

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

DIOGO FERNANDES DOS SANTOS

**ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES, SOROLÓGICOS E
NEUROFISIOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA NEUROPATIA
HANSÊNICA.**

**UBERLÂNDIA
2017**

DIOGO FERNANDES DOS SANTOS

**ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES, SOROLÓGICOS E
NEUROFISIOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA NEUROPATIA
HANSÊNICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^ª. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

**UBERLÂNDIA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237a Santos, Diogo Fernandes dos, 1985
2017 Aspectos clínicos, moleculares, sorológicos e neurofisiológicos no diagnóstico precoce da neuropatia hansênica / Diogo Fernandes dos Santos. - 2017.
178 p. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências Médicas - Teses. 2. Hanseníase - Teses. 3. Hanseníase - Diagnóstico - Teses. 4. Hanseníase - Prevenção - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES, SOROLÓGICOS E NEUROFISIOLÓGICOS NO
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA NEUROPATIA HANSÊNICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia, 23 de Agosto de 2017.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Isabela Maria Bernardes Goulart, FAMED, UFU/MG

Prof. Dr. Wilson Marques Junior, FMRP, USP/SP

Prof. Dr. José Antônio Garbino, ILSL/SP

Prof^ª. Dr^ª. Nívea de Macedo Oliveira Morales, FAMED, UFU/MG

Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira, FAMED, UFU/MG

*Dedico este trabalho a todos
os pacientes portadores de
doenças neuromusculares,
desejando que a fé e esperança
em Deus os console e que a
ciência traga cada vez mais
alívio e, finalmente, a
cura...*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pelo privilégio da vida e pela oportunidade única em exercer a medicina como uma vocação. Obrigado por me ensinar a valorizar o que não se vê em forma material, mas o que realmente tem valor.

À minha esposa, Ariane, obrigado pelo amor, cuidado, honra e dedicação com a nossa família. Obrigado pela paciência e por entender os momentos necessários de ausência e dedicação. Espero que juntos possamos crescer muito e viver os nossos dias com plenitude e gratidão.

Aos meus filhos e grandes amigos, Otávio e Estêvão, muito obrigado pelas alegrias, abraços e momentos simples proporcionados pela paternidade todos os dias, possibilitando que esta jornada fosse mais leve, me incentivando a acreditar e a fazer sempre o meu melhor.

Aos meus amados pais, obrigado pela renúncia e dedicação desde a minha infância, quando vocês abriram mão do pouco que tinham, sonhando que um dia eu alcançaria o muito. O exemplo de vocês inspira a muitos e, com certeza, será eternizado nas próximas gerações.

Aos meus irmãos, Hárrisson e Camila, obrigado pela nossa amizade sincera e pelo desejo constante de crescimento e superação. Vocês conseguem me remeter aos momentos únicos e plenos que um dia vivenciamos juntos.

Aos meus familiares, avós e amigos, minha gratidão e compreensão pelos momentos de ausência.

À Professora e amiga Dra Isabela Maria Bernardes Goulart, por ser um exemplo único em minha formação acadêmica, por ser uma profissional a frente do seu tempo, lutando sempre de modo inovador contra o que é negligenciado, exercendo a medicina com amor, dedicação, empenho e muita competência. Tenho certeza que o seu legado no cuidado e assistência aos pacientes acometidos pela hanseníase será eterno.

A todos os profissionais do CREDESH, que diariamente se esforçam oferecendo um serviço de referência nacional aos pacientes. Meu agradecimento em especial a enfermeira Dulcinéia pelo trabalho desempenhado no acompanhamento dos contatos domiciliares.

Aos médicos hansenólogos do CRESEH Dra Maria Aparecida e Dr Adeilson, pelos ensinamentos compartilhados ao longo dos últimos anos.

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, por todas as contribuições na construção dos artigos e pelo conhecimento compartilhado referente à biologia molecular aplicada na prática clínica.

À Professora Dra Tania Machado e demais profissionais do laboratório de patologia do HC-UFU, pela colaboração na análise histopatológica das biópsias de nervo periférico. Obrigado pela coragem em iniciar este trabalho nunca desenvolvido em nossa universidade.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (PMBIO) do CREDESH, pelo compromisso técnico na execução e análise diagnóstica.

Aos companheiros da pós-graduação, especialmente Douglas e Elaine pelos auxílios e experiências compartilhadas durante todo o doutorado.

Aos amigos residentes de Neurologia da USP-RP e de Neurofisiologia da UNIFESP, que me ensinaram que não há saber maior, mas saberes diferentes.

Aos professores e médicos assistentes da residência médica em Neurologia da USP-RP, com os quais tive o privilégio de aprender os fundamentos de minha especialidade, em um ambiente de extrema excelência e competência.

Aos professores e médicos assistentes da residência médica em Neurofisiologia Clínica da UNIFESP, onde aprendi não apenas executar eletroneuromiografia e outros métodos diagnósticos complementares, mas também fui impulsionado a experimentar o novo, valorizar o detalhe e a desempenhar com cuidado tudo o que nos propomos a fazer.

Aos colegas e funcionários do setor de Neurologia da UFU, que nos últimos anos tem se esforçado para ampliar e aprimorar o serviço de neurologia em nossa universidade.

Aos amigos do Instituto de Neurologia Diagnóstica, Alessandro Mundim, Marcos Lofrano e Raquel Campos, pela amizade e pelas experiências compartilhadas no cotidiano da nossa profissão. Obrigado por terem me recebido tão bem em Uberlândia.

À CAPES, CNPQ, FAPEMIG e FNS/MS pelo suporte financeiro.

“Da incapacidade de não interferir;
do entusiasmo exagerado pelo que é recente
e desdém pelo que é tradicional;
de valorizar mais o conhecimento do que a sabedoria,
a ciência mais do que a arte,
e o talento mais do que o bom senso;
de tratar os pacientes como casos,
de fazer a cura da doença mais penosa
do que a tolerância da mesma,
Senhor Deus, livrai-nos.”
(Sir Robert Hutchison)

RESUMO

Introdução: O longo período de incubação da hanseníase, seus sinais e sintomas insidiosos produzem dificuldades em seu diagnóstico e classificação clínica correta. O reconhecimento precoce do comprometimento neural na hanseníase sobretudo em contatos domiciliares com infecção subclínica e na forma neural primária, em que os achados clínicos e laboratoriais clássicos da doença estão, por definição, ausentes, representa um grande desafio na prática clínica. **Objetivos:** Esta tese foi subdividida em dois estudos, cujos objetivos foram caracterizar os aspectos clínicos, moleculares, sorológicos e neurofisiológicos no diagnóstico precoce da neuropatia hansênica, em pacientes com suspeita de hanseníase neural primária (HNP) e em contatos domiciliares com infecção subclínica. **Metodologia:** No primeiro estudo, foram recrutados 70 pacientes com diagnóstico de HNP e, no segundo estudo, 175 contatos domiciliares soropositivos (CDSP), definido como infecção subclínica e um grupo controle de 35 contatos domiciliares soronegativos (CDSN), acompanhados em um centro de referência nacional em hanseníase do Brasil, no período de 2014 a 2016. Todos os indivíduos foram submetidos a uma avaliação clínica, laboratorial e neurofisiológica. A descrição metodológica detalhada e a análise estatística específica é descrita em cada estudo separadamente. **Resultados:** No estudo 1, 61.4% (43/70) dos pacientes foram claramente sintomáticos e neste grupo todos apresentaram um comprometimento periférico assimétrico, predominantemente sensitivo. A presença de espessamento neural foi observada em 58.6% (41/70). A avaliação eletroneuromiográfica evidenciou a presença de mononeuropatia em 51.4% (36/70). 52.9% (37/70) apresentaram positividade ao teste ELISA anti-PGL1 e 78.6% (55/70) na detecção de DNA de *M. leprae* por PCR em tempo real (qPCR) no raspado intradérmico. Os pacientes com padrão de uma mononeuropatia múltipla demonstraram menores índices de ELISA anti-PGL-1 ($p=0.0006$), maior frequência de espessamento neural ($p=0.0008$) e de sintomas sensitivos ($p=0.01$), quando comparados ao grupo com mononeuropatia. A detecção de DNA de *M. leprae* por qPCR na biópsia de nervo periférico foi positiva em 60.8% (17/28) dos casos. No estudo 2, a análise da qPCR em sangue periférico foi positiva em 40.6% (71/175) dos CDSP e em apenas 8.6% (3/35) dos CDSN ($p=0.0003$). Na avaliação do raspado intradérmico, 4% (7/175) dos CDSP apresentaram baciloscopia positiva e 47.4% (83/175) apresentaram positividade na detecção de DNA de *M. leprae* por qPCR. No grupo CDSN, todos apresentaram baciloscopia negativa e apenas 17.1% (6/35) apresentaram qPCR de raspado positiva ($p=0.0009$). Na avaliação eletroneuromiográfica, 31.4% (55/175) dos CDSP apresentaram sinais de comprometimento neural e no grupo CDSN 13.3% (4/35) ($p=0.0163$). A presença de espessamento neural conferiu uma chance 2.94 vezes maior de alterações na eletroneuromiografia (ENMG) (OR, 2.94; $p=0.0031$). O grupo CDSP apresentou uma chance 4.04 maior de comprometimento neural (OR, 4.04; $p=0.020$). A positividade da qPCR em sangue periférico também conferiu uma maior chance de comprometimento neural (OR, 2.08; $p=0.028$). A presença de uma ou mais cicatriz vacinal pela BCG conferiu uma proteção para a presença de dano neural (OR, 0.41; $p=0.044$). **Conclusão:** No estudo 1, a utilização de ferramentas sorológicas, moleculares e neurofisiológicas em pacientes com suspeita de HNP, contribuiu não apenas com o diagnóstico precoce, mas também para uma classificação clínica correta e tratamento adequado, prevenindo sequelas. Por isso, propomos uma nova recomendação para o diagnóstico de HNP, através da implementação de métodos mais específicos e sensíveis, objetivando tornar esta condição menos subdiagnosticada. No estudo 2, o monitoramento anual dos contatos domiciliares por meio do exame clínico e avaliação sorológica (ELISA anti-PGL1) por pelo menos 5-7 anos, demonstrou que a soropositividade confere uma maior chance de comprometimento neural periférico avaliado pela ENMG e desenvolvimento de formas multibacilares. O uso combinado dos três ensaios (ELISA anti-PGL1, qPCR de sangue periférico e cicatriz de BCG) pode identificar indivíduos com alto risco

de desenvolver neuropatia hansênica, não só indicando o início precoce do tratamento naqueles cujo diagnóstico é confirmado pela detecção de DNA de *M. leprae* em qPCR de raspado intradérmico e/ou ENMG alterada, mas também justificando a quimioprofilaxia naqueles que ainda não apresentam evidências clínicas ou neurofisiológicas de comprometimento neural.

Palavras-chave: hanseníase, hanseníase neural primária, eletroneuromiografia, neuropatia periférica, contatos domiciliares, ELISA anti-PGL1.

