a 90%, 80% e 70%) e mergulhadas por três períodos de cinco minutos em solução de salina fosfatada 0,01M (PBS – como abreviação para *phosphate buffered saline*).

O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado por imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes na concentração de 5% durante trinta minutos, seguida de três banhos de cinco minutos em PBS. Para bloqueio da formação de ligações inespecíficas foi feita imersão dos cortes em solução de soroalbumina e PBS na concentração de 2% durante trinta minutos, seguida diretamente da incubação dos cortes em soro de cabra 1:20 em solução de PBS e soroalbumina a 0,2% e Triton X a 0,001%, durante mais 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

Após os bloqueios, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de coelho anti-PGP 9.5 (Ultraclone Ltd, Inglaterra) na concentração de 1:400 em solução diluidora de anticorpos (Dako, Estados Unidos), em câmara úmida, à temperatura de 4°C. Ao fim de doze a dezoito horas de incubação, os cortes foram lavados em três banhos de cinco minutos em PBS e incubados com imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinilada pré-diluída (Kit Dako – LSAB, Estados Unidos) por trinta minutos, em câmara úmida, à temperatura

ambiente. Após serem novamente lavadas em três banhos de cinco minutos em PBS, as lâminas foram tratadas com o conjugado estreptavidina-peroxidase pré-diluído (Kit Dako – LSAB, Estados Unidos) durante trinta minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

A ligação foi revelada com imersão das lâminas em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio 30 volumes diluídos em PBS, por cinco minutos e solução PBS foi usada para interrupção da reação. Após lavagem com mais três banhos de cinco minutos em PBS, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, lavados, desidratados, diafanizados e as lamínulas foram montadas com entelan (Merck, Alemanha).

3.8 Morfometria

Dois tipos de quantificação foram feitos por morfometria, a contagem de fibras nervosas intraepidérmicas por milímetro de epiderme e a relação entre área de fibras nervosas subepidérmicas marcadas e área total de derme papilar examinada.

As imagens foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Japão) e capturadas por vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Probcf (Media Cybernetics, Estados Unidos) para sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos). Para análise das imagens digitalizadas foi utilizado o programa KS300 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha) instalado no computador do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG.

3.8.1 *Quantificação de fibras intraepidérmicas*

As fibras nervosas intraepidérmicas foram contadas por varredura completa de ambos os cortes de cada lâmina, utilizando aumento de objetiva de 40X. Para esta quantificação o examinador baseou-se na imagem exibida em tempo real no monitor do computador acoplado ao sistema de imagem anteriormente descrito. Foram capturadas imagens de todas as fibras contadas para registro. Foram consideradas apenas fibras que ultrapassavam claramente a camada de células basais da epiderme em direção às camadas superiores, de modo a minimizar a contagem errônea de estruturas não desejadas, mais frequentes na região da camada basal.

Para aferição do comprimento da epiderme, foram capturadas imagens panorâmicas de cada corte, obtidas com aumento de objetiva de 4X. Utilizando-se o programa de análise de imagem foi traçada uma linha contínua delineando toda a extensão do limite inferior da camada basal da epiderme. O comprimento da linha traçada foi calculado automaticamente pelo programa, permitindo calcular a extensão da epiderme estudada em cada corte.

3.8.2 *Quantificação de fibras subepidérmicas*

Para contagem das fibras subepidérmicas foi realizada varredura de toda derme papilar em ambos os cortes das lâminas utilizando lente objetiva com aumento de 20X. Foram capturadas imagens de todos os campos obtidos e a quantificação baseou-se na análise posterior das imagens armazenadas.

A profundidade máxima de derme papilar até a qual as fibras subepidérmicas foram consideradas para a quantificação foi limitada em virtude do infiltrado inflamatório presente nas lesões. A abundância de marcação de estruturas não desejadas de permeio ao infiltrado inflamatório inviabilizou a contagem das fibras nervosas em regiões profundas de derme papilar e em derme reticular nas lesões dos participantes. Desta maneira, optou-se por limitar a contagem das fibras nervosas às regiões mais superficiais de derme

papilar, tanto nas lesões quanto na pele contralateral. O limite de 50 μm de profundidade, contados a partir da extremidade mais superficial das papilas dérmicas, foi escolhido pelos pesquisadores com base na observação cuidadosa dos cortes histológicos das lesões dos pacientes.

Utilizando-se o programa KS300, em cada imagem digitalizada foi desenhado um plano gráfico para excluir regiões do campo que não seriam consideradas para quantificação de fibras subepidérmicas. Dessa forma, em cada imagem, foram excluídas a epiderme e a derme situada profundamente à linha delimitadora do limite convencionado pelos pesquisadores. O restante da imagem, não coberto pelo plano gráfico, formava uma faixa de derme papilar superficial, que serviu como área total do campo para quantificação das fibras subepidérmicas, coradas em marrom pela técnica de imuno-histoquímica.

Através do programa analisador de imagens, para cada campo digitalizado, foram automaticamente obtidos em μm^2 os valores de área correspondente às estruturas coradas em marrom e de área total da faixa dérmica estudada.

3.9 Análise estatística

Os dados coletados nos testes quantitativos e na quantificação das fibras nervosas finas foram armazenados em um banco de dados utilizando-se o programa Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos). Para análise estatística foi adotado o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 (SPSS, Estados Unidos).

Na análise descritiva foram expressas para as variáveis contínuas as medidas de tendência central média e mediana e de variabilidade, desvio-padrão (*DP*) e coeficiente de variação. Para as variáveis categóricas foram expressos percentuais.

Na análise comparativa foi utilizado o teste *kappa* para análise de concordância entre as classificações de hanseníase. Para comparação das variáveis contínuas, não paramétricas, como os limiares de sensibilidade térmica e a quantificação de fibras nervosas entre grupos pareados, pele

contralateral e lesão, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Para comparação de médias entre três ou mais grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, em virtude da distribuição não paramétrica das variáveis.

Foram selecionados o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a existência de correlação entre as variáveis contínuas não paramétricas representativas dos limiares sensibilidade térmica e da quantificação de fibras nervosas e regressão linear simples para avaliar o comportamento da correlação, no caso da sua presença. Para esta etapa da análise estatística, foram criadas novas variáveis a partir do banco de dados original. A criação destas variáveis só foi possível em virtude do desenho do trabalho prever o estudo da pele contralateral dos participantes.

Para se analisar, por exemplo, a existência de correlação entre o limiar de detecção de frio e a quantificação de fibras finas intraepidérmicas, criaram-se duas novas variáveis a partir de quatro variáveis originais do banco de dados. Das variáveis “limiar de frio na lesão” e “limiar de frio contralateral” foi criada uma nova variável chamada “déficit de limiar de frio”. Das variáveis “fibras intraepidérmicas na lesão” e “fibras intraepidérmicas na pele contralateral” foi criada a nova variável “déficit de fibras intraepidérmicas”. Os valores das novas variáveis foram calculados como a diferença percentual entre os valores das variáveis originais.

Tomando-se como referência o trabalho de Cohen (1992) sobre amostragem e poder estatístico, estimou-se que o tamanho da amostra obtida (vinte e dois pacientes) foi suficiente para a realização do estudo de correlação entre as variáveis representativas dos limiares de sensibilidade térmica e as variáveis representativas da quantificação de fibras nervosas, tendo como objetivo um poder de 0,8 e aceitando-se como parâmetros estatísticos uma significância de 0,1% e um tamanho de efeito (*effect size*) = 0,5.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva da população estudada

A análise descritiva dos 22 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2009 é apresentada na Tabela 1.

A idade média dos pacientes foi de 42,2 anos ($DP = 20,1$) e variou de 10 a 73 anos. O tempo médio de evolução da doença até o diagnóstico e o início da poliquimioterapia foi de 17,1 meses ($DP = 11,2$) e variou de 3 a 36 meses. Em média, no momento da aceitação do convite para participar do estudo, os pacientes estavam recebendo tratamento há 7,7 dias ($DP = 11,8$), sendo que 12 deles ainda não haviam iniciado o tratamento. Dois participantes já haviam sido tratados para hanseníase. Um deles apresentava recidiva, tendo terminado o primeiro tratamento com 24 doses de poliquimioterapia há 15 anos. O outro fizera tratamento insuficiente com seis doses de poliquimioterapia há seis meses.

Nenhum dos pacientes apresentava sinais clínicos de neuropatia periférica dos segmentos corporais em que se situavam as áreas de lesão e de pele contralateral estudadas e biopsiadas. Em relação às comorbidades, dois pacientes eram portadores de diabetes melito, seis apresentavam hipertensão arterial sistêmica, um tinha diagnóstico de epilepsia e outro recebia tratamento para insuficiência cardíaca e hipotireoidismo.

Tabela 1

Sumário de análise descritiva da população estudada

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	11	50
Feminino	11	50
Idade (anos)		
< 15	1	4,5
15-30	7	31,8
31-45	4	18,2
46-60	4	18,2
61-75	6	27,3
Número de lesões cutâneas		
≤ 5	12	54,5
> 5	10	45,5
Número de nervos acometidos		
≤ 1	18	81,8
> 1	4	18,2
Classificação operacional (OMS)		
Paucibacilar	12	54,5
Multibacilar	10	45,5
Classificação de Ridley-Jopling		
Indeterminada	4	18,2
Tuberculóide	2	9,1
Dimorfa-tuberculóide	5	22,7
Dimorfa-virchowiana	9	40,9
Virchowiana	2	9,1
História familiar		
Positiva	4	18,2
Negativa	18	81,8
Local da lesão		
Tronco	7	31,8
Braço	4	18,2
Antebraço	3	13,6
Coxa	6	27,3
Perna	2	9,1

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Classificação histológica de Ridley-Jopling

A classificação da forma de hanseníase apresentada pelos pacientes participantes foi baseada na classificação de Ridley-Jopling e é resumida no Gráfico 3. As formas dimorfas corresponderam a 64% dos casos. As formas indeterminada e tuberculóide, juntas, representaram 27% da amostra de pacientes. A forma virchowiana era apresentada por 9% dos participantes.

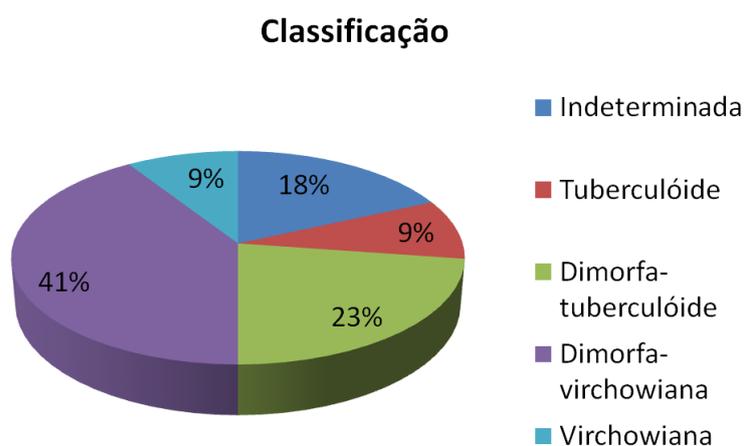


Gráfico 3: Distribuição das formas de hanseníase apresentadas pelos pacientes participantes conforme a classificação de Ridley-Jopling.
Fonte: Dados da pesquisa.

Os casos classificados como forma indeterminada demonstraram ao estudo anátomo-patológico com coloração hematoxilina-eosina, infiltrado inflamatório linfocítico superficial e profundo com sugestiva tríplice distribuição, ou seja, de localização perivascular, perianexial e perineural (FIG. 11, A e B). Não foram vistas micobactérias ao estudo com coloração de Wade.

Aqueles classificados como forma tuberculóide apresentaram infiltrado inflamatório composto por granulomas de células epitelióides acompanhados de abundantes linfócitos. Nestes casos, estavam presentes os sinais de resposta imunológica celular hiperérgica: erosão epidérmica ou necrose caseosa de filete nervoso ou a combinação de presença de células gigantes e ausência de zona subepidérmica hipocelular (FIG. 11, B e C). O índice baciloscópico histológico destes pacientes foi zero.

As lesões dos pacientes classificados como forma dimorfa-tuberculóide também apresentaram à microscopia um infiltrado inflamatório composto por granulomas de células epitelióides. Como regra, foram vistas quantidade moderada de linfócitos e, por vezes, células gigantes (FIG. 11, D e E). Todavia, nenhuma destas lesões apresentou conjuntamente estas duas últimas características e ausência de zona subepidérmica hipocelular, uma vez que esta tríade de combinação direciona para a classificação tuberculóide. O índice baciloscópico variou de zero a dois.

