



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
MESTRADO EM NEUROLOGIA

CARLOS JOSÉ MARTINS

**ESTUDO HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS FILETES NERVOSOS
DÉRMICOS NAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE**

RIO DE JANEIRO
2010

CARLOS JOSÉ MARTINS

**ESTUDO HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS FILETES NERVOSOS
DÉRMICOS NAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira

RIO DE JANEIRO
2010

616.8
M379e

Martins, Carlos José,
Estudo histoquímico e imunohistoquímico dos filetes nervosos dérmicos nas diferentes formas de hanseníase. / Carlos José Martins - Rio de Janeiro, 2010.

111 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Mestrado em Neurologia, 2010.

1. Hanseníase. 2. Proteína S-100. 3. Imunohistoquímica. I. Basílio-de-Oliveira, Carlos Alberto. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

CARLOS JOSÉ MARTINS

**ESTUDO HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DOS FILETES NERVOSOS
DÉRMICOS NAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovado em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Fernando Raphael de Almeida Ferry
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Barbosa Durães
Universidade Federal Fluminense - UFF

DEDICATÓRIA

À Deus e aos mentores espirituais, por me guiarem e protegerem a minha vida.

À minha família e em especial à Wilfrida Elina Heisele Alfonso Martins, minha mãe, terna e eterna em meu coração. Seu exemplo de integridade e perseverança, sempre espelharam a minha trajetória na vida e na profissão.

AGRADECIMENTOS

À Dayane, minha companheira, que além de participar ativamente na confecção desta tese, sempre me apoiou e foi compreensiva mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço-te pelo carinho e peço desculpas pelo tempo que deixamos de estar juntos.

Ao Ilustre Prof. Dr. Carlos Alberto Basilio de Oliveira, Professor Titular da Disciplina de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, meu orientador, pelo acolhimento, gentileza e apoio incondicional em todas as fases desta pesquisa. Minha eterna gratidão.

À Prof^ª. Dr^ª. Regina Papais Alvarenga, idealizadora do curso de Mestrado em Neurologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), exemplo de seriedade, competência e profissionalismo, por quem tenho a mais sincera admiração.

Ao Prof. Dr. Heliomar de Azevedo Valle, da Disciplina de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Gaffrée e Gunle (UNIRIO), um ser de luz, sintonizado com a inteligência e sensibilidade; incentivo constante, funcionando como um co-orientador e pelo exemplo forte de profissional competente, minha eterna amizade.

Ao Prof. Ricardo Barbosa Lima, da Disciplina de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (UNIRIO), uma pessoa rara, que reúne sabedoria e ações determinadas numa trajetória dedicada à investigação científica, por sua simplicidade, generosidade, solicitude e pela inestimável contribuição na elaboração deste trabalho, meu carinho, admiração e amizade.

À Prof^ª. Dr^ª. Denise Duprat Neves, por sua generosidade e colaboração, especialmente na análise dos dados estatísticos.

Ao Prof. Aureo do Carmo Filho, pela orientação nas análises estatísticas.

Aos colegas da Disciplina de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, pela compreensão dos momentos ausentes do ambulatório, sem a qual, não teria sido possível concluir este curso.

Às secretárias da Disciplina de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Dora, Jo, Lisete e Nely pela incansável ajuda no levantamento dos prontuários dos pacientes.

Aos funcionários e técnicos da Disciplina de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, pela imensa colaboração na confecção das lâminas histológicas.

À Dra Cristiane Sasajima, pela sua amizade e ajuda.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIRIO, Luiz Eduardo e Heleine, pela amizade, carinho, ajuda, competência e paciência.

À todos os meus amigos e colegas de mestrado que muito me ensinaram e têm uma parcela importante na realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Introdução: O exame histopatológico é importante para o diagnóstico e para classificação do tipo de Hanseníase, orientando para o correto tratamento dos pacientes. O diagnóstico histológico nos grupos tuberculóide e indeterminado é difícil e, frequentemente, impossível, devido a dificuldade de detectar os bacilos com a coloração do Ziehl - Wade ou pelo Fite. A positividade na Hanseníase Tuberculóide (HT) e Hanseníase Borderline (BHT) varia de 0 a 36%, portanto, tornando cerca de dois terços dos casos negativos. Mesmo assim, essa positividade é alcançada depois da busca exaustiva em múltiplos cortes de tecido. Por esse motivo, a demonstração evidente do acometimento neural no infiltrado granulomatoso é considerado um achado importante na Hanseníase Tuberculóide e Hanseníase Borderline Tuberculóide, com quase o mesmo significado do achado de bacilos no nervo. Isso permite a diferenciação de outras granulomatoses cutâneas como a Sarcoidose, Tuberculose, Tubercúlides, Sífilis Tardia e Micoses Profundas, nas quais a destruição dos nervos geralmente não é observada. Entretanto, alterações neurais semelhantes à Hanseníase têm sido encontradas em alguns casos de Sarcoidose, Lúpus Vulgar, Sífilis Tardia, Líquen Plano e Morféia (JACOB et al., 1984; SINGH et al. 1994; BALL; KHO; MARTINKA, 2004). Mesmo assim, a fragmentação neural, num contexto clínico favorável, é um indício diagnóstico da Hanseníase Tuberculóide e Hanseníase Borderline Tuberculóide. Objetivos: O estudo teve como objetivo caracterizar quantitativamente o método mais eficaz na evidência dos filetes nervosos dérmicos, nas diferentes formas clínicas da Hanseníase, utilizando a coloração de rotina Hematoxilina & Eosina e a marcação imunohistoquímica pela proteína S-100. Analisamos e comparamos também a distribuição e o tipo de agressão dos filetes nervosos em relação aos infiltrados inflamatórios dérmicos nos diferentes padrões histopatológicos da Hanseníase e também no grupo da sarcoidose, utilizada como controle. Metodologia: Estudo observacional, transversal e histórico, realizado no período de julho de 2008 a novembro de 2009, que incluiu 57 lâminas histológicas de Hanseníase e 23 lâminas de sarcoidose, utilizadas como controle e obtidas de pacientes matriculados e biopsiados no serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (HUGG/UNIRIO). O material foi corado pelo método de rotina com a Hematoxilina e Eosina e marcado

imunohistoquimicamente com a proteína S-100. As lâminas foram analisadas pelos professores do serviço de Anatomopatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. Conclusões: A marcação imunohistoquímica com a proteína S-100, mostrou-se quantitativamente superior à coloração pelo HE na visualização dos filetes nervosos, sobretudo nos grupos paucibacilares-HT/HBT e no grupo controle. A proteína S-100, também demonstrou que a distribuição dos filetes nervosos, nos padrões 3 (Dentro e Entre os granulomas) e 1 (Dentro dos granulomas), são próprios do grupo paucibacilar-HT/HBT e multibacilar-HBB/HBV/HV e, os padrões número 2 e 3, (Entre os granulomas) e (Dentro e entre dos granulomas), são mais encontrados no grupo controle/sarcoidose. No tipo de lesão neural, os tipos de agressão Infiltrado (A), Fragmentado (B) e Ausente (C), foram próprios dos grupos paucibacilar-HT/HBT e multibacilar-HBB/HBV/HV. Os padrões de nervos Intactos (D) foram vistos nos grupos controle-Sarcoidose e também no grupo paucibacilar-HI.

Palavras-chave: Hanseníase. Proteína S-100. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: The histopathology is important for leprosy diagnosis and classification, suggesting the correct treatment. In indeterminate and tuberculoid leprosy groups, the histology diagnosis is difficult, unfortunately, impossible, due to detecting bacilli difficulty in Ziel-Neelsen or Fite colorations. The positive bacilloscopy in Tuberculoid (HT) and Borderline Tuberculoid Leprosy (BHT) ranges from 0-36%, despite exhaustive search on multiple specimens, resulting in two thirds of negative exams. Therefore, the neural damage on granulomatous infiltrate is an important finding in both groups, meaning almost the same as a positive bacilloscopy on nerve, what differentiate to the others cutaneous granulomatosis as sarcoidosis, tuberculosis, tuberculidosis, Late Syphilis and Deep Mycosis, in which the nerves' destruction is not observed. However, a neural damage similar to leprosy's, have been found in some sarcoidosis, Lupus Vulgaris, Late Syphilis, Lichen Planus and Morphea cases (JACOB et al., 1984; SINGH et al. 1994; BALL; KHO; MARTINKA, 2004). Even so, the neural fragmentation in a favorable clinical context is a diagnostic clue of Tuberculoid and Borderline Tuberculoid Leprosy. **Objectives:** The study objects to characterize quantitatively the most efficient method to evidence dermic fiber nerves, on different leprosy clinical manifestations, by using Hematoxylin & Eosin and S-100 protein immunohistochemical staining. We analyzed the inflammatory infiltrate distribution and aggression on leprosy's different histopathology patterns, comparing to sarcoidosis (control group). **Methodology:** It is a observational, cross-sectional and historical study, conducted from July 2008 to November 2009, including 57 histological slides of leprosy and 23 slides of sarcoidosis, used as controls and from patients enrolled and biopsied in the Hospital Universitário Gaffrée e Guinle of the Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (HUGG/UNIRIO), on Dermatology Department. The material was stained with Hematoxylin & Eosin and protein S-100 scored immunolocalized and analyzed by professors of Pathology Department in Gaffrée e Guinle Hospital. **Conclusions:** The protein S-100 immunohistochemical staining, was quantitatively superior to HE in the visualization of fibers nerves, mainly in the paucibacillary-HT/HBT groups and the control group. The S-100 protein, also showed that in the distribution of fiber nerve, the pattern numbers 3 (Within and Among granuloms) and 1 (Within the granuloms) are specific of paucibacillary-HT/HBT and multibacillary-HBB/HBV/HV groups, and patterns 2

and 3 (Among the granuloms) and (Within and Between the granuloms) are mostly found in paucibacilar-HI group and controls. Regarding the type of neural injury, the findings of aggression infiltrate (A) Fragmented (B) and Absent (C), were characteristic of paucibacillary-HT/HBT and multibacillary-HBB/HBV/HV groups. The patterns of “no damage” on nerves (D) have been seen in controls and also in the paucibacillary-HI group.

Key words: Leprosy. S-100 protein. Immunohistochemical staining.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Lâmina basal com seus componentes e moléculas de adesão	28
Figura 2	Corte transversal de um nervo periférico mostrando o Epineuro, Perineuro e Endoneuro	29
Gráfico 1	Média (+ EPM) do número de filetes com coloração HE e S-100	61
Figura 3A	Vários granulomas do tipo sarcoídico, constituídos por células epitelióides e escassos linfócitos na periferia (100x)	68
Figura 3B	Detalhe do processo inflamatório granulomatoso sarcoídico (200 x)	68
Figura 4A	Filetes nervosos distribuídos entre os granulomas 40x	69
Figura 4B	Detalhe dos filetes nervosos 200x	69
Figuras 5A e 5B	Leve infiltrado inflamatório linfocitário perivascular	70
Figura 5C	Detalhe do filete nervoso intacto	70
Figuras 6A e 6B	Cortes transversais de filetes nervosos intactos	71
Figuras 6C e 6D	Cortes transversais de estruturas fibrilares escuras, sem células inflamatórias no interior	72
Figuras 7A e 7B	Esboço de granuloma, com filete intacto em corte transversal	73
Figuras 8A e 8B	Processo inflamatório infiltrando o perineuro e dissociando a parede do nervo	74
Figuras 9A e 9B	Detalhe da infiltração neural por linfócitos	75
Figuras 10A e 10B	Cortes longitudinais de filetes nervosos, com infiltração do perineuro por linfócitos	76
Figuras 11A, 11B e 11C	Filetes nervosos fragmentados e infiltrados por linfócitos	77
Figuras 12A, 12B, 12C e 12D	Extenso granuloma em forma de raquete, englobando filete nervoso infiltrado	78
Figura 13	Filetes nervosos fragmentados no interior do processo granulomatoso	79
Figuras 14A e 14B	Extenso filete nervoso fragmentado e infiltrado por células linfocitárias	80
Figuras 15A, 15B e 15C	Sequenciamento do extenso nervo fragmentado e infiltrado	81

Figuras 16A e 16B	Filete nervoso no centro do granuloma e infiltrado por abundantes linfócitos	82
Figuras 17A e 17B	Filetes nervosos com intensa infiltração de células mononucleares	83
Figura 18A	Panorâmica do processo inflamatório granulomatoso atingindo até o tecido subcutâneo	84
Figura 18B	Filete nervoso envolvido e infiltrado pelo granuloma de células mononucleares	84
Figura 19A e 19B	Filetes nervosos mostrando fibrilas escuras e células inflamatórias	85
Figuras 20A	Filete nervoso seccionado longitudinalmente e infiltrado por linfócitos - H & E	86
Figuras 20B	Visualização pela marcação com proteína S-100	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley e Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para Hanseníase	38
Tabela 2	Distribuição das 57 lâminas de Hanseníase incluídas no trabalho, de acordo com as seis formas clínicas	52
Tabela 3	Padrões histopatológicos	52
Tabela 4	Localização dos filetes nervosos nos diferentes padrões histopatológicos utilizando a marcação imunohistoquímica pela proteína S-100	62
Tabela 5	Tipo de lesão neural nos diferentes padrões histopatológicos utilizando a marcação imunohistoquímica pela proteína S-100	63
Tabela 6	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total - Localizações Dentro / Dentro e Entre (Hanseníase) x Entre (controle)	65
Tabela 7	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total - Localização Dentro (Hanseníase) x Entre (controle)	65
Tabela 8	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total, excluindo HI (Dentro) x Entre (controle)	66
Tabela 9	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase Total x controle	66
Tabela 10	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase HT/HBT x controle	66
Tabela 11	Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase Total, exceto HI x controle	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Acurácia
aC	Era antes de Cristo
ANOVA	Análise de Variância
B	Borderline ou Dimorfa
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	Boederline Borderline
C1q	Subcomponente do complemento C1
C3d	Fração do complemento
CID	Classificação Internacional de Doenças
DAB	Diamino-benzidina
E	Especificidade
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ O ₂	Água Oxigenada
HBB	Hanseníase Borderline Borderline
HBT	Hanseníase Borderline Tuberculóide
HBV	Hanseníase Borderline Virchowiana
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HI	Hanseníase indeterminada
HT	Hanseníase Tuberculóide
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
I	Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF gama	Interferon gama
kg	Kilograma

L / V	Leporomatosa / Virchowiana
LL	Lepromatoso Lepromatoso
M. avium	Mycobacterium avium
M. leprae	Microbactérium leprae
M. tuberculosis	Microbacterium tuberculosis
Mb	Mega base
MB	Multibacilar
mg	Miligrama
NgCAM	<i>Neural Glia Cell Adhsion Molecule</i>
NGF-R	<i>Nerve Growth Factor</i>
NO	Oxido Nitroso
NRAMP1	<i>Natural Resistance Gene associated to Macrofagus one protein</i>
NSE	Enolase Neuro Específica
OKT6	Anticorpo monoclonal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAP	Anticorpo peroxidase-antiperoxidase
PB	Paucibacilar
PGLs	Antígenos glicolipídicos fenólicos
PQT	Poliquimioterapia
ROI	Reative Oxigen Intermediates
RR	Reação Reversa
S	Sensibilidade
T	Tuberculóide
T CD4+	Linfócito T Auxiliar
T CD8+	Linfócito T Citotócito/Supessor
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Th 0	Célula Auxiliar tipo 0
Th 1	Célula Auxiliar tipo 1
Th 2	Célula Auxiliar tipo 2
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNF β	<i>Tumor Necrosis Factor β</i>
TT	Tuberculóide Tuberculóide
UNIRIO	Univesidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

WHO World Health Organization

α Alfa

β Beta

γ Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	HANSENÍASE - ASPECTOS GERAIS	20
2.1.1	Histórico e Epidemiologia	21
2.1.2	Mycobacterium leprae	23
2.1.3	Hipóteses da Agressão Neural na Hanseníase	25
2.1.4	As Principais Características do Sistema Nervoso Periférico	25
2.1.5	Interação do Micobacterium Leprae com SNP	27
2.2	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	29
2.3	FORMAS CLÍNICAS	32
2.3.1	Classificação de Ridley e Jopling (1966)	33
2.3.2	Classificação da OMS	37
2.4	DIAGNÓSTICO	38
2.5	TRATAMENTO	39
2.6	PREVENÇÃO	40
2.7	ESTADOS REACIONAIS	41
3	IMUNOHISTOQUÍMICA	43
4	PROTEÍNA S-100	46
5	OBJETIVOS	50
5.1	OBJETIVO GERAL	50
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
6	METODOLOGIA	51
6.1	MATERIAL	51
6.1.1	Definição dos padrões histopatológicos	53
6.1.2	Localização histológica dos filetes nervosos em relação aos infiltrados inflamatórios	54
6.1.3	Tipo de agressão histológica dos filetes nervosos	54
6.1.4	Doença utilizada como controle: sarcoidose	55
6.2	MÉTODOS	56
6.2.1	Imunoperoxidase (PAP) - para pesquisas da proteína S-100	57
7	ASPECTOS ÉTICOS	60
8	RESULTADOS	61
8.1	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	68

9	DISCUSSÃO	87
10	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A - Relação das lâminas estudadas e grupos histopatológicos	109
	ANEXO A - Aprovação do CEP-HUGG	111

1 INTRODUÇÃO

A Hanseníase é mais facilmente diagnosticada quando o *Mycobacterium leprae* é demonstrado nas lesões, mas, frequentemente isso é inviável nas formas da Hanseníase indeterminada (HI) e da Hanseníase tuberculóide (HT), nas quais o *M. leprae* raramente é detectado, visto que, nessas formas clínicas, o número de bacilos é escasso. Nesses casos, a evidência histológica de neurite é amplamente aceita como um achado de HT e de HI. Entretanto, identificar filetes nervosos em meio a um infiltrado linfocitário, no caso de HI, ou, no interior de um granuloma, no caso de HT, pela coloração de rotina com a Hematoxilina & Eosina pode ser difícil. A importância de caracterizar a neurite na Hanseníase torna-se ainda maior quando se sabe que existem semelhanças morfológicas clínicas e histopatológicas da Hanseníase, sobretudo a forma tuberculóide, com outras dermatoses granulomatosas, tais como lupus vulgar, sífilis tardia e sarcoidose, nas quais os quadros histopatológicos não estão, habitualmente, associados com neurite.

Existem relatos na literatura que enfatizam a importância da marcação imunohistoquímica pela proteína S-100 nas biópsias de pele, como auxiliar na identificação de filetes nervosos em meio a reação inflamatória, destacando-se assim a evidência histopatológica da neurite e, conseqüentemente direcionando o diagnóstico para a infecção, particularmente a Hanseníase tuberculóide.

A proteína S-100 é um marcador imunohistoquímico das células de Schwann dos nervos e foi usada para delinear filetes nervosos nas biópsias de lesões cutâneas, uma vez que ela destaca estas estruturas e seus fragmentos nos cortes teciduais (FLEURY; BACCHI, 1987; JOB et al., 1990; SINGH et al., 1994).

A proteína S-100 também é encontrada no tecido nervoso normal (neurônios e célula gliais), melanócitos, células de Langerhans da pele, células mioepiteliais e ductais das glândulas sudoríparas, e algumas outras células.

O autor desta tese, atuando na área da dermatologia clínica, tem por objetivo, dar continuidade a esta linha de pesquisa: filetes nervosos, proteína S-100 e Hanseníase, sobretudo, baseado em alguns trabalhos (THOMAS et al., 1999; GUPTA et al., 2006) que descrevem a importância de se avaliar a distribuição dos filetes nervosos em relação aos granulomas inflamatórios e também o tipo de lesão deste nervo, que em determinadas ocasiões, podem ser quesitos úteis para confirmar ou descartar uma hipótese de Hanseníase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HANSENÍASE - ASPECTOS GERAIS

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica, que encontra no ser humano e no tatu, seus únicos hospedeiros naturais. Inclui-se na categoria das inflamações crônicas granulomatosas, pois o padrão de reação é basicamente o agregado de macrófagos modificados, com quantidade variadas de outras células inflamatórias, em especial os linfócitos.

A doença afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico. Tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) intracelular obrigatório, de lenta multiplicação e cujo cultivo *in vitro* ainda não foi possível (ARAÚJO, 2003; MATSUO, 2005).

O bacilo foi identificado pela primeira vez pelo cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873 (PALLAMARY, 1995). A transmissão da doença faz-se pelo contatato intenso e prolongado de uma pessoa infectada que apresenta carga bacilar elevada e o indivíduo saudável, através de secreções naso-orofaríngeas (WHO, 2009b).

Acredita-se que o período de incubação da doença seja prolongado, estimando um tempo igual ou maior que cinco anos a partir do contato para o aparecimento da Hanseníase (WHO, 2009c).

A maioria das pessoas não desenvolve Hanseníase, mesmo após exposição maciça ao bacilo e, estima-se uma ligeira predominância da infecção no gênero masculino em relação ao feminino em torno de 1,5 - 2, respectivamente (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; ALCAIS et al., 2005).

O sintoma principal que o portador vai apresentar são manchas na pele com alteração da sensibilidade local; inicialmente de alteração da sensibilidade térmica, em seguida da dolorosa e por último da sensibilidade tátil e motora, além de espessamento do nervo periférico próximo ao sítio da lesão cutânea (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

No Brasil, adota-se oficialmente o termo Hanseníase desde 1976 de acordo com a lei nº 9010 - DO de 30/3/95, em substituição ao termo "Lepra" ou aos que a ela se referem nos documentos oficiais, com o objetivo de reduzir o estigma associado ao portador da doença ou de seus familiares (MORHAN, 2009).

2.1.1 Histórico e Epidemiologia

A Hanseníase, originalmente conhecida como Lepra, é provavelmente, uma das doenças mais antigas registradas na literatura. Os primeiros relatos da doença datam do ano 600 aC., com casos existentes na China, Egito e Índia. Supõe-se, no entanto, que a origem da doença seja o Continente Africano (MONOT et al., 2005). Textos destas regiões e evidências objetivas como análise de esqueletos, sugerem a existência da doença há cerca de três mil ou quatro mil anos (EIDT, 2004). A existência da Hanseníase em outras regiões, em tempos antigos, é encontrada em relatos, porém são frutos de erros de tradução (OPROMOLLA, 2000).

O termo *facies leonina* foi introduzido no ano de 150, por Arateus em seu trabalho “Terapêutica de Afecções Crônicas”. Na mesma obra, compara a pele dos doentes à pele de elefante, dando a Hanseníase o nome de elefantíase.

Durante a Idade Média, a Hanseníase teve alta incidência na Europa e Oriente Médio, sendo criados asilos para os portadores da doença. A melhoria nas condições sociais durante a Idade Moderna e Contemporânea fez com que houvesse uma queda da endemia na Europa. Os focos endêmicos na Ásia e África foram mantidos e a Hanseníase foi trazida ao Novo Mundo com a colonização e o tráfico de escravos. No Brasil, os primeiros relatos datam do final do século XVIII (EIDT, 2004), e nesta mesma época, são construídos os hospitais de “lázarus”. Nesta ocasião, foi iniciado um modelo isolacionista que mais tarde seria caracterizado pelos asilos-colônia. Estes asilos ocupavam áreas extensas, com plantações, criação de animais, prefeitura, policiamento, cadeia, cassino, igreja e oficinas. O serviço nas colônias era precário, sendo prestado pelos próprios doentes. Toda pessoa com o diagnóstico de Hanseníase era encaminhada para os asilos e só poderia sair de lá após a alta de um serviço médico oficial.

Em 1940, com o advento da sulfona como medida preventiva da disseminação da Hanseníase, as políticas governamentais começaram a mudar. Em 1962, o isolamento compulsório foi abolido e gradativamente os portões foram abertos aos pacientes que desejassem seguir o tratamento ambulatorial, muitos dos quais preferiram permanecer por terem perdido o convívio social e pelo estigma criado pela doença (MARZLIAK et al., 2008).

Hoje a doença encontra-se distribuída praticamente em todos os países da África, Ásia e América Latina. Na Europa não se tem registro de casos novos, segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2005.

Na América do Norte (EUA) registram novos casos, mas a prevalência encontra-se inferior a 1:10000 (hab.) habitantes. Em relação aos EUA, segundo dados oficiais, 7029 casos foram identificados no período entre 1975 a 2005, mantendo nestes anos uma prevalência inferior a 1:10000 hab. (NATIONAL HANSEN'S DISEASE PROGRAM DATA STATISTICS, 2009). Estes dados indicam que a doença nestes continentes está sob controle não representando problema de saúde pública conforma os critérios da OMS.

Com a introdução da poliquimioterapia (PQT) para tratamento da doença no início da década de 80, o número global de casos identificados, que na época era em torno de 5,4 milhões distribuídos em 122 países endêmicos, reduziu drasticamente para 641.091 em 2000, com 107 países atingindo a meta proposta pela OMS (JACOBSON; KRAHENBUHL, 2009). O grande sucesso da PQT levou a OMS a lançar, em Maio de 1991, durante o 44º World Health Assembly, uma campanha mundial para eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública até o ano 2000. A iniciativa reforçou a queda na prevalência, porém, no começo de 2008, o último levantamento da OMS mostra que o objetivo de eliminação ainda precisa ser alcançado: a prevalência da doença foi de 212.802 casos, com três países apresentando taxa acima de 1:10000 hab - Brasil, Nepal e Timor Leste - apresentando respectivamente uma prevalência de 2,4, 1,18 e 1,23 (WHO, 2009a; WHO, 2008).

O Brasil encontra-se entre esses três países, e é aquele com a maior prevalência da doença, com taxa de 2,4: 10000 hab e com 45.847 casos detectados, no começo de 2008. No estado do Rio de Janeiro, as taxas de prevalência da Hanseníase encontram-se muito próximas das expectativas da OMS. No ano de 2008 foram detectados 1880 novos casos, em relação aos 2.552 casos de 2007, com coeficiente de detecção geral de 11,84/100.000 habitantes e 14,31/100.000 habitantes respectivamente e uma prevalência de 1,46/10000 hab. (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008a; 2009).

Atualmente, a Hanseníase permanece como problema de saúde pública em quinze países situados na Ásia, África e América do Sul. Seis países (Brasil, Índia, Madagascar, Mianmar, Moçambique e Nepal) são responsáveis por 83 % do número

total de casos e por 88% dos casos novos de Hanseníase. Destes países, a Índia merece destaque, pois sozinha é responsável por 64 % da prevalência e por 78% dos casos novos (WHO, 2009a).

O número de casos registrados no mundo durante o ano de 2008 apresentou uma queda de 4 % em relação a 2007, seguindo a tendência do ano anterior. Os esforços ainda visam eliminar a Hanseníase em nível nacional nos países endêmicos, e em um nível local, naqueles que ainda apresentam áreas endêmicas (WHO,2008; WHO, 2009a). No Brasil, a queda foi de apenas 2,8% sendo registrados 38.992 casos, 2910 destes em menores de 15 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, um caso de Hanseníase é definido quando uma pessoa apresenta uma ou mais das seguintes características: uma ou mais lesões de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de um ou mais nervos com espessamento neural e baciloscopia positiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008b).

2.1.2 *Mycobacterium leprae*

O bacilo causador da Hanseníase foi identificado pela primeira vez em 1873 pelo cientista norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, sendo por este motivo chamado de bacilo de Hansen (PALLAMARY, 1995). O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é um microorganismo intracelular obrigatório, álcool-ácido resistente (BAAR), móvel, de conformação levemente curva e que mede em torno de 2- μ micra por 0,5 μ micra. O fato do bacilo não ser cultivável em meio artificial, além de intrigante cientificamente, tem sido um fator limitante clássico da pesquisa em Hanseníase. Tipicamente, os estudos sobre o metabolismo do *M. leprae* e da resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção são feitos ou por comparação com outras micobactérias cultiváveis, tais como, o *M. tuberculosis*, *M. avium*, ou utilizando bacilos mantidos por inoculação em patas de camundongo timentizados, ou ainda, a partir de tecido infectado de tatu, sem outro hospedeiro natural (SCOLLARD et al., 2006).

O *M. leprae* é o microorganismo conhecido que apresenta o tempo mais longo de multiplicação, em torno de 14 dias, o que seria uma explicação plausível para o longo período de incubação da doença (COLE et al., 2001).

Sabe-se que a composição da parede celular é semelhante em todas as bactérias, sendo esta parede composta por ligações covalentes de complexos de ácido micólico, arabinogalactanas e peptidoglicanas. No entanto, na composição da parede celular do *M. leprae* encontram-se peptidoglicans e glicolípídeos fenólicos (PGLs) que conferem especificidade imunológica ao bacilo, em particular, o PGLs (SCOLLARD et al., 2006).

O bacilo tem tropismo pelas células fagocitárias e de Schwann da bainha de mielina que reveste os nervos periféricos. Este neurotropismo é atribuído à ligação do *M. leprae* com a laminina alfa 2 da membrana basal anexa às células de Schwann. O complexo *M. leprae*/laminina liga-se então à alfa-dextroglicana, uma proteína de membrana da célula de Schwann em um evento que medeia a invasão celular (RAMBUKKANA et al., 1997; RAMBUKKANA, 2000).

As células de Schwann são incapazes de digerir os patógenos e os agentes terapêuticos têm dificuldade de atingir os tecidos-alvo nervosos. O estímulo imunológico gerado pela presença do *M. leprae* somado à desmielinização dos nervos periféricos, leva ao dano neural (SCOLLARD et al., 2006).

Com o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, ficou evidente uma dramática redução de seu material genético. Comparando com seu parente mais próximo, o genoma do *M. leprae* apresenta em torno de 3,27 megabases (Mb) contra 4,4 Mb do *M. tuberculosis*, ocupado parcialmente por 1.116 pseudo-genes inertes na tradução de proteínas. Análises comparativas detectaram apenas 391 espécies de proteínas solúveis codificadas pelo genoma do *M. leprae*, em comparação com aproximadamente 1800 do *M. tuberculosis* (COLE et al., 2001).

Esta evolução redutiva do genoma do *M. leprae* contribui para a eliminação de importantes funções do seu metabolismo, talvez justificando peculiaridades, tais como o fato do bacilo não ser cultivável, ter um tempo de duplicação muito longo e ter se firmando como parasita intracelular obrigatório.

2.1.3 Hipóteses da Agressão Neural na Hanseníase

Estima-se, hoje, a existência de 3.000.000 de doentes no mundo, com incapacidade tipo 2 permanente, enquanto que, no Brasil, há 55.000 casos, mesmo após o tratamento poliquimioterápico (PQT) completo.

Sabe-se que 30% da destruição de fibras nervosas são necessárias para inferir manifestação clínica.

A agressão nervosa na Hanseníase pode ocorrer de duas formas. A primeira delas é comum tanto à forma paucibacilar quanto à multibacilar, ocorrendo no início da doença e as células inflamatórias estão ausentes. Já a segunda forma, é tardia e com presença do processo inflamatório, podendo haver o desenvolvimento de autoimunidade, citotoxicidade, com presença de ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*) e NO (*Óxido nítrico*), fibroblastos, NGF-R (*Nerve Growth Factor*), NgCAM (*Neural Glia Cell Adhesion Molecule*), Interferon gamma e TGF- β (*Transforming growth factor beta*), TNF- α e TNF β (*Tumor Necrosis Factors*), IL-6, IL-8, IL-12 e IL-10 (Interleucinas) e metalo proteinases matriciais (CHACHA et al., 2009).

2.1.4 As Principais Características do Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso periférico é composto pelas fibras nervosas, formadas por um ou mais axônios, envoltos pelas células de Schwann, mantidas pelo endoneuro, mais material amorfo da matriz extracelular, capilares, fibroblastos e mastócitos, assim como o epineuro e o perineuro.