ABSTRACT

Introduction: The long incubation period of leprosy, its insidious symptoms and signs produce difficulties in its diagnosis and correct clinical classification. Early recognition of neural impairment in leprosy – especially in household contacts with subclinical infection and in the primary neural form, in which the classic laboratory and clinical findings of the disease are, by definition, absent – represents a great challenge in clinical practice. **Objectives:** This thesis was subdivided into two studies, whose objectives were to characterize the clinical, molecular, serological and neurophysiological aspects in the early diagnosis of leprosy neuropathy, in patients with suspected primary neural leprosy (PNL) and household contacts with subclinical infection. **Methodology:** In the first study, 70 patients with a diagnosis of PNL were recruited and, in the second study, 175 seropositive household contacts (SPHHC), defined as a subclinical infection, and one control group of 35 seronegative household contacts (SNHHC), accompanied in a national leprosy reference center of Brazil, in the period from 2014 to 2016. All the individuals were submitted to a clinical, laboratory and neurophysiological evaluation. A detailed methodological description and specific statistical analysis are provided separately in each study. **Results:** In Study 1, 61.4% (43/70) of the patients were clearly symptomatic, a group that all presented an asymmetrical peripheral impairment, predominantly sensorial. The presence of neural thickening was observed in 58.6% (41/70). Electroneuromyographic evaluation evidenced the presence of mononeuropathy in 51.4% (36/70); 52.9% (37/70) presented positivity by the anti-PGL1 ELISA test and 78.6% (55/70) in *M. leprae* DNA detection by real time PCR (qPCR) in intradermic smear. The patients with a pattern of multiple mononeuropathy showed lower indices of anti-PGL-1 ELISA ($p=0.0006$), and higher frequencies of neural thickening ($p=0.0008$) and sensorial symptoms ($p=0.01$), when compared to the mononeuropathy group. The qPCR of nerve biopsies was positive in 60.8% (17/28). In Study 2, the qPCR analysis in peripheral blood was positive in 40.6% (71/175) of SPHHC versus only 8.6% (3/35) of SNHHC ($p=0.0003$). Intradermic smear evaluation found 4% (7/175) of SPHC with positive bacilloscopy while 47.4% (83/175) presented positivity in *M. leprae* DNA detection by qPCR. In the SNHHC group, all presented negative bacilloscopy and only 17.1% (6/35) presented positive smear qPCR ($p=0.0009$). In electroneuromyographic evaluation, 31.4% (55/175) of SPHHC presented signs of neural impairment versus 13.3% (4/35) in the SNHHC group ($p=0.0163$). The presence of neural thickening conferred a 2.94-fold higher chance of ENMG alterations (OR, 2.94; $p=0.0031$). The SPHHC group presented a 4.04-fold higher chance of neural impairment (OR, 4.04; $p=0.020$). The peripheral blood qPCR positivity gives a 2.08-fold higher chance (OR, 2.08; $p=0.028$); and the presence of at least one BCG vaccine scar demonstrated 2.44-fold greater protection against neural impairment (OR, 0.41; $p=0.044$). **Conclusion:** In Study 1, the utilization of serological, molecular and neurophysiological tools in patients with suspicion of PNL contributed not only to early diagnosis, but also to a correct clinical classification and adequate treatment, thus preventing sequelae. Therefore, we propose a new recommendation for diagnosing PNL through the implementation of more specific and sensitive methods, aiming to make this condition less underdiagnosed. In Study 2, annual monitoring of domiciliary contacts through clinical exam and serological evaluation (anti-PGL1 ELISA), for at least 5-7 years, demonstrated that seropositivity confers a greater chance of peripheral neural impairment evaluated by

electroneuromyography and development of multibacillary forms. The combined use of three assays (ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR and BCG scar) can identify individuals at high risk for developing leprosy neuropathy, not only indicating the early initiation of treatment in those whose diagnosis is confirmed by *M. leprae* DNA detection in qPCR of intradermic smear and/or altered ENMG, but also justifying chemoprophylaxis in those that do not yet present clinical or neurophysiological evidence of neural impairment.

Keywords: leprosy, primary neural leprosy, electroneuromyography, peripheral neuropathy, household contacts, ELISA anti-PGL1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fundamentação Teórica

Figura 1	Gerhard Henrick Armauer Hansen	25
Figura 2	Estratégia global para o controle da hanseníase no período entre 2016-2020...	28
Figura 3	Classificação de Ridley & Jopling (1966).....	31
Figura 4	Manifestações cutâneas nas diferentes formas clinicas da hanseníase.....	32
Figura 5	Manifestações cutâneas nas diferentes formas clinicas da hanseníase.....	33
Figura 6	Espessamento neural na neuropatia hansênica.....	37
Figura 7	Reação hansênica tipo 1.....	40
Figura 8	Reação hansênica tipo 2.....	41
Figura 9	Teste de Mistuda.....	46
Figura 10	Alterações histopatológicas em nervos periféricos de pacientes com neuropatia hansênica.....	53
Figura 11	Sequelas e deformidades em paciente com diagnóstico de hanseníase neural primária.....	59
Figura 12	Padrão de comprometimento neural na hanseníase.....	61
Figura 13	Estudo da condução motora no nervo ulnar em paciente com diagnóstico de hanseníase.....	64
Figura 14	Estudo da condução motora durante episódios reacionais.....	67
Figura 15	Representação esquemática do potencial de ação sensitivo e potencial de ação muscular composto.....	78
Figura 16	Estudo da condução motora no nervo mediano.....	80
Figura 17	Estudo da condução motora no nervo ulnar.....	81

Figura 18	Estudo da condução motora no nervo fibular comum.....	82
Figura 19	Estudo da condução motora no nervo tibial.....	83
Figura 20	Biópsia de nervo periférico (fibular profundo).....	90
Figura 21	Biópsia de nervo periférico (cutâneo dorsal da mão).....	91

Estudo 1

Figure 1	Guideline and recommendations for PNL diagnosis.....	115
----------	--	-----

Estudo 2

Figure 1	Protocol for recruitment of asymptomatic household contacts of patients with leprosy.....	135
Figure 2	Protocol proposed for annual household leprosy contacts evaluation.....	142

LISTA DE TABELAS

Estudo 1

Table 1	Distribution of the most affected peripheral nerves in patients with primary neural leprosy diagnosis.....	110
Table 2	Distribution of the electroneuromyographic pattern in patients with primary neural leprosy diagnosis.....	111
Table 3	Distribution of patients with primary neural leprosy according to the electroneuromyographic pattern, and comparisons of proportions.....	112
Table 4	Distribution of patients with primary neural leprosy according to ELISA anti-PGL1 seropositivity and comparisons of proportions.....	113
Table 5	Combination of diagnostic tools for primary neural leprosy diagnosis, considering suspicious clinical cases with positive electroneuromyography.....	114

Estudo 2

Table 1	Epidemiological, clinical and laboratory characteristics among the household contacts of patients diagnosed with leprosy.....	136
Table 2	Distribution of peripheral nerves most involved in the electroencephalographic evaluation of the household contacts of patients with leprosy diagnosis.....	137
Table 3	Distribution of the electroneuromyographic pattern in the neurophysiological evaluation of household contacts of patients with leprosy diagnosis.....	138
Table 4	Evaluation of the chance of peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography in household contacts of patients with leprosy according to ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR and BCG scar.....	139
Table 5	Analyses of dependence relationship between peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography and the variables ELISA anti-PGL1, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR, peripheral blood qPCR and BCG scar, through multiple logistic regression.....	140
Table 6	Probability of peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography in household contacts of patients with leprosy according to risk factor combinations (ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR and BCG scar).....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAAR	Bacilo álcool-ácido-resistente
CDSN	Contato domiciliar soronegativo
CDSP	Contato domiciliar soropositivo
CREDESH	Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase
DD	Dimorfo-Dimorfo
DT	Dimorfo-Tuberculóide
DV	Dimorfo-Virshoviano
ENMG	Eletroneuromiografia
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENH	Eritema nodoso hansênico
HI	Hanseníase Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
HC	Hospital das Clínicas
HNP	Hanseníase Neural Primária
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMC	Imunidade mediada por célula
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
ML-LBP2	Proteína de ligação do <i>M. leprae</i> à laminina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONG	Organização não governamental
PAS	Potencial de ação sensitivo
PAMC	Potencial de ação muscular composto

PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-1	Glicolípido-Fenólico-1
PNL	Primary neural leprosy
qPCR	PCR em Tempo Real
RR	Reação reversa
RRP	Receptor de reconhecimento padrão
SPHC	Seropositive household contacts
SNHC	Seronegative household contacts
T	Tuberculoide
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th17	Célula T auxiliar tipo 17
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TLRs	Toll-like receptors
Treg	Células T reguladoras
TYK2	Tirosina quinase 2
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
V	Virchovano
Vsp	Virchoviano subpolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 Aspectos Históricos.....	25
2.2 Aspectos Epidemiológicos	26
2.3 Vias de Transmissão do <i>Mycobacterium leprae</i>	28
2.4 Formas Clínicas	30
2.4.1 Hanseníase Neural Primária	34
2.5 Estados Reacionais	39
2.6 Espectro da Resposta Imune ao <i>M. Leprae</i>	43
2.7 Patogenia do comprometimento neural periférico	46
2.8 Diagnóstico da Hanseníase	49
2.8.1 Histopatologia	50
2.8.2 Sorologia na Hanseníase	54
2.8.3 Detecção de <i>Mycobacterium leprae</i>	56
2.8.4 Comprometimento neural e avaliação eletroneuromiográfica	58
2.9 Tratamento da Hanseníase	68
2.10 Estratégia de Controle da Hanseníase por meio da avaliação de contatos domiciliares	69
3- OBJETIVOS	72
3.1 - Objetivo Geral	73
3.2 - Objetivos Específicos	74

3.2.1- Estudo 1	74
3.2.2- Estudo 2	75
4- MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1- Aspectos éticos	77
4.2- Eletroneuromiografia	77
4.3- Sorologia ELISA anti-PGL1	84
4.4- Extração de DNA	85
4.5- Baciloscopia e coleta de esfregaço dérmico	88
4.6- Biópsia de pele	89
4.7- Biópsia de nervo periférico	89
5- RESULTADOS	92
Estudo 1	93
Estudo 2	121
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS	148
7- REFERÊNCIAS	151
8- APÊNDICES	168
8- ANEXOS	178

1- Introdução

O Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia MG (CREDESH / HC / UFU-MG) é um dos seis centros de referência nacional em hanseníase do Brasil. Este centro tem experiência na aplicação de ferramentas sorológicas, moleculares e neurofisiológicas nos pacientes e contatos domiciliares para identificar comprometimento neural precoce, essencial para o diagnóstico e acompanhamento dessa doença neuro-dermatológica.

Como não há prevenção primária contra hanseníase, desde o ano 2000, o CREDESH tem trabalhado para possibilitar o diagnóstico precoce da hanseníase através do acompanhamento diário de pacientes e monitoramento de contatos domiciliares por um período de mais de sete anos, o que nos permitiu seguir o processo de adoecimento dos contatos e analisar as correlações clínicas e laboratoriais deste processo. Nossa equipe multidisciplinar realizou em 2016 em torno de 50.000 atendimentos e procedimentos clínicos e laboratoriais.

Considerando a nossa experiência, é necessário virar a página da "lepra bíblica" e trabalhar com a Hanseníase do século XXI. Para iniciar esta reflexão, devemos lembrar que o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é um bacilo virulento, não porque é letal, mas porque afeta nervos periféricos e pode ser devastador para o paciente, pois leva a deficiências, deformidades e estigmas sociais.

Pensando nisso, propomos a implantação do diagnóstico sorológico da infecção e a detecção de DNA de *M. leprae* por PCR em tempo real (qPCR) em indivíduos assintomáticos, considerando tratar-se de uma doença extremamente insidiosa. Mesmo que isso gere maior custo de assistência à saúde para esta doença negligenciada, não podemos esperar pela multiplicação bacilar atingindo 10.000 por grama de tecido, para que possamos encontrá-lo na baciloscopia ou biópsias por microscopia óptica, quando essa carga já produziu danos consideráveis aos pacientes.

Devemos analisar que o benefício é muito maior do que o custo para esta abordagem de diagnóstico precoce, tendo em conta os elevados custos de um

programa de reabilitação para esta enorme quantidade de pessoas com deficiência, a fim de devolver-lhes a dignidade ou minimizar os anos perdidos como resultado desta situação causada pela hanseníase.

Apesar de um aparente progresso observado nos últimos anos no controle da hanseníase, a identificação precoce de casos continua sendo um dos objetivos primordiais dos programas de controle desta doença. Além disso, o insucesso do atual esquema terapêutico sobre a incidência da hanseníase demonstra que a eliminação da doença como problema de saúde pública, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), depende de uma ação incisiva sobre a interrupção da sua cadeia de transmissão.

O longo período de incubação da hanseníase, seus sintomas e sinais insidiosos produzem dificuldades em seu diagnóstico e classificação clínica correta. O reconhecimento precoce do comprometimento neural na hanseníase sobretudo em contatos domiciliares e na forma neural primária, em que os achados clínicos e laboratoriais clássicos da doença estão, por definição, ausentes, representa um grande desafio na prática clínica, tanto pela dificuldade em suspeição diagnóstica como pela falta de métodos diagnósticos disponíveis durante a investigação, já que poucos centros dispõem de eletroneuromiografia (ENMG), testes sorológicos, moleculares e biópsia de nervo periférico para auxiliar na comprovação diagnóstica.

Esta tese é a materialização dos ideais acima expostos, objetivando a demonstração inequívoca de que a hanseníase é uma doença primariamente neural, inicialmente caracterizando e validando os exames sorológicos, moleculares e neurofisiológicos em casos suspeitos de hanseníase neural primária (HNP), uma condição ainda subdiagnosticada e desafiadora na prática clínica e a possibilidade do diagnóstico precoce da hanseníase em sua forma neural, através da busca pelo comprometimento neural subclínico em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.