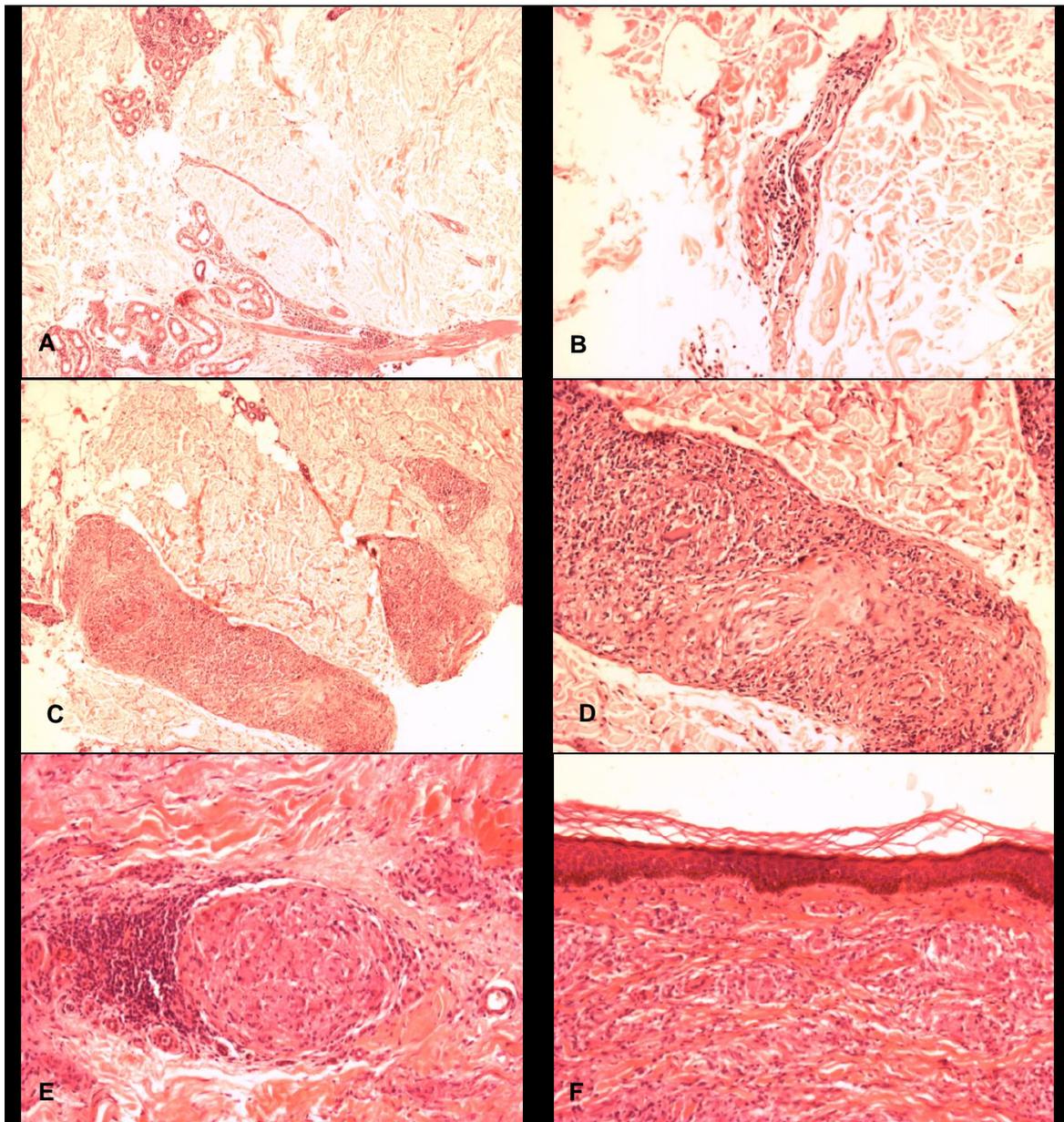


Figura 11: Microfotografias das lâminas utilizadas para definição da forma de hanseníase conforme a classificação de Ridley-Jopling, pela coloração com hematoxilina-eosina. Em “A” está representada a forma indeterminada, com infiltrado linfocitário de distribuição perianexial e perivascular, que em “B” acomete e destrói um filete neural na derme reticular. Em “C” observa-se a forma tuberculóide, com infiltrado inflamatório granulomatoso de células epitelióides em derme reticular, que, em “D” se completa com a presença de células gigantes e exuberante infiltrado granulomatoso de células epitelióides que acomete um filete neural, que exhibe necrose caseosa. Em “E”, vê-se forma dimorfa-tuberculóide, com infiltrado granulomatoso semelhante ao da forma tuberculóide, mas que em “F” permite o discernimento de uma estreita zona hipocelular subepidérmica. Em “A” e “C”: aumento de 40x. Em “B”, “D”, “E”, “F”: aumento de 100x. **Fonte:** dados da pesquisa

As lesões de forma dimorfa-virchowiana demonstraram infiltrado inflamatório predominantemente composto por macrófagos e zona subepidérmica hipocelular. Raros aglomerados de células epitelióides foram vistos e o infiltrado linfocitário era abundante em alguns casos (FIG.12, A e B). O índice baciloscópico variou entre quatro e cinco.

Os casos classificados como forma virchowiana tinham em comum infiltrado inflamatório composto por macrófagos espumosos, ausência de células epitelióides, raros linfócitos e clara zona subepidérmica hipocelular (FIG.12, C e D). O índice baciloscópico histológico destes pacientes foi de seis.

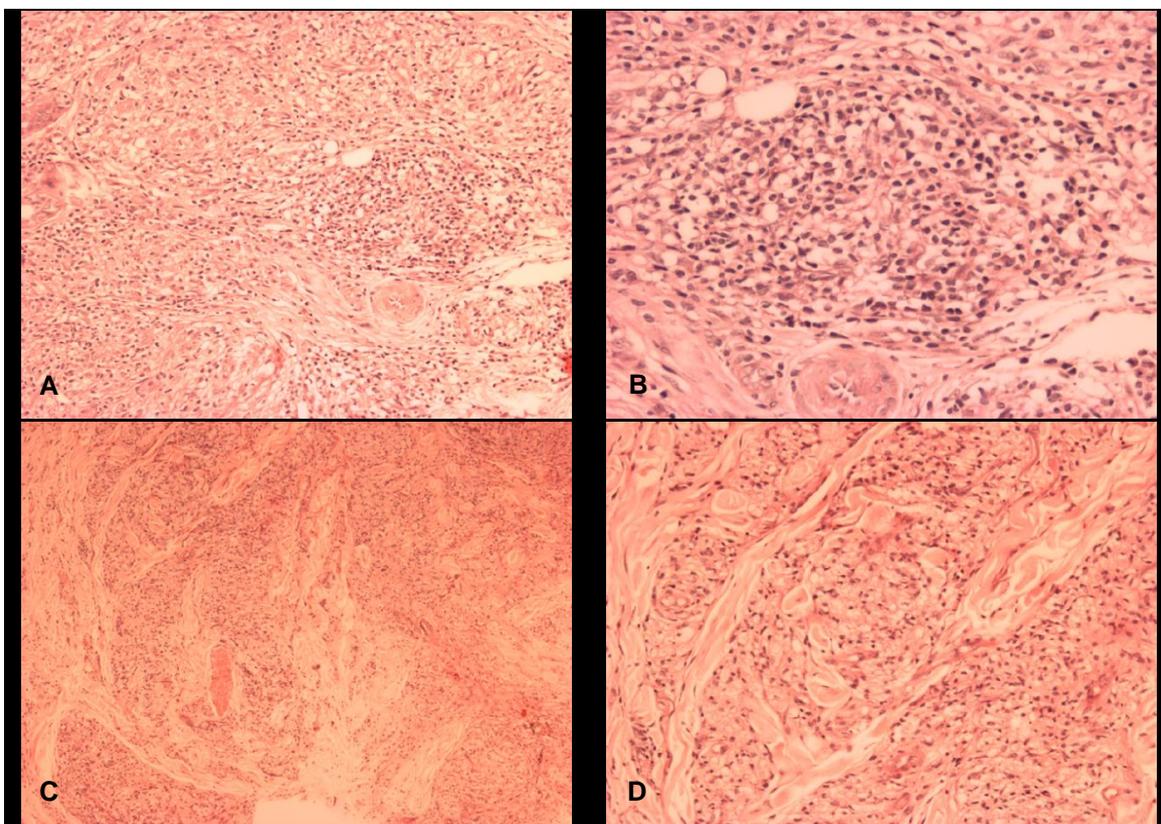


Figura 12: Microfotografias das lâminas utilizadas para definição da forma de hanseníase conforme a classificação de Ridley-Jopling, pela coloração com hematoxilina-eosina. Em “A” está representada a forma dimorfa-virchowiana, com infiltrado predominantemente composto por macrófagos, rico em linfócitos, evidenciados em “B”. Em “C” observa-se forma virchowiana, com infiltrado predominantemente composto por macrófagos espumosos e, como visto em “D”, pobre em linfócitos. Em “A” e “C”: aumento de 40x. Em “B” e “D”: aumento de 100x.

Fonte: dados da pesquisa

A classificação de Madrid, a mais freqüentemente utilizada no serviço de hansenologia do Hospital Eduardo de Menezes, pôde ser comparada com a classificação de Ridley-Jopling, conforme demonstrado no Quadro 3.

Caso	Classificação	
	Madrid	Ridley-Jopling
1	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
2	Indeterminada	Indeterminada
3	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
4	Indeterminada	Dimorfa-tuberculóide
5	Virchowiana	Virchowiana
6	Tuberculóide	Dimorfa-tuberculóide
7	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
8	Indeterminada	Indeterminada
9	Dimorfa	Tuberculóide
10	Dimorfa	Dimorfa-tuberculóide
11	Indeterminada	Indeterminada
12	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
13	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
14	Dimorfa	Dimorfa-tuberculóide
15	Indeterminada	Indeterminada
16	Virchowiana	Virchowiana
17	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
18	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
19	Indeterminada	Dimorfa-virchowiana
20	Dimorfa	Dimorfa-virchowiana
21	Dimorfa	Dimorfa-tuberculóide
22	Dimorfa	Tuberculóide

Quadro 3: Classificação de forma clínico-bacilosópica (Madrid) e imuno-histológica (Ridley-Jopling). Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se que o caso número 4 seria classificado como forma indeterminada pela classificação de Madrid e foi classificado como forma dimorfa-tuberculóide pela classificação de Ridley-Jopling. Esta mudança, apesar de poder trazer implicações prognósticas sobre a evolução do caso, não ocasionou modificação do esquema poliquimioterápico, uma vez que a OMS considera como paucibacilar o caso dimorfo-tuberculóide com baciloscopia dérmica negativa, como a apresentada pelo paciente.

Os casos 10, 14 e 21, classificados como forma dimorfa pela classificação de Madrid, foram alocados mais especificamente na forma dimorfa-tuberculóide pela classificação de Ridley-Jopling. Entretanto, mais uma vez, tal modificação não alterou o tratamento indicado para os três pacientes, uma vez que todos apresentavam baciloscopia dérmica positiva, sendo considerados casos multibacilares de acordo com as orientações da OMS.

Diferentemente, os casos de número 9 e 22 seriam considerados multibacilares pela classificação de Madrid e receberiam poliquimioterapia de doze meses de duração. A classificação histológica, todavia, classificou-os como paucibacilares e permitiu a poliquimioterapia de seis meses de duração.

A mais importante contribuição da histologia para a classificação foi em relação ao caso de número 19, que seria classificado como forma indeterminada pela classificação clínico-baciloscópica, mas foi alocado entre os casos multibacilares, sob a forma dimorfa-virchowiana, por meio da classificação Ridley-Jopling. A Tabela 2 sintetiza a comparação entre as classificações de Ridley Jopling e de Madrid para a amostra de pacientes estudados. O coeficiente de concordância de *kappa* foi de 0,697.

Tabela 2
Classificação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares conforme as classificações de Ridley-Jopling e de Madrid

Classificação de Ridley-Jopling	Classificação de Madrid		Total
	Paucibacilar	Multibacilar	
Paucibacilar	6	2	8
Multibacilar	1	13	14
Total	7	15	22

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: valor de *kappa*: 0,697

A Tabela 3 aponta a divisão dos pacientes em paucibacilares e multibacilares, para fins de definição do esquema terapêutico, de acordo com a classificação de Ridley-Jopling e a classificação operacional da OMS. O valor de *kappa* foi de 0,904.

Tabela 3
Classificação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares conforme as classificações de Ridley-Jopling e Operacional da OMS

Classificação de Ridley-Jopling	Classificação operacional da OMS		Total
	Paucibacilar	Multibacilar	
Paucibacilar	8	0	8
Multibacilar	1	13	14
Total	9	13	22

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: valor de *kappa*: 0,904.

4.3 Teste de sensibilidade tátil das lesões

A sensibilidade tátil das lesões estudadas foi quantificada com os monofilamentos de Semmes-Weinstein. O Gráfico 4 mostra o perfil de sensibilidade tátil das lesões. A sensibilidade tátil estava preservada em 30% das lesões. A alteração era leve, com sensibilidade preservada para o monofilamento azul em outros 30% dos pacientes participantes.

Cor do monofilamento sentido na lesão

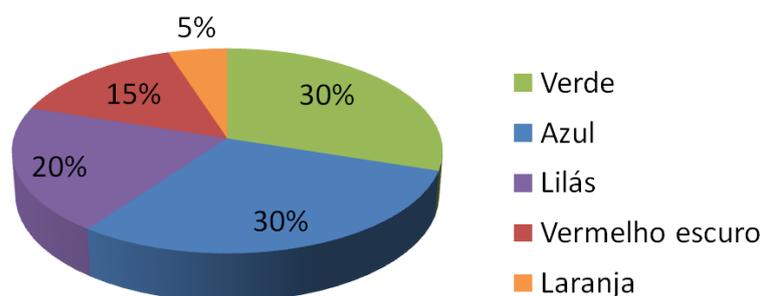


Gráfico 4: Sensibilidade tátil das 22 lesões ao teste com monofilamentos de Semmes-Weinstein. Fonte: Dados da pesquisa.

O Quadro 4 mostra o perfil de sensibilidade tátil das lesões de acordo com a classificação de Ridley-Jopling.

Ridley-Jopling	Cor do monofilamento sentido na lesão				
	Verde	Azul	Lilás	Vermelho escuro	Laranja
Indeterminada	2	2			
Tuberculóide	1				1
Dimorfa-tuberculóide		2	1	1	
Dimorfa-virchowiana	3	1	3	1	
Virchowiana		1		1	

Quadro 4: Perfil de sensibilidade tátil das lesões e classificação de Ridley-Jopling.
Fonte: Dados da pesquisa.

Pôde-se observar uma tendência de as lesões com sensibilidade tátil preservada, ou pouco alterada, apresentarem maior tempo de evolução até o diagnóstico que as lesões com perda mais pronunciada de sensibilidade tátil (GRÁF. 5 e TAB. 4). Todavia, o teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença estatisticamente significativa das médias dos tempos de evolução entre os grupos de sensibilidade tátil das lesões ($p = 0,759$).