Dentro da bainha perineural, os axônios e as células de Schwann são envolvidos pela lâmina basal, representada por uma organização especial da matriz extracelular e composta por várias moléculas secretadas por múltiplas células, dentre elas, as de Schwann.

A lâmina basal, através de interações com receptores da membrana celular, participa no metabolismo celular, na organização das proteínas das membranas plasmáticas, na migração celular durante a embriogênese, na diferenciação celular e na influência da regeneração axonal, além de possuir funções estruturais e sinalizadoras.

A laminina, um dos componentes da lâmina basal, é uma molécula grande e flexível, formada por três cadeias longas de polipeptídios (α , β e γ), em forma de cruz assimétrica, mantidas unidas por pontes de dissulfetos. Conhecem-se, até o momento, um total de 15 isoformas de lamininas.

A lâmina basal e as lamininas são importantes para o sistema nervoso periférico. Além de programarem a síntese da mielina pelas células de Schwann, elas contribuem no correto desenvolvimento do sistema neural embrionário e garantem a integridade e a interação com os componentes da matriz extracelular.

Em casos de distrofias musculares e neuropatias periféricas, há ausência de uma das isoformas, a laminina-2, provocando a descontinuidade da lâmina basal, desmielinização e diminuição na condução dos estímulos, uma vez que as células de Schwann se tornam incapazes de controlar esses processos, porque, dentro do axônio, seu número diminui e a proliferação fica mais lenta.

As lamininas, na matriz extracelular, se ligam ao colágeno IV, à perlecana e às entactinas e aos receptores de superfície celular, em particular, às integrinas.

As integrinas são formadas por duas subunidades: α e β , e funcionam como receptores transmembrânicos heterodiméricos na manutenção dos contatos morfológicos entre a matriz extracelular e o cito esqueleto, para a conservação da arquitetura celular e do equilíbrio do meio interno.

Estão localizados em sítios denominados "áreas de adesão focal", onde a sua porção intracitoplasmática mantém contato com o citoesqueleto e, no meio extracelular, agem primariamente como receptores de colágeno, laminina e fibronectina cujos ligantes podem unir-se a diferentes tipos de integrinas.

As alterações das expressões das lamininas e integrinas são de tal importância que podem ser usadas para caracterizar a evolução e a gravidade em casos de neuropatias em humanos e ratos.

Dentre outras moléculas expressas no sistema nervoso periférico, destaca-se a proteína S-100, a qual compreende 21 diferentes isoformas, dentre elas, a S-100 α e S-100 β são as principais presentes no tecido nervoso. É um dímero altamente ácido, hidrossolúvel, com massa molecular de 21kDa, que mostra forte afinidade ao cálcio, e pertence à família das proteínas moduladoras, encontradas exclusivamente em vertebrados. Apresentam-se em células gliais, células de Schwann, melanócitos, células de Langherans, dendrócitos dérmicos, histiócitos, adipócitos, células mioepiteliais e algumas células epiteliais de glândulas.

A proteína S-100 participa de atividades reguladoras intra e extracelulares, inibe a fosforilação e regula a estabilidade do citoesqueleto, alterando seu metabolismo, por meio de atividades enzimáticas, incluindo a homeostase do cálcio.

Quanto às suas funções extracelulares, exerce influências sobre as células inflamatórias, neurônios, astrócitos, células gliais, endoteliais e epiteliais. Demonstrou-se em humanos e cobaias, que a expressão da S-100, nos corpúsculos de Meissner e Paccini, é irregular, após a compressão ou secção do nervo. Sua expressão tem sido utilizada nos trabalhos envolvendo a Hanseníase, sobretudo, com o objetivo de melhor diagnosticar a doença, particularmente, nas formas indeterminada e tuberculoide com baciloscopia negativa.

Fleury e Bacchi (1987) detectaram alteração da expressão da proteína S-100 em 8 casos (88,8%) de 9 casos com granuloma histopatológico inespecífico, sem bacilo. Singh e colaboradores (1994), ao estudar as dermatoses granulomatosas sugeriram a utilidade da proteína S-100, na elucidação diagnóstica da Hanseníase.

Thomas e colaboradores (1999) empregaram o método da expressão da proteína S-100 também em doenças granulomatosas, logo concluiu que era útil na exclusão da Hanseníase, precisamente quando as terminações nervosas apresentaram-se íntegras.

Outro importante receptor da célula de Schwann é a dextróglicana originariamente isolada dos músculos esqueléticos, é um receptor da laminina-2, que mantém a adesão da lâmina basal da matriz extracelular com a membrana celular da célula de Schwann.

Com a ligação do *Mycobacterium leprae* à laminina-2, é possível que a dextróglicana participe no processo de desmielinização e na depressão axonal na Hanseníase, com o mecanismo semelhante à ação das integrinas, particularmente da $\beta 1$ (SHETTY; MISTRY; ANTIA, 2000; CHACHA et al., 2009).

2.1.5 Interação do *Micobacterium Leprae* com SNP

A afinidade do *Micobacterium leprae* pelos nervos periféricos é conhecida e estudos recentes demonstram que a ligação da bactéria às células de Schwann, induz a desmielinização, em particular no tipo não-mielinizado das células de Schwann, cujas ligações são mais intensas. Nestas células, o *Micobacterium leprae*

encontra proteção contra respostas imunes do hospedeiro e um local extremamente favorável à sua proliferação e sobrevivência (SPIERINGS et al., 2000).

Há evidências de que na Hanseníase, a invasão do organismo pela bactéria decorra da ligação entre o *Micobacterium leprae* e a célula de Schwann na lâmina basal da matriz extracelular. Especificamente, esta micobactéria apresenta o glicolípido felólico-1 (PGL-1) e estudos demonstram que a forma purificada do PGL-1 liga-se particularmente à cadeia α 2 da laminina-2.

Em síntese, os mecanismos de ação do *Micobacterium leprae* ainda não foram completamente elucidados e aceitos. A agressão da micobactéria sobre a matriz extracelular do sistema nervoso periférico provoca quebra da ligação entre a lâmina basal e células de Schwann, deteriorando a integridade das fibras nervosas e alterando funções fisiológicas e neuronais (CHACHA et al., 2009).

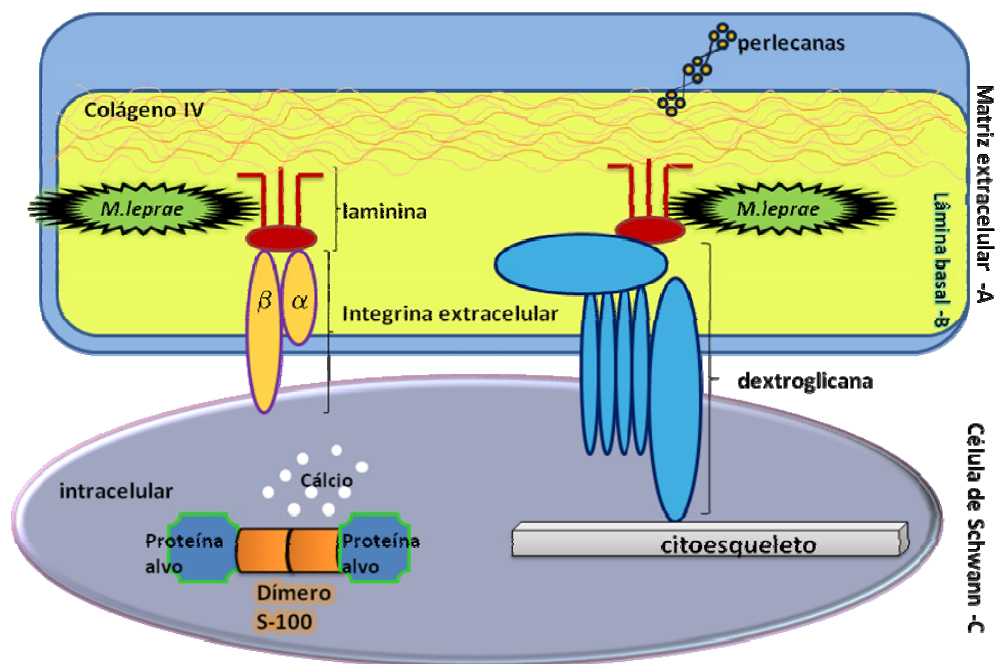


Figura 1: Lâmina basal com seus componentes e moléculas de adesão
A - Matriz extracelular; B - Lâmina basal; C - Célula de Schwann (CHACHA et al., 2009)

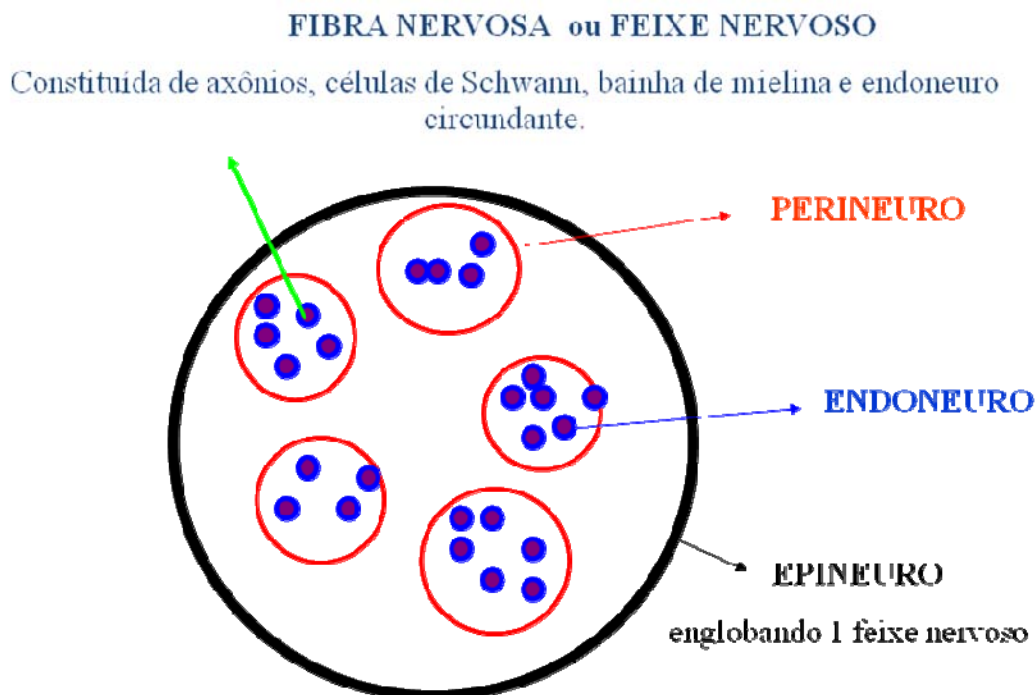


Figura 2: Corte transversal de um nervo periférico mostrando o Epineuro, Perineuro e Endoneuro (Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008)

2.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

O *M. leprae* é um microorganismo de alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, embora consiga infectar grande número de indivíduos, somente uma pequena parcela irá desenvolver doença. E mesmo entre aqueles que adoecem, as manifestações clínicas e histopatológicas compreendidas entre as formas polares desta doença são as mais variadas. As características clínicas da doença refletem a diversidade da patologia, a qual depende do equilíbrio entre a multiplicação bacilar e resposta imune do hospedeiro. Somente através de uma “visão imunológica” podemos entender como e porque das diferentes reações do hospedeiro frente a um único agente etiológico. A resposta imune específica, desencadeada pelo *M. leprae*, não só determina o curso da infecção como a expressão das diversas formas clínicas da doença.

Assim como em outras doenças causadas por microorganismos intracelulares obrigatórios, a Hanseníase exige do hospedeiro uma resposta imune celular eficiente. Logo, uma falha na imunidade celular específica favorece uma

proliferação indiscriminada de bacilos, justificando a existência das formas mais graves da doença, como as encontradas no pólo lepromatoso ou virchowiano.

Entretanto, ainda que a imunidade celular assuma maior importância no controle da Hanseníase, esta se encontra intimamente ligada a imunidade humoral. A análise isolada de qualquer uma delas tem um caráter estritamente ditático, uma vez que ambas são ativadas simultaneamente e se interrelacionam (LYRA, 2004).

O reconhecimento de duas populações distintas de linfócitos T auxiliares (Th-1 e Th-2) trouxe novas possibilidades sobre os mecanismos reguladores envolvidos na resposta imune (MODLIN, 1994; MISRA et al., 1995).

Admite-se que o padrão de produção de linfocinas do tipo Th-1 determina uma resposta imune celular efetiva, que cursa com predomínio de linfócitos T CD4+, formação de granulomas e ação antibacteriana eficaz. Em contrapartida, no padrão Th-2, ocorre predomínio de linfócitos T CD8+ associado a uma resposta celular inadequada, que permite franca multiplicação bacilar, resultando em infecção progressiva.

Os pacientes TT e BT apresentam resposta do tipo Th-1. Já os pacientes BL e LL, com imunidade deficitária, apresentam resposta do tipo Th-2, que leva a um estímulo na produção de anticorpos por linfócitos B (MOSMANN; COFFMAN, 1989).

Os linfócitos Th-1 secretam IL-2 e INF- γ enquanto os linfócitos Th-2 produzem basicamente IL-4, IL-5 e IL-10. Ambas as sub-populações linfocitárias têm origem a partir de um padrão comum TH-0. A diferenciação em Th-1 seria influenciada pela presença de INF γ e IL-2 (SIELING et al., 1994), enquanto a IL-4 teria a capacidade de induzir a diferenciação no padrão Th-2.

Entretanto, os padrões de produção de linfocinas do tipo Th-1, Th-2 e Th-0 têm sido mais bem demonstrados em modelos experimentais utilizando murinos do que em modelos humanos. Nestes casos não há consenso entre os autores. Howe e colaboradores (1995) observaram um padrão de linfocinas heterogêneo, distinto dos tipos Th-1, Th-2 e Th-0, ao estudar a pele e o sangue periférico de pacientes com Hanseníase.

Outros fatores ainda não tão bem estabelecidos também parecem influenciar na resposta imune do hospedeiro, como a carga bacilar (GODAL; LOFGREN; NEGASSI, 1972), o tempo de exposição aos antígenos bacterianos, a coexistência de infecções superimpostas (PARRONCHI et al, 1991) e uma predisposição

genética, envolvendo genes implicados com a resistência ou susceptibilidade a agentes infecciosos (MORAES et al., 2001).

Genes como o da resistência natural associado a proteína 1 do macrófago (NRAMP1 e TNF- α seriam capazes de induzir resposta imune inata e adquirida relacionada com resistência contra micobactérias (SANTOS et al., 2000; MORAES et al., 2001).

Moraes e colaboradores (2001) sugerem que o alelo TNF 2 pode estar associado a maior produção de TNF- α que, por sua vez, estaria relacionada a uma resposta mais intensa à reação lepromínica (teste de Mitsuda).

Pacientes tuberculóides mostram índices de TNF- α mais elevados quando comparados com lepromatosos. Corroborando estes achados, Moraes e colaboradores (2001) encontraram níveis crescentes do alelo TNF 2 em pacientes com formas resistentes de Hanseníase TT e BT.

Algumas citocinas desempenham papel chave no orquestramento da resposta imune.

O INF- γ apresenta importante ação como mediador da resposta imune.

É produzido por linfócitos T ativados e está relacionado com a capacidade microbicida dos fagócitos mononucleares da geração de radicais livres de oxigênio, peróxidos e superperóxidos. Encontra-se com maior frequência nas formas resistentes de Hanseníase, estando intimamente relacionado à resposta imune efetiva (KAWAMURA et al., 1992).

O TNF- α é uma citocina que possui amplas ações biológicas, tais como, inibição de crescimento tumoral e proteção contra agentes infecciosos, além de ser importante mediador de respostas inflamatórias e do choque séptico. Portanto, a produção excessiva de TNF- α pode ser deletéria, levando inclusive a falência orgânica múltipla e morte.

Em virtude destes efeitos deletérios e benéficos, é necessário haver um rigoroso controle desta citocina por parte do organismo.

Alterações relacionadas à transcrição gênica e produção desta proteína estão intimamente ligadas às complicações relacionadas a respostas inflamatórias agudas em uma série de doenças.

O TNF- α é uma molécula pró-inflamatória capaz de mediar a expressão de molécula de adesão e migração leucocitária na pele. O TNF- α tem um papel fundamental na resposta imunológica contra o *M. leprae*, entretanto, também tem

mostrado ter grande importância na gênese dos estados reacionais (SAMPAIO, 2003).

2.3 FORMAS CLÍNICAS

Desde a mais remota época, sempre se buscou classificar a Hanseníase de acordo com suas formas clínicas. As descrições mais antigas são oriundas da China e Índia e datam do século VI aC . O tratado indiano Sushra Samhita, escrito por volta do ano 600 aC, foi o primeiro a reconhecer diferentes formas da doença (HASTINGS; OPROMOLLA, 1994): Vat Rakta, forma clínica com alterações sensoriais e deformidades, porém sem lesões cutâneas e Aruna Kushta, esta subdividida em duas variedades com lesões cutâneas, sendo a primeira com alterações sensoriais e a outra com predomínio de ulceração.

Danielssen e Boeck (1848) dividiram a Hanseníase em duas formas: nodular e anestésica. Hansen e Looft (1895) classificaram esta doença em Lepra tuberosa e máculo-anestésica, a fim de fazer referência as lesões de pele também presentes nestas formas clínicas. Neisser (1903) dividiu a doença em três formas: Lepra tuberosa, cutânea e nervosa. Darier, em 1923, foi o primeiro a adotar o termo tuberculóide em relação à Lepra. Em 1931, nas Filipinas (Manila), houve a primeira tentativa em uniformizar a classificação da Hanseníase. O Congresso Internacional de Lepra no Cairo (1938) aperfeiçoou a classificação de Manila, adotando o termo lepromatoso para a forma até então conhecida como cutânea e dividindo a forma neural em 3 subtipos: neuro-macular simples, neuro-macular tuberculóide e neuro-anestésica. Posteriormente, diversas classificações foram propostas, sendo dignas de nota a do II Congresso Pan Americano de Lepra no Rio de Janeiro (1946), a de Havana (1948), onde o conceito de proposto por Rabello em dividir a doença em duas formas polares foi aceito, e a de Madrid que admitia a presença de um novo grupo conhecido como dimorfo (Borderline, que seria uma forma intermediária entre os dois extremos (tuberculóide e lepromatosa) (LYRA, 2004). A classificação de Madrid (1953) admitia ainda a forma indeterminada ou indiferenciada, capaz de evoluir para qualquer espectro clínico. Ridley e Jopling (1962) propuseram uma nova classificação, baseada em critérios imunológicos e histopatológicos, originalmente planejada para fim de pesquisa (LYRA, 2004).

Em 1966, Ridley e Jopling aperfeiçoaram este sistema de classificação, que passou a levar em conta aspectos clínicos e baciloscópicos, além dos previamente citados. A grande vantagem que a classificação de Ridley e Jopling trouxe foi poder explicar a enorme variedade de manifestações clínicas encontradas na Hanseníase por meio de mecanismos imunológicos, ou melhor, da interação do *Mycobacterium leprae* com o hospedeiro (JOPLING; MCDOUGALL, 1991). A classificação de Ridley e Jopling (1966), adotada neste trabalho, admite cinco formas clínicas espectrais e uma forma clínica inicial, descritas a seguir.

2.3.1 Classificação de Ridley e Jopling (1966)

Hanseníase Indeterminada (HI): Forma clínica inicial da doença capaz de envolver espontaneamente ou evoluir para qualquer das formas espectrais. Clinicamente caracteriza-se por presença de máculas hipocrômicas, hipoestésicas, geralmente em pequeno número. Pode haver perda de pêlos no interior das manchas. O aspecto histopatológico é de um infiltrado do tipo linfo-histiocitário inespecífico e somente o envolvimento das terminações nervosas, laminações do perineuro e aumento da celularidade intraneural, pode definir o diagnóstico (SALES et al., 2004). O índice bacteriológico é negativo, enquanto o teste de Mitsuda pode ser negativo ou positivo.

Hanseníase tuberculóide tuberculóide (TT): Uma das formas polares da doença, é classicamente representada por placa eritematosa ou hipopigmentada de limites bem definidos, uniformemente infiltrada, com centro deprimido, alopecia, anidrotica e com anestesia precoce. Algumas vezes assume aspecto descamativo. Costumam ser lesões únicas ou pouco numerosas, associadas a espessamento de nervo periférico. Sintomas como anestesia, hiperestesia, fraqueza e/ou atrofia muscular podem estar presentes. Em geral, a lesão neurológica está restrita a um ou dois troncos nervosos.

O aspecto histopatológico (RIDLEY; JOPLING, 1966) é de granuloma tuberculóide, com grande número de células gigantes do tipo Langhans e halo linfocitário bem constituído, que se dispõe em faixa na derme papilar acompanhando o feixe vaso-nervoso superficial, algumas vezes podendo “tocar” a epiderme. Na

derme média /profunda o infiltrado inflamatório é focal, do tipo perivascular e perianexial. Raramente, pode-se identificar filetes nervosos, provavelmente já destruídos pelo processo inflamatório. Mastócitos estão presentes em grande número, mas não se consegue identificar BAAR. O teste de Mitsuda é positivo e a baciloscopia negativa.

Existe ainda uma forma com acometimento neural puro, sem manifestação cutânea (MENICUCCI et al., 2005).

Hanseníase borderline tuberculóide (BT): As lesões cutâneas são semelhantes a das Hanseníase tuberculóide tuberculóide (TT), entretanto as placas costumam ser mais numerosas, algumas vezes com lesões satélites e com bordas externas menos nítidas em alguns pontos. A xerodermia intralesional habitualmente não é tão pronunciada como na forma TT. Embora o número de troncos nervosos acometidos seja pequeno, geralmente é maior que na TT. Na Hanseníase borderline tuberculóide os achados histopatológicos (RIDLEY; JOPLING, 1966) também são semelhantes à TT. Entretanto, pode haver pequenas diferenças, tais como, a presença de um edema moderado dissociando os granulomas, a permanência de alguns filetes nervosos preservados, além da ausência de “agressão” a epiderme. Não se identificam BAAR ao exame histopatológico. O Mitsuda é positivo e a baciloscopia negativa.

Hanseníase borderline borderline (BB): Entre os dois pólos, encontra-se a forma borderline borderline, que substituiu a designação inicial de dimorfa. Esta é mais instável das formas clínicas de Hanseníase.

Caracteriza-se por apresentar placas infiltradas, eritematosas, cujo limite externo é impreciso e o centro oval, hipopigmentado, com bordas internas bem delimitadas, assumindo o aspecto conhecido como “foveolar” ou em “queijo suíço”. O grau de anestesia das lesões é menor quando comparado ao das formas tuberculóides. O número e o tamanho das lesões são bastante variados.

O aspecto histopatológico apresenta grande variação de acordo com a área biopsiada, ora se aproximando do pólo tuberculóide, ora se parecendo com o pólo lepromatoso (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os granulomas são quase exclusivamente formados por células epitelióides pouco coesas e por raros linfócitos e plasmócitos e não se observam células gigantes de Langhans. Os feixes nervosos são mais

fácilmente identificáveis e podem mostrar proliferação moderada de células de Schwann. Em alguns casos, já se observa faixa subepidérmica de colágeno (Faixa de Unna). Bacilos álcool-ácido resistentes podem ser encontrados. O teste de Mitsuda costuma ser negativo, enquanto o índice baciloscópico é positivo.

Hanseníase borderline lepromatosa (BL): As lesões podem ser máculas, papulas, placas e nódulos e costumam ser numerosas e assimétricas. Algumas placas têm grande dimensão, geralmente com configuração foveolar típica. Estas lesões não são brilhantes ou suculentas e não apresentam alteração de sensibilidade tão marcante quanto às encontradas na forma TT da doença. Eventualmente, alguns nódulos demonstram características depressão central. Pode haver espessamento de vários nervos periféricos.

A histopatologia (RIDLEY; JOPLING, 1966) demonstra raros agregados de células epitelioides em meio a macrófagos pouco diferenciados e quantidade variável de linfócitos e plasmócitos. O infiltrado inflamatório é mais denso do que o encontrado nas formas anteriormente descritas e a epiderme pode ser atrófica em determinados cortes. Os filetes nervosos são identificados com maior facilidade e encontram-se infiltrados por células mononucleares, assumindo o característico aspecto de “bulbo de cebola”. O teste de Mitsuda é negativo e a baciloscopia é positiva.

Hanseníase lepromatosa lepromatosa (LL): Forma polar da doença que se caracteriza por apresentar imunidade celular deficiente, incapaz de reprimir a multiplicação do *M. leprae*. As lesões iniciais costumam ser máculas, levemente hipopigmentadas ou eritematosas, algo brilhante, com limites mal definidos, tendência a simetria e, numa fase precoce, podem passar despercebidas ao exame. As alterações de sensibilidade são pouco evidentes neste período inicial, assim como o espessamento de nervos periféricos. Com a progressão da doença, toda a superfície corporal tende a ser acometida, com exceção do couro cabeludo, axilas, virilha, cavo poplíteo e períneo. A pele torna-se infiltrada, lisa, brilhante, eritematosa e ressecada, adquirindo aspecto característico. Pode haver aparecimento de tubérculos ou nódulos difusamente distribuídos, porém com predomínio na face, em especial nos pavilhões auriculares. A infiltração da face, o aprofundamento das linhas de expressão, o espessamento do nariz e pavilhões

auriculares, associados a madarose e preservação dos cabelos confere a estes pacientes o aspecto denominados de “fácies leonina”. Nota-se ainda edema das mãos e membros inferiores, que podem apresentar livedo reticular, cianose e encontram-se particularmente xerodérmicos. Nesta fase, as lesões são notavelmente simétricas, assim como as alterações de sensibilidade “em bota e luva”. O espessamento dos troncos nervosos periféricos também tende a ser bilateral e simétrico. A infiltração da mucosa nasal é comum levando a voz fanhosa, coriza, epistaxe, ulceração nasal, deformidades da asa do nariz e até destruição/desabamento da pirâmide nasal. Outros órgãos também podem ser acometidos. As alterações oftalmológicas comprometem o aparelho lacrimal, pálpebra, córnea e úvea. Dacriocistite, ectrópio, lagofalmo, ceratite, uveíte, úlceras de córnea e até cegueira são complicações descritas. Lesões ósseas, tais como reabsorção de falanges distais, mal perfurante plantar, perda dos incisivos e destruição dos ossos nasais são talvez as alterações mais estigmatizantes da Hanseníase. Podem ocorrer lesões testiculares como orquite, epididimite e atrofia que acarretam esterilidade, ginecomastia e impotência. Lesões de órgãos internos como laringe, fígado, rins e supra-renal são mais raramente observadas (MCKEE; CALONJE; GRANTER, 2005; TALHARI et al., 2006).

Existem ainda formas clínicas particulares de Hanseníase lepromatosa lepromatosa como a variante históide e “Lepra bonita” (de Lucio) (SOUZA, 1997). A Hanseníase históide foi descrita por Wade em 1960 e caracteriza-se pela presença de lesões nodulares, de superfície lisa, brilhantes de consistência firme e limites bem definidos, semelhantes a dermatofibromas. Originalmente tida como forma de resistência a dapsona, a Hanseníase históide também tem sido observada em pacientes virgens de tratamento (SHAW et al., 2000).

Descrita em 1852 no México por Lucio e Alvarado, a Lepra de Lucio tem como característica principal a presença de infiltração cutânea difusa, que confere a pele aspecto espessado, túmido e brilhante, associado a extensa perda de pelos corporais. Nesta forma particular de Hanseníase lepromatosa não ocorrem nódulos ou tubérculos (JOPLING; MCDUGALL, 1991).

A injeção intradérmica do antígeno de Mitsuda acarreta necrose local após 6 horas, fenômeno conhecido como reação de Medina, de grande importância para o reconhecimento de “lepra bonita”. A histopatologia da Hanseníase lepromatosa é característica (RIDLEY; JOPLING, 1966): a epiderme apresenta-se atrofica e

retificada, estando separada da derme por uma faixa de colágeno bem delimitada (Faixa de Unna). Ocupando toda a extensão da derme, encontra-se um denso processo inflamatório que se estende por grande áreas do corte, sem, contudo, “tocar” a epiderme. Este processo inflamatório é constituído basicamente por macrófagos, plasmócitos e poucos linfócitos com disposição perivascular. Os macrófagos, com a evolução da enfermidade, assumem aspecto vacuolado e encontram-se tumefeitos e repletos de bacilos, recebendo então o nome de células de Virchow ou células espumosas. Os bacilos álcool - ácido resistentes são facilmente reconhecíveis e formam verdadeiras “massas” conhecidas como globias. Os nervos podem mostrar alguma alteração estrutural, todavia sem apresentar infiltração celular. O índice baciloscópico é positivo, enquanto o teste de Mitsuda é negativo.

2.3.2 Classificação da OMS

Visando otimizar a atuação dos programa de saúde pública, em 1982, um grupo de experts da OMS elaborou uma nova forma de classificação que divide os pacientes hansênicos em dois grupos: os paucibacilares e os multibacilares. Embora não seja uma forma de classificação precisa, o sistema adotado pela OMS tem a seu favor a simplicidade, o que permite o uso operacional mesmo em unidades básicas de saúde que não disponham de grandes recursos técnicos ou humanos. Assim sendo, permite orientar o tratamento adequado aos pacientes, de acordo com a classificação em pauci ou multibacilar, com seis ou doze doses de PQT, respectivamente.

Com a finalidade de simplificar o sistema de classificação, foram adotados como critérios o número de lesões cutâneas e de troncos nervosos acometidos. Pacientes com mais de cinco lesões de pele ou com mais de um tronco nervoso comprometido são classificados como multibacilares e os demais como paucibacilares.

A baciloscopia deve ser realizada quando há possibilidade. Os pacientes com baciloscopia positiva são classificados como multibacilares, enquanto aqueles com índice baciloscópico negativo são considerados paucibacilares (LOCKWOOD;

SARNO; SMITH, 2007). Quando houver dúvida na classificação do doente, recomenda-se que ele seja tratado como multibacilar.

Gallo e colaboradores (2003), ao avaliarem 837 prontuários de pacientes multibacilares submetidos à classificação da OMS, a qual se baseia no número de lesões cutâneas, encontraram sensibilidade e especificidade de 89,6% e 83,8% respectivamente, e valor preditivo positivo de 95,1% e negativo de 69,5%.

O Brasil adota tanto a classificação de Madri como a da OMS em seus documentos oficiais. A classificação de Ridley e Jopling (1966) é frequentemente utilizada para fins de pesquisa. É importante esclarecer que devido à terminologia adotada no Brasil, termos derivados da palavra “lepra” foram substituídos por outras derivadas de “virchow”, uma referência ao aspecto “espumoso” do macrófago rico em bacilos de Hansen, também chamadas de células de Virchow.

Adota-se também, em nosso país, para as formas intermediárias o termo “dimorfo” como tradução de “borderline”. Esta nomenclatura particular gera inclusive polêmica quando na codificação da doença pelo pela Classificação Internacional de Doenças (CID 10) 10ª revisão, que mesmo que traduzido para o Português mantém as siglas em Inglês, segundo a classificação de Ridley e Jopling (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005).

Tabela 1: Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley e Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para Hanseníase

Classificação	Indeterminada	Tuberculóide	Borderline	Lepromatosa
Madri	I	T	B	L
Ridley e Jopling	I	TT	BT, BB, HBV	LL
OMS	Paucibacilar		multibacilar	

TT: Tuberculóide tuberculóide; BT: Borderline tuberculóide, embora apresente características de forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; BB: Borderline borderline; BL: Borderline lepromatoso e LL: Lepromatoso lepromatoso.