2- Fundamentação Teórica

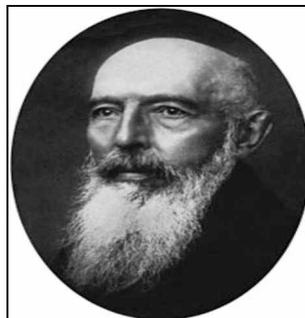
2.1- Aspectos Históricos

A hanseníase é considerada uma das mais antigas doenças da humanidade. Foi descrita desde os tempos bíblicos, com os primeiros relatos há mais de 3000 anos, sendo a origem da doença ainda controversa, embora acredita-se que tenha iniciado na África ou Ásia (EIDT, 2004).

A doença foi introduzida na América Latina durante o período de colonização espanhola e portuguesa, associado ao tráfego de escravos africanos, que constituiu a sua principal via de disseminação no continente. O primeiro caso descrito no Brasil ocorreu em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde posteriormente também foi criado o primeiro leprosário nacional (EIDT, 2004; YAMANOUCHI, 1993).

De acordo com os conceitos atuais, vários autores questionam a utilização do termo lepra, já que este substantivo não se refere exclusivamente a hanseníase, mas a inúmeras patologias cutâneas que ao longo dos anos foram sendo classificadas e desvinculadas desta terminologia (CURY, 2010).

O termo lepra é atribuído ao norueguês Gerhard Armauer Hansen (figura 1), o primeiro pesquisador a identificar o bacilo *M. Leprae* como causa da doença em 1873, revolucionando os conceitos da época sobre a moléstia (JUCKER-KUPPER, 2009).



Fonte: Who Named It em www.whonamedit.com

Figura 1 - Gerhard Henrick Armauer Hansen. Médico bacteriologista e dermatologista norueguês, conhecido pela identificação do *Mycobacterium leprae* como o agente causador da hanseníase em 1873.

2.2- Aspectos Epidemiológicos

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública especialmente pelo seu potencial incapacitante e forte efeito social de discriminação e estigma. Além disso, a hanseníase ainda representa a principal etiologia infecciosa de neuropatia periférica em todo o mundo (YAWALKAR, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), através de programas governamentais bem como pelo apoio do Banco Mundial e de Organizações não Governamentais (ONGs), estabeleceu como meta a redução da prevalência da doença a menos de um caso numa população de 10.000 habitantes no ano de 2000. Entretanto, neste ano, a prevalência global registrada foi de 1,24 casos por 10.000, representando uma redução de 90% da prevalência registrada em 1985. Na ocasião, 107 dos 122 países considerados endêmicos em 1985 conseguiram atingir a meta determinada pela OMS. Entretanto, a queda da prevalência mundial da hanseníase deveu-se exclusivamente à implementação dos esquemas de poliquimioterapia (PQT) e alta de todos os casos notificados após a conclusão do tratamento proposto (WHO, 2002).

Para algumas autoridades no assunto, existem inúmeros equívocos nesta política implementada pela OMS, já que as taxas de incidência continuaram a ser altas em vários países (WHO, 2016). Além disso, apesar da disponibilização da PQT, não houve um acompanhamento rigoroso após a alta destes pacientes na maioria dos países que atingiram a meta proposta. Por isso, a vigilância inadequada, pesquisas precárias, alta precoce, a disseminação de informações imprecisas e a redução do apoio político aumentam o problema de não se desenvolver estratégias mais eficazes para eliminar a hanseníase, de modo que o futuro da eliminação desta doença em nível global permanece muito distante.

A hanseníase ainda é uma doença endêmica em alguns países. Foram relatados 211.973 casos novos da doença no mundo em 2015 (2,9 casos por 100.000 habitantes), conforme dados da OMS (WHO, 2016). Quanto ao Brasil,

registrou-se 25.218 casos novos da moléstia no ano de 2016, sendo que desse total 18.224 foram classificados como multibacilares (MB) o que demonstra e reforça a presença do diagnóstico tardio (WHO, 2017). O Brasil além de ser o segundo país em número de casos notificados, é responsável por 92% de todos os casos da América (WHO, 2002, 2016; FREITAS; DUARTE; GARCIA, 2014).

O controle da hanseníase no Brasil envolve uma cadeia causal muito complexa, de modo que existe uma necessidade clara de se intensificar as medidas capazes de contribuir com o diagnóstico precoce da doença, bem como ações para promover a prevenção, inclusive considerando as desigualdades sociais existentes no território nacional (FREITAS; DUARTE; GARCIA, 2014). As regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste são as mais comprometidas, possivelmente devido a uma associação com as condições socioeconômicas e de políticas públicas locais que influenciam diretamente a questão do acesso aos serviços de saúde (ARAÚJO, 2003; KERR-PONTES et al., 2004; SOUZA; EL-AZHARY; FOSS, 2009).

O predomínio dos casos nas formas MB, a presença de casos com graves incapacidades neurais e a notificação de novos casos em crianças no Brasil, demonstra o atraso no diagnóstico da doença, assim como o despreparo no reconhecimento das implicações dessa micobacteriose, reforçando o controle epidemiológico ineficiente da hanseníase, cuja transmissão ainda está ativa no país (CARNEIRO et al., 2011; WHO, 2016).

Conforme ilustrado na figura 2, a estratégia global para controle da hanseníase proposta para o período de 2016 a 2020 tem o objetivo de reduzir ainda mais a carga de hanseníase no âmbito global e local, estando fundamentada em três pilares: fortalecer o controle, a coordenação e a parceria do governo; combater a hanseníase e suas complicações; e combater a discriminação e promover a inclusão. Para isso, propõe uma ênfase no diagnóstico precoce de casos, antes do surgimento de incapacidades visíveis, assim como uma maior detecção da doença em grupos de risco, mediante campanhas em áreas de alta

endemicidade. A estratégia global propõe ainda o desenvolvimento de planos nacionais para garantir o exame de todos os contatos próximos de pacientes com o diagnóstico de hanseníase, sobretudo os contatos intradomiciliares (WHO, 2016).



Figura 2 – Estratégia global para o controle da hanseníase no período entre 2016-2020. Modelo esquemático evidenciando os principais objetivos e metas definidas para este período pela Organização Mundial de Saúde.

2.3- Vias de Transmissão do *Mycobacterium leprae*

A principal via de transmissão da doença é a via aérea superior. Estudo recentemente publicado por Araujo et al. (2016) corroborou com esta afirmação, através da avaliação minuciosa e caracterização dos participantes por qPCR de amostras de biópsias de concha nasal, swabs nasais e da sorologia de pacientes e contatos, comprovando e sistematizando que a via aérea é a principal via de disseminação de *M. leprae* e particularmente o nariz é a porta principal de entrada e saída do bacilo, favorecendo a persistência da doença no contexto epidemiológico.

A exposição de um indivíduo ao bacilo leva à uma infecção da mucosa nasal, que desencadeia respostas imunes tanto celulares quanto humorais e, caso a colonização seja bem sucedida, o *M. leprae* é transportado pela corrente sanguínea e disseminado para locais em que possa encontrar um crescimento favorável, como as células de Schwann (PATROCINIO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2011; REIS et al., 2014; ARAUJO et al., 2016).

O *M. leprae* já foi detectado no solo, água e até mesmo em superfícies ambientais de áreas endêmicas, embora não exista até o momento uma comprovação de como os bacilos de fontes ambientais poderiam infectar um indivíduo. Por isso, outras vias de eliminação do bacilo não são relevantes do ponto de vista epidemiológico, já que o bacilo não atravessa a pele íntegra e a infecção não se dissemina pelo toque (JOB et al., 2008; ARAUJO et al., 2016).

Classicamente, considera-se que a transmissão do *M. leprae* se dê exclusivamente pelo contato de pessoas suscetíveis à doença com os doentes não tratados das formas MB: grupo dimorfo (D) e forma virchowiana (V), ou seja, com baciloscopia positiva. No entanto, a presença de DNA em metade das amostras de swab nasal de contatos domiciliares de pacientes com diagnóstico de hanseníase no estudo de Araujo et al. (2016), apoia a teoria de que a transmissão por pessoas sem nenhum sintoma de hanseníase, porém com a presença do *M. leprae* na mucosa nasal possa ocorrer, visto que, os programas de controle baseados na PQT não surtiram efeito esperado sobre a incidência da doença (CHELH; HASTINGS, 1985; PATROCINIO et al., 2005; ARAUJO et al., 2016).

Os pacientes virchowianos não tratados podem liberar até 100 milhões de bacilos de suas secreções nasais diariamente. Estes indivíduos infectados eliminam bactérias viáveis pela via nasal, embora 72 horas após a primeira dose de PQT os bacilos eliminados pelo paciente são incapazes de se multiplicar no novo hospedeiro (JOB et al., 2008).

A velocidade de multiplicação do bacilo é muito lenta e pode durar em média de 11 a 16 dias, permanecendo viável no meio ambiente por até 9 dias. O

M. leprae tem o maior tempo de multiplicação entre as micobactérias patogênicas, o que se reflete no tempo de incubação prolongado e na cronicidade da doença (OPROMOLLA, 2000).

Avaliar a exposição, o início da infecção e da doença torna-se virtualmente impossível pelo fato do *M. leprae* não poder ser cultivado *in vitro*, e o período de incubação da hanseníase ser extremamente longo, além de existirem formas paucibacilares (PB) que são dificilmente detectadas por técnicas habituais de microscopia óptica (RIDLEY, 1990; GOULART; MINEO; FOSS, 2000).

O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, infecta muitas pessoas, embora poucas delas desenvolvam a doença. Dentre essas, algumas apresentam resistência ao bacilo, constituindo os PB, que abrigam pequeno número de bacilos no organismo, teoricamente insuficiente para infectar outras pessoas. Em contrapartida, um número menor de pessoas não apresentam resistência ao bacilo, que se multiplica no organismo infectado, passando a ser eliminado para o meio exterior e podendo infectar outros indivíduos, constituindo os MB, que são a maior fonte de infecção e manutenção da cadeia de transmissão da doença (NOORDEEN, 1985).

2.4- Formas Clínicas

As formas clínicas podem ser categorizadas de acordo com a classificação de Ridley-Jopling (figura 3), proposta na década de 60, que se baseia na resposta imunológica do hospedeiro, classificação histopatológica da lesão cutânea e na carga bacilar. De acordo com esta classificação, os pacientes com uma melhor resposta imunológica do tipo celular (mediada por linfócitos T) são classificados como tuberculóides (T), enquanto os pacientes anérgicos, com uma deficiência importante deste tipo de resposta imune celular são classificados como virchovianos (V).

Entre estes dois extremos, encontram-se os pacientes definidos como “borderline”, por apresentarem respostas imunológicas intermediárias. Além disso, de acordo com a resposta imune destas formas intermediárias, podem ser diferenciadas como dimorfo-virchovianos (DV), dimorfo-tuberculóides (DT) ou mesmo dimorfo-dimorfo (DD). Deve-se ressaltar ainda que até em um mesmo indivíduo, estas formas clínicas podem sofrer variações, de acordo com o estado imunológico/reacional em relação à própria doença (RIDLEY; JOPLING, 1962; HASTINGS, 1985; GOULART et al., 1996).

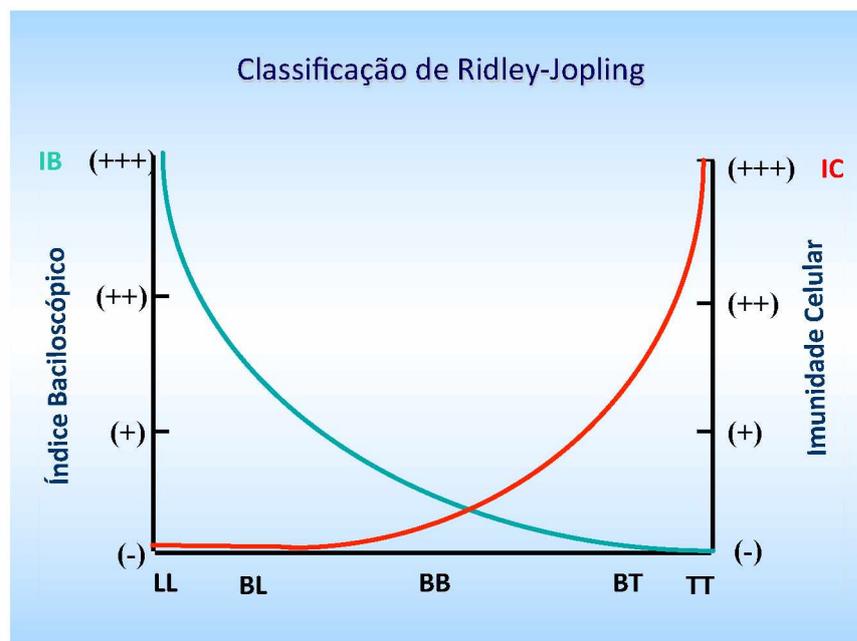


Figura 3 - Classificação de Ridley & Jopling (1966).