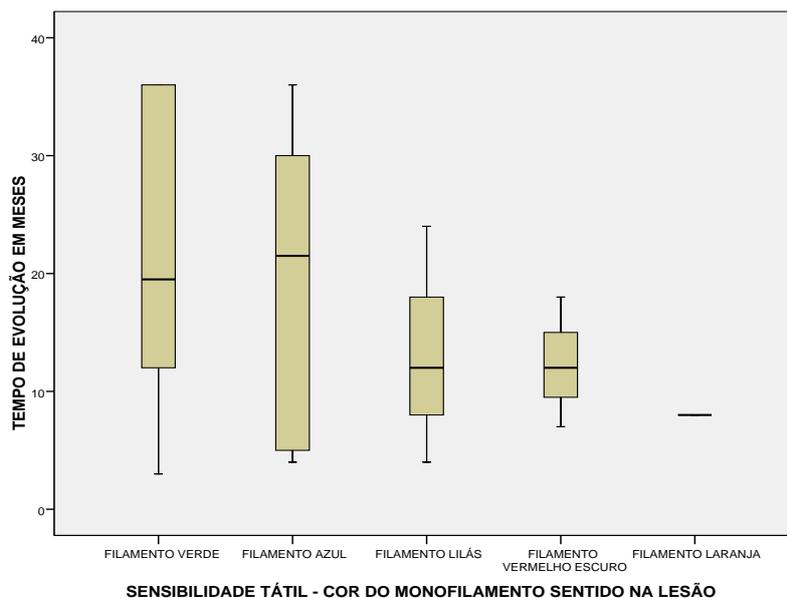


Gráfico 5: Distribuição do tempo de evolução da doença até o diagnóstico, conforme a sensibilidade tátil aos monofilamentos de Semmes-Weinstein.
Fonte: Dados da pesquisa. A representação gráfica utiliza mediana para tendência central.

Tabela 4

Distribuição das médias e desvios padrões dos tempos de evolução da doença até o diagnóstico, conforme a sensibilidade tátil aos monofilamentos de Semmes-Weinstein

Sensibilidade tátil da lesão estudada	Tempo de evolução da doença até o diagnóstico	
	Média em meses	Desvio padrão
Verde	21,0	13,4
Azul	19,7	13,0
Lilás	13,3	10,1
Vermelho-escuro	12,3	5,5
Laranja	8,0 (único caso)	-

Fonte: Dados da pesquisa. $p = 0,759$ (teste de Kruskal-Wallis)

4.4 Teste quantitativo de sensibilidade térmica

O TQST foi comparado entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”. A sensibilidade térmica foi comparada entre os dois grupos utilizando-se as médias de cada um dos limiares térmicos avaliados: limiar de detecção de calor, limiar de detecção de frio, limiar de detecção de dor induzida por frio e limiar de detecção de dor induzida por calor. Houve diferença entre os grupos “lesão” e “pele contralateral” em relação a todos os limiares térmicos avaliados. As médias dos valores de limiares de detecção de sensibilidade térmica e os valores de p do teste de Wilcoxon são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5
Comparação dos limiares obtidos no teste quantitativo de sensibilidade térmica entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”

Limiar de detecção	Lesão		Pele contralateral		Valor de p
	Média (°C)	Desvio-padrão	Média (°C)	Desvio-padrão	
Frio	19,0	9,22	27,9	2,3	< 0,001
Calor	43,2	5,6	37,3	4,7	< 0,001
Dor induzida por frio	3,0	6,0	8,7	9,2	0,003
Dor induzida por calor	48,9	2,1	44,6	4,2	< 0,001

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: valor de p ao teste de teste de Wilcoxon.

Em virtude de uma limitação de segurança automática do analisador de sensibilidade térmica, a temperatura à qual os pacientes são expostos tem sua variação limitada ao intervalo de 0°C a 50°C. Das 22 lesões examinadas, três apresentaram limiar de detecção de frio inferior a 0°C e cinco apresentaram

limiar de detecção de calor maior que 50°C. Para a análise estatística, estes casos foram codificados no banco de dados com os valores 0°C e 50°C, respectivamente. Como esperado, a determinação dos limiares de detecção de dor induzida por calor e dor induzida por frio sofreu maior influência dessa limitação inerente ao aparelho. Das 22 lesões, 17 apresentaram limiar de dor ao frio menor que 0°C e 13 apresentaram limiar de dor ao calor maior que 50°C. Da mesma forma, foram registrados no banco de dados com os valores 0°C e 50°C.

Para se avaliar se o grau de comprometimento de sensibilidade térmica nas lesões estaria relacionado ao grau de comprometimento de sensibilidade tátil, as lesões dos pacientes foram divididas em grupos de acordo com sua sensibilidade aos monofilamentos, ou seja, grupos verde, azul, lilás, vermelho escuro e laranja. Para os limiares de detecção de calor e frio percebeu-se uma tendência de piora da sensibilidade térmica, acompanhando o grau de perda de sensibilidade tátil (GRÁF. 6 e 7).

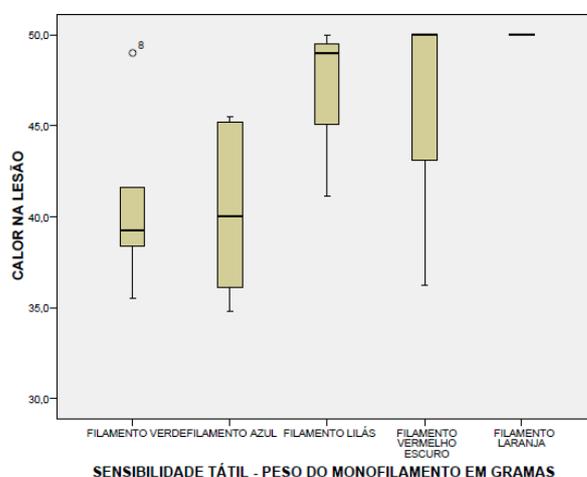


Gráfico 6: Distribuição dos limiares de detecção de calor nas lesões de Hanseníase, estratificadas em grupos de acordo com o resultado do teste de sensibilidade tátil por meio de monofilamentos.

Fonte: Dados da pesquisa. A representação gráfica utiliza mediana para tendência central.

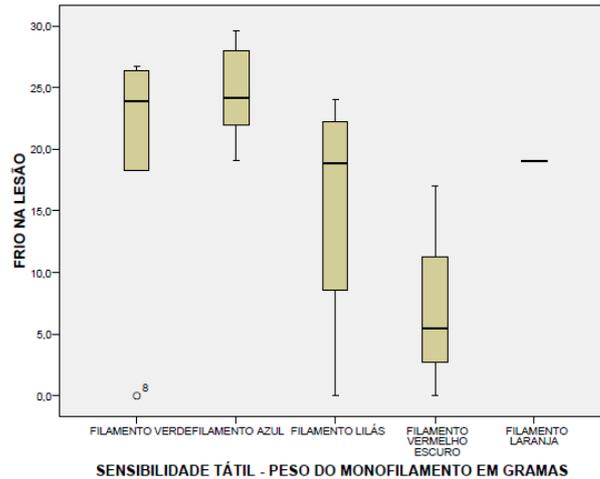


Gráfico 7: Distribuição dos limiares de detecção de frio nas lesões de hanseníase, estratificadas em grupos de acordo com o resultado do teste de sensibilidade tátil por meio de monofilamentos.

Fonte: Dados da pesquisa. A representação gráfica utiliza mediana para tendência central.

Todavia, a tendência expressa na análise descritiva realizada por meio de boxplots e medianas, não foi confirmada pela análise comparativa realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis, que não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de sensibilidade tátil, para nenhum dos quatro tipos de limiares de sensibilidade térmica estudados.

A interpretação da perda de sensibilidade térmica ocorrida em cada paciente poderia ser realizada por meio da diferença absoluta ou por meio da diferença percentual entre os valores obtidos na lesão e na pele contralateral para cada um dos limiares de detecção estudados (TAB. 6).

Tabela 6

Quantificação da perda de sensibilidade térmica nas lesões em relação à pele contralateral, por meio da média das diferenças entre os valores dos limiares encontrados nos dois sítios

Limiar de detecção	Perda de sensibilidade térmica				
	Diferença absoluta		Diferença percentual		
	Média(°C)	Desvio-padrão	Média(%)	Desvio-padrão	CV*
Frio	9,2	8,5	33,6	32,1	0,95
Calor	6,0	4,3	16,6	12,6	0,76
Dor ao frio	5,5	6,7	39,6	46,5	1,17
Dor ao calor	4,2	3,7	10,1	9,4	0,93

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: *CV: coeficiente de variação (desvio-padrão/média).

A diferença absoluta é um valor interessante e lógico para interpretação da perda de sensibilidade térmica na prática ambulatorial (a Tabela 7 demonstra a diferença absoluta dos limiares de calor e frio estratificada conforme a sensibilidade tátil da lesão). Todavia, a diferença percentual foi escolhida para as análises estatísticas deste trabalho por se acreditar que este tipo de cálculo seja mais robusto às variações fisiológicas dos limiares de detecção térmicos entre diferentes regiões do corpo.

Tabela 7
Distribuição da perda de sensibilidade térmica nas lesões em relação à
pele contralateral, estimada por meio da diferença absoluta entre os
valores dos limiares encontrados nos dois sítios, conforme a
sensibilidade tátil na lesão

Monofilamento sentido	Diferença frio (°C) (pele contralateral – lesão)			Diferença calor (°C) (lesão – pele contralateral)		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
Verde	8,1	2,3	27,6	4,3	1,0	7,5
Azul	3,8	1,0	6,2	5,1	1,3	12,4
Lilás	12,1	3,8	25,9	9,0	4,6	13,0
Vermelho-escuro	18,8	7,0	25,0	7,7	3,2	15,4
Laranja	8,2	-	-	5,4	-	-

Fonte: Dados da pesquisa

A utilização do TQST para diagnóstico de comprometimento de sensibilidade em uma lesão de hanseníase requer o estabelecimento de pontos de corte precisos, a partir dos quais passa-se a considerar o teste alterado. Alternativamente, pode-se considerar comprometida a sensibilidade da lesão quando há uma diferença de pelo menos 1°C entre o valor de seu limiar e o da pele contralateral (SANTIAGO *et al.*, 2000).

Com base nesta última definição, a sensibilidade do TQST para detecção de comprometimento de sensibilidade térmica na amostra de pacientes incluídos no presente trabalho foi de 100%. As Tabelas 8 e 9 permitem a comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica baseada em pontos de corte estabelecidos previamente em um estudo publicado por um dos autores deste trabalho (VILLARROEL *et al.*, 2007) e a definição de comprometimento de sensibilidade em caso de diferenças maiores ou iguais a 1°C.

A concordância demonstrada nas tabelas é elevada. Dentre os 22 pacientes, apenas o participante de número 2 apresentou limiares de detecção ao frio e calor considerados normais quando comparados ao valor de corte sugerido na literatura. Tratava-se de um paciente com hanseníase da forma indeterminada e lesão macular em joelho, sensível ao monofilamento lilás, que apresentou involução importante após 30 dias de tratamento.

Tabela 8

Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao frio baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão e a baseada em um ponto de corte para o limiar na lesão

Diferença entre pele contralateral e lesão $\geq 1^{\circ}\text{C}$	Limiar de detecção de frio $< 28,95^{\circ}\text{C}^*$		Total
	Não	Sim	
	(sensibilidade normal)	(sensibilidade alterada)	
Não (sensibilidade normal)	0	0	0
Sim (sensibilidade alterada)	1	21	22
Total	1	21	22

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: *ponto de corte sugerido na literatura (VILLARROEL *et al*, 2007).

Tabela 9

Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao calor baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão e a baseada em um ponto de corte para o limiar na lesão

Diferença entre lesão e pele contralateral $\geq 1^\circ\text{C}$	Limiar de detecção de calor $> 35,1^\circ\text{C}^*$		Total
	Não (sensibilidade normal)	Sim (sensibilidade alterada)	
Não (sensibilidade normal)	0	0	0
Sim (sensibilidade alterada)	1	21	22
Total	1	21	22

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: *ponto de corte sugerido na literatura (VILLARROEL *et al*, 2007).

Não foi realizado o teste de água quente e fria nos pacientes participantes deste trabalho. Todavia, considerando que as recomendações indicam que no momento do teste os tubos devem estar à temperatura de 25°C e 45°C, foi realizada uma dicotomização das variáveis contínuas referentes aos limiares de sensibilidade ao frio e ao calor, estimados pelo TQST, levando em consideração aqueles valores de temperatura como pontos de corte para detecção do comprometimento de sensibilidade nas lesões. Então, considerando como padrão ouro para detecção de comprometimento de sensibilidade térmica na lesão o encontro de uma diferença de pelo menos 1°C entre o valor dos limiares observados na lesão e na pele contralateral, foram avaliadas as medidas de qualidade intrínsecas que descreveriam um teste com tubos de água, inferido com base nos valores de temperatura recomendados. As Tabelas 10 e 11 resumem as observações.