2.4 DIAGNÓSTICO

Basicamente o diagnóstico é feito de acordo com as manifestações clínicas da doença (WHO, 2009a). Embora tentativa de identificação direta do *M. leprae* nas

amostars biológicas de pacientes, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês) ou mesmo por sorologia, em busca de anticorpos específicos como o anti-PGL 1, tem sido realizadas (SCOLLARD et al., 2006). A primeira manifestação sugestiva da doença é uma mancha na pele com alterações da sensibilidade. A confirmação pode ser feita, então, pela identificação de bacilos na linfa coletada nos lóbulos das orelhas, cotovelos ou da própria lesão por bacterioscopia. Conta-se então o número de bacilos por campo microscópico e gera-se um índice, o índice baciloscópico (IB), que vai ser útil tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento pós-tratamento. A biópsia da pele afetada também pode ser utilizada com alta especificidade, pois além de refletir a resposta inflamatória na pele e nervos periféricos, pode identificar a presença do bacilo por colorações específicas como a de Ziehl-Neelsen e serve para diferenciar a reação granulomatosa da Hanseníase de outras granulomatoses (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Na tentativa de identificar o perfil da resposta imunológica de um indivíduo frente a antígeno do *M. leprae*, pode-se fazer um teste cutâneo denominado reação de Mitsuda, realizada pela primeira vez em 1919 e aperfeiçoada desde então (MARTELLI et al., 2002). O antígeno de Mitsuda ou lepromina, utilizada neste teste intradérmico é formada por uma suspensão de bacilos de Hansen autoclavados. O antígeno é injetado intradérmicamente, e a reação é mensurada após 28 dias. A resposta é positiva quando exista a formação de um granuloma no local da inoculação maior ou igual a 5 mm de diâmetro.

A resposta positiva evidencia a integridade da resposta imunológica celular, ou seja, a capacidade de formar granuloma. Por esta razão a possibilidade de influências genéticas na resposta à lepromina tem sido motivo de interesse dos geneticistas no que concerne aos aspectos de herança imunológica. Esta reação ajuda na classificação clínica e serve como prognóstico na forma indeterminada (SCOLLARD et al., 2006).

2.5 TRATAMENTO

O tratamento atual da Hanseníase é poliquimioterápico, baseado na associação de três medicamentos e foi introduzido na década de 80 pela OMS.

Desde o início da década de 90 os medicamentos têm sido distribuídos de forma gratuita em todo o mundo (WHO, 2009c).

Este esquema terapêutico revolucionou a história natural da doença e hoje se pode dizer que a doença é curável em 100% dos casos tratados.

O esquema PQT é padronizado para as formas paucibacilares e multibacilares, segundo critérios da OMS de 1980. Os casos paucibacilares são tratados com Dapsona, 100mg/dia e Rifampicina 600 mg em dose mensal supervisionada, em um total de seis doses. Já para as formas multibacilares, o tratamento consta de 100 mg/dia de Dapsona, 50 mg/dia de Clofazimina, mais dose mensal supervisionada de 100mg de Dapsona, 300mg de Clofazimina e 600mg de Rofampicina ou um total de doze doses. As doses supervisionadas são feitas nas unidades de saúde que prestam atendimento ao hanseniano e servem para evitar o abandono do tratamento e diminuição da população bacteriana viável, diminuindo o contágio (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008c).

Importante ressaltar que embora o tratamento multiterápico a longo prazo elimine o agente bacteriológico, a eventual perda da função nervosa ocasionada não pode ser revertida (SCOLLARD et al., 2006).

2.6 PREVENÇÃO

A prevenção da Hanseníase, até o momento, está baseada na detecção dos casos, principalmente multibacilares e o tratamento precoce com drogas efetivas com o objetivo de impedir a cadeia de transmissão. Cogita-se a elaboração de vacinas específicas para prevenir a doença em pessoas expostas ou de áreas endêmicas, na tentativa de profilaxia tanto pré como pós exposição. Isto ainda não se concretizou, mas com o seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, a investigação de antígenos potenciais para confecção de vacinas voltou a tornar-se uma possibilidade plausível.

Na atualidade, utiliza-se como profilaxia, a vacina BCG, com antígenos do *M. bovis*. Esta vacina confere níveis de proteção entre 20 - 80% com uma enigmática eficácia (MARTELLI et al., 2002; SCOLLARD et al., 2006).

Três relativamente recentes *trials* estudaram a hipótese que a combinação de BCG com o *M. leprae* morto aumentava a eficácia da vacina. Os estudos foram

conduzidos na Venezuela e Malawi e, ambos os estudos, concluíram que não é a adição do *M. leprae* que aumenta a eficácia e sim o número de doses, sendo que uma segunda dose, mesmo naqueles com cicatriz vacinal aumentava a chance de proteção além de 50% (SCOLLARD et al., 2006; CONVIT et al. 1992).

No Brasil, segundo orientação do Ministério da Saúde, preconiza-se uma única dose de BCG intradérmica em todos os contatos intradomiciliares, independente de serem PB ou MB e de terem ou não cicatriz vacinal prévia (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008d).

2.7 ESTADOS REACIONAIS

No curso evolutivo da doença podem acontecer os episódios reacionais, reações inflamatórias agudas ou subagudas que podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o tratamento (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

Os episódios reacionais são divididos em duas formas, denominadas Reação Reversa (RR) tipo 1 e Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ou tipo 2 que juntas podem afetar de 30 a 50 % dos pacientes acometidos de Hanseníase. Nos episódios reacionais, o portador tem piora do estado geral, piora do acometimento neural e cutâneo, podendo também ter os órgãos internos afetados. Estes episódios são considerados emergências médicas, devido ao dano neural que pode ser irreversível. A causa, mecanismo e tratamento dos estados reacionais ainda são pouco entendidos e desafiadores. Os estados reacionais parecem ser elicitados por respostas imunológicas diversas. A RR acomete mais os pacientes das formas interpolares (BV, BB e BT) e parece ser uma resposta imunológica celular do tipo hipersensibilidade tardia (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

Frente a um episódio de RR, o portador até pode mudar dentro do espectro clínico da doença para melhor (upgrading) ou (downgrading); neste tipo de reação, as lesões cutâneas ficam mais edematosas e eritematosas e ocorre neurite progressiva. O ENH afeta mais os doentes bacilares (BV ou V), o episódio caracteriza-se por nódulos cutâneos, por vezes ulcerados, febre e mal estar, podendo ocorrer iridociclite, epididimite, artrite e miosite, além de certo grau de neurite. Esta reação deve-se ao aumento de imunoglobulinas circulantes e pobre resposta celular. Uma outra forma particular de reação, embora não tão frequente,

pode acontecer nos doentes bacilares: trata-se de uma vasculite necrotizante chamada de fenômeno de Lúcio, cuja mortalidade e morbidade são bastante elevadas (SCOLLARD et al., 2006; COSTA et al., 2005).

Os estados reacionais normalmente são tratados com altas doses de corticosteróides e/ou talidomida, sendo este último medicamento mais utilizado no ENH devido sua ação antiinflamatória - porém, por ser reconhecidamente teratogênico, o uso da talidomida exige medidas preventivas quanto à anticoncepção que devem ser adotadas por mulheres que necessitam deste tratamento (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

3 IMUNOHISTOQUÍMICA

A Patologia conta hoje com um arsenal poderoso de recursos tecnológicos. Ao lado de procedimentos convencionais de análise macro e microscópica utilizados há muito tempo, nos últimos anos surgiram novos e diversificados instrumentos de estudo, trazendo colaboração valiosa ao estudo das doenças.

As técnicas de imunohistoquímicas representam uma das maiores conquistas, complementando o exame histopatológico, a histoquímica e a microscopia eletrônica, e os resultados já conseguidos, e a constante produção de novos marcadores, permitem vislumbrar um futuro ainda profundo.

A imunohistoquímica é técnica essencialmente qualitativa. Embora métodos quantitativos possam ser aplicados para determinar um número de elementos presentes ou a intensidade da reação, seu objetivo fundamental é o encontro e a localização topográfica de antígenos nos tecidos. Nesse sentido, difere de outros testes imunológicos que fornecem resultados quantitativos, como radioimunoensaio, ELISA etc. O produto da reação imunohistoquímica deve ser sempre interpretado em conjunto com os achados morfológicos, e não simplesmente em termos de reação positiva ou negativa.

Esta técnica é um conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. O produto da reação antígeno-anticorpo é examinado ao microscópio em preparados citológicos, em cortes histológicos de amostras incluídas em parafina ou em cortes obtidos de tecidos congelados e cortados em criostato.

Sua utilização permite identificar grande variedade de antígenos celulares e microorganismos, tais como: imunoglobulinas, enzimas, fatores de coagulação, partículas virais, entre outros (MENDONÇA, 1987).

O método foi introduzido em 1942 por Coons e colaboradores quando acoplaram uma substância fluorescente, o isotiocianato de fluoresceína, a um anticorpo, permitindo a identificação do complexo antigênico usando microscópio com fonte de luz ultravioleta.

A imunofluorescência passou então a auxiliar o diagnóstico anatomopatológico, e tem sido de grande valia em Dermatopatologia, sobretudo no que se refere às doenças bolhosas.

O método representou uma descoberta importante, mas apresentava algumas desvantagens que limitavam a sua utilização: necessidade de cortes em congelação, emprego de microscópio com fonte de luz ultravioleta, exame imediato das preparações, pouca definição celular, impossibilidade de arquivamento do material, inviabilidade de análise concomitante pela microscopia eletrônica e estudo retrospectivo.

Em 1962, Saint-Marie tentou a fixação prévia do material em álcool, inclusão em parafina e aplicação posterior da técnica de imunofluorescência.

Em 1957, Straus utilizou a peroxidase extraída do rábano silvestre (horseradish) para avaliar a absorção protéica dos túbulos renais do rato. A possibilidade de união de uma enzima com uma proteína tornou-se uma realidade.

Grande avanço técnico foi conseguido em 1966 por Nakane e Pierce que conjugaram um anticorpo a uma peroxidase. Posteriormente, outras enzimas foram experimentadas, tais como a glicose-oxidase e a fosfatase alcalina.

O complexo antígeno-anticorpo-peroxidase, para ser reconhecido ao microscópio óptico necessitava de um substrato cromógeno capaz de gerar um produto final corado. A benzidina passou a ser a substância mais empregada para este fim e em decorrência de suas propriedades tóxicas e possivelmente carcinogênicas, Grahan e Karnovsky (1966) substituíram-na pelo seu derivado, a 3-3 diamino-benzidina-4 HCl (DAB).

Em 1969, Avrameas e Ternyck fixaram o material em glutaraldeído e conseguiram o exame simultâneo: imunohistoquímico e de microscopia eletrônica.

O aprimoramento técnico alcançou seu ápice em 1970, quando Sternberger e colaboradores conseguiram um anticorpo peroxidase-antiperoxidase (PAP): complexo estável, solúvel, que não perdia a imunorreatividade nas passagens sucessivas pelas soluções tampões. A modificação introduzida proporcionou maior sensibilidade e especificidade na identificação antigênica.

Um dos problemas solucionados foi a eliminação da peroxidase endógena, presente em algumas células. Isto foi conseguido por Streefkerk (1972), utilizando o peróxido de hidrogênio H_2O_2 a 3 % em metanol.

Ainda em 1972 Miller, examinando material fixado em formol e incluído em parafina, identificou imunoglobulinas em material processado anteriormente, comprovando a possibilidade de estudos retrospectivos.

A amplitude do método imunohistoquímico tornou-se evidente quando Touraine e colaboradores (1983) conseguiram identificar os linfócitos T humanos, usando anti-soro heterólogo.

A presença de imunoglobulinas nas células plasmáticas foi comprovada a seguir por Taylor e Burns (1974), que utilizaram a α - N pironina para bloquear a peroxidase endógena.

A técnica imunohistoquímica exige cuidados especiais para que a resolução final permita a identificação segura dos atributos antigênicos pesquisados. A aderência adequada dos cortes nas diferentes etapas do processamento, o afastamento da peroxidase endógena, a tripsinização do material, a correta diluição dos anti-soros, a análise obrigatória dos padrões de comparação teciduais são exemplos dos requisitos técnicos indispensáveis.

Em 1983, Pinneys aplicou as técnicas de imunoperoxidase à Dermatopatologia e chamou atenção à sua importância, não só quanto ao diagnóstico, como à histogênese das lesões. Entre os vários anti-soros utilizou o antígeno carcinoembrionário, anticorpo monoclonal para mielina, fator VIII e pré-ceratina.

Na Hanseníase, a primeira referência coube a Rea e Taylor (1977) quando verificamos variações dos níveis de lisozima no soro e lesões cutâneas.

Yamashita, Iwamoto e Iijima (1978) pesquisaram a lisozima dos macrófagos de pacientes hansenianos.

Ridley, Russel e Ridley (1982) estudaram nos granulomas hansenianos a presença de Ig G, Ig M, C1q, C3d, lisozima, alfa-1-antitripsina, plasminogênio e proteínas C-reativa, através da imunoperoxidase.

4 PROTEÍNA S-100

Em 1965, Moore isolou do cérebro bovino uma proteína ácida 100 % solúvel em solução saturada de sulfato de amônia de pH neutro, denominando-a, por este motivo, proteína S-100 (PS-100).

A proteína PS-100 é constituída por 91 resíduos de aminoácidos; pertence à família das proteínas ligadas pelo íon cálcio, não contém fósforo, carboidrato ou lipídios. O peso molecular é de 21.000 daltons e apresenta identidade imunológica com numerosas espécies de vertebrados (KESSLER; LEVINE; FASSMAN, 1968; ISOBE; OKUYAMA, 1978; MCNUTT, 1998).

Esta proteína se constitui de uma mistura de três espécies moleculares: S-100 a, S-100 b e S-100 a0, dímeros contendo as sub-unidades α e β , sendo a PS-100a ($\alpha\beta$) e PS-100b ($\beta\beta$) os componentes predominantes. A PS-100 a0 ($\alpha\alpha$) representa a fração menor, apenas 3% da proteína total; o peso molecular da PS-100 a é de 20.097 daltons e da PS-100 b, 21.104 (ISOBE; OKUYAMA, 1978; ISOBE; ISHIOTA; OKUYAMA, 1981; ISOBE et al., 1983; SEDAGHAT; NOTOPOULOS, 2008).

A síntese da PS-100 foi estudada nas culturas de células gliais do rato por Pfeiffer e colaboradores (1970), que verificaram o acúmulo no citoplasma, quando a cultura atingia uma certa densidade, coincidia com a inibição da proliferação celular na fase estacionária. Admitiram a existência de um mecanismo regulador atuante sobre a superfície celular.

Considerada desde o início uma proteína específica do sistema nervoso, sua identificação nas células de Schwann do sistema nervoso periférico e nas células dendríticas satélites dos gânglios foi realizada por Eng e colaboradores (1976).

Cocchia e Michetti (1981) identificaram a PS-100 utilizando a fixação de complemento, no gânglio cervical superior e medular adrenal de ratos adultos. Nesta localização, chamaram atenção para a sua presença ao nível de células de Schwann, mas não no neurônio.

Kanamori e colaboradores (1982) identificaram a PS-100 nos linfócitos T humanos circulantes de pessoas normais e seu número diminuído nos portadores de leucemia linfocítica.

Cocchia, Michetti e Donato (1981) aplicaram a PS-100 na pele normal humana identificando-a nos melanócitos (origem neuroectodérmica) e células de

Langerhans (origem mesodérmica); discutiram, inclusive a idéia inicial de que a proteína só fosse encontrada nas células do sistema nervoso.

Kahn e colaboradores (1983) a aplica em Dermatopatologia. Na pele normal ela é identificada nos melanócitos e células de Langerhans. Na derme, ao nível de células de Schwann, corpúsculos de Paccini, Meissner, células reticulares interdigitantes, condrócitos, ácinos, ductos e células mioepiteliais da glândula mamária. Quanto aos tumores, os achados são semelhantes aos descritos na literatura.

Nakajima e colaboradores (1982b) identificaram a PS-100 em histiócitos da histiocitose X, granuloma eosinofílico, Hand - Schuller - Christian, Letter-Siwe, células de Langerhans epidérmicas, interdigitantes dos linfonodos, timo e baço. Referiram que a população de células de Langerhans na pele é variável tanto de caso para caso como em sua localização. Na medula óssea é ausente, assim como nas células epitelióides dos granulomas da sarcoidose.

Rowden, Connelly e Winkelmann (1983) estudando a histiocitose X, xantogranuloma juvenil, xantogranuloma necrobiótico, xantoma papuloso, xantoma eruptivo e reticulohistiocitose, encontraram a PS-100 positiva nos histiócitos da histiocitose X, mas não nas células gigantes ou histiócitos dos outros processos proliferativos. Relataram ainda um caso de difícil classificação histopatológica, no qual foi identificado um foco com células positivas para PS-100.

Weiss, Langloss e Enziger (1983), aplicando-a ao neurofibroma, comentaram sobre o seu espectro celular, assim como do Schwannoma maligno, sarcoma de células claras e tumores neurogênicos puros (neuroblastoma, neuroepitelioma, ganglioneuroma) visto estarem encontrando resultados conflitantes.

Watabe e colaboradores (1983) identificaram a PS-100 nos corpúsculos "táctil like" dos neurofibromas e aventaram a possibilidade de serem constituídos por células de Schwann.

Gaynor e colaboradores (1980) utilizando a técnica de fixação de complemento e a imunofluorescência, demonstraram a localização da PS-100 nas células cultivadas dos melanomas, em cinco das sete estirpes pesquisadas. No ano seguinte, os mesmos autores encontraram-na em lesões primárias e metastáticas dos melanomas e também nos nevos compostos. Assim, consideram a PS-100 como um bom marcador para pesquisar células do melanoma, principalmente na variedade amelanótica e micrometátases ganglionares.

A aplicabilidade no conhecimento de tumores melanocíticos foi confirmada por Cochran e colaboradores (1982) utilizando cortes em parafina e substrato de aminoetilcarbazol em 56 melanomas e 35 nevos nevocíticos. Todos foram positivos e não estavam relacionados com o grau de pigmentação do tumor. Os autores destacaram que o material tinha até sete anos de incluído em parafina e comentaram sobre não haver problemas quanto ao diagnóstico diferencial entre melanoma metastático e linfomas.

Nakajima e colaboradores (1982a) encontraram 44 casos positivos em 47 melanomas diagnosticados previamente, e 10 em 12 nevos examinados.

Springall e colaboradores (1983) fizeram um estudo comparativo dos resultados obtidos com a PS-100 e com a enolase neurônio específica (NSE) em 33 melanomas maligno primários. Encontraram positividade para PS-100 em 33, e apenas seis para NSE, concluindo que aquela deve ser escolhida para pesquisa de células do melanoma.

Nascimento (1986), no Brasil, realizou pesquisa de PS-100, NSE e gangliosídeo GD3 (Melan-1) em 54 lesões de melanomas. Comprovou a utilidade desses marcadores, mas conclui que não servem como indicadores de prognóstico.

Maceira e colaboradores (1982) pesquisaram a PS-100 nos granulomas da sarcoidose, mostrando um maior número de células dentríticas nos granulomas imunogênênicos.

Mshna, Crawford e Humber (1982) pesquisaram antígenos micobacterianos intraneurais em nervos periféricos de pacientes hansenianos, através da imunoperoxidase e concluíram que as técnicas baseadas no estudo imunohistoquímico, apresentam muito maior sensibilidade na detecção de estados patológicos.

Modlin e colaboradores (1984) fizeram um estudo comparativo empregando a PS-100 e OKT6 em pele de pacientes hansenianos. Foram estudados 40 pacientes com Hanseníase e empregada a técnica de imunoperoxidase indireta para PS-100 e imunofluorescência para o OKT6. O OKT 6 se mostrou melhor para identificação das células de Langerhans epidérmicas, enquanto na derme a PS-100 foi superior. Registraram pela primeira vez o aumento do número de células de Langerhans na epiderme de pacientes hansenianos com lesões imunologicamente ativas (Hanseníase tuberculóide, reação reversa e eritema nodoso). Na derme, nas

lesões tuberculóides, elas circundam os granulomas, em contraste com as lesões virchowianas, onde estão ausentes.

Dugan, Modlin e Rea (1985) fazendo estudos imunohistoquímicos das reações de Mitsuda, relataram a hiperplasia das células de Langerhans epidérmicas, nas formas tuberculóides e sua escassez no pólo virchowiano.

No Brasil, Fleury e Bacchi (1987) utilizaram a PS-100 como auxiliar do diagnóstico histopatológico das biópsias de pacientes hansenianos pertencentes às formas tuberculóides e dimorfa.

Fizeram uma análise do acometimento neural destas formas de apresentação, assim como referência à população de células Langerhans.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o método histológico mais eficaz na evidência dos filetes nervosos dérmicos, nas diferentes formas clínicas da Hanseníase e sua contribuição para diferenciá-la das outras doenças granulomatosas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar quantitativamente, tanto pelo método de rotina, como pela marcação imunohistoquímica, os filetes nervosos nas lâminas de Hanseníase, em suas diferentes formas clínicas.
- Analisar e comparar a distribuição dos filetes nervosos em relação aos infiltrados inflamatórios dérmicos, nas diferentes formas clínicas de Hanseníase.
- Analisar e comparar o tipo de lesão dos filetes nervosos nas diferentes formas de Hanseníase.
- Analisar e comparar as formas granulomatosas da Hanseníase (HT e HBT) com a sarcoidose, granulomatose não-infecciosa, quanto aos aspectos quantitativos dos filetes nervosos, distribuição dos filetes nervosos em relação aos infiltrados inflamatórios e o tipo de lesão dos filetes nervosos.
- Calcular o rendimento destas variáveis como teste de diagnóstico para a Hanseníase.

6 METODOLOGIA

6.1 MATERIAL

Trata-se de um estudo observacional, transversal e histórico, de base clínico e laboratorial, em que as lâminas histológicas incluídas para o estudo, foram obtidas de biópsias de pacientes matriculados no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, examinados e diagnosticados clinicamente no ambulatório de Dermatologia, e posteriormente, confirmados histopatologicamente no Departamento de Anatomia Patológica, no período de 1997 a 2007.

A aplicação de nosso método resultou na seleção de 57 lâminas de Hanseníase e, cuja amostra, incluiu, segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966), pacientes com as cinco formas clínicas espectrais - Hanseníase tuberculóide tuberculóide, Hanseníase borderline tuberculóide, Hanseníase borderline borderline, Hanseníase borderline virchowiana, Hanseníase Virchowiana e uma forma clínica inicial - Hanseníase Indeterminada.

Foram excluídas as lâminas com diagnóstico de formas reacionais ou que não apresentavam material suficiente para revisão histopatológica, portanto, não preenchendo o critério de lâmina adequada.

Selecionamos e incluímos 23 lâminas de sarcoidose para compor o grupo controle, por representar uma clássica doença granulomatosa não-infecciosa e, que frequentemente, exige um diagnóstico histopatológico diferencial com algumas formas de Hanseníase, sobretudo com as suas variantes granulomatosas.

Tabela 2: Distribuição das 57 lâminas de Hanseníase incluídas no trabalho, de acordo com as seis formas clínicas

Nº de Casos/Doentes	Forma Clínica	Nº de Lâminas
16	Indeterminada	17
12	Tuberculóide	13
10	Borderderline Tuberculóide	12
2	Borderline Borderline	2
5	Borderline Virchowiana	5
7	Virchowiana	8
controle = 21		23

Como o objetivo do estudo foi o de analisar o número de filetes nervosos, a localização destes nervos em relação aos infiltrados inflamatórios específicos e o tipo de lesão neural, as 57 lâminas de Hanseníase e as 23 lâminas do grupo controle, foram distribuídas na formação de quatro grupos de padrões histopatológicos:

Tabela 3: Padrões histopatológicos

Grupos	Padrões histopatológicos		
1	paucibacilar	Baar (-)	Indeterminada HI
2	paucibacilar	Baar (-)	Tuberculóide HT/HBT
3	multibacilar	Baar (+)	Infiltrado difuso HBB/HBV/HV
4	sarcoidose-controle		

6.1.1 Definição dos padrões histopatológicos

1. Padrão de Infiltrado Inespecífico (Padrão Indeterminado - HI):

Hanseníase Indeterminada (HI): dermatite crônica inespecífica com infiltrado inflamatório linfo-histiocitário perianexial; presença de fibras nervosas ou bainha perineural com aumento da celularidade.

2. Padrão de infiltrado granulomatoso tuberculóide (Padrão HT/HBT):

Hanseníase tuberculóide (HT): células epitelióides bem diferenciadas em focos, com ou sem células gigantes tipo Langhans. Halo linfocitário ao redor, formando granulomas que em geral se estendem à epiderme. Zona clara subepidérmica não visualizada; fibras nervosas muitas vezes visualizadas nos granulomas com diminuição da inervação.

Hanseníase borderline tuberculóide (HBT): a presença de zona subepidérmica clara faz o diagnóstico diferencial com o HT, a presença de focos de células epitelióides com halo linfocitário ou a presença de células gigantes tipo Langhans faz o diferencial com o BB; as fibras nervosas podem ser visualizadas nos granulomas fortemente infiltradas.

3. Padrão de infiltrado predominantemente granulomatosos com faixa de Unna (Zona de Grenz) associado à infiltrado histiocitário difuso - (Padrão HBB):

Hanseníase borderline borderline (HBB): as células epitelióides estão dispersas nos granulomas bem desenvolvidos, porém menores que os da HT; as células gigantes tipo Langhans são ausentes e os linfócitos são raros e dispersos; as fibras nervosas são em geral bem visualizadas e mostram moderada proliferação de células de Schwann;

4. Padrão de infiltrado histiocitário predominantemente difuso ou perianexial (Padrão HBV/HV):

Hanseníase borderline virchowiana (HBV): histiócitos com tendência a vacuolização e com áreas de densa infiltração linfocitária perineural ou tomando extensa área do granuloma; fibras nervosas pouco alteradas.

Hanseníase virchowiana (HV): granulomas de células histiocitárias com diferentes graus de alteração lipídica, originando células espumosas, das quais as com pequenos vacúolos e as com grandes alterações espumosas só são encontradas no HV. Os linfócitos são geralmente escassos e esparsos. Os nervos podem ter alguma alteração estrutural.

6.1.2 Localização histológica dos filetes nervosos em relação aos infiltrados inflamatórios

- a. Padrão nº 1 - filetes nervosos localizados DENTRO do infiltrado inflamatório granulomatoso.
- b. Padrão nº 2 - filetes nervosos localizados ENTRE os infiltrados granulomatosos.
- c. Padrão nº 3 - filetes nervosos localizados DENTRO e ENTRE os infiltrados inflamatórios.
- d. Padrão nº 4 - filetes nervosos INDETECTÁVEIS.

6.1.3 Tipo de agressão histológica dos filetes nervosos

Padrão Infiltrado (A): Estruturas fibrilares escuras com padrão ondulado e com células inflamatórias. Nervo com infiltração do perineuro por linfócitos e/ou formação de granulomas epitelióides intraneurais.

Padrão Fragmentado (B): Estruturas pequenas, escuras, fibrilares, geralmente múltiplas dentro do granuloma. Identificadas como fragmentos de nervo devido ao aspecto fibrilar ondulado, embora o nervo intacto não fosse identificado. Padrão sugestivo de estágio mais avançado de destruição neural pelo infiltrado inflamatório.

Padrão Ausente (C): Ausência de estruturas fibrilares escuras dentro ou fora do granuloma, indicando destruição neural pelo granuloma, sem possibilidade de reconhecimento.

Padrão Intacto (D): Estruturas fibrilares escuras com aspecto ondulado, sem células inflamatórias no interior. Padrão exclui HT e HBT.

6.1.4 Doença utilizada como controle: sarcoidose

A sarcoidose é doença granulomatosa não infecciosa de etiologia desconhecida, em cuja patogênese parece participar os fatores genéticos, imunológicos, ambientais e infecciosos. Vários órgãos podem ser afetados, causando amplo espectro de manifestações clínicas. A pele é acometida em cerca de 20 a 35% dos casos, proporcionando ao dermatologista importante papel no diagnóstico da doença.

O granuloma sarcoídico é granuloma imunológico, constituído pelo arranjo concêntrico de células epitelióides, que consistem em histiócitos modificados pela ação dos linfócitos T. Os granulomas são geralmente uniformes na forma e no tamanho, sendo compostos por histiócitos de citoplasma amplo e eosinofílico, núcleo vesiculoso de aspecto oval ou torcido e nucléolo proeminente. Em sua periferia, os granulomas sarcoídicos podem apresentar halo frouxo de linfócitos, sendo por tal motivo designados “granulomas desnudos” ou “granulomas nus“, contrapondo-se aos granulomas tuberculóides em que denso infiltrado linfocitário pode ser observado no contorno daquelas estruturas. A necrose caseosa, característica dos granulomas tuberculóides, não é observada nos granulomas sarcoídicos. A impregnação argêntica revela fibras de reticulina na periferia e no interior dos granulomas sarcoídicos, aspecto não encontrado nos granulomas tuberculóides. O granuloma sarcoídico pode apresentar-se envolvido por fibras de colágeno de arranjo compacto. As células gigantes de Langhans, gigantócitos com núcleos dispostos na periferia em forma de ferradura, podem compor o infiltrado. Embora não sejam específicos da sarcoidose, podem-se observar no interior dos gigantócitos os corpúsculos asteróides (fibras colágenas de aspecto estrelado) e os corpos de Schaumann (inclusões arredondadas, basófilas, que parecem

corresponder a lisossomas calcificados). Na pele os granulomas são vistos na derme média, podendo atingir a derme profunda e o tecido subcutâneo. A epiderme subjacente aos granulomas tem frequentemente aspecto normal ou atrófico, e raramente se apresenta acantótico. Pode ocorrer o fenômeno de eliminação transepidermica. O achado de material birrefringente não afasta o diagnóstico de sarcoidose. Na sarcoidose, os granulomas não acometem folículos pilosos e nervos. Alguns casos de sarcoidose apresentam quadro histopatológico um pouco diferente do habitual, tendendo mais para um granuloma do tipo tuberculóide, ocasião em há necessidade de maiores estudos no diagnóstico diferencial, principalmente com a Hanseníase da forma tuberculóide e borderline tuberculóide (BALL; KHO; MARTINKA, 2004).

6.2 MÉTODOS

Os fragmentos para o exame histopatológico foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina e os cortes, com espessura de 5 μ , corados pela Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Wade.

Os blocos em parafina encontravam arquivados no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Gafrée e Guinle. A partir deste material, foram realizados novos cortes, com a mesma espessura, para realização das seguintes técnicas de coloração e marcação imunohistoquímica:

- Hematoxilina-Eosina
- Ziehl-Wade
- Imunoperoxidase (PAP), para pesquisa de proteína S-100

O exame microscópico das preparações coradas pela hematoxilina-eosina, Ziehl-Wade e o reconhecimento dos antígenos nas lâminas preparadas pela técnica imunohistoquímica foram realizados em microscópico óptico comum da marca Olympus CX 41.

6.2.1 Imunoperoxidase (PAP) - para pesquisas da proteína S-100

1. Instrução:

- Preparação das lâminas:

A técnica de imuno-histoquímica precisa ter uma preparação especial da lâmina usada para os cortes histológicos, pois o procedimento de recuperação antigênica costuma causar a queda do tecido da lâmina, sendo necessário a utilização da lâmina especial para imuno-histoquímica.

- Recuperação antigênica:

As amostras fixadas em formalina requerem recuperação antigênica para a grande maioria dos epítomos habitualmente pesquisados.

- Incubação em calor úmido:

As lâminas são incubadas em tampão citrato 10 Mm / Ph 6,0, em banho-maria entre 95 °C - 99 °C, durante 30 minutos); após esfriar por 20 minutos, seguem-se lavagens em água corrente.

- Bloqueio da peroxidase endógena:

Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol (ou solução comercial de água oxigenada a 3% = 10 volumes), em um banho de 20 minutos. Seguem-se lavagens em água corrente.