Esta classificação adota subgrupos dentro do espectro da hanseníase, obedecendo critérios clínicos e bacteriológicos, enfatizando os aspectos imunológicos. No extremo tuberculóide (TT) existe uma eficiente imunidade celular, enquanto no polo virchoviano ou lepromatoso (LL), há uma deficiência da resposta imune celular e, conseqüentemente, uma elevada carga bacilar. Entre os dois extremos, observa-se as formas borderline (BT, BB e BL), com respostas imunes intermediárias.

Apesar de não ter sido descrita por Ridley e Jopling, a forma indeterminada corresponde às fases iniciais da doença, na qual ainda não é possível determinar clinicamente em qual dos pólos o paciente se encontra ou irá evoluir. A hanseníase indeterminada (HI) é, portanto, a forma mais precoce da doença e,

frequentemente, não é diagnosticada. Lesões de HI quando não se curam espontaneamente, podem passar por um período de incubação, que pode variar de um a cinco anos, o que confere à hanseníase características de uma doença infecciosa de evolução crônica, para então evoluir para as formas clínicas definitivas da doença (YAWALKAR, 2002).

Clinicamente, a forma T mostra-se com lesão única em placa ou em pequena quantidade, com bordas bem definidas, de tamanhos diversos, com formas anulares ou circulares bem delimitadas apresentando distúrbio de sensibilidade do tipo anestésico, frequentemente acompanhadas por um comprometimento neural, inclusive com formação de abscessos em casos mais graves. Os DT se assemelham aos T, porém apresentam lesões em placa com bordas pouco delimitadas, também com lesão neural assimétrica e intensa. Os DD são identificados clinicamente pela presença de lesões de contornos irregulares, tonalidade ferruginosa com centro plano, liso, circular com periferia infiltrada e borda espessa de característica foveolar, também com comprometimento neural intenso e extenso (Figura 4) (SOUZA, 1997; OPROMOLLA, 2000).

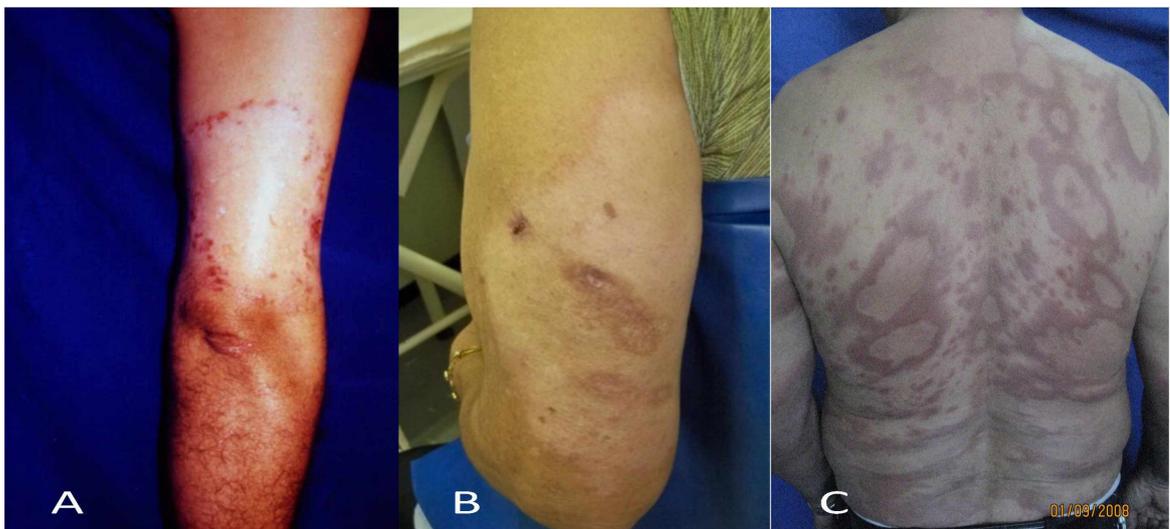


Figura 4 – Manifestações cutâneas nas diferentes formas clínicas da hanseníase. A – Forma tuberculóide (T). B- Forma dimorfo-tuberculóide (DT). C- Forma dimorfo-dimorfo (DD). Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

O grupo DV é análogo ao V, uma vez que apresentam numerosas lesões infiltradas de tom acastanhado, por vezes observando-se a presença de nódulos (hansenomas), com poucas lesões neurais, mas com presença de comprometimento visceral. O grupo V manifesta-se com lesões difusas, com infiltração cutânea formando pápulas, tubérculos, nódulos (hansenomas), placas de aspecto ferruginoso, acometimento de vários órgãos e externando diversos sinais e sintomas como fácies leonina, madarose, perfuração de septo nasal, lesões osteoarticulares (lesões líticas), lesões periodontais, laringite (rouquidão e dispneia), acometimento hepático, esplênico, testicular e dentre outros (Figura 5) (SOUZA, 1997; OPROMOLLA, 2000).



Figura 5 – Manifestações cutâneas nas diferentes formas clínicas da hanseníase. A – Forma dimorfo-virchoviana (DV). B e C- Forma virchoviana (V). Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Para fins de tratamento, a classificação operacional subdivide os pacientes em PB ou MB de acordo com o índice baciloscópio (IB), o número de lesões cutâneas e a quantidade de nervos acometidos. Os pacientes classificados como PB, incluem aqueles acometidos pelas formas clínicas I, T e DT da classificação de Ridley-Jopling, todos com baciloscopia de raspado intradérmico negativo,

enquanto os pacientes MB incluem as formas clínicas DD, DV e V (WHO, 1988, 2011). Uma classificação simplificada recomendada pela OMS foi proposta em 2000, baseada apenas no número de lesões cutâneas, em que pacientes com até cinco lesões são classificados como PB e os casos com mais de cinco lesões como MB. Esta última classificação operacional simplificada é adotada pelo ministério da saúde no Brasil (BRASIL, 2016).

2.4.1- Hanseníase Neural Primária

Em alguns pacientes, a hanseníase pode se manifestar como uma apresentação clínica da doença sem quaisquer lesões de pele, definida como hanseníase neural primária (HNP), cujo diagnóstico é fundamentado principalmente nos estudos eletrofisiológicos, biópsia de nervo periférico e exames moleculares (NASCIMENTO et al., 2013; JARDIM et al., 2004).

Por definição, a HNP se refere aos casos em que se observa a presença de uma neuropatia periférica que pode se apresentar como uma mononeuropatia, mononeuropatia múltipla ou até mesmo uma mononeuropatia múltipla confluyente, na ausência de lesões cutâneas ao exame dermaneurológico e em que a baciloscopia do raspado intradérmico é negativa (GARBINO et al., 2011, 2013).

A HNP foi inicialmente descrita em 1952, no *International Journal of Leprosy*, quando foram publicados os resultados do Simpósio Internacional sobre Classificação da hanseníase (WADE, 1952). Desde a sua descrição, observou-se a dúvida entre a HNP se tratar de uma forma distinta da hanseníase ou uma condição dentro do espectro clínico da doença (GARBINO et al., 2011).

Esta forma clínica, além de classicamente reconhecida como HNP, tem uma nomenclatura variável na literatura, sendo comumente referida como hanseníase neural pura, primariamente neural, forma neurítica, forma neurítica pura e até mesmo polineurítica (JARDIM et al., 2003), o que inclusive pode

influenciar os dados epidemiológicos conflitantes em relação a esta condição clínica.

Os dados epidemiológicos referentes à HNP são extremamente variáveis. Dongre et al. (1976), na Índia, em um estudo populacional que avaliou 11581 pacientes, encontrou uma incidência de 5.5% de casos compatíveis com HNP. Em um estudo indiano prospectivo, no qual 8000 indivíduos foram acompanhados ao longo de um período de cinco anos, a incidência de HNP foi de 13.2% (NOORDEEN, 1972).

No Brasil, também existem poucos estudos epidemiológicos relacionados à HNP. Garbino et al. (2008) descreve uma casuística de um centro de referência nacional em hanseníase, no qual foram realizadas 162 biópsias de nervo periférico em um período de 20 anos e, destas, confirmados 34 casos de HNP (menos de dois casos por ano). Em outro trabalho de Garbino et al. (2005), foram confirmados 14 casos de HNP em um período de 10 anos. Tomaselli (2014) em um estudo observacional retrospectivo, avaliou pacientes com o diagnóstico de HNP em um período de 12 anos em outro centro de referência nacional, totalizando 34 casos. O estudo de Jardim et al. (2003) apresenta a maior incidência da HNP, no qual dos 286 pacientes atendidos com o diagnóstico de hanseníase, 17.1% foram confirmados com esta forma clínica.

Além de uma prevalência baixa da HNP, sobretudo na literatura nacional, alguns autores consideram ainda a existência de erros no diagnóstico desta forma clínica, sobretudo por uma investigação incompleta de lesões cutâneas e por uma investigação inadequada por diagnósticos diferenciais, o que prejudica ainda mais a sistematização dos dados (GARBINO et al., 2011, 2013).

A avaliação dermatológica é, portanto, essencial na abordagem de um paciente com suspeita de HNP. Embora por definição a ausência de lesões cutâneas seja inclusive um critério diagnóstico, alguns trabalhos que acompanharam pacientes com o diagnóstico de HNP, demonstraram que até 15.8% destes desenvolveram lesões cutâneas em um período de 36 meses após o

diagnóstico (SUNEETHA et al., 2005). Durante o acompanhamento destes casos é possível ainda a ocorrência de reações hansênicas, inclusive durante ou após o tratamento, o que também pode reclassificar a forma clínica da doença (GARBINO et al., 2013).

Em casos suspeitos de HNP, a biópsia de áreas hipostésicas ou, na ausência destas, de regiões próximas ao nervo afetado pode contribuir com o diagnóstico, ainda que a ausência de alterações histológicas nestas amostras não exclua esta condição (GARBINO et al., 2013). Alguns autores referem que a biópsia de pele em áreas com alterações sensitivas correspondentes ao território do nervo afetado podem apresentar alterações histopatológicas sugestivas de hanseníase numa proporção considerável (GARBINO et al., 2005; MENICUCCI et al., 2005). Entretanto, apesar de ser um método invasivo, a biópsia de nervo periférico tem uma sensibilidade de até 75.9%, acima da biópsia de pele (58,6%) (SUNEETHA et al., 2001).

Clinicamente, a HNP cursa com um comprometimento predominantemente sensitivo e assimétrico. Van Brakel e Khawas (1994) avaliaram 396 casos novos de HNP, encontrando comprometimento motor em 96 e comprometimento sensitivo em 116. Os nervos mais comprometidos foram: componente sensitivo do nervo tibial (21%), componente motor do nervo ulnar (20%), componente sensitivo do nervo ulnar (17%), componente sensitivo do nervo mediano (8,8%) e componente motor do nervo fibular (4.8%) (VAN BRAKEL; KHAWAS, 1994). Jardim et al. avaliou 49 pacientes com HNP, observando parestesias em 55% dos casos e comprometimento motor em 24%, dor neuropática em 12% e perda sensitiva em 8.0%. Mononeuropatia múltipla foi observada em 61% dos pacientes e mononeuropatia em 33%, apenas 6% apresentaram uma polineuropatia (JARDIM et al., 2003).