Tabela 10

Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao frio baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão, e uma definição inferida a partir do valor de temperatura recomendada para o teste com tubo de água fria (25°C)

Diferença entre pele contralateral e lesão $\geq 1^\circ\text{C}$ (limiar de frio)	Sensibilidade esperada ao tubo de água fria a 25°C		Total
	Sentiria	Não sentiria	
	<small>(sensibilidade normal)</small>	<small>(sensibilidade alterada)</small>	
Não <small>(sensibilidade normal)</small>	0	0	0
Sim <small>(sensibilidade alterada)</small>	6	16	22
Total	6	16	22

Tabela 11

Comparação entre a definição de comprometimento de sensibilidade térmica ao calor baseada na diferença maior ou igual a 1°C entre pele contralateral e lesão, e uma definição inferida a partir do valor de temperatura recomendada para o teste com tubo de água quente (45°C)

Diferença entre lesão e pele contralateral $\geq 1^\circ\text{C}$ (limiar de calor)	Sensibilidade esperada ao tubo de água quente a 45°C		Total
	Sentiria	Não sentiria	
	<small>(sensibilidade normal)</small>	<small>(sensibilidade alterada)</small>	
Não <small>(sensibilidade normal)</small>	0	0	0
Sim <small>(sensibilidade alterada)</small>	12	10	22
Total	12	10	22

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com as tabelas, nota-se que seis pacientes não teriam tido o comprometimento de sensibilidade ao frio detectado ao toque com tubo de água fria a 25°C e que doze pacientes não teriam tido o comprometimento de sensibilidade ao calor detectado ao toque com tubo de água quente a 45°C. É interessante ressaltar que dos seis pacientes que teriam sensibilidade preservada ao tubo de água fria, cinco pacientes, ou 22,7% da amostra de participantes, também teriam a sensibilidade preservada ao tubo de água quente, ou seja, definitivamente não teriam o déficit de sensibilidade térmica detectado ao teste com tubos contendo água.

Como método de detecção do comprometimento de sensibilidade térmica nas lesões, o teste com tubo de água fria apresentaria sensibilidade estimada de 72,7%. O teste com tubo de água quente teria sensibilidade de 45,4%. Quando considerados conjuntamente, a sensibilidade do teste com tubos de água quente e fria seria estimada em 77,3%.

4.5 Imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica das biópsias de pele contralateral demonstrou fibras neurais intraepidérmicas, visualizadas como estruturas lineares descontínuas coradas em marrom, com aspecto de “colar de contas”, que atravessavam verticalmente as camadas basal, espinhosa e granulosa em direção à superfície da pele, para então se curvarem e continuarem seu trajeto paralelamente à camada córnea, por vezes podendo ser vistas dentro desta camada. Todavia, nem todas as fibras intraepidérmicas foram visualizadas ao longo de todo o seu trajeto. Muitas vezes as fibras atravessavam o corte obliquamente e só eram vistas algumas porções de seu trajeto (FIG. 13, A e B).

Na região de derme papilar, as fibras neurais subepidérmicas foram visualizadas como estruturas marrons mais grossas, porém de espessura e densidade de coloração variáveis, de formato linear ou às vezes em pequenos grumos, dispostas paralelamente à camada basal ou, por vezes, posicionando-se para atravessá-la em direção à superfície (FIG. 13, C e D).

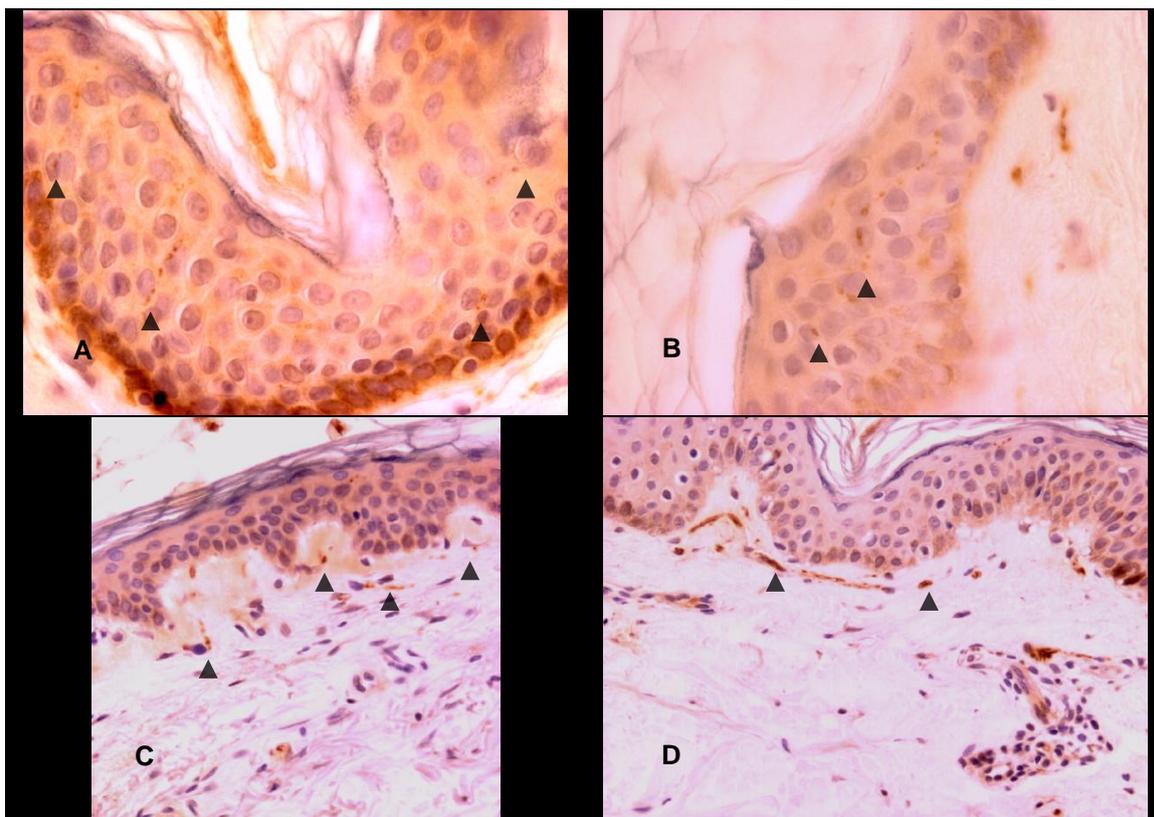


Figura 13: Microfotografias representativas da coloração imuno-histoquímica para PGP 9.5. Em “A” e “B”, fibras intraepidérmicas são evidenciadas na pele contralateral de dois pacientes (cabeças de setas). Em “C” e “D” são evidenciadas fibras subepidérmicas na pele contralateral de outros dois participantes (cabeças de setas). Há infiltrado inflamatório na pele representada em “D”, proveniente de um paciente com hanseníase da forma indeterminada, que apresentava uma única mácula hipocrômica em região deltoideana contralateral. Em “A” e “B”: aumento de 400x. Em “C” e “D”: aumento de 200x. **Fonte: dados da pesquisa**

Também foram marcados músculos piloerectores e filetes nervosos em derme reticular profunda e subcutâneo. As fibras finas que se enovelam ao redor dos ácinos das glândulas sudoríparas não foram bem visualizadas.

A marcação imuno-histoquímica das biópsias de lesões demonstrou uma rarefação de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas (FIG. 14). A avaliação da derme reticular média e profunda e do subcutâneo foi prejudicada pelo background de marcação que se acentuava junto ao infiltrado inflamatório típico da doença. Diante de um infiltrado inflamatório denso e exuberante, independentemente da forma de hanseníase apresentada, a diferenciação adequada entre fibras neurais e marcação inespecífica só pôde ser adequadamente realizada nas camadas mais superficiais de derme papilar.

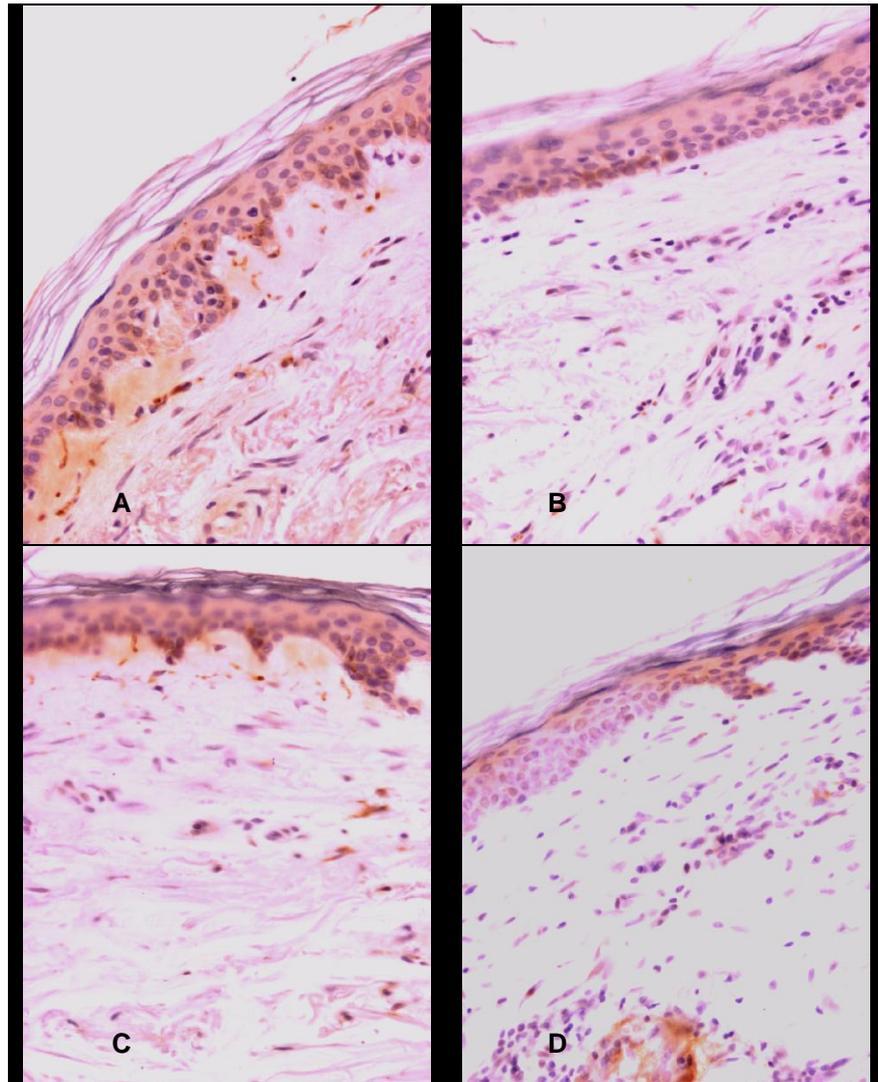


Figura 14: Comparação da densidade de fibras evidenciadas por coloração imuno-histoquímica para PGP 9.5 entre pele contralateral e lesão de pacientes com hanseníase. Em “A” e “C”, microfotografias obtidas da pele contralateral de pacientes com hanseníase. Em “B” e “D”, microfotografias obtidas de lesões. Aumento de 200x. **Fonte:** dados da pesquisa

4.6 Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas

A quantificação de fibras neurais foi comparada entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”, utilizando-se as médias dos valores de quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas. A diferença apresentou significância estatística e é demonstrada na Tabela 12.

Tabela 12
Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas
comparada entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”

Fibras cutâneas	Lesão		Pele contralateral		Valor de <i>p</i>
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
Intraepidérmicas (quantidade por mm de epiderme)	1,2	2,3	4,7	3,5	< 0,001
Subepidérmicas (porcentagem de área dérmica marcada)	0,2	0,2	1,1	0,8	< 0,001

Fonte: Dados da pesquisa. Notas: valor de *p* ao teste de teste de Wilcoxon.

Os valores de área total de derme papilar utilizada para o cálculo da porcentagem de área marcada correspondente a fibras subepidérmicas foram comparados entre os grupos “lesão” e “pele contralateral” e não foi detectada diferença significativa ($p= 0,96$).

Para se avaliar se a rarefação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas nas lesões estaria relacionada ao grau de comprometimento de sensibilidade tátil, as lesões dos pacientes foram divididas em grupos de acordo com sua sensibilidade aos monofilamentos, ou seja, grupos verde, azul, lilás, vermelho escuro e laranja. Entretanto, a comparação das médias dos valores de quantificação de fibras intraepidérmicas e dérmicas das lesões, realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre estes grupos.

A avaliação da desnervação intraepidérmica e subepidérmica em cada paciente foi realizada por meio da diferença percentual entre os valores obtidos na lesão e na pele contralateral. As lesões apresentaram uma rarefação média de fibras subepidérmicas de 79,5% ($DP = 19,6$; coeficiente de variação = 0,24) e uma redução média de fibras intraepidérmicas de 80,8% ($DP = 24,9$; coeficiente de variação = 0,30) em relação às áreas sadias contralaterais.

Foi observada uma boa correlação entre as variáveis “déficit de fibras intraepidérmicas” e “déficit de fibras subepidérmicas”, que representam respectivamente os valores de redução percentual de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas nas lesões dos pacientes, quando comparadas à pele contralateral (coeficiente de Spearman: 0,60; $p = 0,004$). O Gráfico 8 demonstra a dispersão dos casos de acordo com os valores destas duas variáveis.

Nota-se, neste gráfico, que não há uma linha clara que represente o comportamento da correlação existente entre as variáveis. De fato, a análise de regressão linear simples não resultou em um modelo estatístico adequado à interpretação desta correlação.