- Reação Anticorpo Primário:

Anticorpo utilizado: S-100 Polyclonal marca DAKO Cód.: Z0311

Diluição: 1:1500 (uma parte de anticorpo para 1500 partes de solução de PBS com albumina a 1%).

O anticorpo é aplicado ao tecido, sendo aproximadamente 3 gotas por lâmina de modo que o tecido fique completamente coberto pelo anticorpo. As lâminas são incubadas por 1 hora.

- Reação de polímero ADVANCE HRP marca DAKO Cód.: K 4068.

Após incubar as lâminas com anticorpo específico.

Lavar com solução tampão PBS. Incline levemente a bandeja e borrife o PBS nas lâminas sobre a pia, removendo o anticorpo, incline a bandeja até 80° para remover o excesso, borrife mais PBS e deixe descansar por 3 minutos.

Incubar com ADVANCE HRP LINK por 15 minutos à temperatura ambiente.

Lavar com solução tampão PBS e deixar descansar por 3 minutos

Incubar com ADVANCE HRP ENZYME por 15 minutos à temperatura ambiente.

Lavar com solução PBS e deixe descansar por 3 minutos.

- Revelação e montagem:

Incubar as lâminas em solução substrato (diaminobenzidina - DAB), durante 30 segundos a 2 minutos lavar com água corrente quando a lâmina adquirir coloração marrom.

Contracorar com hematoxilina de Harris por 20 segundo a 1 minuto e lavar em água corrente e destilada.

Desidratar as lâminas (álcool e xilol).

Montagem das lâminas com bálsamo de Damar (goma de damar diluída em xilol) para leitura em microscopia óptica comum.

As 57 lâminas de Hanseníase e as 23 lâminas de sarcoidose foram examinadas no Departamento de Anatomia Patológica. Dois dermatopatologistas foram os responsáveis pela análise e revisão das 80 lâminas disponíveis.

Os dados foram digitados em planilha Excel e analisados no programa SPSS Statistics, realizando nos cruzamentos, as análises estatísticas cabíveis (APÊNDICE A).

Calculamos as frequências das variáveis nominais e as medidas centrais, de dispersão e a amplitude das variáveis contínuas para a apresentação das características da amostra e das variáveis por grupos.

Foi fixado em 0,05 o valor de p ($\alpha=0,05$) para a rejeição da hipótese de nulidade, em teste bilateral. Os valores são apresentados com o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC=95%) de certeza, com faixa de resultados dentro da qual o verdadeiro valor se encontra na população.

O teste do Quiquadrado foi empregado para dados em escala nominal, em tabelas de contingência. O teste *t-student* com duas caudas foi empregado para detectar diferenças significativas das variáveis entre Hanseníase e o grupo controle.

A Acurácia (A), Sensibilidade (S), Especificidade (E), com respectivo intervalo de confiança de 95%, são aferidos a partir de tabelas de contingência 2x2. Utilizamos o programa de cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos (BRAILE; GODOY, 1999).

Após as análises das lâminas, os aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos encontrados nas 5 formas clínicas e no controle, foram fotografados, utilizando-se materiais próprios para esta documentação. Utilizamos um microscópio Olympus BX 41, acoplado de uma máquina digital NIKKON COLPIX.

7 ASPECTOS ÉTICOS

O Projeto de Pesquisa foi encaminhado em 05/12/2007 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) - CAAE-0072.0.328.000-07 (ANEXO A).

8 RESULTADOS

O número de filetes com coloração HE e S-100 foram analisados através de uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias. O primeiro fator, com quatro níveis, estava relacionado ao padrão histopatológico (fator entre grupos). O segundo fator, com dois níveis, estava relacionado com o tipo de coloração (fator intra-grupo). O gráfico 1 apresenta estes resultados. A ANOVA revelou uma interação entre os dois fatores ($F(3,76)=3,18$; $p=0,029$), bem como um efeito de coloração ($F(1,76)=30,01$; $p<0,001$). O tipo do padrão histológico não se mostrou significativo ($F(3,76)=0,21$; $p=0,88$). Uma análise post-hoc indicou que houve um aumento na coloração S-100 em relação á coloração HE no tipo histopatológico paucibacilar-HT/HBT ($p<0,001$) bem como na situação controle ($p<0,001$) mas não nas condições paucibacilar-HI ($p>0,1$) e multibacilar-HBB/HV ($p>0,1$).

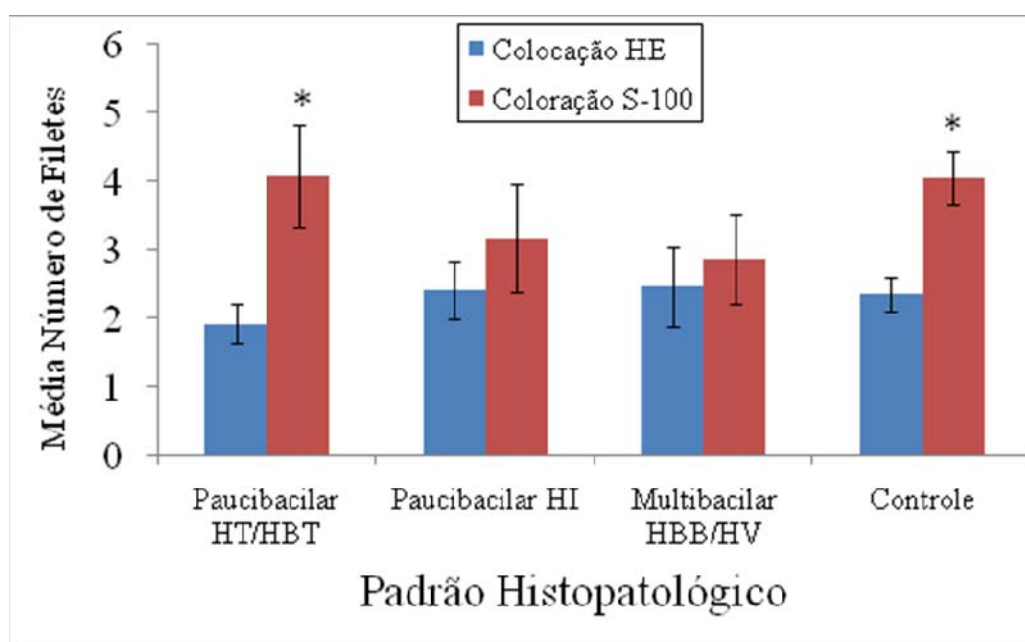


Gráfico 1: Média (\pm EPM) do número de filetes com coloração HE e S-100

A seguir serão apresentados a distribuição dos filetes nervosos (tabela 4) e o tipo de lesão (tabela 5) nos diferentes padrões histopatológicos. Esses resultados são apresentados em porcentagens e analisados através do teste de Qui-quadrado.

Tabela 4: Localização dos filetes nervosos nos diferentes padrões histopatológicos utilizando a marcação imunohistoquímica pela proteína S-100

Padrão Histopatológico	Dentro dos granulomas	Entre os granulomas	Dentro e Entre os granulomas	Indetectáveis	Total
paucibacilar-HT/HBT	40% (10)	4,0% (1)	48,0% (12)	8,0% (2)	100% (25)
paucibacilar-HI	23,5% (4)	58,8% (10)	5,9% (1)	11,8% (2)	100% (17)
multibacilar-HBB/HV	46,7% (7)	0% (0)	26,7% (4)	26,7% (4)	100% (15)
Total Hanseníase	36,8% (21)	19,3% (11)	29,8% (17)	14,0% (8)	100% (57)
Controle	0% (0)	65,2% (15)	30,7% (7)	4,3% (1)	100% (23)

A tabela 4 apresenta a distribuição (%) da localização dos filetes nervosos nos diferentes padrões histopatológicos e, ao compararmos estes resultados, constatamos que das 25 lâminas compondo o grupo paucibacilar-HT/HBT, os resultados predominantes foram o do padrão nº 3 (Dentro e Entre os granulomas) e do padrão nº 1 (Dentro dos granulomas); 12 marcações imunohistoquímicas mostraram o padrão nº3 (n=25, 48%), seguindo de 10 padrões nº1, correspondendo a (n=25, 40%) dos casos.

O padrão nº 4 (Indetectáveis), foi visto em 2 marcações (n=25, 8%) e somente 1 marcação (n=25,4%) para o padrão nº 3 (Entre os granulomas). Portanto, houve uma equivalência na maior proporção de distribuição entre os padrões nº3 e nº1 do que nos padrões nº 4 e nº 2.

Ao compararmos com o grupo da sarcoidose, observamos que ao contrário do grupo paucibacilar-HT/HBT, no grupo controle, as lâminas marcadas pela proteína S-100, foi significativa maior a proporção ($p < 0,001$) do padrão nº 2 (Entre os granulomas), com 15 achados e perfazendo um total de (n=23, 65,2%) dos casos, enquanto que este padrão nº 2 no grupo paucibacilar-HT/HBT, apresentou-se em somente 4% dos casos. Observamos também que houve significância estatística em relação ao padrão nº 1 (Dentro dos granulomas), onde o controle-sarcoidose não revelou nenhum caso (0%) e no grupo paucibacilar-HT/HBT encontramos 10 casos (n=25, 40%) ($p=0,027$). Em relação ao padrão nº3 (Dentro e Entre os granulomas), os resultados mostraram uma leve equivalência, tendo 12 casos (n=25, 48%) no grupo paucibacilar-HT/HBT e o grupo controle com 7 lâminas (n=23, 30,7%).

No padrão nº 4 (Indetectáveis) do grupo controle e paucibacilar-HT/HBT, também não houve significância estatística na proporção dos resultados, com

apenas 1 caso (n=23, 4,3%) do grupo controle e 2 casos (n= 25; 8%) do grupo paucibacilar-HT/HBT (p=0,37).

Analisando o grupo paucibacilar-HI, foi significativa a maior proporção do padrão nº2 (Entre os granulomas), ocorrendo em 10 casos (n=17, 58,8%) p=0,008. O padrão nº1 (Dentro dos granulomas) foi verificado em 4 lâminas (n=17, 23,5%). Houve 2 casos (n=17, 11,8%) relacionados ao padrão nº4 (Indetectáveis) e, em apenas 1 caso (n=17, 5,9%), o exame imunohistoquímico mostrou o padrão nº3 (Dentro e Entre os granulomas).

Ao analisarmos o padrão multibacilar-HBB/HBV/HV, houve predomínio do padrão nº1 (Dentro dos granulomas), observando 7 (n=15, 46,7%) diagnósticos positivos nas preparações imunohistoquímicas. Os padrões nº 3 (Entre e Dentro) e nº4 (Indetectáveis) apresentaram distribuições idênticas com 4 (n=15, 26,7%) lâminas positivas para cada padrão histopatológico. Não encontramos nenhum caso (0%) no padrão 2 (Entre os granulomas).

Entre o total das lâminas de Hanseníase distribuídas pelos 3 padrões histopatológicos, a tabela mostra o predomínio do padrão nº 1 (Dentro dos granulomas) com um total de 21 (n=57, 36,8%) casos confirmados pela marcação imunohistoquímica pela proteína S-100. Logo em seguida, encontramos o padrão nº 3 (Dentro e Entre os granulomas), somando 17 lâminas (n=57, 29,8%).

O padrão nº2 (Entre os granulomas) foi evidenciado em 11 lâminas (n=57, 19,3%) e, por último o padrão nº4 (Indetectáveis), que mostrou apenas 8 lâminas (n=57, 14%).

Tabela 5: Tipo de lesão neural nos diferentes padrões histopatológicos utilizando a marcação imunohistoquímica pela proteína S-100

Padrão Histopatológico	Infiltrado	Fragmentado	Ausente	Intacto	Total
paucibacilar-HT/HBT	52,0% (13)	40,0% (10)	8,0% (2)	0,0% (0)	100 % (25)
paucibacilar-HI	11,8% (2)	11,8% (2)	11,8% (2)	64,7% (11)	100% (17)
multibacilar-HB/HBV/HV	40,0% (6)	33,3% (5)	26,7% (4)	0,0% (0)	100% (15)
Total Hanseníase	36,8% (21)	29,8% (17)	14,0% (8)	19,3% (11)	100% (57)
Controle	8,7% (2)	4,3% (1)	4,3% (1)	82,6% (19)	100% (23)

A tabela 5 apresenta a distribuição (%) do tipo de lesão dos filetes nervosos nos diferentes padrões histopatológicos e, ao compararmos estas agressões neurais, observamos que no grupo paucibacilar-HT/HBT, foram significativas as

maiores proporções de padrões histopatológicos pertencentes aos padrões Infiltrado (A) e Fragmentado (B), com respectivamente 13 lâminas (n=25, 52%) e 10 lâminas (n=25, 40%) ($p < 0,001$).

Apenas 2 lâminas (n=25, 8%) não mostraram a presença dos filetes nervosos, incluindo, desta maneira, no padrão Ausente (C). Nenhum caso (0%) foi encontrado no padrão Intacto (D).

Ao compararmos com o grupo controle da sarcoidose, observamos que, ao contrário do grupo paucibacilar-HT/HBT, neste grupo, foi significativamente maior a proporção do padrão Intacto (D), com 19 lâminas positivas=23, 82,6%), enquanto que no grupo paucibacilar-HT/HBT, não revelou nenhum caso positivo (0%).

Em relação aos padrões Infiltrado (A) e Fragmentado (B), também observamos significância estatística, onde o grupo controle mostrou pouca positividade, com 2 lâminas (n=23, 8,7%) para o padrão Infiltrado (A) e 1 lâmina (n=23, 4,3%) para o padrão Infiltrado (A), enquanto que no grupo paucibacilar-HT/HBT os resultados foram de 13 lâminas positivas (n=25, 52%) para o padrão Infiltrado (A) e 10 lâminas positivas (n=25, 40%) para o padrão Fragmentado (B) ($p=0,0013$).

Analisando o padrão Ausente (C) do grupo controle e paucibacilar-HT/HBT, também não houve significância estatística na proporção dos resultados, com apenas 1 lâmina positiva no grupo controle (n=23, 4,3%) e 2 lâminas positivas no grupo paucibacilar-HT/HBT (n=25, 8%) ($p=0,17$).

Estudando o grupo paucibacilar-HI, verificamos que 11 marcações (n=17, 64,7%) apresentaram o padrão Intacto (D) e os restantes das lâminas revelaram uma equivalência proporcional nos padrões, compreendendo 2 casos (n=17, 11,8%) no padrão Infiltrado (A), 2 casos (n=17, 11,8%) no padrão Fragmentado (B) e 2 casos (n=17, 11,8%) no padrão Ausente (C).

Observando o grupo multibacilar-HBB/HBV/HV, notamos que, do mesmo modo que no grupo paucibacilar-HT/HBT, predominaram os padrões Infiltrado (A), com 6 casos (n=15, 40%) e Fragmentado (B) com 5 lâminas (n=15, 33,3%).

No padrão Ausente (C), pela marcação imunohistoquímica com a proteína S-100, 4 lâminas (n=15, 26,7%) exibiram este quadro histopatológico. Nenhuma lâmina (0 %) estudada apresentou o padrão Intacto (D) ($p=0,06$).

Entre o total das lâminas de Hanseníase distribuídas pelos 3 padrões histopatológicos, a tabela mostra uma maior proporção do padrão Infiltrado com 21

lâminas (n=57, 36,8%), seguido do padrão Fragmentado (B) com 17 lâminas (n=57, 29,8%), padrão Intacto (D) com 11 lâminas (n=57, 19,3%) (C) e finalmente, o padrão Ausente com 8 casos (n=57, 14%).

As tabelas nº 6, 7, 8, 9, 10 e 11, mostram dados obtidos utilizando programa de cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos (BRAILE; GODOY, 1999), visando o estudo da Sensibilidade e Especificidade nos dois quesitos: tipo de lesão dos filetes nervosos e distribuição dos filetes na Hanseníase, em comparação com o grupo controle da sarcoidose. Os resultados presentes nas tabelas de localização dos filetes comprovam que a distribuição Dentro e a distribuição Entre são importantes no diagnóstico diferencial entre a Hanseníase o grupo controle.

Podemos também observar que nas tabelas referentes ao tipo de lesões dos filetes nervosos, nos variados padrões histopatológicos, obtivemos resultados significativos quando incluímos e comparamos as três alterações dos filetes nervosos: Infiltrado, Fragmentado e Ausente, com o grupo controle.

Tabela 6: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total - Localizações Dentro / Dentro e Entre (Hanseníase) x Entre (controle)

DISTRIBUIÇÃO DOS FILETES NERVOSOS EM RELACAO AOS INFILTRADOS	
Dentro / Dentro e Entre x Entre	
Hanseníase Total x controle (sarcoidose)	
Sensibilidade - Especificidade - Acurácia	IC = 95 %
Sensibilidade = 77,6%	65,9 -89,2
Especificidade = 68,2%	48,2 -87,6
Acurácia = 74,6%	64,5 -84,8

Tabela 7: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total - Localização Dentro (Hanseníase) x Entre (controle)

DISTRIBUIÇÃO DOS FILETES NERVOSOS EM RELACAO AOS INFILTRADOS	
Dentro x Entre	
Hanseníase Total x controle (sarcoidose)	
Sensibilidade - Especificidade - Acurácia	IC = 95 %
Sensibilidade = 65,6 %	49,2 -82,2
Especificidade = 100%	100
Acurácia = 76,6%	64,5 - 88,7

Tabela 8: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia. Hanseníase Total, excluindo HI (Dentro) x Entre (controle)

DISTRIBUIÇÃO DOS FILETES NERVOSOS EM RELACAO AOS INFILTRADOS	
Dentro x Entre	
Hanseníase Total - HI x controle	
Sensibilidade - Especificidade - Acurácia	IC = 95 %
Sensibilidade = 94,4%	83,9 – 100
Especificidade = 100	100 – 100
Acurácia = 97%	91,1 – 100

Tabela 9: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase Total x controle

Tipo de lesão do filete nervoso	Hanseníase Total x controle (sarcoidose)		
	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
	IC=95%	IC=95%	IC=95%
Somente Infiltrado	36,6 24,3 - 49,4	90,5 77,9 - 100	51,3 40,2 - 62,4
Somente Fragmentado	29,8 17,9 - 41,7	95,7 87,3 - 100	48,8 37,8% - 59,7
Somente Ausente	14 5 - 23	95,7 87,3 - 100	48,8 37,8 - 59,7
Qualquer alteração presente	80,7 70,5 - 90,9	82,6 67,1 - 98,1	81,3 72,7 - 89,3

Tabela 10: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase HT/HBT x controle

Tipo de lesão do filete nervoso	Hanseníase - HT/HBT x controle (sarcoidose)		
	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
	IC=95%	IC=95%	IC=95%
Somente Infiltrado	52 32,4 - 71,6	91,3 79,8 - 100	70,8 58,0 - 83,7
Somente Fragmentado	40 20,8 - 59,2	95,7 87,3 - 100	66,7 53,3 - 80
Somente Ausente	8 - 21,2	95,7 87,3 - 100	50 35,9 - 64,1
Qualquer alteração presente	100 100 - 100	82,6 67,1 - 96,2	91,7 83,8 - 99,5

Tabela 11: Resultados da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, comparando os tipos de lesões dos filetes nervosos, quando considerados, ora isoladamente, ora agrupados (infiltrado, fragmentado e ausente) - Hanseníase Total, exceto HI x controle

Tipo de lesão do filete nervoso	Hanseníase - HT/HBT/HB x controle exceto HI (sarcoidose)		
	Sensibilidade IC=95%	Especificidade IC=95%	Acurácia IC=95%
Somente Infiltrado	47,5 32,0 - 63,0	91,3 79,8 -100	63,5 51,6 - 75,4
Somente Fragmentado	37,5 22,5 - 52,5	95,7 87,3 -100	58,7 46,6 - 70,9
Somente Ausente	50 38,1 - 61,9	50 35,2 - 64,8	50 40,7 - 59,3
Qualquer alteração presente	100 100 - 100	82,6 67.1 -98,4	93,7 87,6 - 99,7

8.1 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Os achados histopatológicos de algumas lâminas de Hanseníase e do grupo controle (sarcoidose) foram fotografados utilizando um microscópio Olympus BX 41, acoplado com uma máquina digital NIKKON COLPIX.

Sarcoidose (HE) - HP: 12551

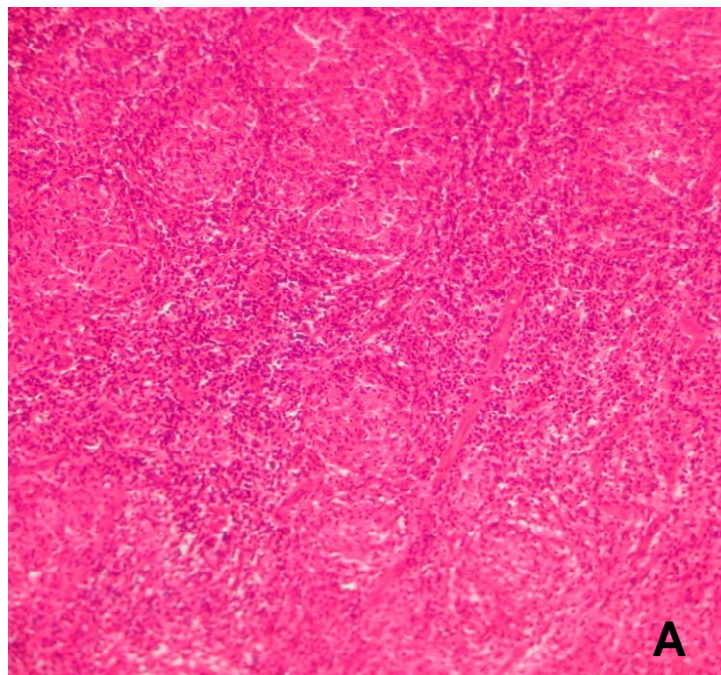


Figura 3A: Vários granulomas do tipo sarcóidico, constituídos por células epitelióides e escassos linfócitos na periferia (100x)

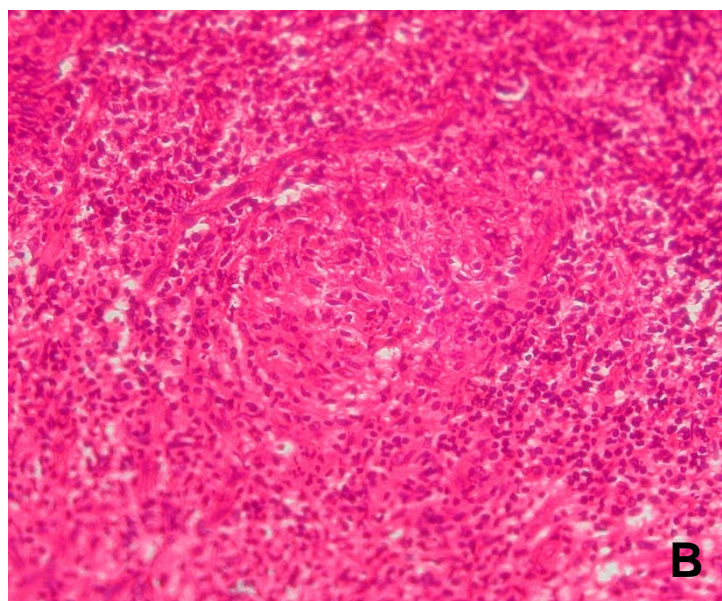


Figura 3B: Detalhe do processo inflamatório granulomatoso sarcóidico (200 x)

Sarcoidose (PS-100) - HP: 12551

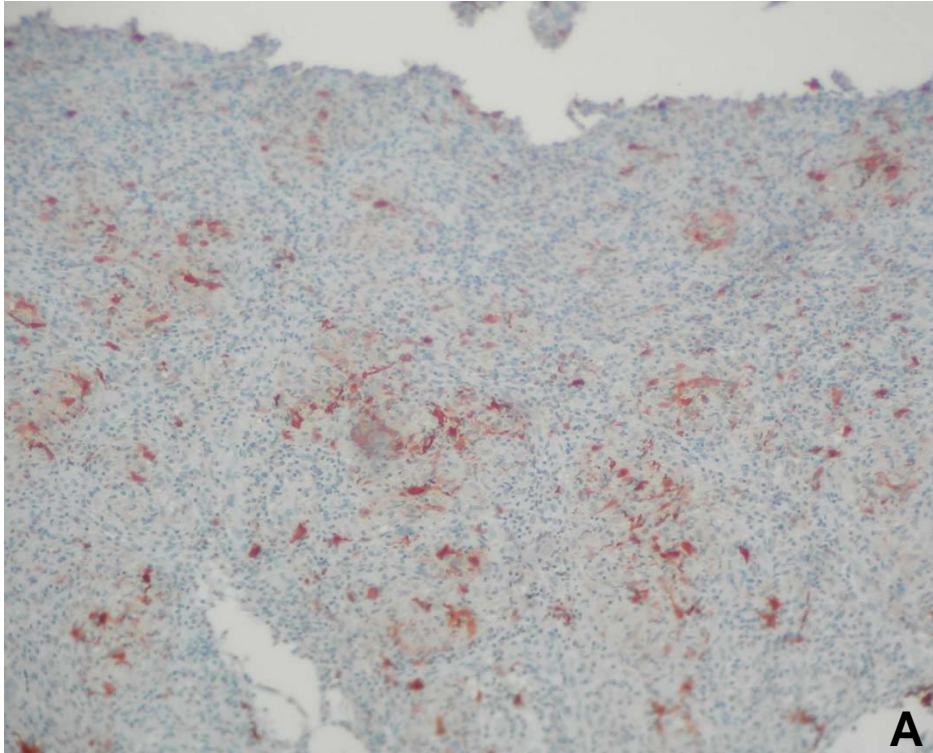


Figura 4A: Filetes nervosos distribuídos entre os granulomas 40x

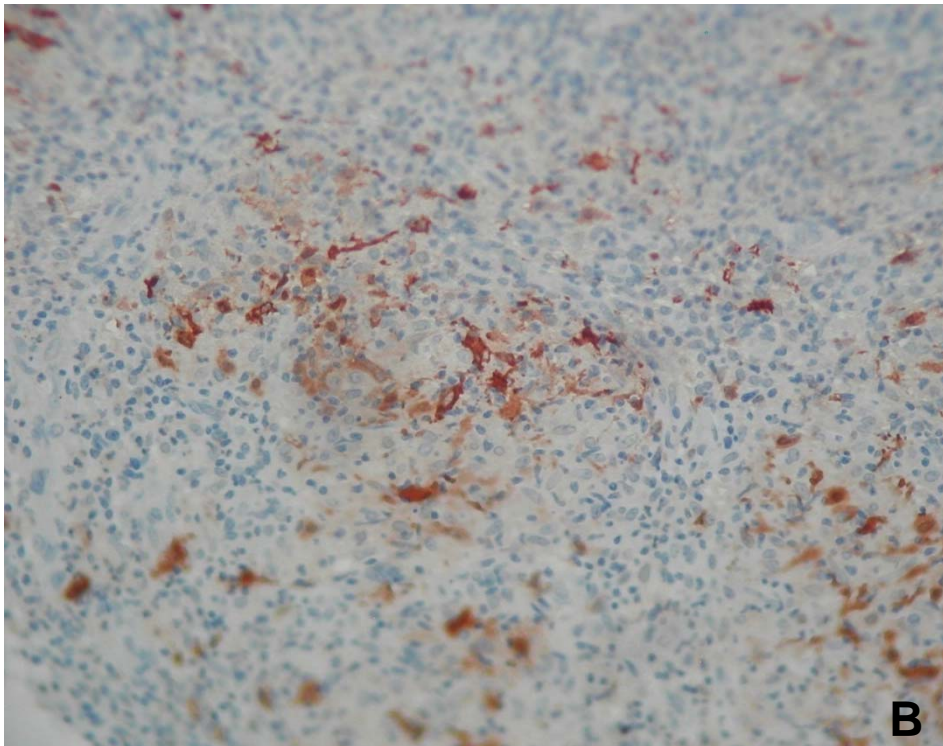
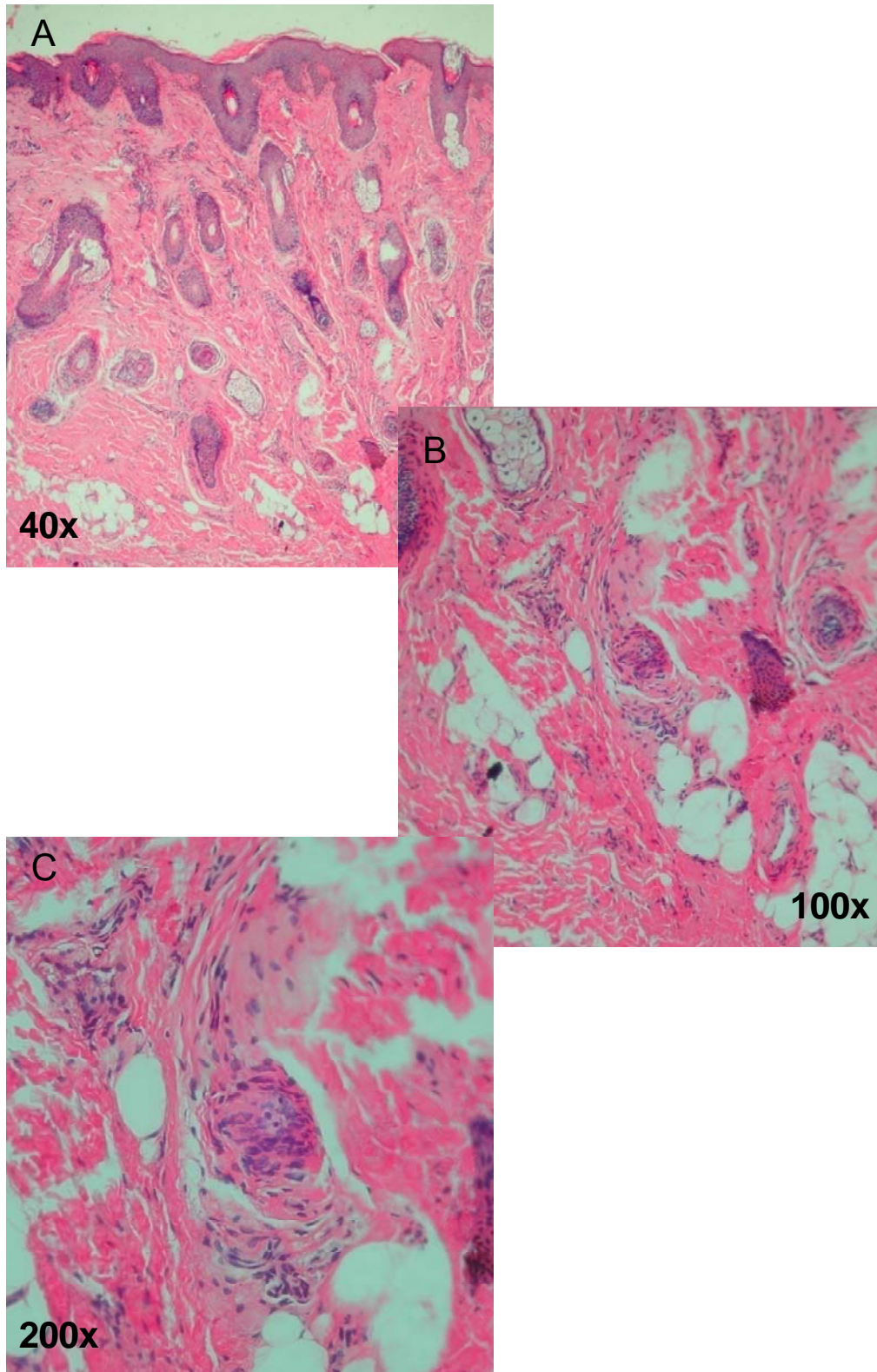