Tomaselli (2014) na descrição de 34 pacientes com o diagnóstico de HNP, também encontrou uma instalação assimétrica dos sintomas em todos os casos avaliados, em 94.2% ocorrendo de maneira isolada em um membro, sobretudo

nos membros superiores. O território sensitivo mais comprometido foi correspondente ao nervo ulnar (38.2%). A queixa inicial foi sensível em 91.2% dos casos, notadamente parestesia e hipostesia. Os nervos sensitivos mais frequentemente acometidos com um padrão truncal foram os nervos ulnar e fibular superficial. Um outro estudo realizado no mesmo serviço também encontrou um predomínio sensitivo em 82.9% dos casos no que se refere às queixas iniciais de pacientes com o diagnóstico de HNP, confirmando ainda o padrão clínico de uma mononeuropatia múltipla sensitivo-motora em 58.8% (DOS SANTOS, 2015).

O espessamento neural, embora não seja um sinal clínico exclusivo da neuropatia hansênica, contribui bastante com a suspeita diagnóstica, sobretudo na existência de um antecedente epidemiológico em regiões endêmicas. A presença de espessamento neural foi observada em uma frequência de 70.6% a 88.2% dos casos em estudos recentes, reforçando a importância deste achado no exame físico neurológico em pacientes sob suspeita de HNP (Figura 6) (TOMASELLI, 2014; DOS SANTOS, 2015).

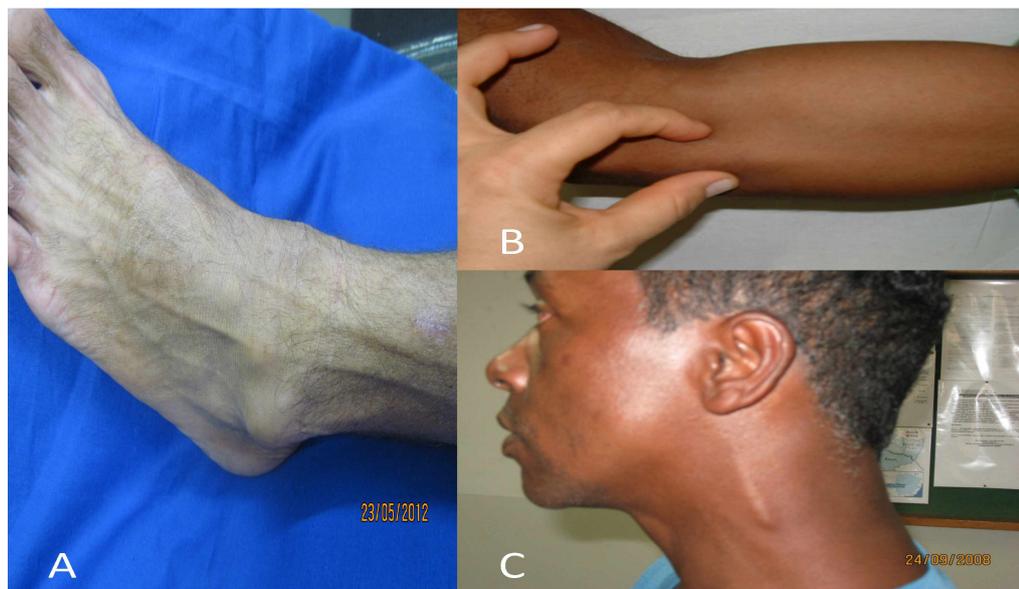


Figura 6 – Espessamento neural na neuropatia hansênica.

A- Nervo fibular superficial. B- Nervo ulnar. C- Nervo auricular. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Ainda em relação ao exame físico, quando avaliadas as modalidades sensitivas predominantemente alteradas na neuropatia hansênica, dor e temperatura são as mais comprometidas, enquanto a sensibilidade vibratória, cinético postural, bem como os reflexos tendinosos profundos e a força muscular estão alterados apenas em fases avançadas da doença e quando há uma maior quantidade de nervos afetados pela doença. Além disso, os sinais clínicos sugestivos de comprometimento autonômico são frequentes e podem ocorrer em qualquer fase da doença, inclusive em estágio precoce/subclínico, quando ainda não há comprometimento truncal evidente (SABIN; SWIFT; JACOBSON, 2005; TOMASELLI, 2014; DOS SANTOS, 2015).

Além do comprometimento sensitivo truncal descrito na maioria dos trabalhos que avaliaram as alterações clínicas de pacientes com o diagnóstico de HNP, o dano neural periférico pode assumir uma forma exclusivamente intradérmica, reforçando o padrão temperatura dependente desta neuropatia. Nesse acometimento intradérmico, a área sensitiva alterada não corresponde a um território de inervação específico de um nervo periférico, mas cursa com alterações multifocais, com a presença de regiões hipoestésicas sobretudo em áreas frias do corpo, como a região anterior do joelho, face posterior do cotovelo e antebraço, lóbulos das orelhas e glabella (TOMASELLI, 2014; DOS SANTOS, 2015).

O diagnóstico diferencial da hanseníase neural primária deve incluir outras causas de mononeuropatias e mononeuropatias múltiplas, tais como inflamatórias (colagenoses e vasculites não-sistêmicas); metabólicas (diabetes, hipotireoidismo, associadas a agentes tóxicos e medicamentosos); traumáticas e posturais (compressões agudas e crônicas); congênitas e hereditárias (neuropatia hereditária suscetível a pressão - HNPP, neuropatias hereditárias sensitivo-motoras - Charcot-Marrie-Tooth - CMT e suas variantes) e tumorais. Por isso, é sempre muito importante, no momento do diagnóstico de HNP, reforçar a ausência de

outra etiologia suspeita para a neuropatia periférica durante a anamnese e avaliação clínica (GARBINO et al., 2011, 2013).

O atraso no diagnóstico é comum especialmente nesta forma clínica, possivelmente em decorrência da falta de ferramentas diagnósticas disponíveis, corroborando para um subdiagnóstico. A duração da doença é um fato de extrema relevância em todas as formas clínicas da hanseníase, bem como na HNP. Nos pacientes em que o tempo de evolução da doença é maior do que 12 meses, observa-se claramente uma maior gravidade dos sintomas sensitivo-motores e, conseqüentemente, uma maior quantidade de nervos comprometidos e um maior comprometimento funcional (TOMASELLI, 2014). Na verdade, a maioria dos estudos descrevem casos de HNP com evolução arrastada, o que é evidenciado pelo padrão de mononeuropatia múltipla, por vezes confluyente observado pela maioria dos autores (JARDIM et al., 2003, 2004; TOMASELLI, 2014; DOS SANTOS, 2015).

2.5- Estados Reacionais

Sobrepondo a classificação clínica espectral da hanseníase impõe-se ainda, os chamados "estados reacionais" que podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e mesmo após o tratamento, quando o paciente é considerado curado (NAAFS, 1994; FOSS, 2005). Os episódios reacionais podem acometer todas as formas clínicas da doença, com exceção da HI (PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985; FOSS; OLIVEIRA; SILVA, 1997; FOSS et al., 2005).

As reações hansênicas podem ser definidas como manifestações clínicas agudas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o *M. leprae* (SAMPAIO; SARNO, 1998). Estes episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade

relacionadas à função do nervo periférico, e são classificados em dois tipos: reação Tipo 1 e reação Tipo 2 (RIDLEY, 1969)

Reação Tipo 1 ou reação reversa (RR), ocorre principalmente nas formas dimorfas (DT, DD, DV) e com menor frequência nas formas T e virchovianos-subpolares (Vsp), além de estar associada com um aumento abrupto da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae*. É uma reação de hipersensibilidade tardia associada à redução da carga bacilar das lesões e ascensão no espectro em direção ao pólo tuberculóide, também denominado de *upgrading*. Esta reação envolve a produção de citocinas de resposta Th1, incluindo interferon-gama, interleucinas (IL) 2 e 12, refletindo uma melhora imunológica celular contra o bacilo, por vezes com positividade do Mitsuda (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990; FLEURY, 1989; FOSS et al., 2005; ANTUNES et al., 2016).

Clinicamente, a reação tipo 1 cursa com uma piora acentuada e aguda das lesões de pele presentes previamente, tornando-se eritematosas e edemaciadas, inclusive com eventuais ulcerações e surgimento de novas lesões. No sistema nervoso periférico, pode ocorrer a agressão de um ou mais troncos neurais, com consequente dor e/ou novas alterações sensitivo-motoras (Figura 7) (BHAT et al., 2012; FOSS et al., 2005).



Figura 7 – Reação hansênica tipo 1. Paciente dimorfo-tuberculóide, evidenciando novas lesões eritematosas e edemaciadas, neste caso acompanhando lesão no nervo ulnar no segmento do cotovelo e presença de mão reacional. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

A reação Tipo 2 ou reação tipo eritema nodoso hansênico (ENH) é caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica, apresentando imunologia mais complexa. Normalmente ocorre em pacientes multibacilares, V e DV, durante e após o tratamento, embora também possam ocorrer em indivíduos não tratados. Em alguns pacientes, pode ocorrer um ou mais episódios, ou então se tornar crônica e aparecer mesmo após o término do tratamento. Nestas reações existe uma associação com a resposta imune do tipo Th2, envolvendo a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-8 e IL-10. Ainda é possível a ocorrência de reações mistas, principalmente nos pacientes DV (NAAFS, 1994; FOSS et al., 2005; ANTUNES et al., 2016).

Na reação tipo 2, pode ocorrer o surgimento de pápulas ou nódulos subcutâneos eritematosos e dolorosos, quentes e moveis à palpação, reconhecidos como ENH, que podem inclusive evoluir para necrose caracterizando o eritema nodoso necrotizante. Pode ocorrer ainda a deposição de imunocomplexos em diversos órgãos, levando a quadros de artrite, glomerulonefrite, orquiepididimite, miosite, iridociclite, hepatomegalia, vasculites, assim como alterações hematológicas e laboratoriais (Figura 8). (BHAT et al., 2012; FOSS et al., 2005).



Figura 8 – Reação hansênica tipo 2.

Paciente dimorfo-virchoviano, evidenciando a presença de nódulos subcutâneos compatíveis com o eritema nodoso hansênico e inúmeras pápulas eritematosas. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

A ocorrência de estados reacionais na hanseníase é um evento comum durante o tratamento que deve ser devidamente monitorado tanto do ponto de vista clínico quanto laboratorial, já que estes eventos estão diretamente relacionados com o risco de maior incapacidade na doença. Entretanto, poucos estudos quantificaram o número de reações hansênicas por paciente, devido a uma dificuldade tanto de monitorizar esses indivíduos e à falta de critérios claros que determinam o início e o fim de um estado reacional (ANTUNES et al., 2016).

Existe uma relação positiva entre o número de estados reacionais durante o tratamento e o número de lesões cutâneas observadas no momento do diagnóstico, assim como com o IB da biópsia de pele e raspado intradérmico, reforçando a relação destes episódios com a carga bacilar do indivíduo (SOUSA et al., 2007; BRITO et al., 2008; ANTUNES et al., 2016).

Por isso, o monitoramento dos estados reacionais ao longo do tratamento e mesmo após a alta é fundamental na assistência de pacientes com hanseníase, já que dados clínicos e laboratoriais podem ajudar a identificar grupos de risco e criar protocolos de monitoramento, prevenindo sobretudo a ocorrência de lesões neurais. (ANTUNES et al., 2013, 2016)

As reações hansênicas constituem uma situação de urgência médica, em algumas situações com necessidade de intervenção medicamentosa e acompanhamento multiprofissional, já que sua evolução pode levar a grave lesão neural, infecções secundárias, incapacidades físicas e sequelas que perpetuam o estigma relacionado à hanseníase. Basicamente, as reações tipo 1 são tratadas com glicocorticóide, especificamente a prednisona, em uma dose de 1 a 1.5mg/kg/dia, com redução lenta após o seu início, associado à imobilização do membro comprometido. Os casos de neurite refratária ao tratamento convencional devem ser submetidos a pulsoterapia com metilprednisolona em ambiente hospitalar. Em contrapartida, o medicamento indicado para a reação tipo 2 é a talidomida na dose de 100 a 400 mg/dia de acordo com a gravidade do caso clínico e laboratorial (BRASIL, 2016).

2.6- Espectro da Resposta Imune ao *M. Leprae*

Embora a hanseníase seja uma doença infecciosa crônica ela também pode ser considerada uma doença imunológica, uma vez que as reações do sistema imune são de grande importância na defesa contra a infecção (RIDLEY; JOPLING, 1966). A imunidade celular tem um papel primordial na hanseníase uma vez que ela protege o indivíduo contra a doença e contra a disseminação do bacilo (GODAL; NEGASSI, 1973; GOULART et al., 2000).