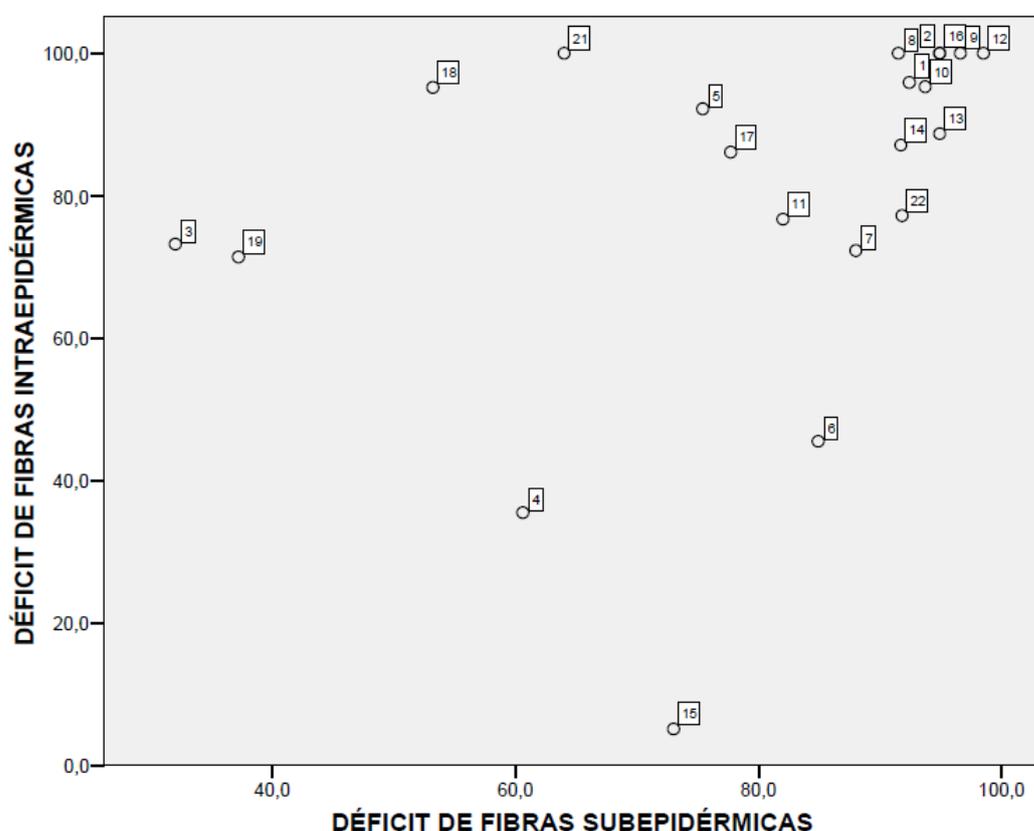


Gráfico 8: Gráfico de dispersão representando os valores das variáveis “déficit de fibras intraepidérmicas” e “déficit de fibras subepidérmicas” para cada um dos pacientes participantes.

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: 1- Os déficits foram calculados como a diferença percentual entre os valores obtidos na lesão e na pele contralateral. 2- Por não ter sido realizada a quantificação de fibras intraepidérmicas da lesão, o quadro número 20 não está representado.

4.7 Análises de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais

A análise de correlação foi realizada para se estudar o comportamento dos valores dos limiares de sensibilidade térmica em função do estado da inervação cutânea. Presumindo que quanto maior fosse a rarefação de fibras nervosas cutâneas piores seriam os limiares de sensibilidade, os pesquisadores pretenderam avaliar a existência desta correlação e, se possível, descrever o seu comportamento por meio de um modelo de regressão. Entretanto, apesar de aparentemente óbvia, não foi possível detectar a existência da correlação entre as variáveis que representaram o déficit de inervação cutânea e as variáveis que representaram o déficit de sensibilidade térmica (tabelas 13 e 14).

Tabela 13
Testes de correlação entre limiares de sensibilidade térmica e
quantificação de fibras nervosas intraepidérmicas

Pares de variáveis submetidas ao teste de correlação	Análise descritiva da variável		Análise bivariada de correlação		Interpretação
	Média (%)	Desvio padrão	Coeficiente de Spearman	Significância	
	Déficit de limiar de frio	33,6			
Déficit de fibras intraepidérmicas	80,8	24,9			
Déficit de limiar de calor	16,6	12,6	0,07	0,73	ausência de correlação
Déficit de fibras intraepidérmicas	80,8	24,9			
Déficit de limiar de dor ao frio	39,6	46,5	- 0,09	0,69	ausência de correlação
Déficit de fibras intraepidérmicas	80,8	24,9			
Déficit de limiar de dor ao calor	10,1	9,5	- 0,16	0,47	ausência de correlação
Déficit de fibras intraepidérmicas	80,8	24,9			

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: déficits calculados como a diferença percentual entre os valores obtidos na pele contralateral e na lesão.

Tabela 14
Testes de correlação entre limiares de sensibilidade térmica e
quantificação de fibras nervosas subepidérmicas

Pares de variáveis submetidas ao teste de correlação	Análise descritiva da variável		Análise bivariada de correlação		Interpretação
	Média (%)	Desvio padrão	Coeficiente de Spearman	Significância	
	Déficit de limiar de frio	33,6			
Déficit de fibras subepidérmicas	79,5	19,6			
Déficit de limiar de calor	16,6	12,6	- 0,10	0,65	ausência de correlação
Déficit de fibras subepidérmicas	79,5	19,6			
Déficit de limiar de dor ao frio	39,6	46,5	0,007	0,97	ausência de correlação
Déficit de fibras subepidérmicas	79,5	19,6			
Déficit de limiar de dor ao calor	10,1	9,5	0,13	0,58	ausência de correlação
Déficit de fibras subepidérmicas	79,5	19,6			

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: déficits calculados como a diferença percentual entre os valores obtidos na pele contralateral e na lesão.

Suspeitou-se que a ausência de significância pudesse ser devida a uma limitação do TQST, uma vez que o dispositivo analisador, que entra em contato com a pele dos pacientes, é programado para funcionar somente entre as temperaturas limítrofes de 0°C e 50°C. Quando o limiar de detecção ao frio situa-se abaixo de 0°C ou acima de 50°C o verdadeiro valor do limiar não pode ser obtido. Para permitir a inserção dos dados nos cálculos estatísticos convencionou-se, nestes casos, considerar como valor dos limiares os próprios valores limítrofes do aparelho, como já havia sido realizado por outros autores.

Para se verificar se este seria o motivo da ausência de correlação entre as variáveis estudadas, optou-se por se repetir os testes de correlação, retirando do banco de dados os pacientes em que este artifício metodológico havia sido empregado. Todavia, mesmo após os novos cálculos, não pode ser observada correlação entre as variáveis estudadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Características da amostra de pacientes participantes

A média de idade dos pacientes, 42,2 anos, compara-se a outros trabalhos, que observaram média de 43,9 anos (LYON, 2005) e 46,5 anos (SARUBI, 2008). Dentre os pacientes, 4,5% apresentavam idade inferior a 15 anos. Este percentual é semelhante aos 4,2% e 7,4% divulgados pelo Ministério da Saúde sobre a situação no estado de Minas Gerais e no Brasil, respectivamente (BRASIL, 2009b). O diagnóstico da doença em menores de 15 anos denota exposição precoce ao agente etiológico, mais provavelmente dentro do próprio lar e implica maior endemicidade.

É aceito que em cerca de 50% dos casos recém-diagnosticados seja possível a identificação da fonte infectante (MARGARIDO-MARCHESE *et al*, 2006). Na amostra estudada, apenas 18,2% apresentavam história familiar positiva para a doença. Estes percentuais não se contradizem, uma vez que o exame dos contatos domiciliares dos pacientes ainda não havia sido feito no momento de sua inclusão na pesquisa. Na verdade, esta diferença ressalta a importância de se cuidar para que todos os contatos domiciliares destes pacientes sejam examinados.

Quanto ao número de lesões cutâneas, 45,5% dos pacientes apresentaram seis ou mais lesões, correspondendo à forma multibacilar da classificação operacional OMS, percentual pouco maior que os 39,5% encontrados em um estudo realizado em Minas Gerais entre os anos de 2002 e 2004 incluindo 1041 pacientes (GROSSI *et al*, 2008).

O envolvimento de nervos periféricos pela hanseníase é um importante preditor de incapacidades e deformidades físicas. Apenas 18,2% dos participantes apresentavam dois ou mais nervos acometidos, diferentemente dos 61% encontrados entre os 135 pacientes incluídos em outro trabalho, realizado entre os anos de 2002 e 2004 (LYON *et al*, 2008), ou os 39,1% encontrados em outro estudo envolvendo 110 pacientes, entre os anos de 2006 e 2007 (SARUBI, 2008), ambos realizados no mesmo centro de referência.

Esta diferença pode ser explicada em parte pelo fato de o presente trabalho ter excluído pacientes com evidências de acometimento do nervo periférico responsável pela inervação das regiões cutâneas a serem estudadas e biopsiadas e em parte pela diferença de tamanho entre as amostras envolvidas.

O diagnóstico precoce da hanseníase é fundamental para que o tratamento seja iniciado oportunamente, visando a evitar suas complicações neurológicas e a controlar a disseminação da doença. Na amostra de pacientes participantes, o tempo médio de evolução até o início de tratamento de 17,1 meses pode ser considerado longo. Todavia pode ser compreendido, uma vez que o Hospital Eduardo de Menezes é um centro de referência estadual para o controle da doença e recebe, essencialmente, pacientes referenciados de unidades básicas de saúde ou clínicas particulares, para elucidação diagnóstica de casos previamente tidos como duvidosos.

Sabendo-se que a cura da doença pode levar à recuperação da sensibilidade nas lesões e que a clofazimina usada na poliquimioterapia de casos multibacilares pode ter efeito anti-inflamatório protetor de nervos (ARUNTHATHI; SATHEESH, 1997), depreende-se que inclusão de pacientes em vigência tratamento há vários meses ou que já tivessem completado o tratamento poderia ser considerada um fator de confusão para a quantificação das fibras neurais cutâneas e sua correlação funcional. Dessa forma, é interessante ressaltar que os pacientes participantes deste trabalho haviam iniciado o tratamento há pouco mais de 7,7 dias, no momento da inclusão e que doze, de vinte e dois pacientes, nem mesmo haviam iniciado o esquema terapêutico.

5.2 Comparação entre as diferentes formas de classificação

A classificação de Ridley e Jopling foi escolhida para a classificação dos casos por ser a mais utilizada em pesquisas e levar em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro ao parasita (GROSSI *et al*, 2008). Quando se faz necessário escolher entre os esquemas

de poliquimioterapia paucibacilar e multibacilar, a OMS interpreta a classificação de Ridley-Jopling considerando como casos paucibacilares aqueles que apresentam as formas indeterminada, tuberculóide ou dimorfa-tuberculóide com baciloscopia dérmica negativa. Como multibacilares são consideradas as formas dimorfa-tuberculóide com baciloscopia dérmica positiva, dimorfa-dimorfa, dimorfa-virchowiana e virchowiana.

Dos pacientes estudados, 63,6% puderam ser considerados multibacilares pela classificação de Ridley-Jopling. Estes seriam 68,2% e 59,1% segundo as classificações de Madrid e da OMS, nesta ordem. A concordância apresentada pela classificação de Ridley-Jopling foi substancial com a classificação de Madrid e excelente com a classificação da OMS, de acordo com os coeficientes de *kappa* de, respectivamente, 0,697 e 0,904. Corroborando estes resultados, os dados de um trabalho realizado no mesmo centro, entre os anos de 2002 e 2004, envolvendo 135 pacientes indicaram 53,6% de casos multibacilares pela classificação da OMS e 57% apresentaram sorologia positiva no teste ML-Flow (LYON *et al*, 2008). Mais discrepantes foram os resultados de um estudo realizado entre 2006 e 2007 com pacientes do mesmo ambulatório, que classificou como multibacilares 46,4% dos casos pela classificação da OMS e 84,6% pela classificação de Madrid (SARUBI, 2008).

Para a maioria dos pacientes, as divergências existentes entre as classificações não provocaram modificação do esquema terapêutico. Sabe-se, porém, que formas diferentes de hanseníase guardam implicações prognósticas diferentes. O caso número 4, por exemplo, seria classificado como forma indeterminada pela classificação de Madrid e foi reclassificado como forma dimorfa-tuberculóide pela classificação de Ridley-Jopling. Esta mudança não ocasionou modificação do esquema poliquimioterápico, uma vez que se tratava de forma dimorfa-tuberculóide com baciloscopia dérmica negativa. Entretanto, o prognóstico destas duas formas pode, indubitavelmente, ser diferente.

Por outro lado, os casos de número 9 e 22, considerados multibacilares pela classificação de Madrid, foram reclassificados pela histologia como paucibacilares e tiveram seu planejamento terapêutico modificado. Ambos apresentavam lesões de conformação anular com delimitação interna nítida e

delimitação externa imprecisa, chamadas foveolares e tidas como lesões elementares muito sugestivas da forma dimorfa de hanseníase. O exame histopatológico de ambos revelou, porém, que se tratava claramente da forma tuberculóide da doença.

Da mesma forma, a histologia contribuiu significativamente para condução correta do caso número 19, que seria classificado como forma indeterminada, paucibacilar, pela classificação clínico-baciloscópica, mas foi realocado entre os casos multibacilares, sob forma dimorfa-virchowiana.

5.3 Teste de sensibilidade tátil das lesões

Em 30% dos participantes, as lesões eram sensíveis ao monofilamento verde, de 0,05 gramas. Em outros 30%, o déficit de sensibilidade tátil nas lesões era discreto, sendo as mesmas sensíveis ao monofilamento azul, de 0,2 gramas. Fazer o diagnóstico de hanseníase tendo como base o grau leve de hipoestesia tátil encontrado nestes últimos casos pode ser considerado difícil. Apesar de o Guia para Controle da Hanseníase de 2002 (BRASIL, 2002) recomendar até mesmo o uso de uma mecha fina de algodão seco para a detecção do déficit de sensibilidade tátil nas lesões, alguns autores consideram como déficit a incapacidade de se sentir o monofilamento azul (VAN BRAKEL *et al*, 2008) ou o lilás, de 2,0 gramas (WEXLER; MELCHIOR, 2007).

Diante da tendência de as lesões com sensibilidade tátil preservada ou pouco alterada apresentarem maior tempo de evolução até o diagnóstico, pode-se inferir maior dificuldade, fora do serviço de referência, em se firmar o diagnóstico de hanseníase quando as lesões apresentam pouco ou nenhum comprometimento tátil. Trata-se de um indício de que a avaliação de sensibilidade das lesões sugestivas de hanseníase, fora do serviço de referência, é de tal forma dependente dos testes de sensibilidade tátil, que ocorrerá uma tendência ao atraso no diagnóstico da doença, quando o teste com monofilamentos de Semmes-Weinstein for normal ou discretamente alterado.