Figura 4B: Detalhe dos filetes nervosos 200x

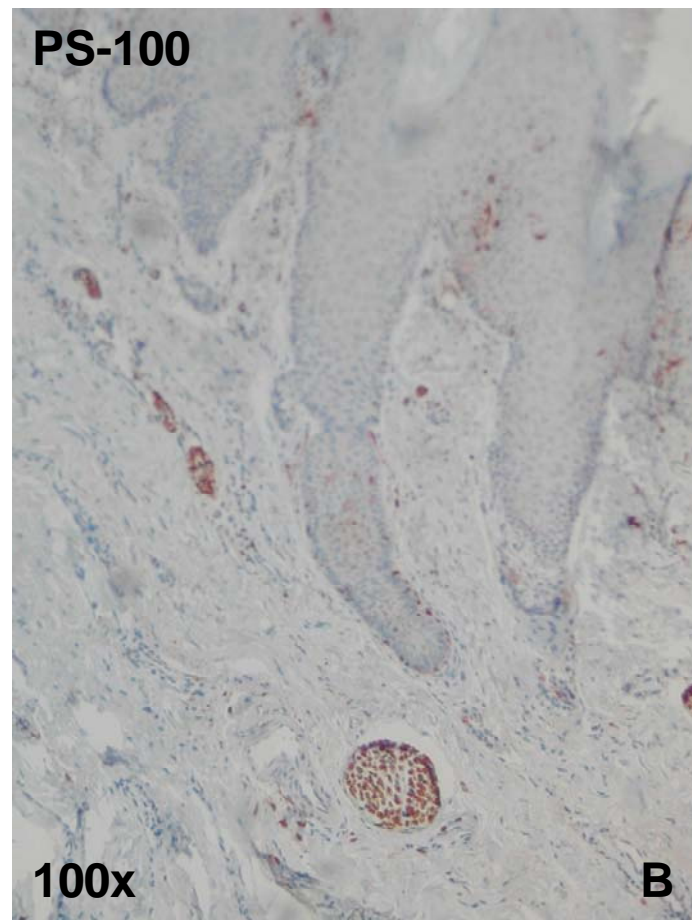
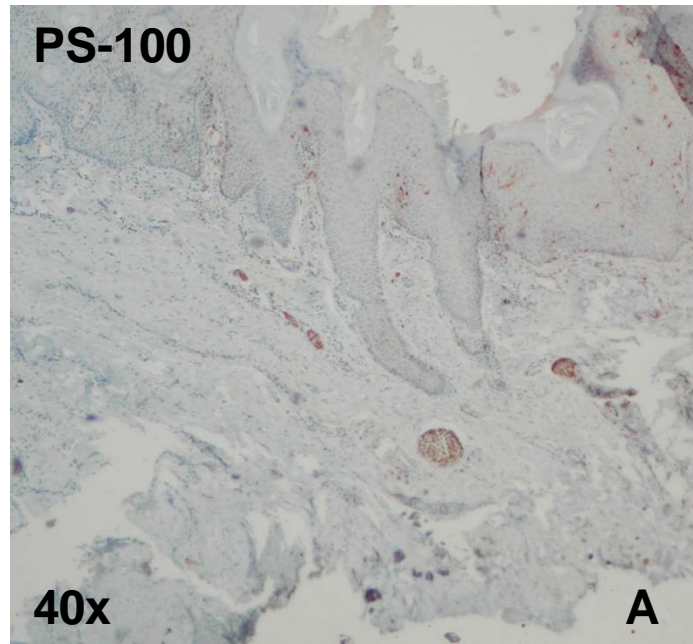
Hanseníase Indeterminada (HE) - HP: 124205



Figuras 5A e 5B: Leve infiltrado inflamatório linfocitário perivascular

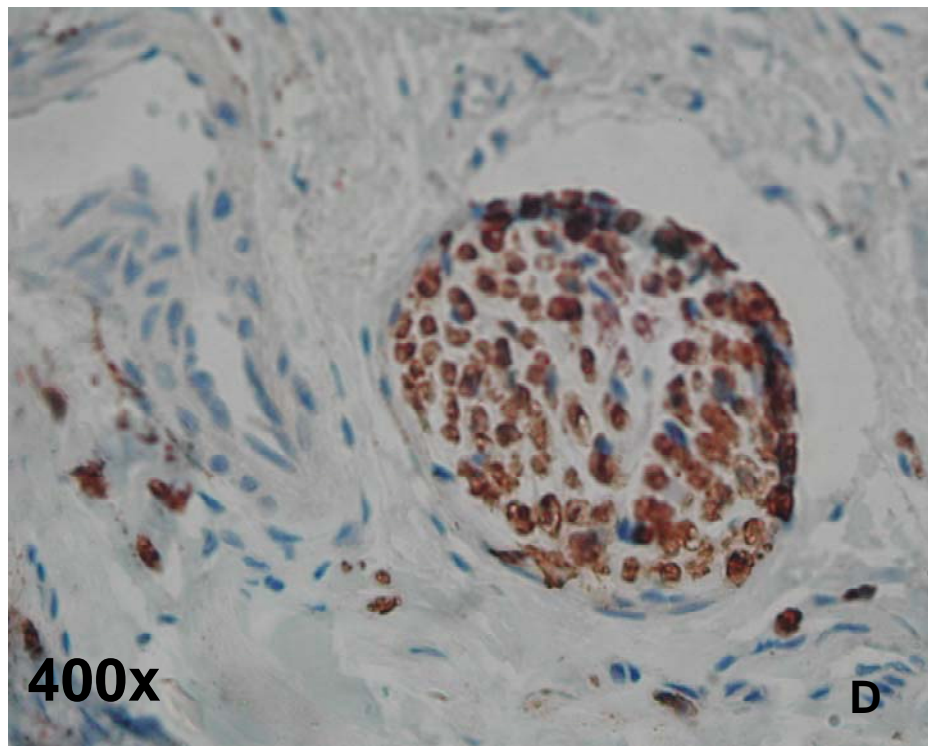
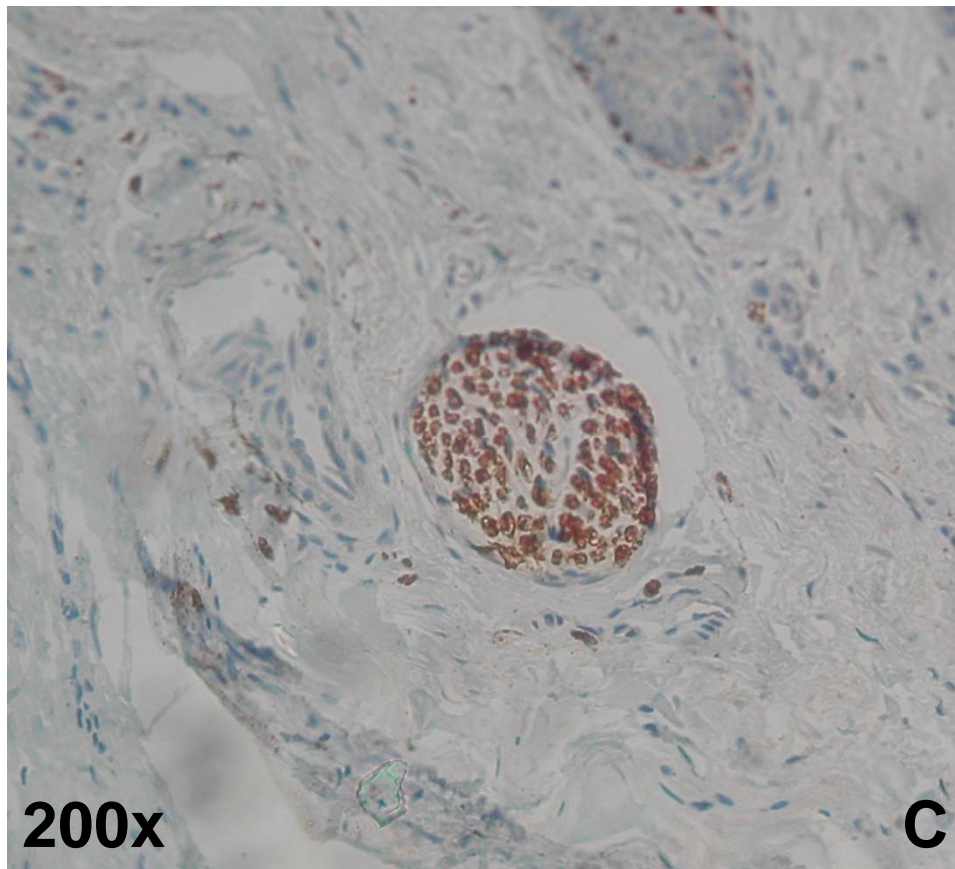
Figura 5C: Detalhe do filete nervoso intacto

Hanseníase Indeterminada - HP: 124205



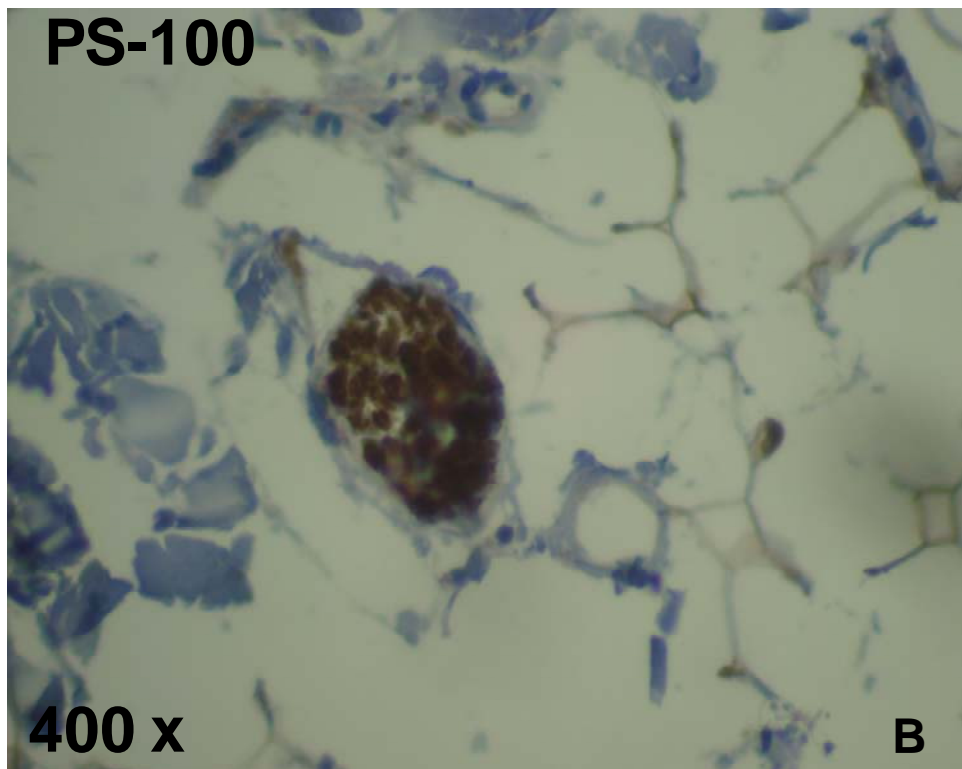
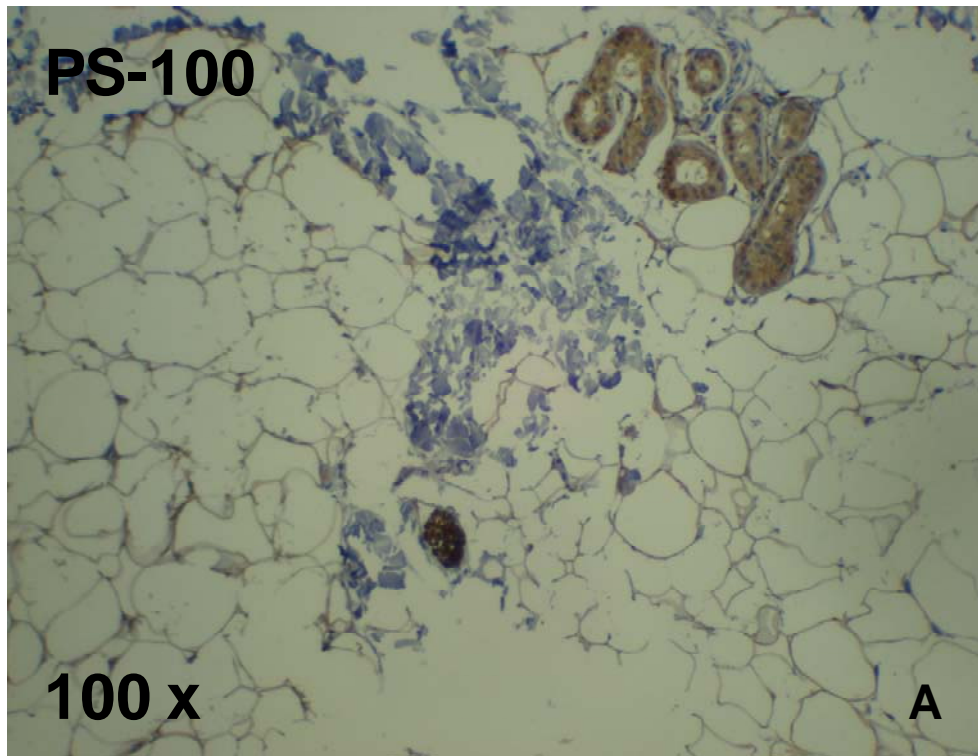
Figuras 6A e 6B: Cortes transversais de filetes nervosos intactos

Hanseníase Indeterminada (PS-100) - HP: 124205



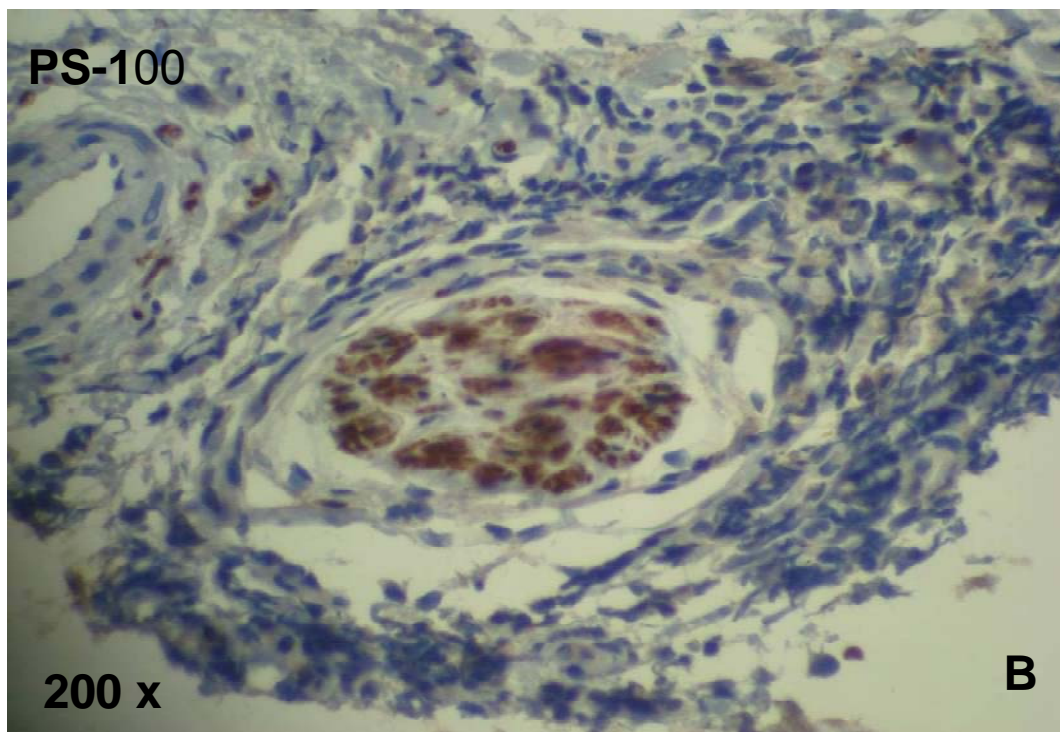
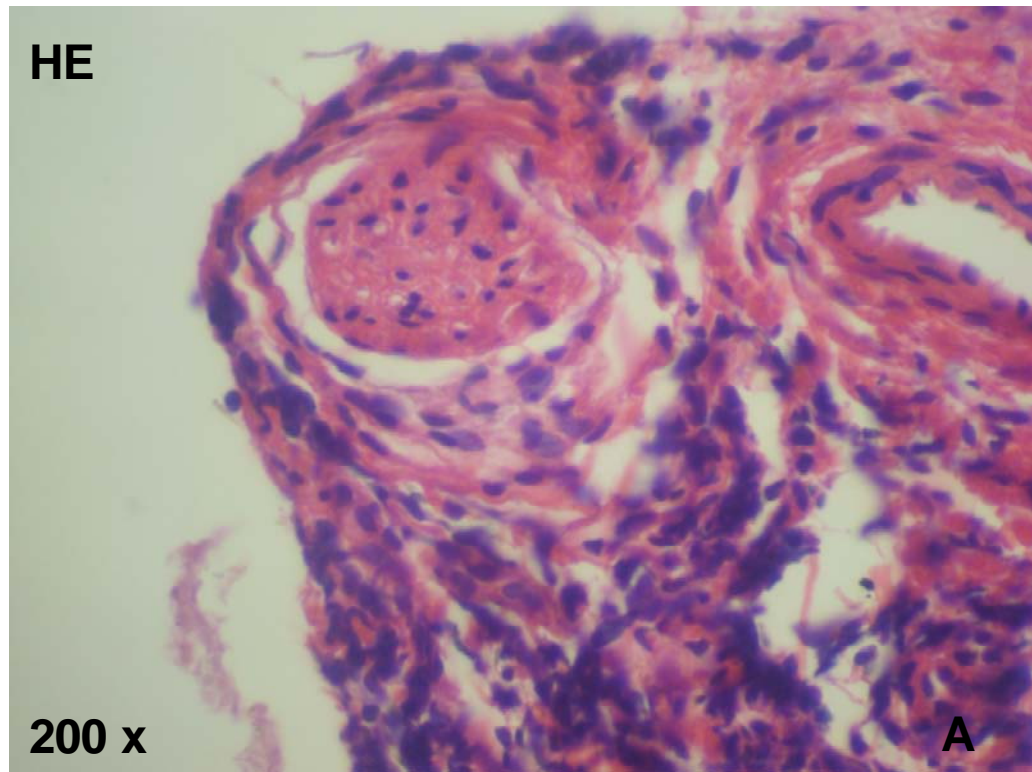
Figuras 6C e 6D: Cortes transversais de estruturas fibrilares escuras, sem células inflamatórias no interior

Hanseníase Tuberculóide - HP: 100794



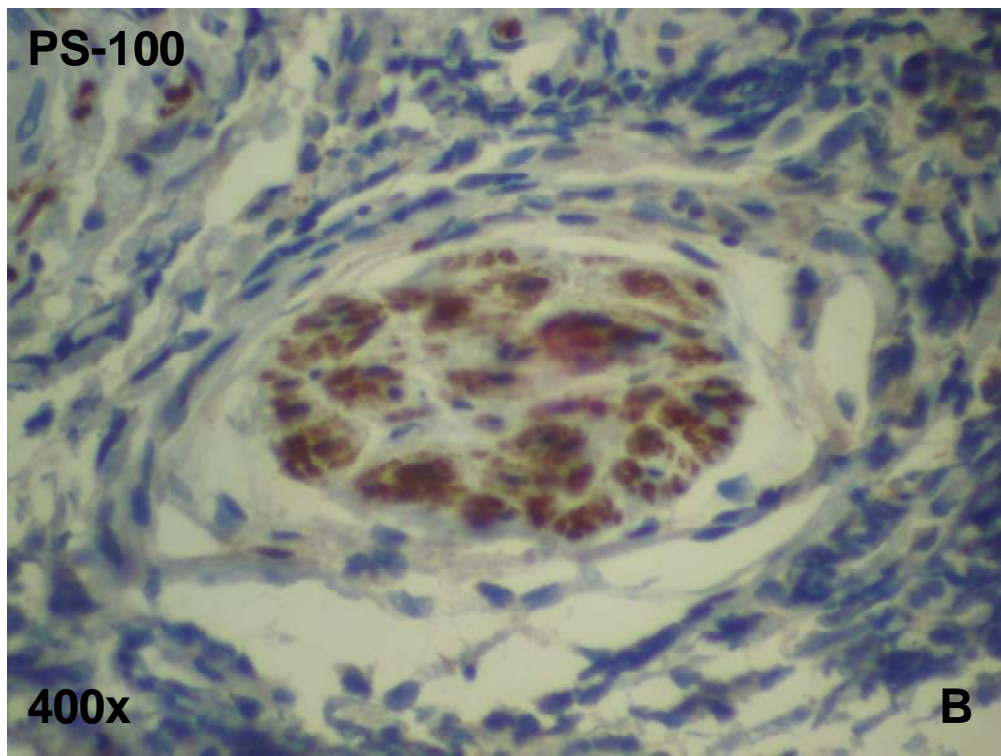
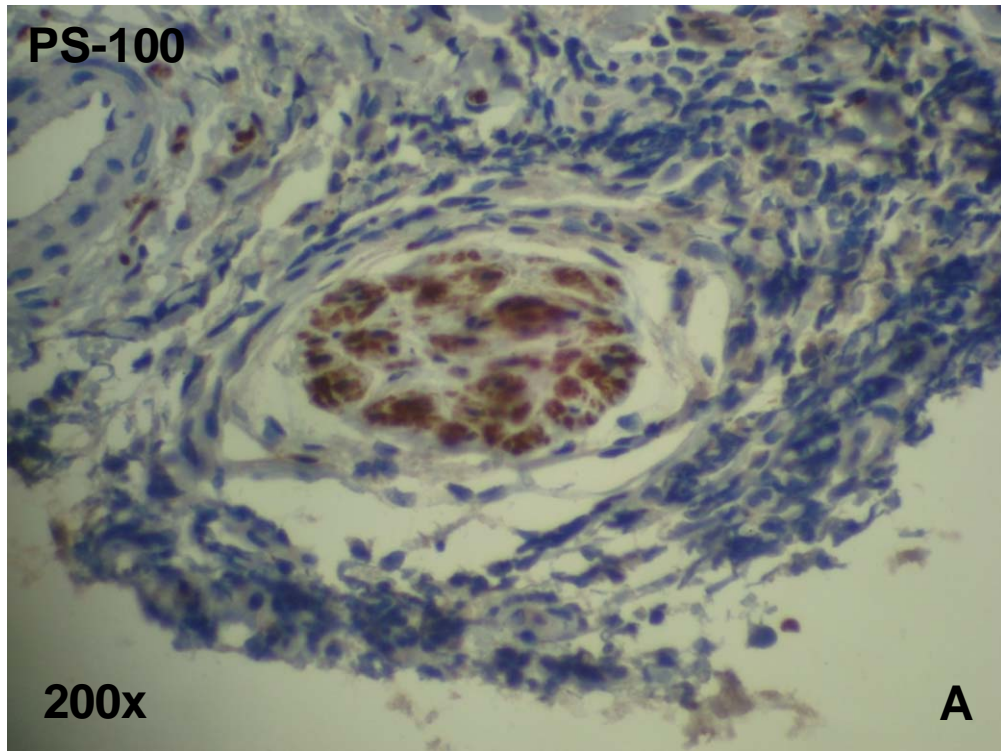
Figuras 7A e 7B: Esboço de granuloma, com filete intacto em corte transversal

Hanseníase Tuberculóide - HP: 99286



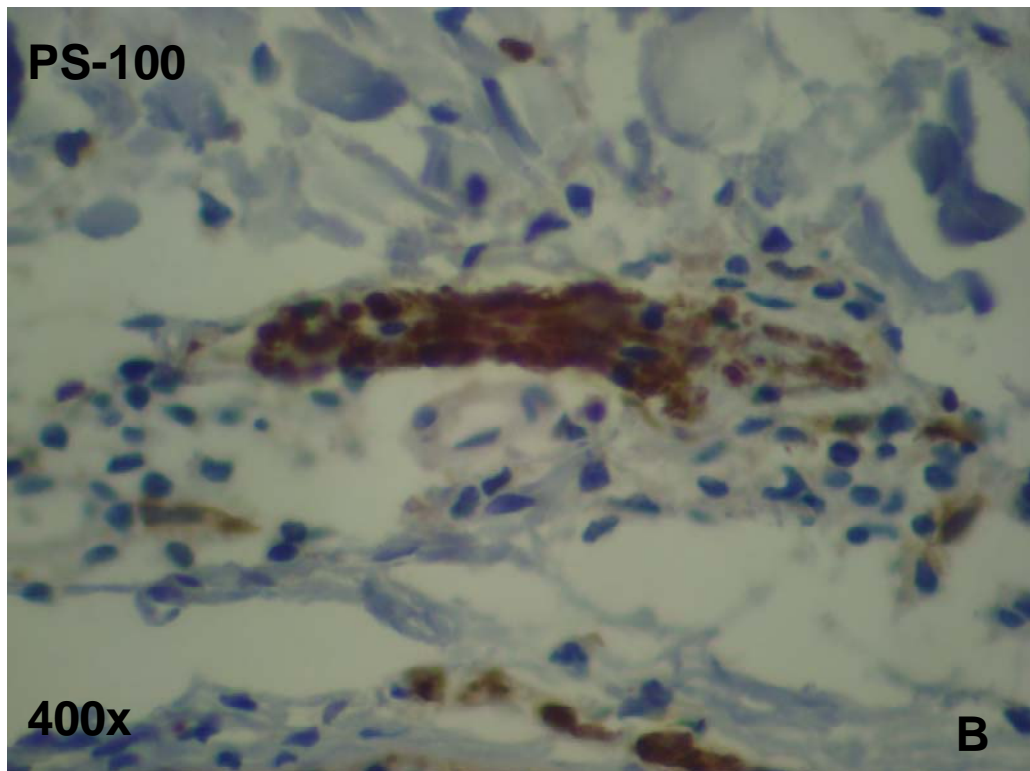
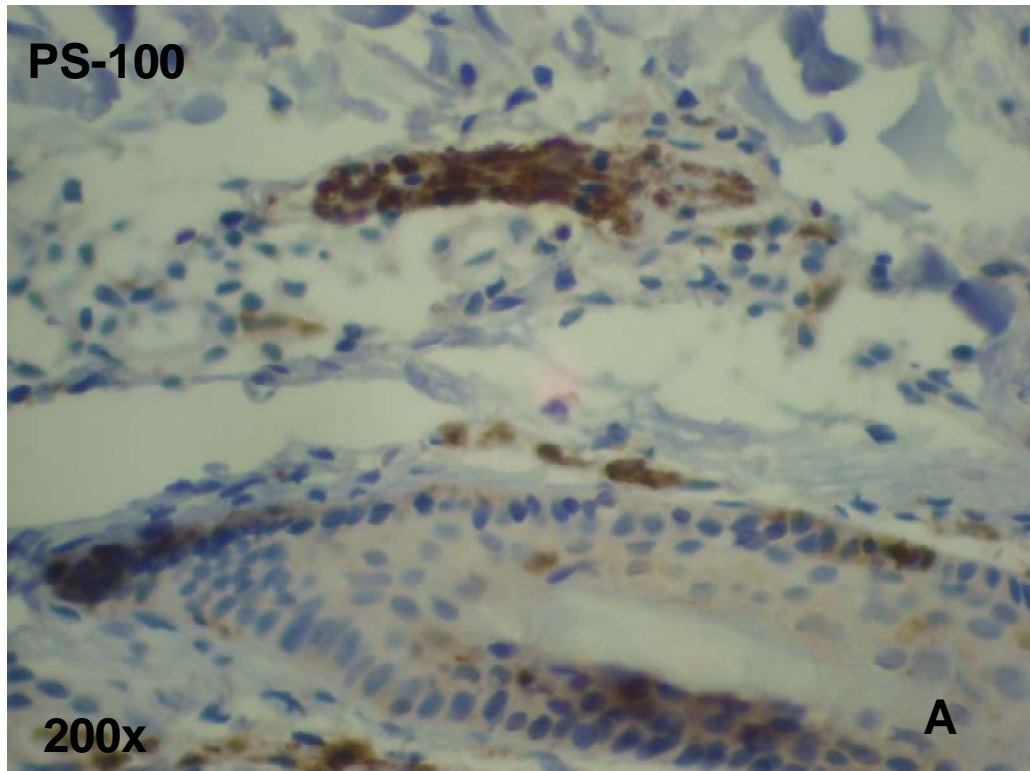
Figuras 8A e 8B: Processo inflamatório infiltrando o perineuro e dissociando a parede do nervo

Hanseníase Tuberculóide - HP: 99286



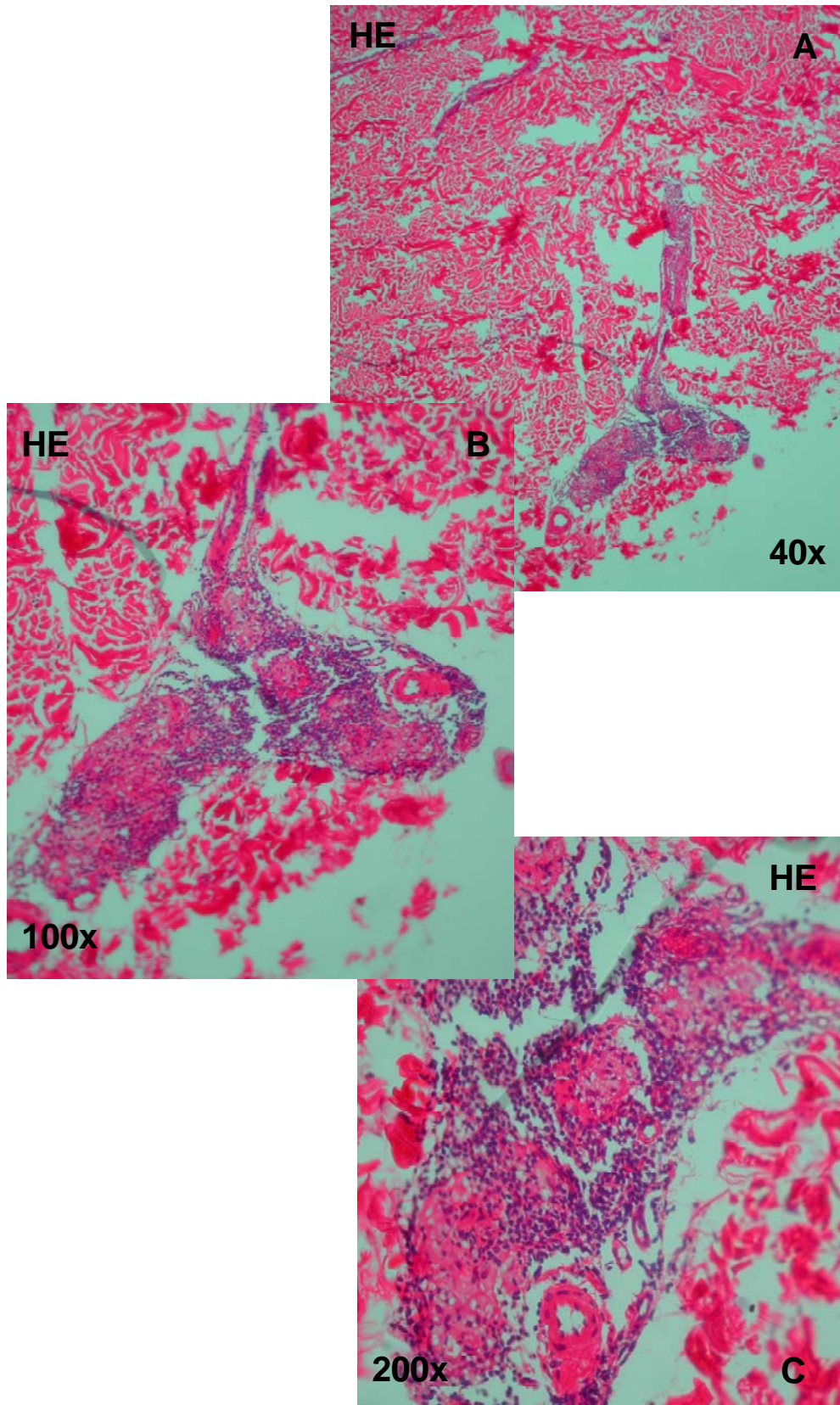
Figuras 9A e 9B: Detalhe da infiltração neural por linfócitos