O processo imunológico a nível celular está intimamente relacionado aos padrões de citocinas produzidas pelas primeiras células de defesa, à quantidade produzida, ao período de produção e à disponibilidade destas citocinas no sítio da infecção (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; YAMAMURA, 1992; KABELITZ; MEDZHITOV, 2007). Quando a micobactéria entra em contato com os macrófagos do hospedeiro, ele é fagocitado e o macrófago passa a produzir citocinas IL-1, TNF- α e IL-12 que atuam sobre linfócitos T, principalmente CD4⁺ tornando-os ativados e capazes de produzir suas próprias citocinas. Os linfócitos CD4⁺ são subdivididos em T-auxiliares 1 (Th1), que produzem as citocinas IL-2, IFN- γ e TNF β , e em T-auxiliares 2 (Th2) que produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10 (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MONTOYA et al., 2009; MODLIN, 2010).

Na hanseníase, a ativação dos linfócitos Th1 produz IL-2 e leva à proliferação de elementos da imunidade mediada por célula (IMC) e da hipersensibilidade tardia. Através de fatores como o IFN- γ , os linfócitos Th1 ativam os macrófagos aumentando suas capacidades microbicidas. Além disso, um excesso de IFN- γ pode suprimir a função dos linfócitos Th2. No entanto, a citocina IL-4, produzida por linfócitos Th2, suprime a ativação das células Th1 ao mesmo tempo em que promove diferenciação e ativação de células B (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MODLIN, 2010; GOULART et al., 2000).

Pacientes com hanseníase T têm uma forte imunidade celular, mas apresentam baixa produção de anticorpos. Esse modelo de imunidade é refletido em granulomas que se formam em torno dos nervos e produzem dano neural sensitivo periférico e lesões de pele secundárias (DE FREITAS; NASCIMENTO; QUAGLINO, 2003). Nesses pacientes, observa-se uma resposta imune celular específica com participação de linfócitos, principalmente do tipo TCD4+, típico do padrão Th1. Desse modo, *M. leprae* é raramente visto e a resistência ao patógeno é forte, a julgar pela ativação *in vitro* de linfócitos de pacientes em respostas aos antígenos de *M. leprae* (MODLIN; REA, 1988). Portanto, as citocinas que predominam nas lesões da forma clínica T são típicas do padrão Th1 (IL-2 e IFN- γ) e atuam no sentido de aumentar a IMC (MODLIN, 2010).

Pacientes com hanseníase V não apresentam resposta celular eficaz contra o *M. leprae* e nas lesões de pele encontram-se macrófagos jovens pouco diferenciados e um pequeno número de células T, predominantemente do tipo CD8+ (GOULART et al., 1996). Nesse polo, predomina a imunidade humoral tipo Th2, a qual exhibe altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido fenólico I (PGL-I), antígeno específico de *M. leprae*, presente nos tecidos e soro de pacientes DV e DD, sem, no entanto, conferir proteção efetiva contra o bacilo (SPENCER; BRENNAN, 2011).

Além do modelo bifásico de diferenciação das células T CD4+ nos subtipos Th1 ou Th2, diversas subpopulações de células T também envolvidas com a resposta imune foram descritas e caracterizadas recentemente, de modo que os subtipos de células T são distinguidos não só pelas citocinas, mas também pela expressão de fatores de transcrição, incluindo os subtipos Th17, Th9 e as células T-reguladoras (Treg) (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016).

As células Treg suprimem ativamente a resposta imune a antígenos próprios e antígenos tumorais, além de inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes, assim como controlar a resposta inflamatória a bactérias, vírus, parasitas e fungos, contribuindo para a persistência do agente infeccioso

(KAUFMANN; KABELITZ, 2010). Pesquisas têm demonstrado um predomínio de células Treg, especialmente produtoras de IL-10, nas formas do polo lepromatoso da doença, indicando um papel supressor da resposta imune (PALERMO et al., 2012; FERNANDES et al., 2013) e eventual persistência da infecção pelo *M. leprae*. Também há indícios da relação das células Treg com as reações hansênicas, principalmente do tipo 1 (PARENTE et al., 2015). Os linfócitos Th17 são secretores da citocina IL-17, que tem uma ação pró-inflamatória, e estão envolvidos na defesa contra microrganismos e na mediação de inflamação, sobretudo nos pacientes PB (SADHU et al., 2016).

Existem diversos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes principalmente na membrana de células efectoras do sistema imune inato que reconhecem diferentes tipos de ligantes, porém aqueles de maior interesse na hanseníase são os receptores do tipo *toll*, conhecidos como *toll-like receptors* (TLRs) (KAWAI; AKIRA, 2009). Dentre os principais componentes na parede celular do *M. leprae*, o PGL-1 possui ligantes lipídicos reconhecidos pelos receptores *TLR2* e pelo heterodímero *TLR2-TLR1* que desencadeiam vias para combater micro-organismos intracelulares, influenciando componentes da imunidade inata e adaptativa estimulando linfócitos T ou B (THOMAS-USZYNSKI et al., 2001; KRUTZIK et al., 2003).

Diante da complexidade dos mecanismos da resposta imune, torna-se complexo determinar as causas da anergia celular em pacientes V, a qual pode ser resultante de defeitos no processamento e apresentação do antígeno aos linfócitos T, ou então devido à ausência de linfócitos reativos ao *M. leprae*. Nas lesões de pacientes V há predomínio de linfócitos T supressores ao contrário do que ocorre na forma T, na qual predomina os linfócitos T auxiliares. Além disso, pode haver deficiência na produção de citocinas estimuladoras e reguladoras (GORODEZKY et al., 2004; SADHU et al., 2016).

A capacidade de o indivíduo gerar uma resposta imune celular específica contra o *M. leprae* pode ser mensurada através do teste de Mitsuda (Figura 9),

uma ferramenta importante no prognóstico dos casos de hanseníase que foi introduzida oficialmente no VI Congresso Internacional de Hanseníase de 1953 em Madri. Este é um teste intradérmico, no qual é injetada uma suspensão de bacilos mortos que desencadeia no local uma reação de hipersensibilidade tardia do tipo granulomatosa. O resultado é obtido após 21 a 28 dias e é graduado de acordo com a medida em milímetros (mm) do diâmetro da endureção (não do eritema) no local da injeção. Em geral são considerados positivos resultados maiores ou iguais (\geq) a 5 mm. Pacientes MB, especialmente aqueles com formas clínicas DV e V, apresentam deficiência no combate ao *M. leprae* e conseqüentemente seus resultados são negativos no teste de Mitsuda. Do outro lado, pacientes PB, particularmente T, são reativos ao teste e apresentam resultados positivos. Em pacientes dimorfos, verifica-se que a positividade da reação diminui gradualmente a partir do polo T, à medida que a resposta imune celular diminui em direção ao polo V (DHARMENDRA, 2012). Em indivíduos saudáveis a positividade ao teste de Mitsuda é associada a uma menor probabilidade de este desenvolver a doença posteriormente (GOULART et al., 2008).



Figura 9 – Teste de Mitsuda.

Realização da injeção intradérmica de uma suspensão de bacilos mortos, desencadeando uma reação local 21 dias após, neste caso positiva (\geq 5 mm).

2.7- Patogenia do comprometimento neural periférico

A patogenia do comprometimento do sistema nervoso periférico na hanseníase se baseia em dois conceitos principais em torno dos quais o dano neural é melhor compreendido: a infecção das células de schwann e a presença de inflamação perineural (SCOLLARD, 2008; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

Após a entrada dos bacilos no organismo humano pela via respiratória, ocorre uma especificidade imunológica pelos macrófagos e células de Schwann, com uma consequente infecção destes tipos celulares. O *M. leprae* compromete os nervos deslocando-se nos linfáticos epineurais e vasos sanguíneos, invadindo sobretudo o compartimento endoneural. A presença de inflamação perineural na hanseníase é um achado histopatológico muito importante, pois corrobora com a rota pela qual este bacilo entra nos nervos, reforçando a infecção das células endoteliais por este agente (SCOLLARD, 2008; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

Os nervos periféricos mais comumente acometidos na hanseníase são aqueles com localização mais superficial, sobretudo nas regiões frias e sujeitas a traumatismos. Estes locais mais frios (região anterior do joelho, posterior do cotovelo e face) são adequados para a proloferação do *M. leprae*, cujo crescimento é extremamente influenciado pela temperatura corporal, com uma maior proliferação do patógeno em temperaturas em torno de 27 a 30 graus Celsius (AGRAWAL et al., 2005).

Vários mecanismos podem desempenhar um papel na invasão das células de Schwann pelo bacilo. Este neurotropismo do *M. leprae* pode ser atribuído à sua afinidade pelo domínio G da laminina $\alpha 2$, uma proteína de matriz extracelular que está presente na lâmina basal das células de Schwann. Por sua vez, o complexo *M. leprae*/laminina- $\alpha 2$ se liga a complexos de destroglicano (porção extracelular (α) e outra transmembrana (β)) (MATSUMURA et al, 1997). O *M leprae* se associa com a molécula α -dístroglicana, enquanto a β - dístroglicana conecta-se com a dístrofina, uma proteína intracelular associada à actina,

formando um complexo constituído pela laminina, α -dístroglicana, β -dístroglicana e dístrofina. Deve-se salientar ainda a existência moléculas presentes no próprio bacilo responsáveis pela sua ligação com a laminina $\alpha 2$, tais como a proteína de ligação do *M. leprae* à laminina (ML-LBP2) e o glicolípido fenólico espécie-específico (PGL-1), responsáveis por mediar o processo de invasão do bacilo (FREEDMAN; WEINSTEIN; KAPLAN, 1999; MATSUMURA et al., 1997; SHIMOJ et al., 1999; RAMBUKKANA et al., 1997, 2001, 2002; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

O comprometimento ocorre tanto nas células de Schwann mielinizadas quanto nas não mielinizadas e, por vezes, como o *M leprae* é muito bem adaptado, minimamente tóxico, é capaz de se multiplicar em várias células mas sem causar uma disfunção importante nas fases iniciais, inclusive sem interferir na capacidade básica de interação com os axônios e de produzir mielina (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

Após a invasão do *M. leprae* no interior da célula de Schwann, não há um mecanismo eficiente para a eliminação do bacilo, que continuam se proliferando e invadindo novos macrófagos. Por isso, vários mecanismos patogênicos podem ser responsáveis pelo dano neural na hanseníase, incluindo a interferência bioquímica do *M. leprae* com metabolismo celular do hospedeiro, danos mecânicos devido o grande fluxo de células e fluidos, ou imunológicos (SPIERINGS et al., 2001; MATTOS et al., 2010).

Em fases tardias da infecção, o bacilo compromete a homeostase celular e desencadeia uma cascata de eventos, que no espectro V culminam com a formação de globias, conferindo um aspecto celular espumoso e, em última análise, levam a um processo de desmielinização segmentar. A desmielinização é induzida por uma variedade de insultos, incluindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e ativação do receptor tirosina kinase (ErbB2), todos contribuindo com este tipo de lesão (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

Está bem estabelecido que a imunidade inata do hospedeiro a *M. Leprae* também é quem determina a manifestações clínicas neurais da hanseníase. Acredita-se que mais de 99% da população apresenta proteção imune adequada à infecção e não desenvolve os sinais e sintomas da doença. Do ponto de vista infeccioso, a presença de uma adequada resposta imune celular pode ser benéfica, já que promove mecanismos capazes de levar à morte do bacilo. Contudo, no sistema nervoso periférico, o quadro inflamatório que acompanha a infecção no tecido nervoso pode resultar em danos graves e irreversíveis nestes pacientes (SPIERINGS et al., 2001; SCOLLARD, 2008; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

O comprometimento neural periférico clínico detectável ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes PB e 40 % dos pacientes MB, sobretudo naqueles que desenvolvem episódios reacionais ao longo de sua evolução. Entretanto, sabe-se que o envolvimento neural subclínico pode ocorrer em praticamente todos os pacientes com hanseníase e que 30% das fibras nervosas precisam ser destruídas antes que as alterações sensitivas se tornem detectáveis (VAN BRAKEL; KHAWAS, 1994; SPIERINGS et al., 2001; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

2.8- Diagnóstico da Hanseníase

Em se tratando de uma doença infecto-contagiosa e de grande potencial incapacitante, o diagnóstico precoce deve ser o primeiro objetivo das ações de controle da hanseníase. O diagnóstico clínico é baseado na presença de alguns sinais cardinais da doença: lesões de pele com hipoestesia termo-analgésica, espessamento de nervos periféricos e presença do bacilo em esfregaços dérmicos, biópsia de pele ou nervo. Na presença destes três sinais, a sensibilidade diagnóstica é de até 97% e o valor preditivo positivo de 98% para o diagnóstico de hanseníase (OOI; SRINIVASAN, 2004; BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

O exame baciloscópio deve ser feito idealmente através da coleta de material nos lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos. Após a realização de procedimentos laboratoriais adequados, o resultado é negativo quando nenhum bacilo é encontrado em cem campos e é positivo quando encontra-se mais de 10 bacilos em 100 campos (SHEPARD; MCRAE, 1968).