Somando-se os pacientes com sensibilidade tátil preservada aos monofilamentos verde e azul pode-se dizer que, em mais da metade dos participantes deste estudo, o critério diagnóstico de perda de sensibilidade na lesão só pôde ser definido por meio do teste de sensibilidade térmica. De fato, toda lesão com sensibilidade tátil preservada ao filamento verde ou azul apresentou limiar de detecção de frio mais baixo que o da área sadia contralateral. A menor diferença entre os limiares de frio na lesão e na pele contralateral foi de 2,3°C nos pacientes em que a lesão apresentava sensibilidade tátil preservada ao filamento verde e de 1,0°C nos pacientes em que a lesão apresentava sensibilidade tátil preservada ao filamento azul. As diferenças médias foram de 8,1°C e 3,8°C, respectivamente. Da mesma forma, toda lesão sensível ao monofilamento verde ou azul mostrou limiar de detecção de calor mais elevado que o da área sadia contralateral. Respectivamente, as diferenças mínimas foram de 1,0°C e 1,3°C e as diferenças médias foram de 4,3°C e 5,1°C.

Quando se avaliou o perfil de sensibilidade tátil das lesões de acordo com a classificação de Ridley-Jopling, pôde-se perceber que todas as lesões da forma indeterminada apresentaram sensibilidade tátil pouco ou nada alterada, em consonância com a literatura (ARAÚJO, 2003). Todavia, não foram percebidas outras generalizações. Inesperadamente, um dos pacientes apresentou sensibilidade tátil preservada ao monofilamento verde em uma lesão com histologia e clínica típicas da forma tuberculóide, em que tradicionalmente se esperaria intenso comprometimento de sensibilidade tátil.

5.4 Teste quantitativo de sensibilidade térmica

É sabido que nas lesões de hanseníase a perda de sensibilidade térmica precede a perda de sensibilidade tátil (VAN BRAKEL *et al*, 2008). Dessa forma, a pesquisa de sensibilidade térmica oferece maior sensibilidade ao diagnóstico e permite que este seja feito mais precocemente. Os resultados reiteram esta premissa quando apontam que todas as lesões com sensibilidade tátil preservada apresentaram comprometimento de sensibilidade térmica.

As médias dos quatro tipos de limiares de detecção de sensibilidade térmica foram significativamente diferentes entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”. A maior diferença absoluta entre os grupos foi para o limiar de detecção de frio, com diferença absoluta média de 9,2°C. A diferença para o limiar de detecção de calor foi em média de 6,0°C. Quando avaliada em termos percentuais, a diferença de limiares de detecção ao frio, com média de 33,6%, avolumou-se ainda mais em relação à diferença de limiares de detecção ao calor, de média 16,6%.

Foi mais fácil detectar o déficit de sensibilidade ao frio que o déficit de sensibilidade ao calor. Comparando os valores de lesão e área sadia contralateral, a diferença absoluta de pelo menos 1°C foi encontrada em todos os pacientes, tanto para frio quanto para calor. Todavia, para o limiar de calor, esta diferença foi discreta, entre 1°C e 2°C, em quatro pacientes. No caso do limiar de detecção de frio isto só aconteceu em um único paciente.

Apesar de ter sido encontrada uma diferença de pelo menos 1°C entre lesão e pele contralateral para os limiares de detecção de frio e calor de todos os pacientes participantes, permitindo estimar a sensibilidade desse critério em 100%, deve-se ter em mente que a especificidade dessa diferença para a detecção de alteração de sensibilidade térmica em pacientes com lesões suspeitas de hanseníase ainda não foi avaliada por meio de estudos científicos sistematizados, reconhecidos pela comunidade científica.

Para algumas dermatoses inflamatórias, aventa-se um mecanismo patogênico denominado inflamação neurogênica, relacionado às fibras finas tipo C, que secretam neurotransmissores como CGRP e SP capazes de atrair e estimular a degranulação de mastócitos, que colaboram para o início do processo inflamatório (STEINHOFF *et al*, 2003). Como as fibras tipo C estão diretamente relacionadas à mediação da sensibilidade térmica, não seria exagero se supor que em virtude de seu envolvimento com o processo inflamatório, as fibras finas amielínicas poderiam exibir algum grau de comprometimento funcional em dermatoses relacionadas à inflamação neurogênica.

À medida que os aparelhos com os quais o TQST é realizado passam a estar disponíveis em serviços de referência no diagnóstico, tratamento e controle de hanseníase, faz-se necessário que se definam claramente os

critérios de detecção de comprometimento de sensibilidade térmica em lesões suspeitas de hanseníase, para que outras dermatoses, que eventualmente cursem com comprometimento discreto dos limiares de detecção térmicos, como as dermatoses relacionadas à inflamação neurogênica, não sejam confundidas com hanseníase.

Foi estimado que em cinco pacientes, 22,7% da amostra participante, o teste com tubos de água quente e fria não permitiria detectar o comprometimento de sensibilidade térmica. Destes cinco pacientes, três apresentavam sensibilidade tátil preservada ao monofilamento verde e dois ao monofilamento azul. Ou seja, é possível que em pelo menos três pacientes, o comprometimento de sensibilidade da lesão requerido para o diagnóstico de precoce de hanseníase, não tivesse sido detectado, caso se dependesse do teste com tubos de água quente e fria para se proceder à avaliação da sensibilidade térmica das lesões.

De fato, uma desvantagem do teste com tubos de água quente e fria é que não se trata de um teste quantitativo (ZASLANSKY; YARNITSKY, 1998). Ilustrativamente, um paciente com hanseníase e perda leve da sensibilidade térmica poderia responder que sente em sua lesão o toque dos tubos de água à temperatura de 45°C e 25°C ou mesmo o frio do algodão embebido em éter. Talvez, neste mesmo paciente, fosse possível detectar o déficit de sensibilidade térmica se a temperatura da água quente estivesse menos elevada ou a temperatura da água fria estivesse menos reduzida do que às temperaturas padrões preconizadas para o teste. Compreende-se, por isso, a recomendação para que o examinador procure valorizar durante o teste mesmo as respostas vagas dos pacientes como “menos quente” ou “menos frio” (BRASIL, 2002).

É inegável que a comparação entre o TQST e o teste com tubos de água quente e fria só poderia ser adequadamente avaliada caso ambos os testes tivessem sido realizados. Dessa forma, ao se traçar tais comparações, deve-se compreender que os resultados do teste com tubos de água foram inferidos arbitrariamente a partir do próprio TQST, tomando-se a temperatura recomendada para a água dos tubos como valor de corte.

Ainda sobre as lesões, a tendência de piora dos limiares de detecção de calor e frio acompanhando a piora da sensibilidade tátil, demonstrada nos

Gráficos 6 e 7, é condizente com a literatura (VILLARROEL *et al*, 2007) e talvez houvesse significância por meio do teste de Kruskal-Wallis diante de uma amostra maior de pacientes.

Para o cálculo de correlação entre as variáveis representativas de déficits de sensibilidade térmica e as variáveis representativas de desnervação cutânea, optou-se por utilizar a diferença percentual entre os valores obtidos na pele contralateral e na lesão. Este tipo de cálculo neutraliza o efeito que as variações fisiológicas de limiares de detecção térmicos e de densidade de inervação cutânea teriam sobre o cálculo de correlação. Os limiares térmicos variam regionalmente, na dependência de fatores como espessura de epiderme, volume de fluidos fisiológicos cutâneos e densidade de inervação (JAMAL *et al*, 1985).

Seria inapropriado calcular, por exemplo, o déficit de sensibilidade térmica ao frio entre uma lesão cervical e a pele contralateral, como sendo a diferença absoluta entre os dois limiares de detecção de frio obtidos, e comparar este déficit àquele de uma lesão localizada na região maleolar. Colocando-se de outra maneira, por exemplo, a redução absoluta de 10°C em relação à pele contralateral que apresenta um limiar de frio de 30°C é menos significativa que a mesma redução absoluta de 10°C quando observada em relação à pele contralateral com limiar de frio de 15°C.

Compreende-se mais facilmente que a diferença absoluta entre os valores observados na lesão e na pele contralateral deva ser preterida em favor da diferença percentual, quando se assume que a densidade de inervação intraepidérmica apresenta importante variação regional, respeitando gradiente de concentração crânio-caudal, maior no tronco que nos membros e maior na região proximal destes que em sua extremidade distal (LAURIA, 2007). Transpondo os exemplos anteriores, um paciente que apresente redução absoluta de cinco fibras por milímetro de epiderme e em cuja pele contralateral sejam contadas trinta fibras por milímetro de epiderme, demonstra uma redução de densidade de inervação menos significativa que outro paciente, que apresente a mesma redução absoluta de cinco fibras por milímetro de epiderme, mas em cuja epiderme sadia sejam encontradas apenas dez fibras por milímetro.

5.5 Quantificação de fibras neurais intraepidérmicas e subepidérmicas

Os resultados de quantificação de fibras neurais cutâneas foram condizentes com os de outros estudos que já haviam demonstrado redução das fibras finas em biópsias de pele de pacientes com hanseníase, utilizando estimativas semi-quantitativas da densidade de inervação (ANTUNES *et al*, 1997; FACER *et al*, 1998). As médias dos valores de quantificação de fibras neurais finas intraepidérmicas e subepidérmicas foram significativamente diferentes entre os grupos “lesão” e “pele contralateral”.

Ressalte-se que os valores de área total de derme papilar utilizada para o cálculo da porcentagem de área marcada correspondente a fibras subepidérmicas foram comparados entre os grupos “lesão” e “pele contralateral” e não foi detectada diferença. Este resultado é importante por certificar a ausência de um viés decorrente da seleção de maiores áreas de derme papilar total no grupo “lesão”, que poderia gerar uma interpretação falsa de redução da porcentagem de área marcada, correspondente a fibras neurais na lesão, o que induziria os pesquisadores à superestimativa da diferença entre os grupos.

É interessante notar que a desnervação observada nas lesões foi intensa. Em média, as lesões apresentaram 20,5% da quantidade de fibras subepidérmicas e 19,2% da densidade de fibras intraepidérmicas encontradas nas biópsias de pele contralateral. Essa desnervação acentuada foi também homogênea entre todos os pacientes, sobretudo em relação às fibras subepidérmicas. Neste sentido, os coeficientes de variação das diferenças percentuais de fibras subepidérmicas e intraepidérmicas foram de 0,24 e 0,30, respectivamente, o que indica homogeneidade dos valores destas variáveis entre os pacientes participantes.

Diferentemente, os coeficientes de variação das diferenças percentuais dos limiares de detecção de frio, calor, dor ao frio e dor ao calor foram elevados, respectivamente 0,95, 0,76, 1,17 e 0,93, indicando uma importante variação dos valores de cada limiar de sensibilidade térmica na amostra. Por meio destes coeficientes, pode-se depreender que o grau de déficit sensitivo

variou significativamente entre os participantes, enquanto a rarefação de fibras finas cutâneas foi homogeneamente intensa em todos eles.

A quantificação de fibras intraepidérmicas em pele contralateral foi, em média, de 4,7 fibras por milímetro de epiderme. Este valor é semelhante à média de 5,3 encontrada em um trabalho brasileiro realizado com objetivo de padronizar a quantificação de fibras intraepidérmicas na região distal da perna de voluntários saudáveis (MOURA *et al*, 2004), mas é inferior ao encontrado pela maioria dos outros autores. Como exemplo, para a região distal da perna, já foram relatados valores normais médios de 9,6/mm (SMITH *et al*, 2001), 16,3/mm (HOLLAND *et al*, 1997), 11,1/mm (CHIANG *et al*, 2002), 17,8/mm (MCCARTHY *et al*, 1995), 13,8/mm (MCARTHUR *et al*, 1998), 5,2/mm (KOSKINEN *et al*, 2005). Para a região proximal da coxa já foram relatados valores normais médios de 21,1/mm (MCARTHUR *et al*, 1998), 20,3/mm (SMITH *et al*, 2001), 23,8/mm (HOLLAND *et al*, 1997). Até o momento, não há publicações sobre a padronização dos valores de densidade de fibras intraepidérmicas na pele de outras regiões, além destes dos sítios em membros inferiores usados para o estudo de neuropatias de fibras finas.

Foi possível a visualização de fibras intraepidérmicas nas biópsias de pele contralateral em todos os pacientes, em contraste à observação de Facer e outros (1998), que relataram desnervação completa da epiderme em 16 das 28 biópsias de pele contralateral realizadas em pacientes com hanseníase. Todavia, aparentemente, as biópsias de pele contralateral dos pacientes com hanseníase apresentaram uma redução da quantificação de fibras intraepidérmicas, levando-se em conta os valores de referência dos trabalhos supracitados, obtidos a partir de voluntários saudáveis.

Acredita-se que esta redução de fibras intraepidérmicas em regiões de pele não acometidas por lesões de hanseníase seja uma evidência da existência de um mecanismo de patogênese neural que atue de maneira sistêmica, independente da ação topograficamente limitada do infiltrado inflamatório neurotrópico típico da doença. Antunes e colaboradores confirmam que, nas lesões, não há correspondência exata entre as regiões de desnervação e as áreas acometidas por infiltrado inflamatório (ANTUNES *et al*, 1997). Facer e outros (2000) propuseram que a redução de fibras intraepidérmicas nas regiões contralaterais às lesões, estaria relacionada a

uma redução de NGF que ocorreria mesmo na pele contralateral dos pacientes com hanseníase.

Em relação às biópsias das lesões, as fibras intraepidérmicas estavam ausentes nas biópsias de seis pacientes. Nos outros dezesseis, a quantificação de fibras intraepidérmicas da lesão não estava abolida, mas se mostrou reduzida em relação à pele contralateral. Este achado diverge dos resultados de outros autores que observaram desnervação completa da epiderme das lesões de hanseníase em todos (FACER *et al*, 1998) ou quase todos pacientes estudados (DALSGAARD *et al*, 1989).