Hanseníase Tuberculóide - HP: 100794



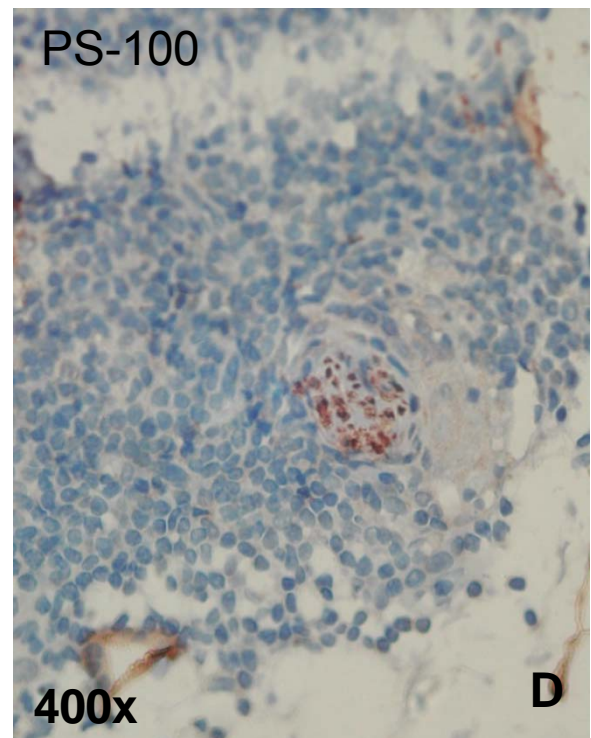
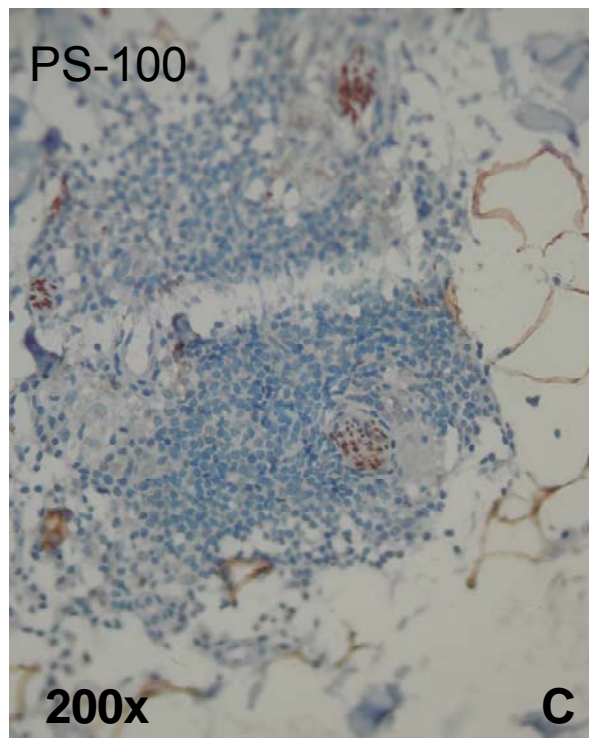
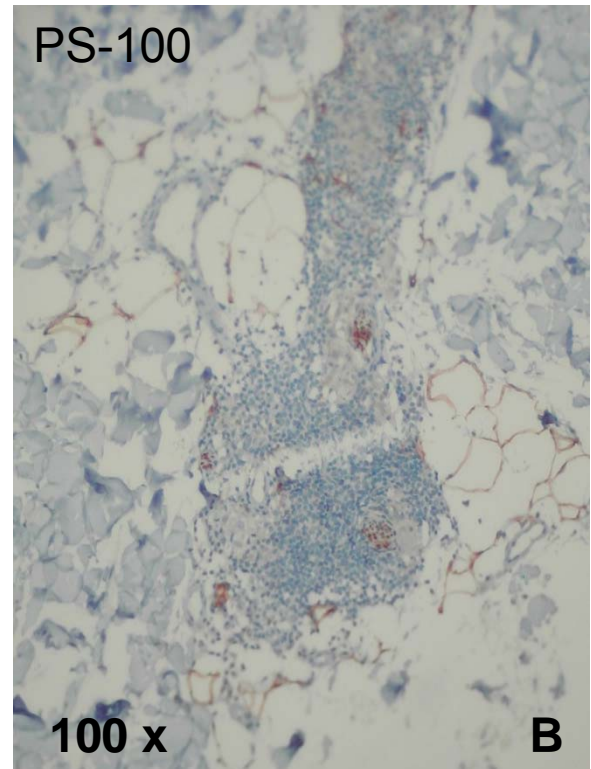
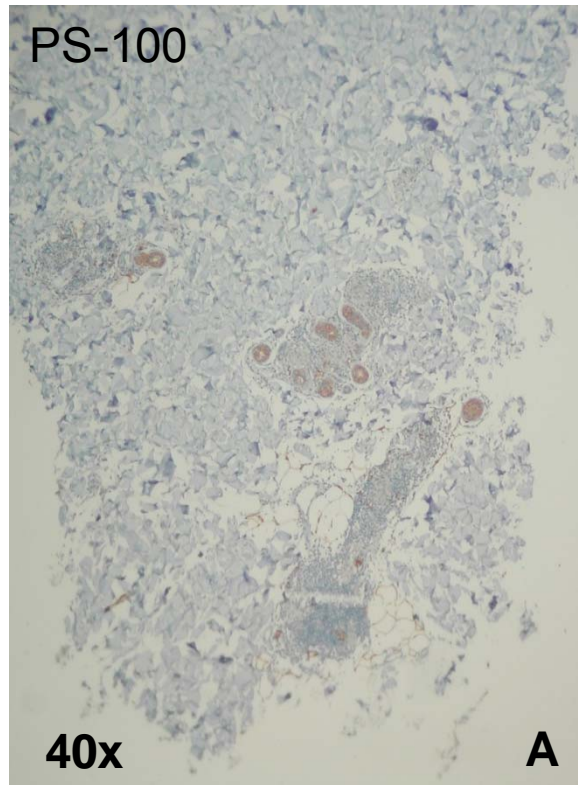
Figuras 10A e 10B: Cortes longitudinais de filetes nervosos, com infiltração do perineuro por linfócitos

Hanseníase Borderline Tuberculóide - HP: 100960



Figuras 11A, 11B e 11C: Filetes nervosos fragmentados e infiltrados por linfócitos

Hansenfase Borderline Tuberculóide - HP: 100960



Figuras 12A, 12B, 12C e 12D: Extenso granuloma em forma de raquete, englobando filete nervoso infiltrado

Hanseníase Borderline Tuberculóide - HP: 111552

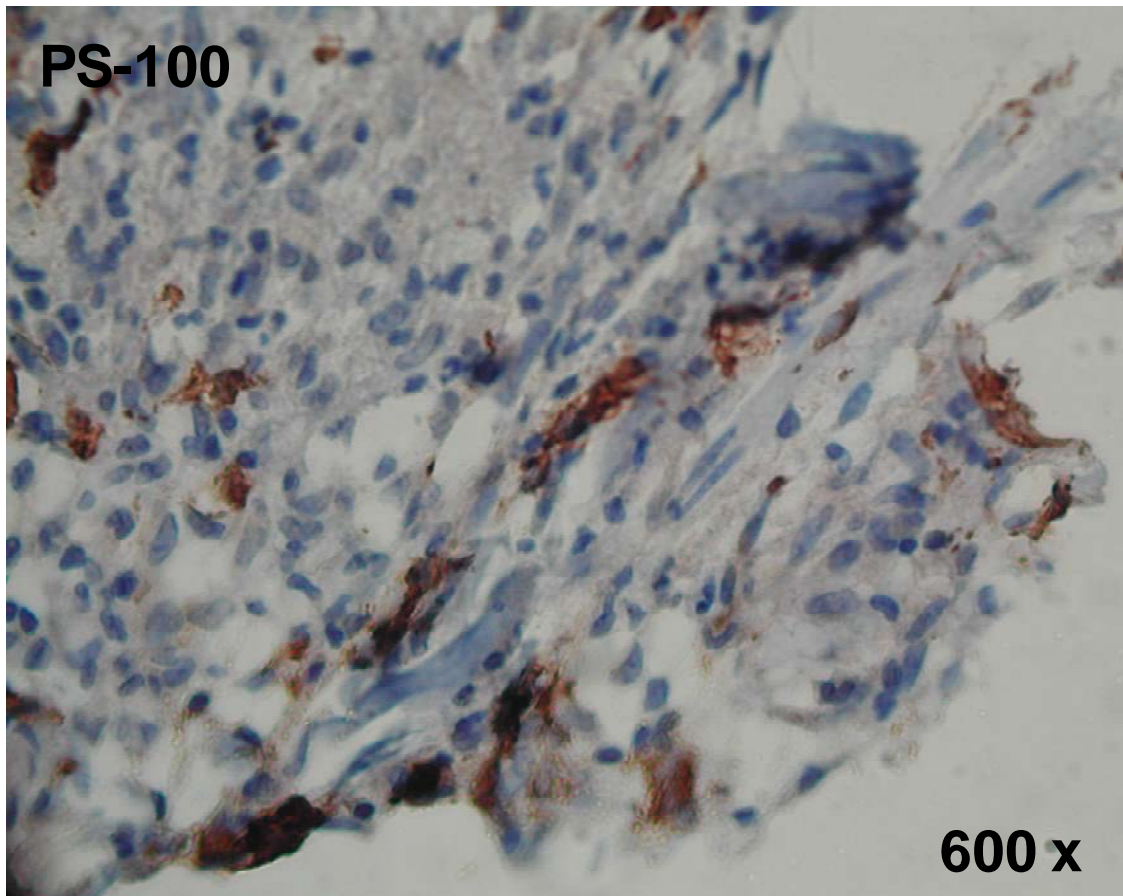
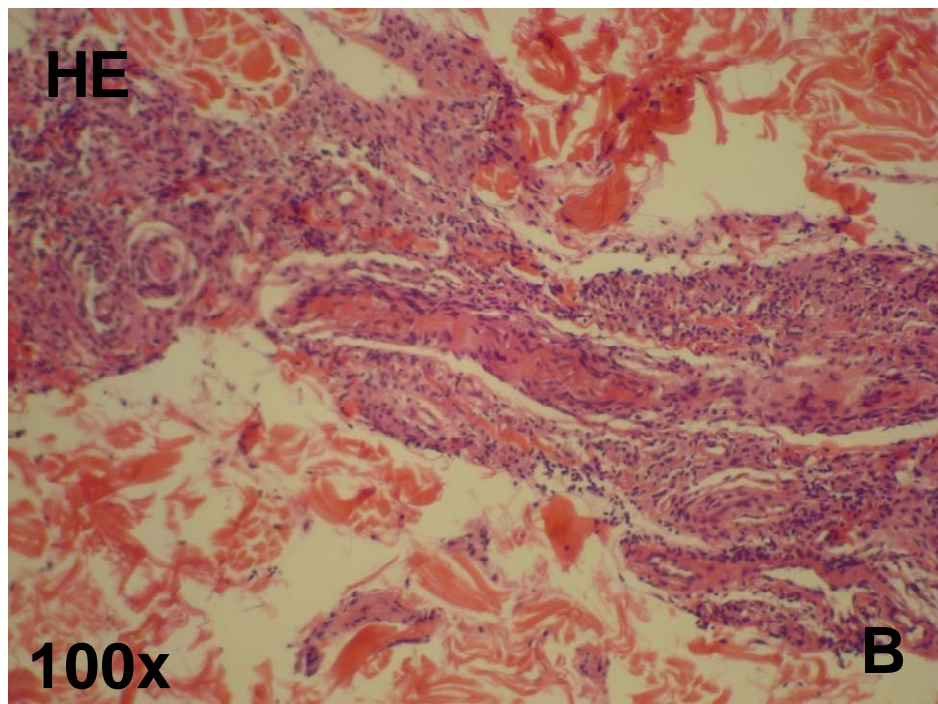
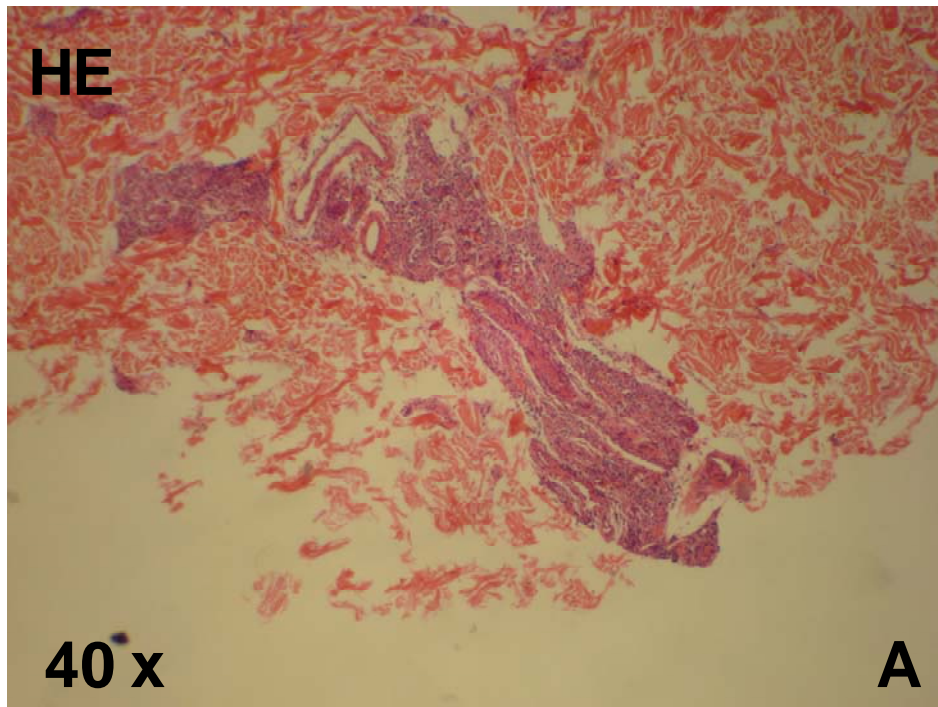


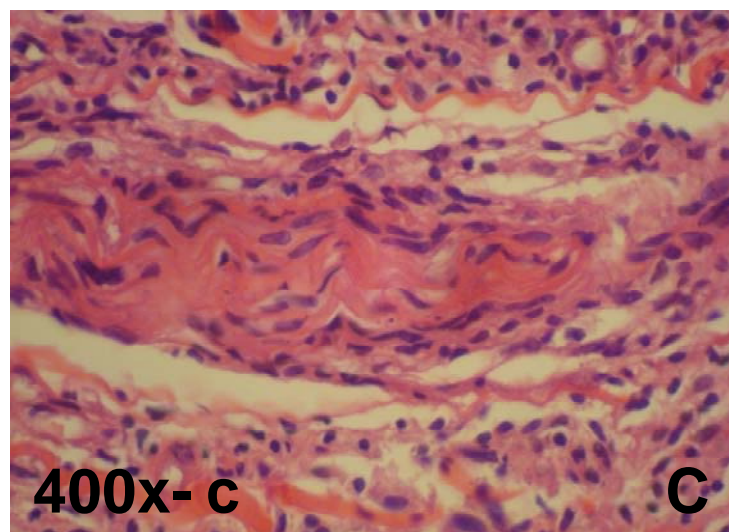
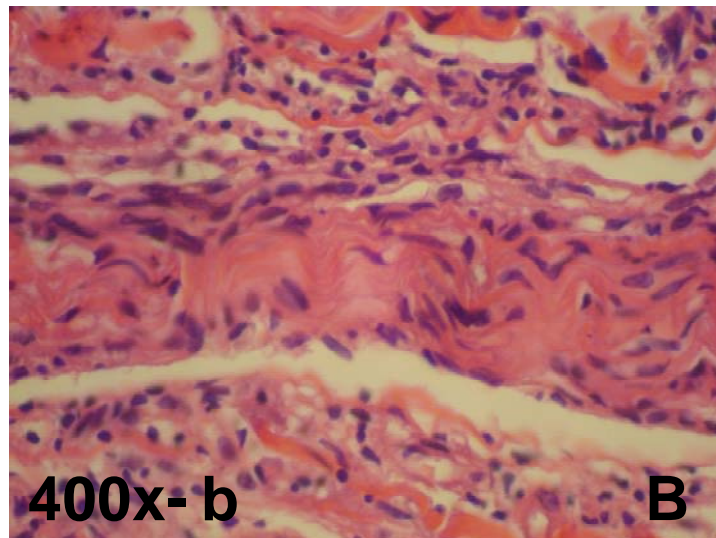
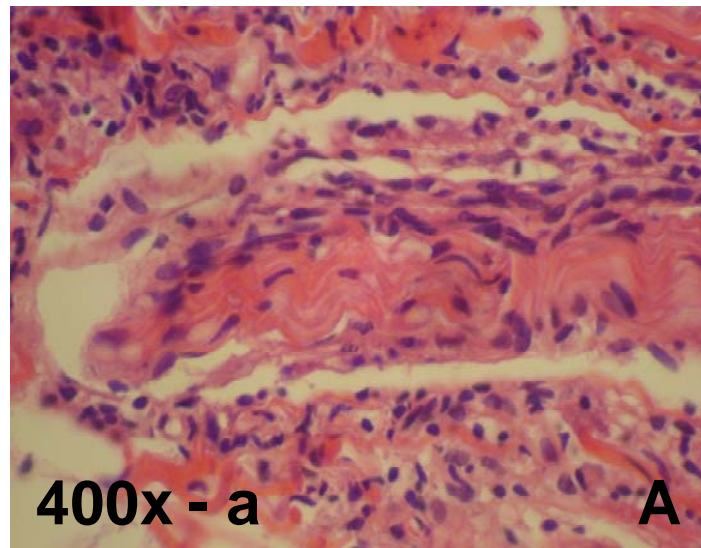
Figura 13: Filetes nervosos fragmentados no interior do processo granulomatoso

Hanseníase Borderline Borderline - HP: 124743



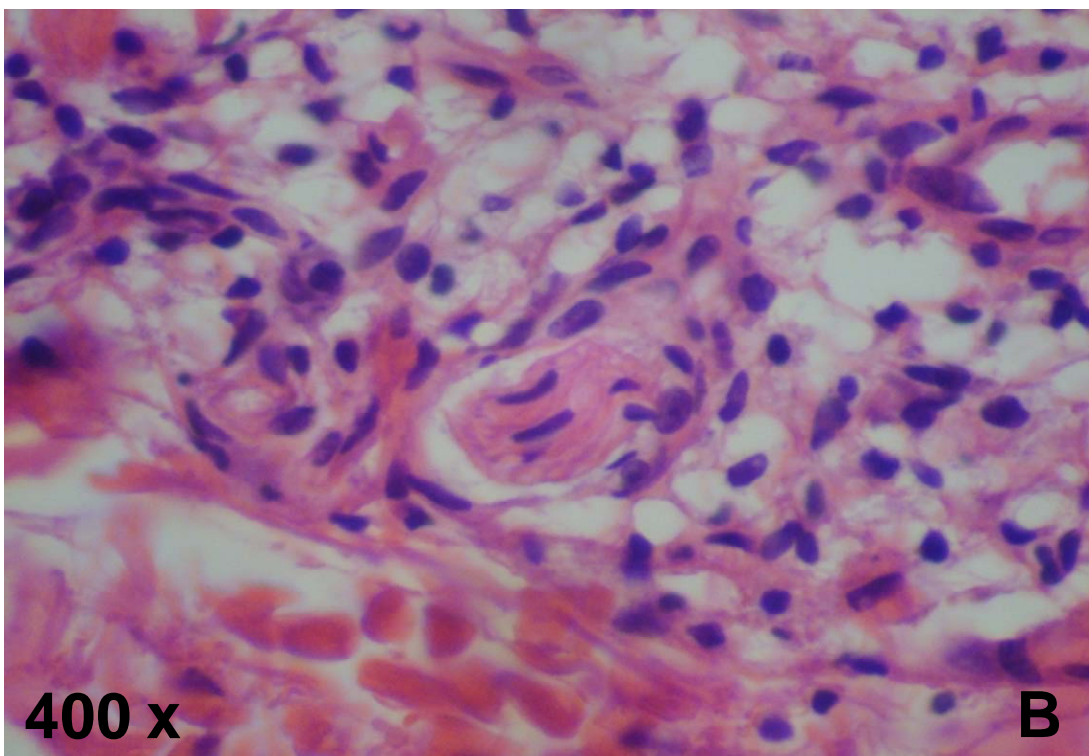
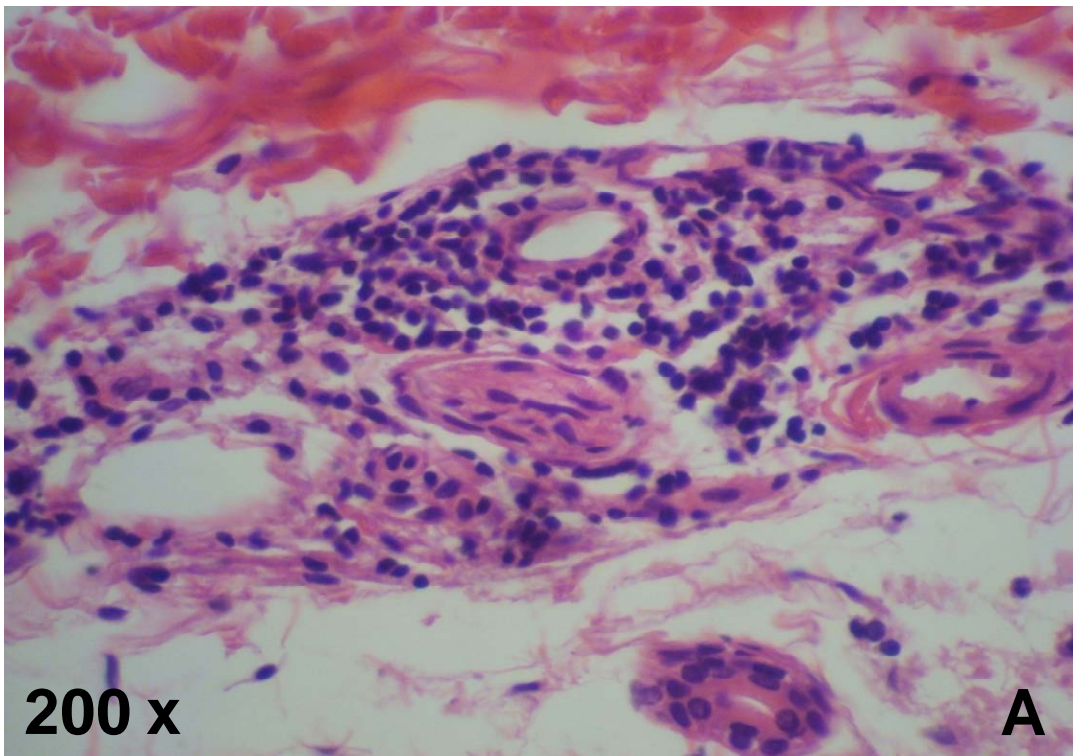
Figuras 14A e 14B: Extenso filete nervoso fragmentado e infiltrado por células linfocitárias

HBB - Cont. HP: 124743 sequência do nervo



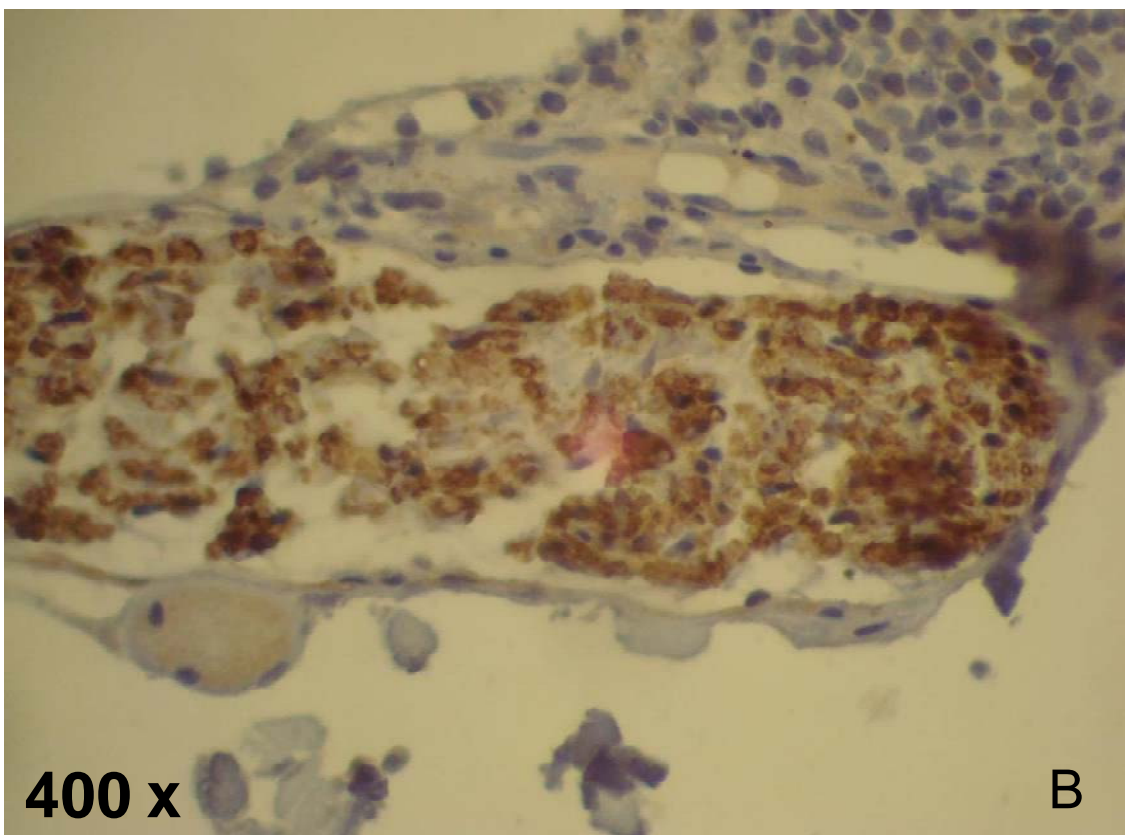
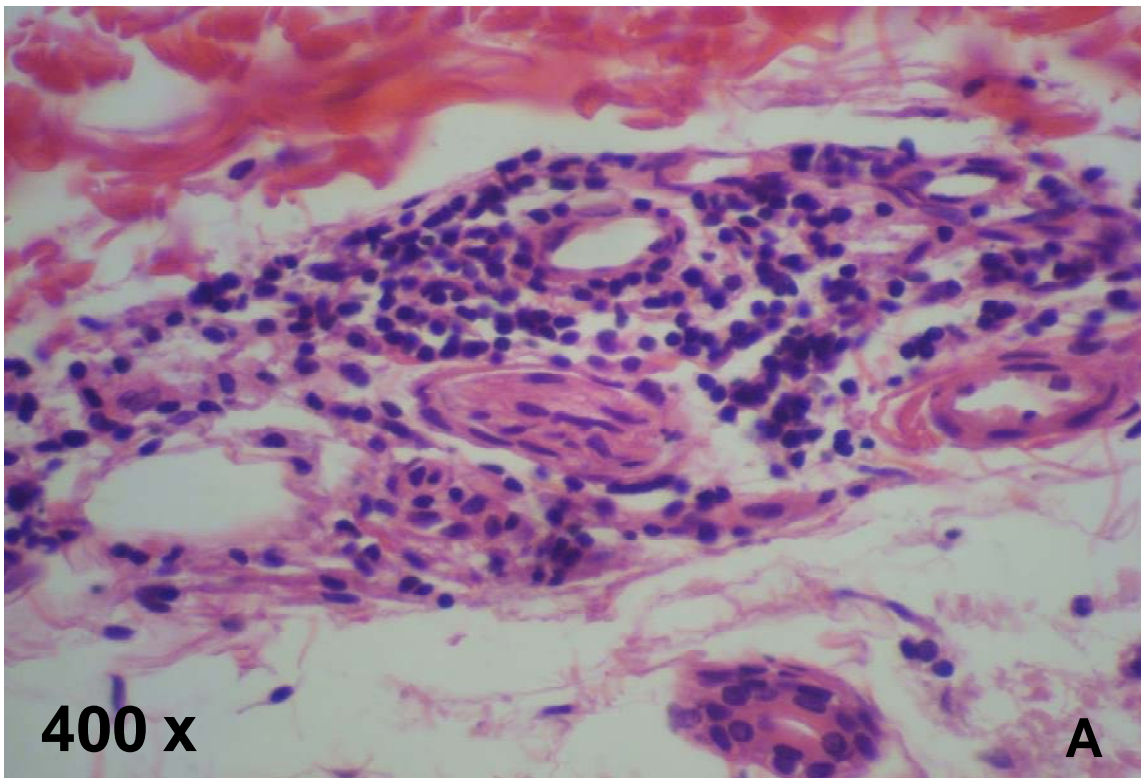
Figuras 15A, 15B e 15C: Sequenciamento do extenso nervo fragmentado e infiltrado

Hanseníase Borderline Virchowiana - HP: 111312



Figuras 16A e 16B: Filete nervoso no centro do granuloma e infiltrado por abundantes linfócitos

Hanseníase Borderline Virchowiana - HP: 11312



Figuras 17A e 17B: Filetes nervosos com intensa infiltração de células mononucleares