O padrão ouro de diagnóstico em hanseníase, considerado ainda hoje, são o exame clínico dermatoneurológico e a baciloscopia (coloração para BAAR) do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele, porém, as formas PB, por terem poucos bacilos, não são detectadas por este método convencional. Como na coloração de BAAR são necessários no mínimo 10.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável, a sensibilidade é baixa, principalmente em pacientes com características tuberculóides da doença, onde os bacilos são raros ou ausentes. (SHEPARD; MCRAE, 1968).

Como o diagnóstico da hanseníase é baseado principalmente em manifestações clínicas, a escassez de sintomas no início da doença pode contribuir para erros no diagnóstico ou para o subdiagnóstico. Por isso, com o avanço tecnológico, inúmeras ferramentas laboratoriais vêm sendo desenvolvidas na investigação da hanseníase, tais como os testes sorológicos e moleculares.

2.8.1- Histopatologia

O exame histopatológico complementa o diagnóstico de hanseníase. Nas manifestações iniciais da HI, os infiltrados são discretos, constituídos principalmente de linfócitos, histiócitos não diferenciados e alguns fibroblastos. A localização perineural e ao redor dos anexos cutâneos é muito importante e deve ser valorizada quando não forem encontrados bacilos, correlacionando com lesões clínicas sugestivas (RIDLEY, 1990).

Na forma clínica T, há macrófagos e histiócitos diferenciados em células epitelióides formando granulomas próximos à pele e aos nervos. A pesquisa de bacilos também é quase sempre negativa (RIDLEY, 1990; FLEURY, 2000).

No grupo D, há intenso edema inter e intracelular; os granulomas são difusos, amarelados que podem simular a degeneração lipóidica encontrada na célula de virchow (RIDLEY, 1990; FLEURY, 2000).

Na forma V, encontramos os macrófagos carregados de bacilos e globias, pois não têm capacidade de destruí-los. Os bacilos são vistos também nos filetes nervosos, endotélio e parede de vasos, bainhas e músculos eretores dos pêlos (RIDLEY, 1990; FLEURY, 2000).

A descrição histopatológica das alterações encontradas nos nervos periféricos (figura 10) comprometidos na hanseníase foi detalhada em estudos pioneiros que abordaram o dano estrutural que ocorre na doença (DASTUR; RAMAMOCHAN; SHAH, 1973). Chimelli et al. (1997) reforçou o valor da biópsia de nervo no diagnóstico da HNP através da demonstração das principais alterações morfológicas e o seu significado, contribuindo com o diagnóstico diferencial com outras neuropatias periféricas. Garbino et al. (2004) corrobora com este estudo anterior, ressaltando a importância deste método, sobretudo nos casos em que a baciloscopia do nervo é negativa.

Antunes et al. (2012) avaliou 144 biópsias de HNP, apenas 24.3 % destes apresentaram quadro histológico definitivo de HNP, definido pela demonstração do *M. leprae* nos macrófagos e/ou células de Schwann do nervo. Outros achados foram encontrados nestas amostras, embora não sejam patognomônicos de HNP, tais como presença de infiltrado epineural, perineural e endoneural, constituído por células mononucleares, granuloma epitelióide e macrófagos; edema subperineural, espessamento perineural e presença de fibrose epineural, perineural e endoneural. Na avaliação por meio de cortes finos, observou-se uma redução na proporção de fibras mielinizadas, presença de microfasciculação e sinais de remielinização.

Hui et al. (2015) avaliou a biópsia de nervo periférico de 46 pacientes com HNP, 47.8% destes com baciloscopia positiva. Em 21.7% dos casos, observou-se a presença de granuloma epitelióide, definidos como um diagnóstico provável de HNP. Nos demais casos, encontrou-se basicamente a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, particularmente no endoneuro, e presença de achados não inflamatórios, tais como fibrose endoneural e espessamento perineural.

É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos citados anteriormente, que avaliaram os achados histopatológicos de pacientes com o diagnóstico de HNP, recrutaram casos com evolução prolongada, na maioria das vezes com quadro neurofisiológico de uma mononeuropatia múltipla, demonstrado pelo comprometimento sensitivo-motor grave em alguns casos, inclusive com presença de deformidades, o que interfere nos achados encontrados, sobretudo na positividade da baciloscopia.

Ainda em relação à HNP, a avaliação da biópsia de pele de área suprajacente ao nervo comprometido, ainda que na ausência de alterações sensitivas locais é fundamental e também pode contribuir com o diagnóstico, conforme já descrito anteriormente. Estima-se que em até 30% dos casos é possível encontrar alterações histológicas compatíveis com o diagnóstico de hanseníase, ainda que clinicamente o paciente não apresente lesões cutâneas características (SUNEETHA et al., 2001).

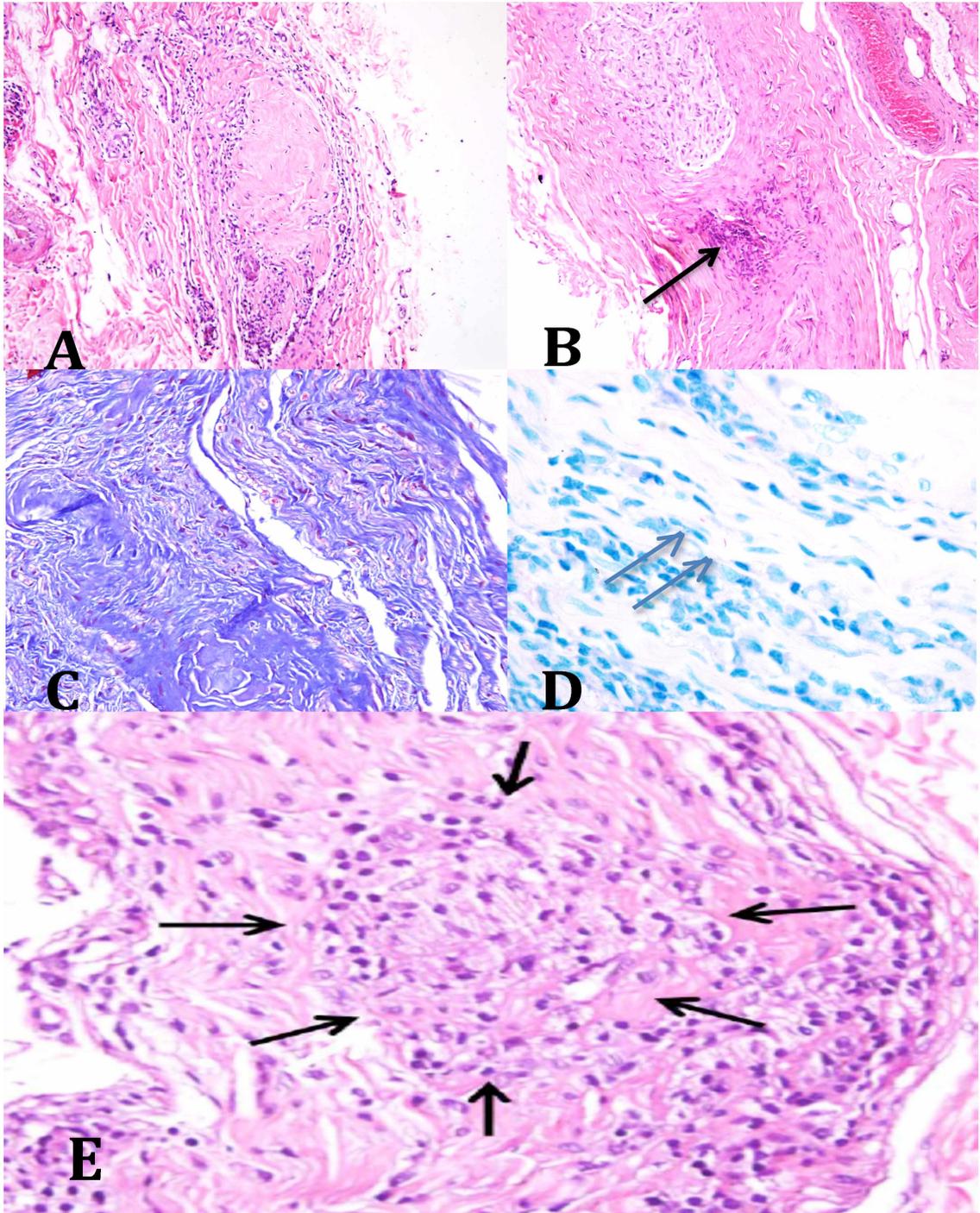


Figura 10 – Alterações histopatológicas em nervos periféricos de pacientes com neuropatia hansênica.

- A- Nervo corado em Hematoxilina-Eosina (HE), com aumento de 200x, exibindo fibrose peri e endoneural, além de infiltrado inflamatório mononuclear circundando vasos do perineuro.
- B- Nervo corado em HE, com aumento de 200x mostrando espessamento fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear do perineuro (seta).
- C- Nervo corado pelo tricrômio de Masson, com aumento de 200x, exibindo espessamento do perineuro, fibrose do endoneuro, angiogênese e redução de fibras mielínicas.
- D- Coloração pelo Fite-Faraco (cumento de 1000x) demonstrando a presença de BAAR (setas).
- E- Nervo corado em HE (cumento de 400x) mostrando no perineuro, infiltrado inflamatório mononuclear e no endoneuro, granuloma frouxo (setas) de células epitelióides com macrófagos vacuolados de permeio, sem necrose.

Imagens cedidas pelo laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da UFU.

2.8.2- Sorologia na Hanseníase

No início dos anos 80, o pesquisador Patrick Brennan, da Universidade Estadual do Colorado (EUA), descreveu o PGL-I, uma molécula da parede celular do *M. leprae* altamente antigênica, principalmente na estimulação da produção de imunoglobulina do tipo M (IgM) (HUNTER; BRENNAN, 1981). Além de antigênica, esta molécula também está envolvida no processo patogênico da invasão de células de Schwann (HUNTER; FUJIWARA; BRENNAN, 1982; NG et al., 2000) e na regulação negativa da resposta imune inflamatória, o que permite que a persistência de *M. leprae* no organismo (SPENCER; BRENNAN, 2011).

O PGL-1 tem sido extremamente estudado desde a sua descoberta, inclusive contribuindo com grandes avanços em pesquisas na hanseníase (HUSSAIN et al., 1990; GOULART et al., 2008; BUHRER-SEKULA et al., 1998). A titulação dos anticorpos anti-PGL-I é diretamente proporcional à carga bacilar do doente, de modo que a soropositividade em pacientes com hanseníase em sua forma clínica MB é praticamente universal, ao contrário de pacientes PB, que geralmente são soronegativos (CHO et al., 2001; LOBATO et al., 2011; SPENCER; BRENNAN, 2011).

A avaliação sorológica também é de extrema importância nos pacientes com o diagnóstico de HNP, já que embora o padrão ouro para o diagnóstico desta forma clínica seja a avaliação histopatológica e a baciloscopia do nervo periférico, métodos não invasivos podem corroborar com este diagnóstico. No estudo de Jardim, Antunes e Simons (2005), foram avaliados 67 pacientes com diagnóstico de HNP, os quais 21% foram soropositivos ao teste ELISA anti-PGL1. Dentre os pacientes com baciloscopia positiva incluídos neste trabalho, 63% foram soropositivos. Na análise combinada com a avaliação molecular por meio de PCR, 16% dos casos com PCR de nervo periférico positiva e 23% dos

casos com PCR de nervo periférico negativa apresentaram soropositividade ao teste ELISA anti-PGL1.