5.6 Análises de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais

Com base neste trabalho, esperava-se poder delinear um modelo matemático de predição da densidade de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas, tendo como base os resultados obtidos no TQST. Todavia, apesar de aparentemente óbvia, não foi possível detectar a existência de correlação entre as variáveis que representaram o déficit de inervação cutânea e as variáveis que representaram o déficit de sensibilidade térmica. De fato, a análise descritiva destas variáveis já antecipava, por meio da observação cuidadosa de seus coeficientes de variação, que o grau de déficit sensitivo havia variado significativamente entre os participantes, enquanto a rarefação de fibras finas cutâneas havia sido homoganeamente intensa em todos eles.

Amostras de pele provenientes de lesões em que os resultados do TQST demonstraram diferentes graus comprometimento da sensibilidade térmica mostraram intensidades de rarefação neural semelhantes na epiderme e na camada dérmica superficial. Assim, é possível que a ausência de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais decorra do fato de que as variações detectadas nos limiares de sensibilidade térmica estudados estejam relacionadas a variações da densidade de inervação de camadas da pele mais profundas que as camadas epiderme e derme papilar superficial. Entretanto, deve ser

considerado que não foram conduzidas em nossas amostras a análise qualitativa ultraestrutural das terminações nervosas, a investigação da expressão imunocitoquímica dos diversos neurotransmissores envolvidos com controle da dor e da sensibilidade térmica, bem como a expressão de citocinas inflamatórias, fatores que podem estar relacionados ao comprometimento funcional das terminações nervosas cutâneas.

Sabe-se que é possível haver comprometimento funcional das terminações nervosas em lesões iniciais de hanseníase, mesmo diante da integridade anatômica da inervação cutânea (SLG; EN, 1996), ou seja, acredita-se que a positividade à coloração para PGP 9.5 não signifique preservação de sensibilidade térmica. Todavia, este detalhe pareceria mais interessante para explicar a ausência de correlação, caso a análise descritiva das variáveis tivesse apontado comprometimento de sensibilidade térmica sem concomitante redução da densidade da inervação, o que, definitivamente, não foi o caso.

De qualquer forma, a mesma rarefação intensa e homogênea de inervação, que matematicamente parece responder pela ausência de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e quantificação neural, pode valorizar a quantificação de fibras neurais finas cutâneas como um método diagnóstico para hanseníase. Sabe-se que os testes de sensibilidade térmica são dependentes da capacidade de os pacientes responderem corretamente às instruções do examinador, o que pode tornar difícil sua realização em crianças ou em pacientes com dificuldades cognitivas. Sabe-se também que o estudo anátomo-patológico da lesão suspeita pode ter importância definidora para o diagnóstico e é considerado padrão-ouro para tal, todavia pode ser inespecífico (SCOLLARD *et al*, 2006). Tais dificuldades ainda não foram completamente corrigidas por outros exames realizados nas biópsias de lesões, como por exemplo, a pesquisa do microorganismo causador por meio das técnicas de hibridização *in situ* e de reação em cadeia da polimerase (PCR), que têm demonstrado sensibilidade de 45,5% e 66,6%, respectivamente (DAYAL *et al*, 2007).

Neste sentido, a quantificação objetiva de fibras finas cutâneas na pele de pacientes com lesões suspeitas deve ser objeto de estudos que visem

especificamente a sua validação dentro do arsenal propedêutico existente para o diagnóstico de hanseníase.

6 CONCLUSÃO

6.1 Resposta aos objetivos propostos

Os limiares de detecção de frio, calor, dor induzida por frio e dor induzida por calor, avaliados por meio do teste quantitativo de sensibilidade térmica, mostraram-se alterados nas lesões dos pacientes, quando estas foram comparadas às regiões contralaterais livres de lesões.

A densidade de fibras neurais finas intraepidérmicas e subepidérmicas nas lesões de hanseníase demonstrou redução homogênea e intensa em relação à densidade das regiões contralaterais livres de lesões. Houve correlação entre o grau de redução percentual da densidade de fibras intraepidérmicas e o grau de redução percentual da densidade de fibras subepidérmicas.

Não houve correlação entre o grau de comprometimento de sensibilidade térmica e o grau de redução percentual da densidade de fibras neurais finas intraepidérmicas ou subepidérmicas. Enquanto o grau de comprometimento de sensibilidade térmica das lesões demonstrou significativa variabilidade entre os participantes, o grau de redução percentual da densidade de fibras neurais finas intraepidérmicas e subepidérmicas foi intenso e homogêneo na amostra de pacientes.

6.2 Perspectivas para pesquisas futuras

Este estudo permite sugerir que avaliação objetiva da densidade de fibras neurais nas biópsias de pele de pacientes com hanseníase seja um instrumento investigativo adicional na compreensão dos mecanismos patogénéticos envolvendo o sistema nervoso periférico nesta patologia.

Trabalhos que procedam à investigação de outros fatores que possam estar relacionados ao comprometimento funcional das terminações nervosas

cutâneas poderão ajudar na compreensão da correlação entre a densidade de fibras neurais finas cutâneas e os resultados do TQST. Dessa forma, poderão ser importantes a análise qualitativa ultraestrutural das terminações nervosas, a investigação da expressão imunocitoquímica dos diversos neurotransmissores envolvidos com controle da dor e da sensibilidade térmica, bem como a expressão de citocinas inflamatórias na pele de pacientes com hanseníase.

Estudos comparativos em maior escala e multicêntricos que contraponham o teste de sensibilidade térmica por meio de tubos de água quente e fria e o TQST poderão ser úteis para o aprimoramento de ambos os testes com vistas à avaliação dos pacientes com lesão suspeita de hanseníase. Além das questões relacionadas ao custo, para que os analisadores termo-sensórios passem a ser utilizados em larga escala na prática ambulatorial, ainda são necessárias pesquisas que definam os critérios de anormalidade do TQST que permitam a detecção do comprometimento de sensibilidade térmica em lesões de hanseníase, diferenciando-as de lesões de outras dermatopatias.

Diante da capacidade, provida pelos analisadores termo-sensórios, de percepção de pequenas diferenças nos valores dos limiares de detecção de sensibilidade térmica entre dois sítios de pele simétricos e contralaterais, fazem-se necessários estudos que investiguem a possibilidade de existência de um comprometimento discreto dos limiares de detecção térmicos em dermatoses relacionadas à inflamação neurogênica, que são, algumas vezes, diagnósticos diferenciais de hanseníase.

Por fim, os resultados da presente pesquisa apontam que novos trabalhos, visando especificamente à validação da quantificação objetiva de fibras finas cutâneas como método auxiliar para diagnóstico de hanseníase, poderão ser importantes.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A. et al. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 107, n. 6, p. 445-454, 2005.

ALMEIDA, N. Prova do éter em hansenologia. **Hansenologia Internationalis**. V. 8, n. 1, p. 46-53, 1983.

AMERICAN ASSOCIATION OF ELECTRODIAGNOSTIC TECHNOLOGISTS. Technology literature review: Quantitative sensory testing. **Muscle & Nerve**, v. 29, n. 5, p. 734-747, 2004.

ANAND, P. Neurotrophins and peripheral neuropathy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 351, n. 1338, p. 449-454, 1996.

ANTUNES, S. L. G. et al. The expression of NGFr and PGP 9.5 in leprosy reactional cutaneous lesions - An assessment of the nerve fiber status using immunostaining. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 2B, p. 346-352, 2003.

_____. A comparison of the expression of NGFr, PGP 9.5 and NSE in cutaneous lesions of patients with early leprosy using immunohistochemistry. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 65, n. 3, p. 357-365, 1997.

ARAÚJO, M. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-82, maio-jun. 2003.

ARUNTHATHI, S.; SATHEESH, K. K. Does clofazimine have a prophylactic role against neuritis? **Leprosy Review**, v. 68, n. 3, p. 233-241, 1997.

BARTLETT, G. et al. Normal distributions of thermal and vibration sensory thresholds. **Muscle & Nerve**, v. 21, n. 3, p. 367-374, 1998.

BELLKROTOSKI, J.; TOMANCIK, E. The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments. **American Journal of Hand Surgery**, v. 12A, n. 1, p. 155-161, Jan. 1987.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

_____. **Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil 2008**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008a.

_____. **Manual de prevenção de incapacidades: cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008b.

_____. **Hanseníase: guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a.

_____. **Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.

_____. **Programa nacional de controle da hanseníase: relatório de gestão maio de 2007 a dezembro de 2008**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009d.

_____. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15/10/2010.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

CASTRO, I. M. Um instrumento para investigação da sensibilidade térmica da pele. **Hansenologia Internationalis**. v. 3, n. 2, p. 165-167, 1978.

CHAKOUR, M. C. et al. The effect of age on A delta- and C-fibre thermal pain perception. **Pain**, v. 64, n. 1, p. 143-152, 1996.

CHANDNA, R. et al. Does nerve examination improve diagnostic efficacy of the WHO classification of leprosy? **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 74, n. 4, p. 327-30, 2008

CHIANG, M. et al. Cutaneous innervation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. **Neurology**, v. 59, n. 7, p. 1094-8, Oct. 2002.

COHEN, J. A power primer. **Psychological Bulletin**, v. 112, n. 1, p. 155-159, Jul. 1992.

CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. **European Journal of Neurology**, v. 11, n. 3, p. 153-62, Mar. 2004.

DALSGAARD, C. et al. Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. **Histochemistry**, v. 92, n. 5, p. 385-90, 1989.

DAYAL, R. et al. PCR and in-situ hybridization for diagnosis of leprosy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, n. 7, p. 645-648, Jul. 2007.

DYCK, P. J.; O'BRIEN, P. C. Quantitative sensation testing in epidemiological and therapeutic studies of peripheral neuropathy. **Muscle & Nerve**, v. 22, n. 6, p. 659-662, Jun. 1999.

DYCK, P. J. et al. Cool, warm and heat-pain detection thresholds – testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. **Neurology**, v. 43, n. 8, p. 1500-1508, 1993.

FACER, P. et al. Do nerve growth factor-related mechanisms contribute to loss of cutaneous nociception in leprosy? **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 231-238, 2000.

_____. Correlation of quantitative tests of nerve and target organ dysfunction with skin immunohistology in leprosy. **Brain**, v. 121, p. 2239-2247, 1998.

FERNÁNDEZ, J. M. M. Sixth International Congress of Leprosy. **American Medical Association Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 69, n. 5, p. 4, 1954.

FRUHSTORFER, H. et al. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 39, n. 11, p. 1071-1075, 1976.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.

GROSSI, M. A. D. F. et al. A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. Suplemento 2, p. 5, 2008.

GULBENKIAN, S. et al. The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 18, n. 3, p. 235-47, Mar. 1987.

HAGANDER, L. G. et al. Quantitative sensory testing: effect of site and skin temperature on thermal thresholds. **Clinical Neurophysiology**, v. 111, n. 1, p. 17-22, 2000.

HILZ, M. J. et al. Thermal perception thresholds – influence of determination paradigm and reference temperature. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 135-140, 1995.

_____. Quantitative thermal perception testing in adults. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 5, p. 462-471, 1999.

HOLLAND, N. et al. Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. **Neurology**, v. 48, n. 3, p. 708-11, Mar. 1997.

JAMAL, G. A. et al. Na improved automated-method for the measurement of thermal threshold. Normal subjects. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 48, n. 4, p. 354-360, 1985.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 671-682, 2005.

KARANTH, S. S. et al. Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. **Journal of Pathology**, v. 157, n. 1, p. 15-26, 1989.

KOSKINEN, M. et al. A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 7, p. 789-94, Jul. 2005.

LAURIA, G. Recent developments in the management of peripheral neuropathy using skin biopsy. **Revue neurologique**, v. 163, n. 12, p. 1266-70, Dec.2007.

LIANG, Y.; JOHANSSON, O. Light and electron microscopic demonstration of the p75 nerve growth factor receptor in normal human cutaneous nerve fibers: New vistas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 1, p. 114-118, 1998.

LOCKWOOD, D. N. J. et al. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? **Leprosy Review**, v. 78, n. 4, p. 317-320, 2007.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 3, p. 230-235, 2005.

LYON, Sandra. **Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase e o resultado do teste sorológico ML flow**. 2005. 138 f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte.

LYON, S. et al. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. **Leprosy Review**, v. 79, n. 2, p. 162-70, Jun. 2008.

MANZANO, G. M. et al. Brief historical note on the classification of nerve fibers. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 1, p. 117-119, 2008.

MARGARIDO-MARCHESE, L. et al. Hanseníase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Org.) **Tratado de Infectologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 1785.

MCARTHUR, J. et al. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. **Archives of Neurology**, v. 55, n. 12, p. 1513-20, Dec. 1998.

MCCARTHY, B. et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. **Neurology**, v. 45, n. 10, p. 1848-55, Oct. 1995.

MEH, D.; DENISLIC, M. Quantitative assessment of thermal and pain sensitivity. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 127, n. 2, p. 164-169, 1994.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 417-426, 2004.

MOURA, L. et al. Normal pattern of intraepidermal nerve fibers in 30 healthy volunteers with PGP 9.5. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 2A, p. 271-5, Jun. 2004.

MUNGER, B. L.; IDE, C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. **Archives of Histology and Cytology**, v. 51, n. 1, p. 1-34, 1988.

PERIQUET, M. et al. Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1641-7, Nov. 1999.

RIDLEY, D. S. Histological classification and immunological spectrum of leprosy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 5, p. 451-465, 1974.

ROLKE, R. et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Standardized protocol and reference values. **Pain**, v. 123, n. 3, p. 231-243, 2006.

SANTIAGO, S. et al. Neurophysiological studies of thin myelinated (A delta) and unmyelinated (C) fibers: application to peripheral neuropathies. **Neurophysiologie Clinique-Clinical Neurophysiology**, v. 30, n. 1, p. 27-42, 2000.