Hanseníase Borderline Virchowiana - HP: 101292

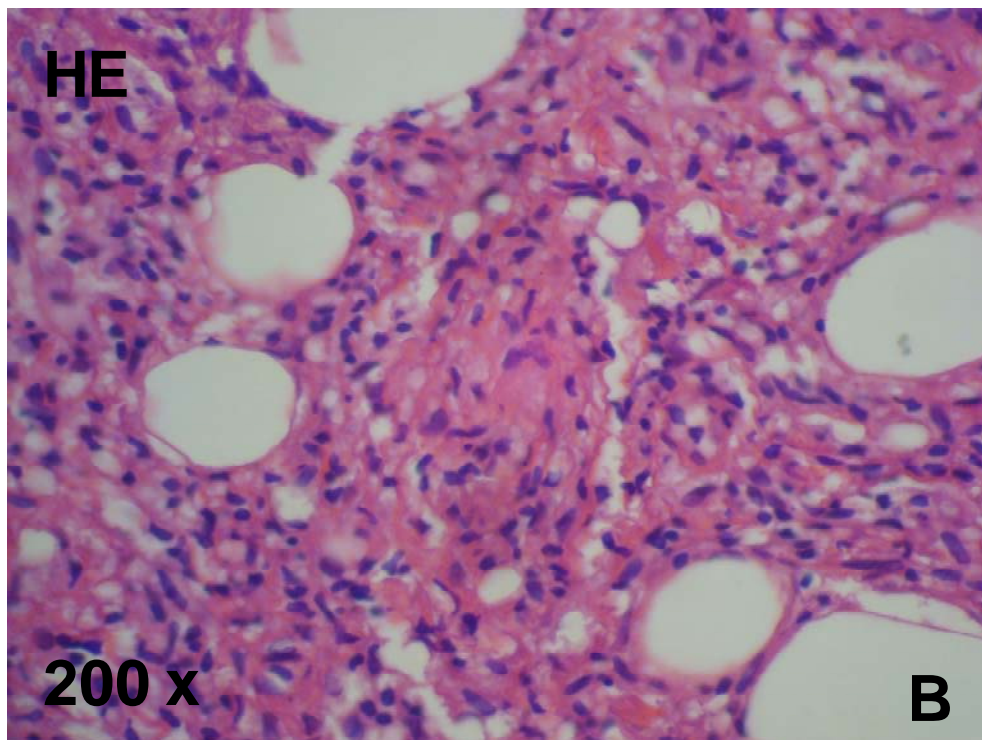
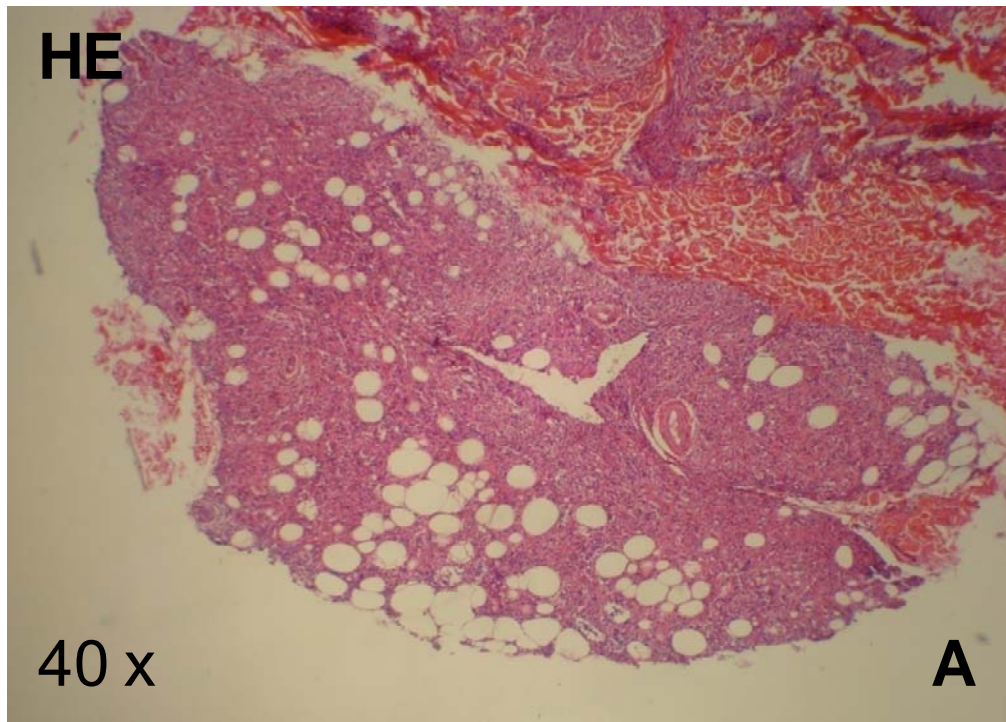
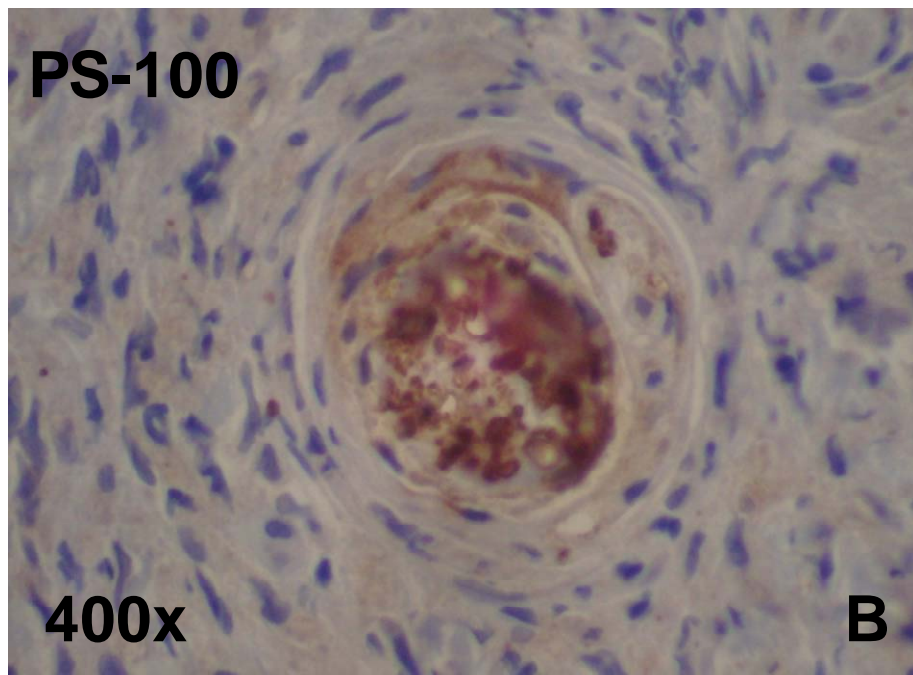
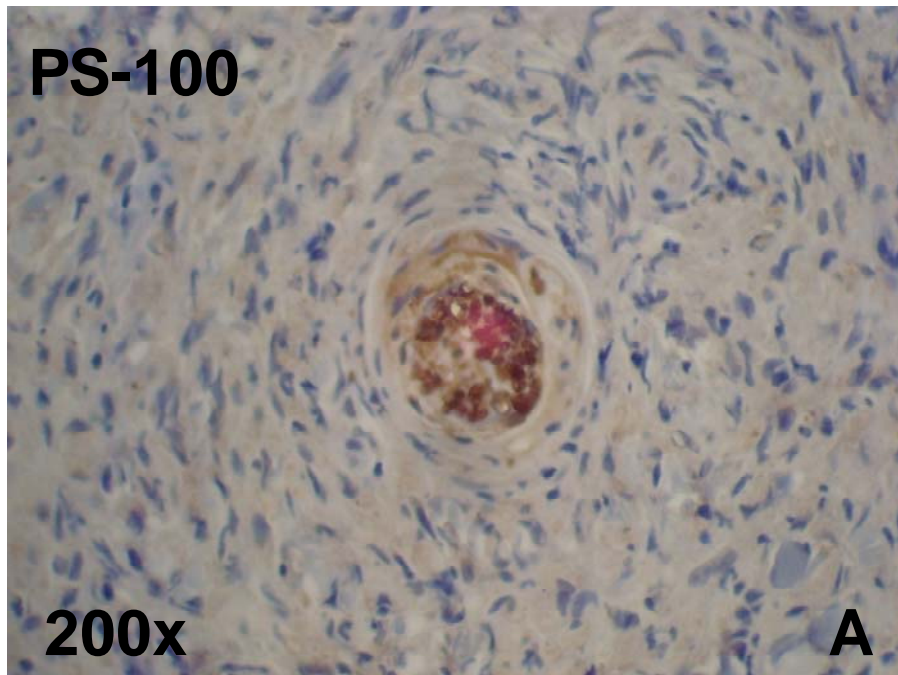


Figura 18A: Panorâmica do processo inflamatório granulomatoso atingindo até o tecido subcutâneo

Figura 18B: Filete nervoso envolvido e infiltrado pelo granuloma de células mononucleares

Hanseníase Borderline Virchowiana - HP: 101292



Figuras 19A e 19B: Filetes nervosos mostrando fibrilas escuras e células inflamatórias

Hanseníase Virchowiana - HP: 117827

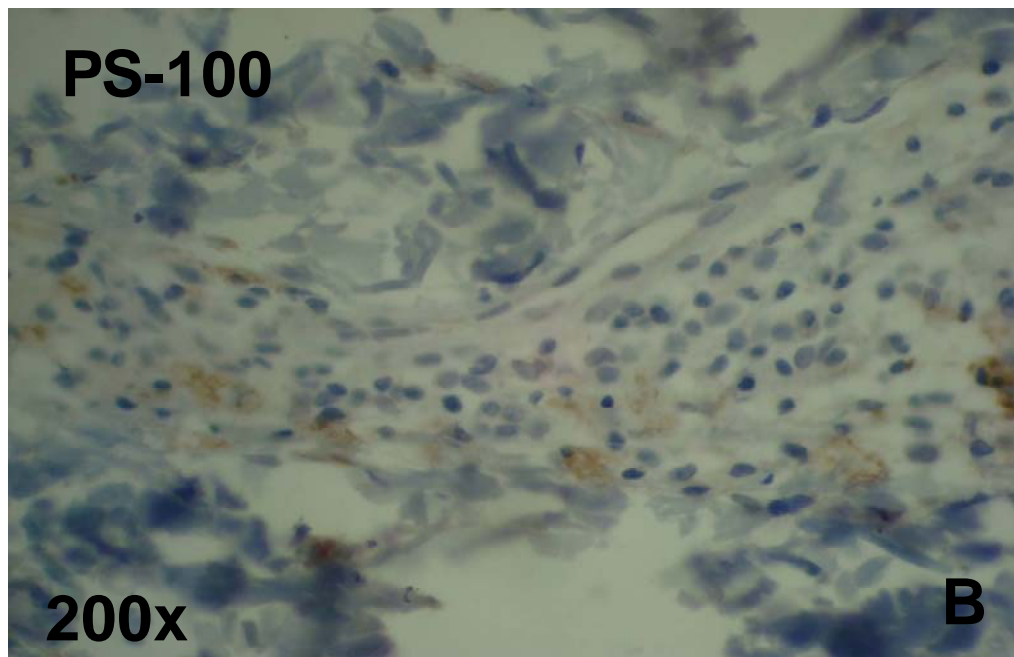
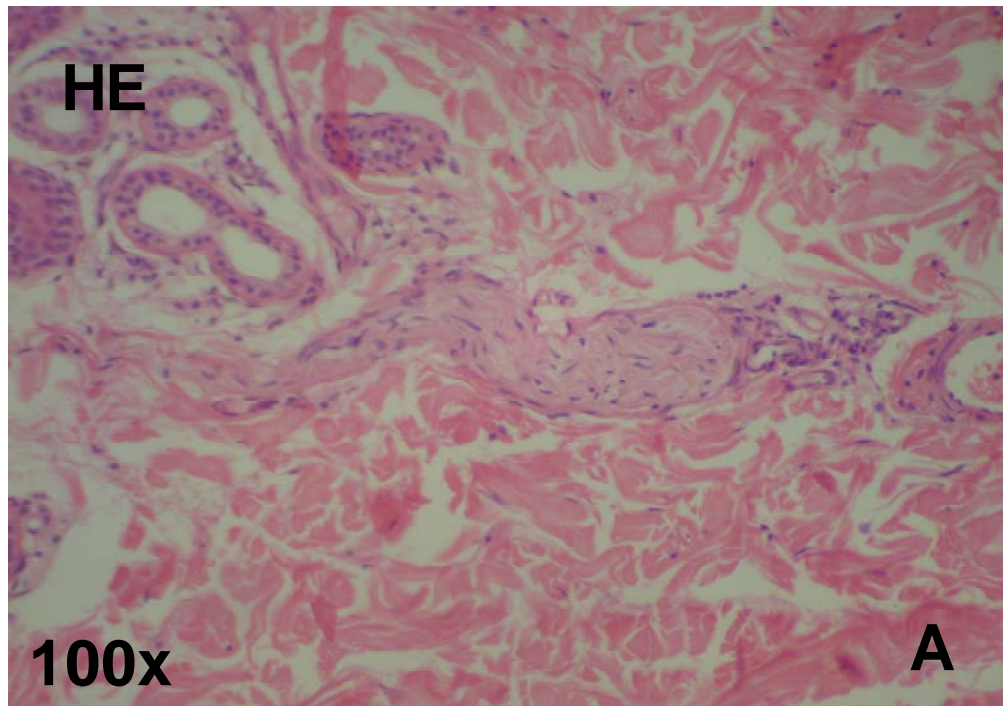


Figura 20A: Filete nervoso seccionado longitudinalmente e infiltrado por linfócitos - H & E

Figura 20B: Visualização da marcação com proteína S-100

9 DISCUSSÃO

O exame anatomopatológico é importante para o diagnóstico e classificação do tipo de Hanseníase, orientando para o correto tratamento dos pacientes. O diagnóstico histológico nos grupos Tuberculóide e Indeterminado é difícil e, frequentemente impossível, devido a dificuldade de detectar os bacilos com a coloração do Ziehl-Wade ou pelo Fite. A positividade na Hanseníase tuberculóide (HT) e Hanseníase borderline (BHT) varia de 0 a 36%, portanto cerca de dois terços dos casos são negativos (FLEURY; BACCHI, 1987; SINGH et al., 1994; THOMAS et al., 1999). Mesmo assim, essa positividade é alcançada, depois da busca exaustiva, em múltiplos cortes de tecido. Por esse motivo, a demonstração evidente do acometimento neural no infiltrado granulomatoso é considerado um achado importante na Hanseníase tuberculóide e Hanseníase borderline tuberculóide, com quase o mesmo significado do achado de bacilos no nervo (JACOB et al., 1990; GUPTA et al., 2006). Isso permite a diferenciação com outras granulomatoses cutâneas, tais como a sarcoidose, tuberculose, sífilis tardia e micoses profundas, nas quais a destruição dos nervos geralmente não é observada (THOMAS et al., 1999). Entretanto, alterações neurais semelhantes à Hanseníase têm sido encontradas em alguns casos de sarcoidose, lúpus vulgar, sífilis secundária, líquen plano e morféia (JACOB et al., 1984; SINGH et al., 1994; BALL; KHO; MARTINKA, 2004). Mesmo assim, a fragmentação neural, num contexto clínico favorável, é um indício diagnóstico da Hanseníase tuberculóide e Hanseníase borderline tuberculóide.

Nas biópsias, os achados indicativos de dano neural são: infiltração densa de células inflamatórias no endoneuro, granulomas endoneurais e identificação de filetes nervosos dentro dos granulomas (FLEURY; BACCHI, 1987).

Frequentemente, o infiltrado inflamatório ou os granulomas obscurecem totalmente a estrutura nervosa. A identificação de remanescentes do nervo dentro dos granulomas, em cortes corados pela coloração de rotina Hematoxilina & Eosina, é difícil, já que esses resíduos são frequentemente confundidos com células epitelióides, fragmentos de músculo eretor do pêlo e pequenos vasos, adenômeros das glândulas sudoríparas e pequenos vasos na periferia dos granulomas (FLEURY; BACCHI, 1987; JOB et al., 1990; THOMAS et al., 1999).

Os primeiros pesquisadores a publicarem um trabalho, utilizando a marcação pela proteína S-100, com finalidade de identificar filetes nervosos e seus fragmentos, em biópsias de pacientes com Hanseníase tuberculóide, foram Fleury e Bacchi (FLEURY; BACHI, 1987). Neste estudo, os autores utilizaram pacientes com Hanseníase tuberculóide confirmados histologicamente e outras doenças granulomatosas. O único paciente em que a aplicação da proteína S-100 não identificou nervos ou seus fragmentos no corte histológico, ou seja, estavam ausentes, demonstrou ser um padrão reconhecido em estudos posteriores, como um dos padrões característicos da Hanseníase tuberculóide, visto que foram interpretados como destruídos pelos granulomas (SINGH et al., 1994; THOMAS et al., 1999; GUPTA et al., 2006). Esse estudo pioneiro abriu as portas para os estudos seguintes, onde Job e colaboradores (1990), já utilizando um grupo controle, encontraram em todas as biópsias de doenças granulomatosas não-Hanseníase, a presença de nervos intactos. Em observações posteriores, outros pesquisadores (GUPTA et al., 2006) concluíram que esse achado está relacionado com a destruição neural encontrada na Hanseníase tuberculóide, uma vez que em nenhum dos casos de Hanseníase tuberculóide ou Hanseníase borderline tuberculóide foram encontrados nervos intactos, portanto, interpretado como uma evidência indireta do diagnóstico.

O nosso trabalho objetivou o estudo dos filetes nervosos nas diferentes formas da Hanseníase, quanto ao método mais eficaz para sua evidenciação, a localização destes filetes em relação aos infiltrados granulomatosos específicos e a identificação do tipo lesão neural ou da existência de nervos intactos. A nossa amostra, incluindo as cinquenta e sete lâminas de Hanseníase e as vinte e três lâminas do grupo controle, as quais foram distribuídas na formação de quatro grupos de padrões histopatológicos: grupo paucibacilar-HT/HBT, grupo paucibacilar-HI, grupo multibacilar-HBB/HBV/HV e grupo controle.

No primeiro estudo, comparando o número de filetes encontrados nestes grupos, o primeiro fator, com quatro níveis, estava relacionado ao padrão histopatológico (fator entre grupos). O segundo fator, com dois níveis, estava relacionado com o tipo de coloração (fator intra grupo). O gráfico 1 nos mostrou a interação entre os dois fatores, bem como um efeito de coloração.

O tipo do padrão histológico não se mostrou significativo ($p=0,88$). Uma análise indicou que houve um aumento significativo na coloração S-100 em relação

à coloração HE no tipo histológico paucibacilar-HT/HBT ($p < 0,001$) bem como na situação controle ($p < 0,001$), mas não nas condições paucibacilar-HI ($p > 0,1$) e multibacilar-HBB/HBV/HV. Acreditamos que estes resultados ocorreram devido a maior sensibilidade deste método na visualização dos filetes nervosos que estavam ocultos pelo denso infiltrado granulomatoso e, também, por se assemelharem com outras estruturas anexiais dérmicas, eram tidas como tais.

Nos grupos paucibacilar-HI e multibacilar-HBB/HBV/HV, não houve significância estatística, interpretados, provavelmente por estes grupos apresentarem respectivamente, um infiltrado inicial leve e inespecífico com poucos filetes e, um infiltrado virchowiano não granulomatoso, mais frouxo e não dificultando a visualização dos filetes; deste modo, prescindindo da marcação imunohistoquímica pela S-100.

Concluimos que no estudo do número de filetes, comparando a coloração pelo HE e a marcação pela proteína S-100, esta última mostrou-se mais eficaz, sobretudo, na comparação intra grupos dos paucibacilares-HT/HBT e no grupo controle da sarcoidose.

Não houve diferença significativa entre a coloração pelo HE e a marcação pela proteína S-100 marcações, quando comparado todos os inter grupos.

Finalizando, para evidenciar os filetes nervosos, os resultados demonstraram que a marcação pela proteína S-100 foi mais eficaz do que a coloração da HE, nos grupos HT e HBT e no grupo controle, porém, nos grupos HI e MB não demonstrou o mesmo desempenho.

Estes dados estão de acordo com a revisão da literatura, ressaltando que nos trabalhos publicados, não houve a inclusão do grupo MB, visto que neste grupo, habitualmente não há dificuldade no diagnóstico diferencial com as outras doenças granulomatosas. Optamos por incluir este grupo, com a finalidade de realizar um estudo comparativo do comprometimento dos filetes nervosos entre as várias formas da doença.

Na segunda fase do nosso trabalho, observamos os achados da localização ou distribuição dos filetes neurais em relação aos infiltrados inflamatórios, sobretudo os granulomatosos, onde na nossa prática diária confronta com as maiores dificuldades na diferenciação diagnóstica.

Com a finalidade de analisar os padrões de distribuição dos filetes nervosos dérmicos, quatro padrões distintos foram identificados, de acordo com o estudo

publicado por Singh e colaboradores (1994): Padrão nº 1 (filetes nervosos “Dentro dos granulomas”), Padrão nº 2 (filetes nervosos “Entre os granulomas”), Padrão nº 3 (filetes nervosos “Dentro e Entre os granulomas”) e Padrão nº 4 (filetes nervosos “Indetectáveis”).

Singh e colaboradores (1994) estudando um total 40 casos, sendo 12 casos de Hanseníase tuberculóide, sem confirmação e 28 casos-controle granulomatoso não-Hanseníase, observaram que entre os tuberculóides, 7 mostraram filetes nervosos dentro do granuloma (58,3%) e ,em 5 doentes (41,6%%), ausência de filetes nervosos. Entre os controles, das 28 lâminas disponíveis, 25 (89,2%) revelaram filetes nervosos fora do granuloma (“Entre os granulomas”), caracterizando o padrão nº 2.

Singh e colaboradores (1994) chamam também a atenção que a ausência completa de filetes nervosos (41,6%) no seu estudo, dentro ou fora do granuloma, é o critério mais confiável para o diagnóstico de Hanseníase tuberculóide. Estes foram os primeiros autores a relacionar a ausência de filetes nervosos com o diagnóstico de Hanseníase, uma vez que traduzem a destruição total dos filetes nervosos pela inflamação granulomatosa.

Thomas e colaboradores (1999) contestam que este seja o padrão mais encontrado. Na sua amostra só encontrou 16 % de nervos ausentes, fato concordante com nossos resultados, em que só verificamos 8% de filetes ausentes. O achado de nervos ausentes é apenas um dos padrões identificados nos estudos posteriores, que serão detalhados mais adiante.

Na nossa amostra, comparando o grupo paucibacilar-HT/HBT e o grupo controle granulomatoso não-Hanseníase, constatamos que no grupo paucibacilar-HT/HBT, os resultados foram concordantes com a literatura quanto ao padrão nº1 (“Dentro do granuloma”), com 40%, porém, na nossa casuística obtivemos também 48% de filetes nervosos no padrão nº 3 (“Dentro e Entre o granuloma”) e apenas 8% de filetes “Indetectáveis”.

Portanto, houve significância estatística em relação ao padrão nº1 (“Dentro do granuloma”), onde a sarcoidose-controle não revelou nenhum caso (0%) e o grupo paucibacilar-HT/HBT (40%) ($p=0,027$).

Neste grupo, os resultados traduzem o neurotropismo dos granulomas que está direcionado aos BAAR existentes nos filetes nervosos. Logo, os granulomas

estão na maioria das vezes abrangendo filetes nervosos (padrão “Dentro e Entre”) e (padrão “Dentro do granuloma”).

Em relação ao padrão nº 3 do grupo controle, (“Dentro e Entre o granuloma”) que mostrou também 30,7%, dos casos, contrapondo com os 48 % do paucibacilar-HT/HBT, os resultados sugerem que os granulomas da sarcoidose possam também englobar filetes nervosos casualmente. Nesse caso, importa identificar a existência ou não de dano neural, se estão íntactos ou se estão comprometidos pelos granulomas, ou seja, Infiltrados, Fragmentados ou completamente destruídos (Ausentes), para a diferenciação com a Hanseníase.

A ocorrência, na nossa amostra, de apenas 1 caso (4%) de padrão nº 2 (“Entre o granuloma”), no grupo paucibacilar-HT/HBT traduz a falta de neurotropismo. Já no grupo controle predominou o achado entre os granulomas com 62,5% dos casos. De acordo com a revisão da literatura, o padrão nº4 (“Indetectáveis”), também traduz neurotropismo, porém, com destruição completa do nervo e impossibilitando sua identificação, como provavelmente ocorreu nos 5 casos da casuística de Sing e colaboradores.

Nos nossos resultados, apenas 2 casos (8%) do grupo Paucibacilar-HT/HBT e em 1 caso (4,3%) do grupo controle, observamos o padrão nº 4 (indetectáveis). Explicaríamos o resultado do grupo paucibacilar, pela destruição dos filetes, porém, não encontramos uma resposta satisfatória para a ocorrência de um caso desse padrão no grupo controle.

No grupo controle, também foi significativamente maior (65,2%) $p < 0,001$ os achados do padrão nº 2 (“Entre o granuloma”). Interpretamos estes achados da sarcoidose, pelo fato do infiltrado distribuir aleatoriamente na derme, sem ter como “alvo” os filetes nervosos, daí o predomínio desse padrão entre os demais.

Analisando o grupo paucibacilar-HI, embora não tenhamos dados na literatura pesquisada, observamos que foi significativa a maior proporção do padrão nº 2 (“Entre o granuloma”), ocorrendo em 58,8% dos casos. O padrão nº 1 (“Dentro dos granulomas”) foi visto em 23,5%. O padrão nº4 (“Indetectáveis”) foi revelado em 11,8% e, em apenas 5,9%, mostrou o padrão nº 3 (“Dentro e Entre os granulomas”). Esses resultados podem ser justificados por se tratar-se de uma forma inicial da doença, onde o infiltrado é inespecífico, sem granulomas bem constituídos, logo, sem uma inflamação e uma agressão neural mais pronunciada. O resultado do

achado de dois casos com padrão nº 4 (“Indetectáveis”), provavelmente indica a inexistência de filetes nas amostras.

Analisando o grupo multibacilar-HBB/HBV/HV, houve predomínio do padrão nº 1 (“Dentro do granuloma”), observado em 46% dos diagnósticos positivos nas preparações imunohistoquímicas. Os padrões nº 3 (“Entre e Dentro dos granulomas”) e nº 4 (“Indetectáveis”) apresentaram distribuições idênticas, com 26,7% de lâminas positivas para cada padrão histopatológico.

Interessante notar que os resultados no grupo multibacilar demonstraram somente padrões bastante relacionados à agressão neural, principalmente o padrão nº 1 (“Dentro do granulomas”), indicando que exista um dano neural pronunciado, inclusive com o maior número do padrão nº 4 (Indetectáveis) do que no grupo paucibacilar, demonstrando a completa destruição dos nervos.

Entre o total de lâminas de Hanseníase distribuídas pelos três padrões histopatológicos, o nosso estudo mostrou o predomínio do padrão nº 1 (“Dentro dos granulomas”), com 36% dos casos confirmados pela marcação imunohistoquímica. Em seguida, encontramos o padrão nº 3 (“Dentro e Entre os granulomas”), com 29,8%. O padrão nº 2 (“Entre os granulomas”) foi evidenciado em 19,3% e, por último, o padrão nº 4 (“Indetectáveis”), em apenas 14 %.

Em relação ao padrão nº 2 (“Entre os granulomas”), cabe ressaltar que o percentual total de 19,3% encontrada, foi devido ao grupo paucibacilar-HI, responsável por 58,8% dos casos, pois o grupo paucibacilar-HT/HBT, só mostrou 4%, e o grupo multibacilar não revelou nenhum caso (0 %). Podemos perceber que o grupo paucibacilar-HI comprometeu a fidelidade dos resultados. Reforçamos que isso ocorreu, apenas pelo fato da Hanseníase indeterminada constituir numa forma inicial da doença.

De forma prática podemos extrair dessas observações os seguintes pontos:

O padrão nº 1 (“Dentro dos granulomas”) e o padrão nº 3 (“Dentro e Entre os granulomas”) são próprios da Hanseníase paucibacilar-HT/HBT e Hanseníase multibacilar-HBB/HBV/HV.

O padrão nº 2 (“Entre os granulomas”) é próprio do grupo controle, porém, em menor número, também encontrado o padrão nº 3 (“Dentro e Entre os granulomas”). Neste caso cabe analisar o tipo de dano neural, que foi objeto da terceira fase do nosso trabalho.

Nesta terceira fase, auxiliados pela marcação imunohistoquímica com a proteína S-100 e, com a finalidade de analisar o tipo de lesão dos filetes nervosos nos três padrões histopatológico da Hanseníase e no padrão controle, destacamos os quatro tipos possíveis de agressão neural: padrão Infiltrado (A), padrão Fragmentado (B), padrão Ausente (C) e padrão Intacto (D), conforme os estudos publicados por Thomas e colaboradores (1999) e Gupta e colaboradores (2006).

Com o propósito de tornar mais objetiva a análise dos resultados, preferimos dividir os padrões em dois grupos: a existência de dano neural e de nervos intactos.

Os padrões Infiltrado, Fragmentado e Ausentes, traduzem a existência de dano neural, enquanto o achado de nervos intactos revela que não houve dano neural.

Comparamos os nossos achados, sobretudo, o dos grupos paucibacilar-HT/HBT e o grupo controle, pois, os trabalhos disponíveis na literatura concentram os seus estudos nas comparações entre a Hanseníase tuberculóide e a Hanseníase borderline tuberculóide com as outras doenças granulomatosas não-Hanseníase, visando e destacando as diferenças sobre ambas granulomatoses, com a finalidade de obter dados histológicos para auxílio no diagnóstico diferencial.

Nos nossos resultados, não foram observados nervos intacto (0%) nos vinte e cinco casos do grupo paucibacilar-HT/HBT, e também em nenhum dos casos do grupo multibacilar-HBB/HBV/HV. No grupo controle foram encontrados nervos intactos em 82,6% dos vinte e três casos. Comparando estes resultados com a literatura encontramos correspondência com os achados de Fleury e Bacchi (1987), Thomas e colaboradores (1999) e Gupta e colaboradores (2006), que não observaram nervos intactos em nenhum dos casos de HT e HBT.

Em relação ao grupo paucibacilar-HI, evidenciamos nervos intactos em 64,7% dos casos, contrastando com os achados de Gupta e colaboradores (2006) que foram os únicos a incluir pacientes deste grupo no trabalho e, encontrando 20% dos casos.

No grupo controle, detectamos 82,6% de nervos intactos, diferentemente de Thomas e colaboradores (1999) e Gupta e colaboradores (2006) que encontraram nervos intactos em 100% dos casos.

Com isso, em relação ao dano neural, detectamos os padrões Infiltrado (A), Fragmentado (B) e Ausente (C) em 100% dos casos paucibacilar-HT/HBT e também em 100% dos casos MB.

Nos pacientes paucibacilar-HI, o dano neural foi observado 35,3% dos casos, incluindo todos os padrões: Infiltrado, Fragmentado e Ausente.

Nossos dados estão de acordo com a literatura, onde Thomas e colaboradores (1999) encontraram dano neural em 100% dos casos estudados, exceto no grupo paucibacilar-HI. Portanto, podemos concluir que a existência de dano neural pode ser demonstrada pela marcação com a proteína S-100 em 100% dos casos de Hanseníase tuberculóide, Hanseníase borderline tuberculóide e também no grupo multibacilar-HBB/HBV/HV, onde não foram evidenciados nervos intactos tanto no nosso trabalho como na literatura. O achado de nervo intacto indica outras doenças granulomatosas não-Hanseníase ou em menor percentagem Hanseníase indeterminada, onde não existe um granuloma bem estabelecido e, portanto, incapaz de produzir uma lesão neural.

Em relação aos estudos da sensibilidade e especificidade dos dois tópicos: tipo de lesão neural e distribuição dos filetes nervosos na Hanseníase, em comparação com o grupo controle da sarcoidose, neste último quesito, retiramos o grupo Indetectáveis, por não sabermos aonde agrupá-los.

Optamos por comparar os grupos “Dentro” x “Entre” para o diagnóstico da Hanseníase, uma vez que nenhum caso de sarcoidose-controle apresentava filetes nervosos dentro dos granulomas.

A sensibilidade foi baixa, 65,6% (IC=95%: 49,2 a 82,2) e a especificidade foi de 100%, quando incluímos todas as formas paucibacilares, porém, retirando o grupo paucibacilar-HI, que apresentava um número significativo de lâminas (n=10) na localização “Entre”, a sensibilidade aumentou para 94,4% (IC=95%: 83,9 a 100), mantendo a especificidade em 100% e, mostrando tratar-se de um excelente exame diagnóstico, com acurácia de 97% (IC=95%: 91,1 a 100%).

Outra forma de aumentar a sensibilidade é incluir, juntamente com o grupo “Dentro”, o achado histológico “Dentro e Entre os granulomas”, como indicativo de Hanseníase, porém, esse procedimento não elevou significativamente a sensibilidade, e também causou uma perda da especificidade (sensibilidade = 77,6% x especificidade = 68,2%), visto que a sarcoidose-controle mostrou-se presente, também nesta localização, em 30,7% com 7 casos observados.