SARUBI, J. C. **Estudo comparativo das técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico de quatro e seis sítios em casos novos de hanseníase, em serviço de referência de Belo Horizonte**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHEPERS, R. J.; RINGKAMP, M. Thermoreceptors and thermosensitive afferents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 2, p. 177-184, 2010.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-+, 2006.

SHY, M. E. et al. Quantitative sensory testing - Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 60, n. 6, p. 898-904, 2003.

SLG, A.; EN, S. Ultrastructural study of the dermal nerves in the cutaneous macular lesions of patients with early leprosy. **Hansenologia Internationalis**, v. 21, n. 2, p. 14-21, 1996.

SMITH, A. et al. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. **Neurology**, v. 57, n. 9, p. 1701-4, Nov. 2001.

SRINIVASAN, H.; STUMPE, B. Leprosy diagnosis: a device for testing the thermal sensibility of skin lesions in the field **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, n. 6, p. 635-41, 1989.

STEINHOFF, M. et al. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Archives of Dermatology**, v. 139, n. 11, p. 1479-1488, 2003.

VAN BRAKEL, W. H. et al. The INFIR Cohort Study: assessment of sensory and motor neuropathy in leprosy at baseline. **Leprosy Review**, v. 76, n. 4, p. 277-295, Dec. 2005.

_____. Early Diagnosis of Neuropathy in Leprosy-Comparing Diagnostic Tests in a Large Prospective Study (the INFIR Cohort Study). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, Apr. 2008.

VILLARROEL, M. et al. Impaired warm and cold perception thresholds in leprosy skin lesions. **Leprosy Review**, v. 78, n. 2, p. 110-21, Jun. 2007.

_____. Comparative study of the cutaneous sensation of leprosy-suspected lesions using Semmes-Weinstein monofilaments and quantitative thermal testing. **Leprosy Review**, v. 78, n. 2, p. 102-9, Jun. 2007.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 165-172, Mar-Apr. 2007.

WEXLER, R.; MELCHIOR, H. Dorsal sensory impairment in hands and feet of people affected by Hansen's disease in Israel. **Leprosy Review**, v. 78, n. 4, p. 362-368, 2007.

World Health Organization. **Epidemiological Record: global leprosy situation 2009**. WHO, 2009.

YARNITSKY, D.; SPRECHER, E. Thermal testing – normative data and repeatability for various test algorithms. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 125, n. 1, p. 39-45, 1994.

YARNITSKY, D. et al. HEAT PAIN THRESHOLDS - NORMATIVE DATA AND REPEATABILITY. **Pain**, v. 60, n. 3, p. 329-332, 1995.

ZASLANSKY, R.; YARNITSKY, D. Clinical applications of quantitative sensory testing (QST). **Journal of the Neurological Sciences**, v. 153, n. 2, p. 215-238, 1998.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa chamada "Correlação Entre Densidade de Fibras Nervosas em Biópsia de Pele e Teste de Quantificação da Sensibilidade Térmica nas Lesões de Pacientes com Hanseníase". Leia com atenção este documento e tenha certeza de que entendeu e esclareceu suas dúvidas antes de responder ao convite.

Justificativa e objetivo da pesquisa: A hanseníase causa um defeito dos pequenos nervos da pele na área da mancha da doença. Quando os pequenos nervos da pele ficam defeituosos, o paciente pára de sentir frio, calor ou os toques leves na área da mancha. Os exames que testam estes pequenos nervos são muito importantes para o médico dizer que a mancha do paciente é uma mancha de hanseníase. Esta pesquisa tem o objetivo de comparar dois exames que testam os pequenos nervos da pele. O primeiro é o exame térmico, que testa a capacidade de o paciente sentir o calor e o frio na área da mancha. O segundo é a biópsia de pele, que permite que o médico veja e conte os pequenos nervos da pele na área da mancha. Com esta pesquisa nós poderemos saber quantos nervos devem estar defeituosos para que o exame térmico mostre que o paciente não sente frio ou calor na mancha.

Procedimento: Se você aceitar o convite, fará primeiro o teste térmico na área da mancha. O aparelho é encostado na mancha e ficará frio e quente. Você dirá se sente o frio e o calor e o médico vai anotar os resultados do exame. Depois, você fará a biópsia da pele. Um pequeno pedaço de pele na área da mancha será retirado para esta pesquisa. Além disso, o médico pesquisador terá que retirar mais um pequeno pedaço, do tamanho do primeiro, mas agora da pele normal do outro lado do corpo. Este segundo pedaço de pele é importante para que o médico saiba quantos pequenos nervos a área com mancha perdeu, comparada com a pele normal que tem os nervos preservados.

Desconfortos, riscos e benefícios: O exame térmico não causa nenhum desconforto e não apresenta riscos. Para fazer a biópsia é necessário anestésicar a pele de onde será colhido o pequeno pedaço. Isto provoca dor, que dura poucos segundos. A biópsia será feita por médico pesquisador que é dermatologista. A biópsia apresenta pequeno risco de infecção local e no local da pele retirada surgirá uma pequena cicatriz após cerca de duas semanas. Se surgir infecção, o médico que fez a biópsia fará o tratamento adequado em seus retornos ao ambulatório. Os pacientes participantes da pesquisa não terão gastos financeiros, não receberão remuneração e poderão não ter benefícios diretos com os exames. Entretanto, os pesquisadores, após analisar o material de todos os pacientes, poderão conseguir definir melhor as vantagens de cada um dos exames estudados. Isso poderá ajudar outros pacientes no futuro.

Métodos alternativos existentes: Os pacientes que não participam da pesquisa fazem somente o teste dos nervos da pele das manchas com os fios de nylon. Você já fez este exame antes de receber este convite. A diferença do exame com fios de nylon é que ele examina nervos da pele que são mais grossos que os pequenos nervos avaliados na pesquisa. Já se sabe que os pequenos nervos são afetados pela hanseníase mais cedo que os nervos mais grossos. Por isso, os exames que testam os nervos finos são capazes de encontrar defeito em nervos mais cedo que o exame com fios de nylon.

Quanto mais rapidamente o defeito de nervos é encontrado pelo médico, mais rapidamente o diagnóstico de hanseníase é feito e mais rapidamente o tratamento é iniciado.

Acompanhamento e assistência: Se você aceitar o convite, será acompanhado pelo Dr. Ismael Alves Rodrigues Júnior, médico dermatologista, que estará presente na primeira consulta e em seus retornos ao ambulatório. Ele também estará disponível para contato por telefone se você tiver dúvidas em qualquer momento.

Esclarecimentos: Se você aceitar o convite, poderá pedir explicações sobre a pesquisa ou sobre os exames a qualquer momento. Você poderá tirar qualquer dúvida com o Dr. Ismael Alves Rodrigues Júnior durante as consultas ou por telefone a qualquer momento. Se você recusar o convite, contará com os serviços do Ambulatório de Hanseníase do Hospital Eduardo de Menezes da mesma maneira, como se a pesquisa não existisse. Seus exames de rotina, seu tratamento e acompanhamento serão feitos normalmente. Se você aceitar o convite, mas por qualquer motivo mudar de idéia, poderá retirar a sua permissão a qualquer momento. Não serão prejudicados seus exames de rotina, seu tratamento ou seu acompanhamento.

Garantia de sigilo: Os resultados de seus exames serão colocados em um computador e só os pesquisadores terão acesso a eles. Os resultados dessa pesquisa serão publicados em revista científica, dissertação de mestrado e apresentados em congressos científicos, mas a identidade de cada um dos pacientes participantes será mantida em segredo e não será divulgada.

Contatos com o pesquisador responsável: Dr. Ismael Alves Rodrigues Júnior – (31) 33285057 (ambulatório-Hospital Eduardo de Menezes), (31) 84548042 (celular), (31) 34092898 (Laboratório de Neuro-imunopatologia Experimental).

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG): Av. Antônio Carlos, 8627, Campus da UFMG, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Tel: (31) 3409-4502.

Consentimento: Declaro que concordo em participar desta pesquisa e que li, entendi as informações deste documento e discuti minhas dúvidas com o Dr. Ismael Alves Rodrigues Júnior.

Data: ____/____/20____.

/

Nome e assinatura do paciente

/

Nome e assinatura do responsável (em caso de pacientes com idade entre 7 e 12 anos)

/

Nome e assinatura do Médico

APÊNDICE B – Formulário de coleta de dados do TQST**Protocolo de Pesquisa**

“CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE DE FIBRAS NERVOSAS EM BIÓPSIA DE PELE E TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE TÉRMICA NAS LESÕES DE PACIENTES COM HANSENÍASE”.

Nome do paciente: _____

Número de prontuário: _____

Data/Hora: _____

Lesão estudada (localização detalhada): _____

Limiares de percepção ao teste de quantificação térmica (realizados nesta ordem):

A) Frio na pele “em espelho”: _____

B) Frio na lesão: _____

C) Calor na pele “em espelho”: _____

D) Calor na lesão: _____

(mét. dos níveis)

E) Dor ao frio na pele “em espelho”: _____

F) Dor ao frio na lesão: _____

G) Dor ao calor na pele “em espelho”: _____

H) Dor ao calor na lesão: _____

(mét. dos limites)

ANEXO A – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 595/08

Interessado(a): Profa. Rosa Maria Esteves Arantes
Departamento de Patologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de dezembro de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "Correlação entre densidade de fibras nervosas em biópsia de pele e teste de quantificação da sensibilidade térmica nas lesões de pacientes com hanseníase" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes

HOSPITAL EDUARDO DE MENESES - FHEMIG COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Título do Projeto

“Correlação entre densidade de fibras nervosas em biópsia de pele e teste de quantificação da sensibilidade térmica nas lesões de pacientes com hanseníase.”

Pesquisador Responsável: **Ismael Alves Rodrigues Júnior**

Pesquisador colaborador: **Manoel de Figueiredo Villarroel**

Orientador: **Profa. Rosa Maria Esteves Arantes**

Instituições onde será realizada a pesquisa: ICB – Departamento de Patologia e Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG (MG)

PERÍODO PREVISTO DA PESQUISA: 01-01-2009 a 31-12-2010

Objetivo da Pesquisa

Objetivo Geral:

Definir a correlação entre sensibilidade térmica (medida por teste quantitativo) e densidade de fibras nervosas finas intra-epidérmicas e dérmicas em lesões de hanseníase.

Objetivos Específicos:

Estudar a densidade de fibras nervosas nas lesões de pacientes recém diagnosticados com hanseníase através de determinação quantitativa morfométrica de área de fibras imunocoradas por marcador genérico de nervos (PGP9.5).

Comparar a densidade de fibras nervosas finas das lesões dos pacientes com a densidade de fibras nervosas finas das áreas controle contralaterais.

Estudar o padrão de sensibilidade térmica através do teste quantitativo de sensibilidade térmica nas lesões e nas áreas contralaterais.

Estabelecer, se presente, a natureza da correlação entre a densidade de fibras nervosas nas lesões e áreas contralaterais e o respectivo perfil de sensibilidade determinado pelo teste de quantificação de sensibilidade térmica.

METODOLOGIA:

Os pacientes serão selecionados no Ambulatório de Hanseníase do Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. Será um estudo de corte transversal. Será realizada biópsia em região com diagnóstico recente de hanseníase e na área contra-lateral (controle em espelho) para análise do número de fibras nervosas finas de um lado e do outro através de técnicas de imunohistoquímica e análise morfométrica. O paciente será ainda testado do ponto de vista da sensibilidade através de testes tradicionais (utilização de monofilamentos, tubos com água quente e fria, etc) e ao teste de quantificação de sensibilidade térmica por médico neurofisiologista através de analisador termo-sensório TSA-2001 (*existe carta do médico neurofisiologista informando que será colaborador do projeto*).

Critérios de inclusão:

- Pacientes maiores de 7 anos de idade, com diagnóstico de hanseníase, em fases iniciais de evolução, ainda sem tratamento.

- Pacientes com lesões de no mínimo 18 mm de diâmetro, para oferecerem uma área de estimulação térmica adequada ao teste eletrônico.

Crítérios de exclusão:

- Pacientes com evidência clínica de alteração neurológica dos nervos periféricos em virtude de hanseníase;
- Pacientes com história de alcoolismo, diabetes, portadores do HIV ou outras doenças que possam apresentar comprometimento neurológico periférico ou central;
- Serão excluídos pacientes com lesões em face em virtude das dificuldades inerentes à avaliação de sensibilidade na região.

BENEFÍCIOS:

O autor do projeto descreve que existe apenas um trabalho publicado na literatura utilizando esta metodologia e que este não foi bem controlado, pois nos critérios de inclusão existiam pacientes em várias fases da doença, inclusive pacientes em tratamento e pacientes já tratados o que ocasionou confusão nos resultados. Seu trabalho contribuiria para uma maior compreensão do processo da lesão neural da doença, além de trazer contribuições para o diagnóstico e prognóstico da doença.

TCLE: encontra-se com linguagem compreensível. Estão explicados os riscos inerentes aos testes a serem realizados, principalmente dos riscos inerentes a biópsia. O pesquisador informa todos os telefones aos quais o paciente poderá recorrer.

COLETA DE DADOS: não foi apresentado questionário de coleta de dados. É informado que serão utilizados prontuários médicos para coleta de dados.

PARECER:

O projeto parece ser de grande relevância e foi muito bem elaborado. O mesmo apresenta os critérios exigidos do ponto de vista das Resoluções do CONEP e portanto pode ser aprovado. O pesquisador deverá apresentar no prazo de 60 dias os seguintes dados:

- *Apresentar o questionário que será utilizado para coleta de dados*
- *Por envolver menores de idade, constar aprovação do responsável, quando for o caso.*

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2008

Jadel Camponizzi
Presidente do CEP/HEM/FHEMIG