Na análise dos estudos da sensibilidade e especificidade, dos tipos de lesões dos filetes nervosos, como parâmetros para auxílio no diagnóstico diferencial entre a Hanseníase, sobretudo, nas suas formas granulomatosas e o grupo controle,

destacamos que este método diagnóstico, conforme se pode constatar, a soma dos padrões Infiltrado, Fragmentado e Ausente produz uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 82,6% (IC=95%: 67,1 a 98,4) e com uma acurácia diagnóstica de 93,7% (IC=95%:87,6 a 99,7) quando o padrão paucibacilar-HI encontra-se ausente. Por outro lado, quando este padrão é incluído, a especificidade mantém-se em 82,6%, ao passo que a sensibilidade cai para 80,7%.

Quando utilizamos as lesões dos filetes nervosos isoladamente, dentro dos mesmos padrões histopatológicos, observamos uma queda da sensibilidade variando de 36,6% até 47,5% e, a especificidade alta, variando de 90,5% até 91,3%.

Finalizando, quando incluímos todas as formas de alterações dos filetes nervosos, este parâmetro mostrou-se útil como mais um auxílio no diagnóstico diferencial histopatológico com o grupo controle-sarcoidose.

Acreditamos, porém, que ainda é necessário aumentar o número de casos, o que nos permitirá diminuir o Intervalo de Confiança, levando a uma maior precisão da acurácia do teste diagnóstico.

Além disso, o aumento da amostra permitirá a avaliação da associação destes achados com outras alterações clínico-patológicas.

10 CONCLUSÃO

1. A marcação com proteína S-100 mostrou-se mais eficaz do que a coloração de rotina Hematoxilina & Eosina, na visualização dos filetes nervosos dérmicos, sobretudo nos grupos paucibacilares-HT/HBT e no grupo controle.

2. A marcação com a proteína S-100 foi mais eficaz do que a coloração da Hematoxilina & Eosina, na quantificação dos filetes nervosos na derme, principalmente na comparação intragrupo paucibacilar-HT/HBT e controle. A análise quantitativa intergrupos paucibacilar-HT/HBT, paucibacilar-HI, multibacilar-HBB/HBV/HV, não mostrou diferenças significativas entre os grupos da Hanseníase e do grupo controle.

3. A análise da distribuição dos filetes demonstrou que pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre o grupo paucibacilar-HT/HBT e o grupo controle, onde predominam respectivamente o padrão de filetes “Dentro e Entre os granulomas” / “Dentro dos granulomas e o padrão “Entre os granulomas”. O padrão “Dentro e Entre os granulomas” pode ser encontrado também no grupo controle; neste caso, a análise isolada da distribuição dos filetes nervosos, em relação ao infiltrado inflamatório, não auxilia no diagnóstico diferencial entre os dois grupos, necessitando da observação do tipo de lesão do filete nervoso.

4. O achado ou não do tipo da lesão neural, foi o aspecto mais importante para o diagnóstico diferencial entre os grupos HT/HBT e o grupo controle, alcançando resultados com elevada significância estatística. Os padrões de dano neural: filetes nervosos “Infiltrados”, “Fragmentados” ou “Ausentes” ocorreram em 100% dos casos do grupo HT/HBT e MB, demonstrando que o dano neural é característico desses pacientes. O padrão de filetes nervosos “Intactos”, relacionado a inexistência de dano neural, não foi observado em nenhum caso, ao contrário do grupo controle que mostrou esse padrão em 84,6% dos casos.

5. A presença do achado histopatológico, filetes nervosos “Dentro dos granulomas”, aponta para o diagnóstico de Hanseníase com uma acurácia de 97%% (IC=95%: 91,1% a 100%), enquanto que a observação de nervo “Intacto” sugere a ausência

desta doença, com uma acurácia de 93,7% para um (IC=95%: 87,6% a 99,7%), considerando o diagnóstico de formas paucibacilar-HT/HBT/MB em comparação com o grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ALCAIS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J.L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol.*, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 44-48, feb. 2005.
- ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 373-382, mai./jun.2003.
- AVRAMEAS, S.; TERNYCK, T. The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, [S.l.], v. 6, p. 53-66, 1969.
- BALL, N.J.; KHO, G.T.; MARTINKA, M. The histologic spectrum of cutaneous sarcoidosis: a study of twenty-eight cases. *J Cutan Pathol.*, [S.l.], v. 31, n. 2, p. 160-168, feb. 2004.
- BRAILE, D.M.; GODOY, M.F. Programa para cálculo estatístico e testes diagnósticos. Versão, 1999.
- BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N. Leprosy. *Lancet.*, [S.l.], v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, apr. 2004.
- CHACHA, J.J.; SOTTO, M.N.; PETERS, L.; LOURENÇO, S.; RIVITTI, E.A.; MELNIKOV, P. Sistema Nervoso Periférico e Pressupostos da Agressão Neural na Hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [S.l.], v. 84, n. 5, p. 495-500, set./out. 2009.
- COCCHIA, D.; MICHETTI, F. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglions of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.*, [S.l.], v. 215, n. 1, n. 103-112, 1981.
- COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; DONATO, R. Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*, [S.l.], v. 294, p. 85-87, nov. 1981.
- COCHRAN, A.J.; WEN, D.R.; HERSCHMAN, H.R.; GAYNOR, R.B. Detection of S-100 protein as an aid to the identification of tumor melanocitic. *Int J Cancer.*, [S.l.], v. 30, p. 295-297, 1982.

COLE, S.T.; EIGLMEIR, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; WHEELER, P.R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; RUTHERFORD, K.M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, Jr.; BARRELL, B.G. Massive gene decay in leprosy bacillus. *Nature.*, [S.l.], v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, feb. 2001.

CONVIT, J.; SAMPSON, C.; ZÚÑIGA, M.; SMITH, P.G.; PLATA, J.; SILVA, J.; MOLINA, J.; PINARDI, M.E.; BLOOM, B.R.; SALGADO, A. Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. *Lancet.*, [S.l.], v. 339, n. 8791, p. 446-450, feb. 1992.

COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N.; BERLINER, E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Immunol.*, [S.l.], v. 45, p. 159-70, 1942.

COSTA, I.M.C.; KAWAND, L.B.; PEREIRA, C.P.; NOGUEIRA, L.S.C. Lucio's Phenomenon: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol.*, [S.l.], v. 44, p. 566-571, 2005.

DUGAN, E.; MODLIN, R.L.; REA, T.H. An in situ immunohistological study of mitsuda reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.l.], v. 53, n. 3, p. 404-409, sept. 1985.

EIDT, L.M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde Soc.*, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 76-88, mai./ago. 2004.

ENG, I.F.; KOSEK, J.C.; FORNO, L.; DECK, J.; BIGBEE, J. Immunohistochemistry of brain protein in fixed paraffin imbedded tissue. *Trans Am Soc Neurochem.*, [S.l.], v. 7, p. 211, 1976.

FLEURY, R.N.; BACCHI, C.E. S-100 protein and immunoperoxidase technique as an aid in the histopathologic diagnosis of leprosy. *Int J Lepr.*, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 338-344, 1987.

GALLO, M.E.N.; RAMOS JÚNIOR, L.A.N.; ALBUQUERQUE, E.C.A.; NERY, J.A.C.; SALES, A.M. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *An Bras Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 415-424, jul./ago. 2003.

GAYNOR, R.; IRIE, R.; MORTON, D.; HERSHMANN, H.R. S-100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*, [S.I.], v. 286, p. 400-401, 1980.

GODAL, T.; LOFGREN, M.; NEGASSI, K. Immune response to *M.leprae* of healthy leprosy contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 40, n. 3, p. 243-250, jul./sept. 1972.

GRAHAN, R.C.; KARNOVSKY, M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem.*, [S.I.], v. 14, p. 291-302, 1966.

GUPTA, S.K.; NIGAM, S.; MANDAL, A.K.; KUMAR, V. S-100 as a useful auxiliary diagnostic aid in tuberculoid leprosy. *J Cutan Pathol.*, [S.I.], v. 33, p. 482-486, 2006.

HASTINGS, R.C.; OPRMOLLA, D.V.A. Leprosy. 2^a ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 470p.

HOWE, R.C.; WONDIMU, A.; DEMISSEE, A.; FROMMEL, D. Functional heterogeneity among CD4⁺ T-cell clones from blood and skin lesions of leprosy patients. Identification of T-cell clones distinct from Th0, Th1 and Th2. *Immunology*, [S.I.], v. 84, n. 4, p. 585-594, apr. 1995.

ISOBE, T.; ISHIOTA, N.; MASUDA, T.; TAKAHASHI, Y.; GANNO, S.; OKUYAMA, T. A rapid separation of S-100 subunit by high performance liquid chromatography: the subunit composition of S-100 proteins. *Biochem Int.*, [S.I.], v. 6, p. 758-764, 1983.

ISOBE, T.; ISHIOTA, N.; OKUYAMA, T. Structural relation of two S-100 protein in bovine brain. Subunit composition of S-100 a protein. *Eur J Biochem.*, [S.I.], v. 115, p. 469-474, 1981.

ISOBE, T.; OKUYAMA, T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP-I B protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem.*, [S.I.], v. 89, n. 2, p. 379-388, sept. 1978.

JACOB, M.; CHACKO, C.J.G.; ARUNTHATHI, S.; CHANDI SM. Significance and interpretation of nerve changes in skin biopsies when present in association with common dermatological conditions. *Int J Lepr.*, [S.l.], v. 52, p. 755, 1984.

JACOBSON, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Overview of leprosy. Disponível em: <http://www.uptodate.com>. Acesso em: 20 de jul. 2009.

JOB, C.K.; DRAIN, V.; DEMING, A.T.; HASTINGS, R.C.; GERBER, M.A. Role of S-100 protein as an marker for Schwann cells in the diagnosis of tuberculoid leprosy. *Int J Lepr.*, [S.l.], v. 58, n. 2, p. 392-393, 1990.

JOPLING W.H.; MCDOUGALL, A.C. Manual de hanseníase. 4ª ed., São Paulo: Atheneu, 1991. 183p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KAHAWITA, I.P.; WALKER, S.L.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.*, [S.l.], v. 83, n. 1, p. 75-82, jan./feb. 2008.

KAHN, H.J.; MARKS, A.; THOM, H.; BAUMAL, R. Role of antibody to S-100 protein in diagnosis pathology. *Am J Clin Pathol.*, [S.l.], v. 79, n. 3, p. 341-347, 1983.

KANAMORI, M.; ENDO, T.; SHIRAKAWA, S.; SAKURAI, M.; HIDAKA, H. S-100 antigen in human lymphocytes. *Bioch Bioph Res Commun.*, [S.l.], v. 108, n. 4, p. 1447-1453, 1982.

KAWAMURA, I.; TSUKADA, H.; YOSHIKAWA, H.; FUJITA, M.; NOMOTO, K.; MITSUYAMA, M. IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against Mycobacterium bovis BCG in mice. *J Immunol.*, [S.l.], v. 148, n. 9, p. 2887-2893, may. 1992.

KESSLER, D.; LEVINE, L.; FASSMAN, G. Some conformational and immunological properties of bovine brain acid protein. *Biochemistry*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 758-764, feb. 1968.

LYRA, M.R. *Descrição epidemiológica das reações hansenicas em pacientes multibacilares submetidos a PQT/OMS de 12 doses fixas*. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2004.

LOCKWOOD, D.N.; SARNO, E.; SMITH, W.C. Classifying leprosy patients-searching for the perfect solution? *Lepr Rev.*, [S.I.], v. 78, n. 4, p. 317-320, dec. 2007.

MACEIRA, J.M.P.; FUKUYAMA, K.; EPSTEIN, W.L.; ROWDEN, G. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein antigen-containing cells in beryllium-induced, zirconium-induced and sarcoidosis granulomas. *Am J Clin Pathol.*, [S.I.], v. 81, n. 5, p. 563-568, 1984.

MARTELLI, C.M.T.; STEFANI, M.M.A.; PENNA, G.O.; ANDRADE, A.L.S.S. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: Hanseníase. *Rev Bras Epidemiol.*, [S.I.], v. 5, n. 3, p. 273-285, 2002.

MARZLIAK, M.I.C.; SILVA, P.C.P.; NOGUEIRA, W.; GUIARD, C.L.; FERREIRA, M.E.; METELLO, H.N.; LAFRATTA, T.E.; MOHALLEN, D.F.; CLEMENT, T.M.G.; MACEDO, H.R. Breve histórico sobre os rumos do controle da Hanseníase no Brasil e no Estado de São Paulo. *Hansen Int.*, [S.I.], v. 33, n. 2 Suppl.1, p. 39-44, 2008.

MATSUO, E. Leprosy as a challenge to science on the ability to decode its enigma. A hypothesis on how to respond. *Jpn J Infect Dis.*, [S.I.], v. 58, n. 2, p. 59-64, apr. 2005.

MCKEE, P.H.; CALONJE, J.E.; GRANTER, S.R. *Pathology of the skin with clinical correlations*. 3ª ed. Elsevier Mosby, 2005.

MCNUTT, N.S. The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol.*, [S.I.], v. 25, n. 10, p. 521-529, nov. 1998.

MENDONÇA, A.M.N. *Identificação Imunohistoquímica da proteína S-100 nas diversas formas de hanseníase*. 1987. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1987.

MENICUCCI, L.A.; MIRANDA, A.; ANTUNES, S.L.G.; JARDIM, M.R.; NERY, J.A.C.; SALES, A.M.; SARNO, E.N. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. *JAAD.*, [S.I.], v. 52, n. 4, p. 648-652, 2005.

MILLER, H.R.P. Fixation and tissue preservation for antibody studies: a review. *J Histochem.*, [S.I.], v. 4, p. 305-320, 1972.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Guia para o Controle da Hanseníase. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 2008a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portal Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27640. Acesso em: 03 de ago. 2008b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portal Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27447. Acesso em: 27 de out. 2008c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portal Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27448. Acesso em: 27 de out. 2008d.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portal Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27445. Acesso em: 20 de jul. 2009.

MISRA, N.; MURTAZA, A.; WALKER, B.; NARAYAN, N.P.; MISRA, R.S.; RAMESH, V.; SINGH, S.; COLSTON, M.J.; NATH, I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*, [S.l.], v. 86, n.1, p. 97-103, sept. 1995.

MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol.*, Los Angeles, v. 102, n. 6, p. 828-832, jun. 1994.

MODLIN, R.L.; ROWDEN, G.; TAYLOR, C.R.; PHIL, D.; REA, T.H. Comparison of S-100 and OKT6 antisera in human skin. *J Invest Dermatol.*, [S.l.], v. 83, p. 206-209, 1984.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, J.Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J.S.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S.N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P.E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P.J.; COLE, S.T. On the origin of leprosy. *Science*, [S.l.], v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, may. 2005.

MOORE, B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm.*, [S.l.], v. 19, n. 6, p. 739-747, 1965.

MORAES, M.O.; DUPPRE, N.C.; SUFFYS, P.N.; SANTOS, A.R.; ALMEIDA, A.S.; NERY, J.A.C.; SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics*, [S.l.], v. 53, p. 45-47, jan. 2001.

MORHAN. Movimento de Reintegração das Pessoas Atigidas por Hanseníase. Hanseníase Informações gerais. Disponível em: http://www.morham.org.br/hans_informacoes_gerais.htm. Acesso em: 20 de jul. 2009.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol.*, [S.l.], v. 7, p. 145-173, 1989.

MSHNA, R.N.; CRAWFORD, C.L.; HUMBER, D.P. The immunopathology of nerve damage in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.l.], v. 50, n. 3, p. 367-368, sept. 1982.

NAKAJIMA, T.; WATANABE, S.; SATO, Y.; KAMEYA, T.; HIROTA, T.; SHIMOSATO, Y. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am J Surg Pathol.*, [S.l.], v. 73, n. 3, p. 429-432, 1982a.

NAKAJIMA, T.; WATANABE, S.; SATO, Y.; SHIMOSATO, Y.; MOTOI, M.; LENNERT, K. S-100 protein in langerhans cells, interdigitating reticulum cells and histiocytes X cells. *Gann.*, [S.l.], v. 73, n. 3, p. 429-432, 1982b.

NAKANE, P.K.; PIERCE, G.B. Jr. Enzyme labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochemcytochem.*, [S.l.], v. 14, p. 929-931, 1966.

NASCIMENTO, L.V. Melanoma. Estudo dos parâmetros do prognóstico. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, 1986.

NATIONAL HANSEN'S DISEASE PROGRAM DATA STATISTICS. HRSC. Gov: Hansens 30 yeartrend. Disponível em: <http://www.hrsa.gov/hansens/30yeartrend.htm>. Acesso em: 3 de ago. 2009.

OPROMOLLA, D.V. *Noções de Hansenologia*. Baurú: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A.C.C. A terminologia relativa à Hanseníase. *An Bras Dermatol.*, [S.I.], v. 80, n. 3, p. 293-294, mai./jun. 2005.

PARRONCHI, P.; MACCHIA, D.; PICCINNI, M.P.; BISWAS, P.; SIMONELLI, C.; MAGGI, E.; RICCI, M.; ANSARI, A.A.; ROMAGNANI, S. Allergen and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci Usa.*, v. 88, n. 10, p. 4538-4542, 1991.

PFEIFFER, S.E.; HERSCHMANN, H.R.; LIGHTBODY, J.; SATO, G. Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. *J Cell Physiol.*, [S.I.], v. 75, p. 329-340, 1970.

PINNEYS, N.S. Immunoperoxidase applications in dermatopathology. *Int J Dermatol.*, [S.I.], v. 22, n. 3, p. 159-160, apr. 1983.

RAMBUKKANA, A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.*, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 23-28, jan. 2000.

RAMBUKKANA, A.; SALZER, J.L.; YURCHENCO, P.D.; TUOMANEN, E.I. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. *Cell.*, [S.I.], v. 88, n. 6, p. 811-821, mar. 1997.

REA, T.H.; TAYLOR, C.R. Serum and tissue lysozyme in leprosy. *Infect Immun.*, [S.I.], v. 18, n. 3, p. 847-856, 1977.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.*, [S.I.], v. 33, p. 119-128, 1962.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 34, n. 3, p. 255-273, jul./sept. 1966.

RIDLEY, M.J.; RUSSEL, D.F.; RIDLEY, D.S. An immunoperoxidase study of immunological factors in skin lesions across the spectrum of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 50, n. 1, p. 11-19, mar. 1982.

ROWDEN, G.; CONNELLY, E.M.; WINKELMANN, R.K. Cutaneous histiocytosis X. The presence of a S-100 protein and its use in diagnosis. *Arch Dermatol.*, [S.I.], v. 119, n. 7, p. 553-558, jul. 1983.

SAINT-MARIE, G. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochemcytochem*, [S.I.], v. 10, p. 250-256, 1962.

SALES, A.M.; SÁ, R.P.; JARDIM, M.M.; MACHADO, A.M.; NERY, J.A.C. Importância do reconhecimento clínico da hanseníase. *J Bras Med.*, [S.I.], v. 87, n. 1, p. 41-50, jul. 2004.

SAMPAIO, E.P. Role of Th1 cytokines in host defenses against mycobacterium leprae. In: KOTB, M.; CALANDRA, T. (Orgs). *Cytokines and chemokines in infectious disease handbook*. New Jersey: Humana Press Totowa, 2003. p. 163-186.

SANTOS, A.R.; ALMEIDA, A.S.; SUFFYS, P.N.; MORAES, M.O.; FILHO, V.F.; MATTOS, H.J.; NERY, J.A.; CABELLO, P.H.; SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 68, n. 3, p. 325-327, sept. 2000.

SEDAGHAT, F.N; NOTOPOULOS, A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia.*, [S.I.], v. 12, n. 4, p. 198-204, 2008.

SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILIS, T.P.; KKRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol.*, [S.I.], v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SHAW, I.N.; EBENEZER, G.; RAO, G.S.; NATRAJAN, M.M.; BALASUNDARAM, B. Relapse as histoid leprosy after receiving multidrug therapy (MDT); a report of three cases. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 68, n. 3, p. 272-276, sept. 2000.

SHETTY, V.P.; MISTRY, N.F.; ANTIA, N.H. Current understanding of leprosy as a peripheral nerve disorder: significance of involvement of peripheral nerve in leprosy. *Indian J Lepr.*, [S.I.], v. 72, n. 3, p. 339-349, jul./sept. 2000.

SELING, P.A.; WANG, X.H.; GATELY, M.K.; OLIVEROS, J.L.; MCHUGH, T.; BARNES, P.F.; WOLF, S.F.; GOLKAR, L.; YAMAMURA, M.; YOGI, Y.; et al. IL-12 Regulates T helper Type 1 Cytokine Responses in Human Infections Disease. *J Immunol.*, [S.I.], v. 153, n. 8, p. 3639-3647, oct. 1994.

SINGH, N.; ARORA, V.K.; RAMAM, M.; TICKOO, S.K.; BATHIA, A. An evaluation of the S-100 stain in the histological diagnosis of tuberculoid leprosy and other granulomatous dermatoses. *Int J Lepr.*, v. 62, n. 2, p. 263-267, 1994.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, [S.I.], v. 30, p. 325-334, jul./set. 1997.

SPIERINGS, E.; DE BOER, T.; ZULIANELLO, L.; OTTENHOFF, T.H. The role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev.*, [S.I.], v. 71, p. S121-S129, dec. 2000.

SPRINGALL, D.R.; GU, J.I.A.N.G.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; LEVENE, A.; LEVENE, M. M.; MARANGOS, P.J.; BLOOM, S.R.; POLAK, J.M. The value of S-100 immunostaining as a diagnostic tool in human malignant melanomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, [S.I.], v. 400, n. 3, p. 331-343, 1983.

STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H. Jr., CUCULIS, J.J.; MEYR, H.G. The unlabelled antibody enzyme method of immunochemistry. preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase) and its use identification of spirochaetes. *J Histochem Cytochem.*, [S.I.], v. 18, p. 315-333, 1970.

STRAUS, W. Segregation of an intravenously injected protein by droplets of cells of rat kidneys. *J Biophys Biochem Cytol.*, [S.I.], v. 3, p. 1037, 1957.

STREEFKERK, J.G. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem.*, [S.I.], v. 20, p. 829-831, 1972.

TALHARI, S.; NEVES, R.G.; PENNA, G.O.; OLIVEIRA, M.L.W. *Hanseníase*. 4^a ed. Manaus: Instituto Superior de Estudo da Amazônia, 2006.

TAYLOR, C.R.; BURNS, J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J Clin Pathol.*, [S.I.], v. 27, p. 14-20, 1974.

THOMAS, M.M.; JACOB, M.; CHANDI, S.M.; GEORGE, S.; PULIMOOD, S.; JEYASEELAN, L.; JOB, C.K. Role of S-100 staining in differentiating leprosy from other granulomatous diseases of the skin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.I.], v. 67, n. 1, p. 1-5, 1999.

TOURAINÉ, J.L.; TOURAINÉ, F.; KISKIES, D.F.; CHOI, Y.S.; GOOD, R.A. Specific antiserum for identification of human "T" lymphocytes. *Clin Exp Immunol.*, [S.I.], v. 16, p. 503-520, 1983.

WADE, H.W. The histoid lepromas (abstrat). *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, [S.l.], v. 28, p. 469, 1960.

WATABE, K.; KUMANISHI, T.; IKUTA, F.; OYAKE, Y. Tactile-like corpuscles in neurofibromas: Immunohistochemical demonstration of S-100 protein. *Acta Neuropathol.*, v. 61, n. 3-4, p. 173-177, 1983.

WEISS, S.W.; LANGLOSS, J.M.; ENZIGER, F.M. Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest.*, [S.l.], v. 49, n. 3, p. 299-308, sept. 1983.

WHO. Global leprosy situation, beginning of 2008. *Wkly Epidemiol Rec.*, [S.l.], v. 33, n. 83, p. 293-300, 2008.

WHO. Health topics: leprosy elimination: leprosy the disease diagnosis. Disponível em: <http://www.who.int/lep/diagnosis/index.html>. Acesso em: 20 de jul. 2009a.

WHO. Health topics: leprosy elimination: transmission. Disponível em: <http://www.who.int/lep/transmission/em/indexhtml>. Acesso em: 20 de jul. 2009b.

WHO. Health topics: leprosy factsheets. Disponível em: <http://who.int/medicentre/factsheets/fs101/en/index.html>. Acesso em: 20 de jul. 2009c.

YAMASHITA, K.; IWAMOTO, T.; IJIMA, S. Immunohistochemical observation of lysozyme in macrophages in leprosy. *Acta Path Jap.*, [S.l.], v. 28, n. 5, p. 697-703, 1978.

APÊNDICE A - Relação das lâminas estudadas e grupos histopatológicos

Caso	Número de lâminas	Tipo	Número de filetes HE	Número de filetes PS-100	Proteína S-100 Distribuição dos filetes				Proteína S-100 Lesão dos filetes nervosos			
					F1	F2	F3	F4	A	B	C	D
1	Paucibacilar	HT	1	3	0	0	1	0	0	1	0	0
2	Paucibacilar	HT	3	3	0	1	0	0	0	1	0	0
3	Paucibacilar	HT	2	7	0	0	1	0	1	0	0	0
4	Paucibacilar	HT	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0
5	Paucibacilar	HT	3	6	0	0	1	0	1	0	0	0
6	Paucibacilar	HT	4	7	0	0	1	0	0	1	0	0
7	Paucibacilar	HT	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
8	Paucibacilar	HT	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0
9	Paucibacilar	HT	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
10	Paucibacilar	HT	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
11	Paucibacilar	HT	1	3	1	0	0	0	1	0	0	0
12	Paucibacilar	HT	3	4	1	0	0	0	1	0	0	0
13	Paucibacilar	HT	5	9	0	0	1	0	1	0	0	0
14	Paucibacilar	HBT	1	2	1	0	0	0	0	1	0	0
15	Paucibacilar	HBT	1	3	0	0	1	0	0	1	0	0
16	Paucibacilar	HBT	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0
17	Paucibacilar	HBT	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
18	Paucibacilar	HBT	2	4	1	0	0	0	0	1	0	0
19	Paucibacilar	HBT	4	10	0	0	1	0	1	0	0	0
20	Paucibacilar	HBT	5	17	0	0	1	0	1	0	0	0
21	Paucibacilar	HBT	2	4	1	0	0	0	1	0	0	0
22	Paucibacilar	HBT	3	4	1	0	0	0	1	0	0	0
23	Paucibacilar	HBT	1	5	1	0	0	0	0	1	0	0
24	Paucibacilar	HBT	2	3	0	0	1	0	1	0	0	0
25	Paucibacilar	HBT	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
26	Paucibacilar	HI	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1
27	Paucibacilar	HI	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1
28	Paucibacilar	HI	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
29	Paucibacilar	HI	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0
30	Paucibacilar	HI	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
31	Paucibacilar	HI	2	3	1	0	0	0	1	0	0	0
32	Paucibacilar	HI	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
33	Paucibacilar	HI	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
34	Paucibacilar	HI	2	3	0	1	0	0	0	0	0	1
35	Paucibacilar	HI	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
36	Paucibacilar	HI	6	12	0	1	0	0	0	0	0	1
37	Paucibacilar	HI	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
38	Paucibacilar	HI	5	10	0	1	0	0	0	0	0	1
39	Paucibacilar	HI	5	5	0	0	1	0	0	0	0	1
40	Paucibacilar	HI	3	3	1	0	0	0	1	0	0	0
41	Paucibacilar	HI	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
42	Paucibacilar	HI	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
43	Multibacilar	HBB	4	4	1	0	0	0	0	1	0	0

Legenda: F1 - Dentro dos granulomas; F2 - Entre os granulomas; F3 - Dentro e entre os granulomas; F4 - Intacto; A - Infiltrado; B - Fragmentado; C - Ausente; D - Intacto.

Caso	Número de lâminas	Tipo	Número de filetes HE	Número de filetes PS-100	Proteína S-100 Distribuição dos filetes				Proteína S-100 Lesão dos filetes nervosos			
					F1	F2	F3	F4	A	B	C	D
44	Multibacilar	HBB	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
45	Multibacilar	HBV	6	6	0	0	1	0	1	0	0	0
46	Multibacilar	HBV	3	3	0	0	1	0	1	0	0	0
47	Multibacilar	HBV	3	3	1	0	0	0	0	1	0	0
48	Multibacilar	HBV	1	3	1	0	0	0	1	0	0	0
49	Multibacilar	HBV	7	7	0	0	1	0	1	0	0	0
50	Multibacilar	HV	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
51	Multibacilar	HV	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
52	Multibacilar	HV	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0
53	Multibacilar	HV	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0
54	Multibacilar	HV	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
55	Multibacilar	HV	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
56	Multibacilar	HV	3	7	1	0	0	0	1	0	0	0
57	Multibacilar	HV	5	5	0	0	1	0	1	0	0	0
58	Controle	Sarcoidose	2	3	0	1	0	0	0	0	0	1
59	Controle	Sarcoidose	5	5	0	1	0	0	0	0	0	1
60	Controle	Sarcoidose	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
61	Controle	Sarcoidose	3	7	0	0	1	0	0	0	0	1
62	Controle	Sarcoidose	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1
63	Controle	Sarcoidose	2	4	0	1	0	0	0	0	0	1
64	Controle	Sarcoidose	2	6	0	0	1	0	0	0	0	1
65	Controle	Sarcoidose	3	4	0	1	0	0	0	0	0	1
66	Controle	Sarcoidose	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
67	Controle	Sarcoidose	2	8	0	0	1	0	0	0	0	1
68	Controle	Sarcoidose	2	5	0	1	0	0	0	0	0	1
69	Controle	Sarcoidose	2	3	0	0	1	0	1	0	0	0
70	Controle	Sarcoidose	3	3	0	0	1	0	0	1	0	0
71	Controle	Sarcoidose	2	6	0	1	0	0	0	0	0	1
72	Controle	Sarcoidose	3	6	0	1	0	0	1	0	0	0
73	Controle	Sarcoidose	1	3	0	1	0	0	0	0	0	1
74	Controle	Sarcoidose	1	5	0	1	0	0	0	0	0	1
75	Controle	Sarcoidose	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1
76	Controle	Sarcoidose	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
77	Controle	Sarcoidose	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1
78	Controle	Sarcoidose	5	5	0	1	0	0	0	0	0	1
79	Controle	Sarcoidose	3	4	0	1	0	0	0	0	0	1
80	Controle	Sarcoidose	2	3	0	0	1	0	0	0	0	1

Legenda: F1 - Dentro dos granulomas; F2 - Entre os granulomas; F3 - Dentro e entre os granulomas; F4 - Intacto; A - Infiltrado; B - Fragmentado; C - Ausente; D - Intacto.

ANEXO A - Aprovação do CEP-HUGG

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MEMO CEP-HUGG / N° 81 / 2010

Rio de Janeiro, 09 de setembro de 2010

Ao
Ilmo. Prof. Carlos José Martins
Dermatologia – Pesquisador Responsável

Ref.: EMENDA datada de 27.08.2010 relativa ao Projeto de Pesquisa "*Estudo histoquímico e imunohistoquímico dos filetes nervosos dérmicos e dos melanócitos na hanseníase*" – Projeto CEP-HUGG n° 67/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em reunião realizada em 09 de setembro de 2010, analisou de acordo com a Resolução CNS n° 196/96 e **APROVOU** a **Emenda, datada de 27.08.2010**, relativa ao projeto de pesquisa em epígrafe, que trata da exclusão de um dos objetivos secundários do projeto de pesquisa, aprovado em 24.01.08, relativo ao estudo dos melanócitos na hanseníase, o que altera o título inicial do projeto que passa a ser "*Estudo histoquímico e imunohistoquímico dos filetes nervosos dérmicos nas diferentes formas de hanseníase.*"

Informamos que, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96, cabe ao pesquisador apresentar ao CEP/HUGG os **relatórios parciais (semestrais) e final** do projeto aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro Eder Portari Filho
Coordenador do CEP-HUGG