Os testes sorológicos anti-PGL-I são capazes de detectar anticorpos não só entre os pacientes de hanseníase, já que muitos estudos relatam a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* em população sadia e em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (MENZEL et al., 1987; DESFORGENES et al., 1989; ILANGUMARAN et al., 1996; DOUGLAS et al., 2004; ARAUJO et al., 2012; 2016). Esta positividade indica que estas pessoas foram expostas ao bacilo, e que este conseguiu infectar uma célula fagocítica e posteriormente elicitar uma resposta imune humoral com produção de anticorpos pelos linfócitos B, caracterizando assim, em um indivíduo assintomático, uma infecção subclínica (LOBATO et al., 2011).

Por isso, os estes sorológicos como o ELISA anti-PGL1 tem sido utilizados em pesquisas de investigação populacional, os chamados *screenings*, e podem ser importantes ferramentas para auxiliar no diagnóstico precoce de novos casos, principalmente dos pacientes com hanseníase MB (GOULART et al., 2009; ARAUJO et al., 2012; 2016). A detecção de anticorpos específicos contra o PGL-I apresenta positividade de 13% a 25% no grupo dos contatos de pacientes com hanseníase, além de estudos já terem demonstrado uma associação entre a soropositividade anti-PGL-I em contatos e um risco maior de adoecer, reforçando a importância da utilização da sorologia ELISA anti-PGL-I como uma estratégia de monitoramento da doença (GOULART et al., 2008; MOURA et al., 2008, PENNA et al., 2016).

Ainda hoje, o maior desafio no desenvolvimento e aplicação de um teste sorológico para o diagnóstico específico da hanseníase é a identificação de antígenos que diferenciem entre a exposição e a doença; e naqueles indivíduos soropositivos, diferencie com alta sensibilidade e especificidade o estágio e a forma clínica da doença (LOBATO et al., 2011).

2.8.3- Detecção de *Mycobacterium leprae*

O *M.leprae* é um microrganismo do reino Monera, filo e classe Actinobacteria, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* composta pelo único gênero *Mycobacterium*. O *M. leprae* é visualizado em microscopia como um bacilo em forma de bastonete, reto ou levemente encurvado com extremidades arredondadas, apresentando aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. Possui divisão binária muito lenta, é Gram-positivo e um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).

A técnica de coloração de Ziehl-Neelsen para microscopia foi desenvolvida em 1882 por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen, e desde então tem sido amplamente utilizada na prática clínica. Nesta técnica, a fucsina confere ao bacilo uma coloração avermelhada em decorrência ao elevado teor de lipídeos estruturais na parede celular do bacilo (SHEPARD; MCRAE, 1968). Algumas modificações na técnica de Ziehl-Neelsen, como realização do procedimento a frio e o método Fite-Faraco foram posteriormente introduzidas, auxiliando na obtenção de uma melhor sensibilidade do método.

Na avaliação da baciloscopia, o resultado é negativo quando nenhum bacilo é encontrado em cem campos e é positivo quando se encontra pelo menos um bacilo é encontrado em cem campos examinados. Por isso, como na coloração de BAAR são necessários no mínimo 10.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável (SHEPARD; MCRAE, 1968), a sensibilidade deste método é baixa, principalmente em pacientes com hanseníase PB, na qual os bacilos são raros ou indetectáveis. Apesar da baixa sensibilidade, o exame de baciloscopia ainda é considerado o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial em hanseníase. (BRASIL, 2016).

Uma das grandes limitações no estudo da hanseníase sempre foi a incapacidade do cultivo de *M. leprae* em meio de cultura artificial, motivando novas pesquisas sobre o agente causador da hanseníase, sobretudo no final da

década de 80, quando alguns autores demonstraram a possibilidade do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) para detecção específica do DNA de *M. leprae* (HARTSKEERL; WIT; KLATSER, 1989; WOODS; COLE, 1989; WILLIAMS et al., 1990).

A PCR é uma técnica rápida, específica e sensível, que permite a amplificação e identificação do DNA de *M. leprae* em amostras contendo pequenas quantidades de bacilos, potencializando o uso de ferramentas moleculares laboratoriais não só na pesquisa, mas também para auxiliar no diagnóstico de hanseníase, na classificação dos pacientes e no monitoramento do tratamento com a PQT (GOULART et al., 2007). A PCR tornou-se uma técnica com múltiplas aplicações e passível de utilização em amostras coletadas das mais diversas fontes, abrindo assim novas possibilidades de investigação nos diversos aspectos da hanseníase. A partir da PCR foi possível o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, a identificação dos poucos genótipos do bacilo e da provável origem da infecção em humanos, assim como diversas outras descobertas que não seriam possíveis sem uma técnica mais precisa e menos trabalhosa do que a baciloscopia (TRUMAN, 2004).

O desenvolvimento da técnica de PCR em tempo-real quantitativa (qPCR) melhorou a sensibilidade e a especificidade na detecção do DNA de *M. leprae*. Um estudo particular que descreveu a técnica de qPCR para detecção do gene repetitivo RLEP do genoma de *M. leprae*, por meio da amplificação e hibridização de sonda específica, indicou o potencial de detecção de aproximadamente 10 bacilos em uma amostra, com quantificação da carga bacteriana pela interpolação com o número de moléculas de DNA de um controle padrão conhecido (TRUMAN et al., 2008).

Principalmente nas fases iniciais da doença, em virtude da dificuldade de encontrar-se bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), através de métodos histopatológicos, a PCR tem sido usada com sucesso na detecção de BAAR presentes em pequenas quantidades nos tecidos. A técnica de PCR torna possível

detectar com alta sensibilidade e especificidade o bacilo de Hansen, quantificar e determinar a viabilidade do bacilo em sítios específicos (através da detecção do seu DNA), dando valiosas informações a respeito da infecção e transmissão do *M. leprae* (DONOGHUE *et al.*, 2001; KURABACHEW; WONDIMU; RYON, 1997; PATROCÍNIO *et al.*, 2005; GOULART *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2016).

Estudos relatam o uso da PCR para determinar a presença do DNA de *Mycobacterium leprae* em swabs nasais de pacientes, contatos e população endêmica (PATROCÍNIO *et al.*, 2005, DE WIT *et al.*, 1993), que inclusive pode estar relacionada com a dispersão do bacilo em regiões endêmicas. Outros estudos inferem a existência de portadores sadios ou infecção subclínica com presença transitória de bacilos na secreção nasal (KLATSER *et al.*, 1993; RAMAPRASAD *et al.*, 1997, JOB *et al.*, 2008, ARAUJO *et al.*, 2016), indicando que o *M. leprae* é altamente infeccioso e que esses indivíduos podem exercer um papel ativo na transmissão para pessoas não protegidas.

A avaliação da PCR também pode contribuir com o diagnóstico definitivo da hanseníase em sua forma neural, principalmente nos casos com baciloscopia negativa e com achados histopatológicos inconclusivos na biópsia de nervo periférico. (MARTINEZ *et al.*, 2014).

No estudo de Jardim, Antunes e Simons (2005), no qual foram avaliados 67 pacientes com o diagnóstico confirmado de HNP, 37.3% apresentaram positividade na avaliação molecular por meio de PCR. O estudo de Cunha *et al.* (2006) avaliou 58 pacientes com o diagnóstico de HNP, encontrando 50% de positividade na análise molecular das amostras de biópsias de nervo periférico, especialmente em 36.8% dos casos em que a baciloscopia foi negativa.

2.8.4- Comprometimento neural e avaliação eletroneuromiográfica

Em relação ao acometimento dos nervos periféricos, podemos observá-lo em todas as formas clínicas da hanseníase, embora ocorra uma importante diferença em sua apresentação, gravidade e extensão do comprometimento, conforme a própria resposta imunológica do indivíduo. Deve-se ressaltar que estas alterações podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o tratamento específico da doença (BOKU; LOCKWOOD; BALAGON, 2010; LOCKWOOD; SAUNDERSON, 2012; GARBINO et al., 2011; NASCIMENTO, 2013).

As consequências relacionadas ao comprometimento neural periférico na hanseníase constituem a principal causa das sequelas e incapacidades decorrentes desta doença, conforme demonstrado na figura 11. Entretanto, ainda há muita dificuldade no reconhecimento do comprometimento neural pelos profissionais de saúde, pois para muitos a hanseníase continua sendo uma doença dermatológica, já que as manifestações cutâneas são mais conhecidas e mais facilmente reconhecidas na prática clínica (WILDER-SMITH; VAN BRAKEL, 2008; LOCKWOOD; SAUNDERSON, 2012; LUGAO, 2015).



Figura 11- Sequela e deformidades em paciente com diagnóstico de hanseníase neural primária. Paciente com sequela grave em membros superiores, onde se observa deformidades decorrentes de lesão do nervos ulnar, com mão em garra e a amiotrofia dos interósseos. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

A neuropatia hansênica pode decorrer como consequência de distintos mecanismos relacionados à interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro. O bacilo causa uma neuropatia periférica de origem sobretudo imunológica, que pode resultar em comprometimento motor, sensitivo e autonômico (VAN BRAKEL;

NICHOLLS; DAS, 2005). Histopatologicamente, há um comprometimento das fibras mielinizadas e amielínicas, geralmente seguido por substituição do tecido nervoso por tecido conjuntivo e fibrose (DE FREITAS, NASCIMENTO; QUAGLINO, 2003; NASCIMENTO, 2013). O comprometimento neural pode ser decorrente do efeito direto da infecção pelo *M. leprae*, como por exemplo dano aos neurofilamentos, alterações de células de Schwann e desmielinização por contato (RAMBUKKANA, 1997; 2001; 2002). Outro mecanismo sugere lesões consequentes ao processo inflamatório imunomediado, compreendendo a ação de anticorpos, citotoxicidade, ativação de linfócitos T citotóxicos e outros. Por fim, o comprometimento neural pode decorrer de edema e processos mecânicos, pois o acometimento de células de Schwann pode deixar as fibras neurais mais susceptíveis a efeitos compressivos e o edema de troncos nervosos pode inclusive levar a um comprometimento isquêmico.

Em relação ao comportamento da neuropatia hansênica nas diferentes formas clínicas, na forma T, o comprometimento dos nervos periféricos ocorre de forma mais restrita, geralmente com poucos nervos alterados, inicialmente restrita aos ramos intradérmicos, levando a hipostesia térmica e dolorosa nas fases iniciais do quadro em áreas circunscritas do corpo, em especial áreas de temperatura inferior ao da temperatura central do paciente. Porém, com a progressão da doença, a resposta inflamatória mediada por linfócitos T pode levar a lesão neural exuberante, acometendo nervos de maior calibre, como os nervos mistos (compostos de fibras sensitivas e motoras) subjacentes à lesão de pele e/ou dos ramos nervosos intradérmicos (SABIN, SWIFT; JACOBSON, 2005).

A hanseníase apresenta um padrão de distribuição muito peculiar, pois ao mesmo tempo em que se observa hipoestesia térmica-dolorosa em áreas circunscritas correspondentes às lesões de pele, ocorre o acometimento do tronco do nervo periférico de forma sobreposta, proporcionando hipoestesia e fraqueza em regiões inervadas por este nervo, mesmo distantes da lesão inicial (Figura 12). Nestes nervos, pode ocorrer uma intensa reação inflamatória local, inclusive com

presença de granulomas e necrose caseosa (SABIN, SWIFT; JACOBSON, 2005).



Figura 12- Padrão de comprometimento neural na hanseníase.

Paciente com diagnóstico de hanseníase forma clínica dimorfo-tuberculóide, com evidências de espessamento nos nervos sural e fibular superficial, associado a presença de lesão cutânea hiperemiada e anestésica em face lateral do pé (que se iniciou seis meses após o quadro neural). Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Na forma V, o acometimento dos nervos ocorre de forma mais difusa, com múltiplos nervos comprometidos pelo bacilo. Apesar da extensão do quadro, a resposta inflamatória do hospedeiro é fraca, preservando relativamente a arquitetura e função dos nervos mistos, até mesmo nas fases mais avançadas da doença. É muito comum a palpação de nervos espessados pela doença nesta forma clínica, mas com preservação funcional dos mesmos (SABIN, SWIFT; JACOBSON, 2005).

Entretanto, sobretudo em pacientes com o diagnóstico de HNP, não é possível uma classificação clínica precisa dos espectros imunológicos, sobretudo naqueles que cursam com uma mononeuropatia isolada. Existem relatos na literatura demonstrando casos em que os pacientes apesar de um único nervo alterado, apresentavam achados histopatológicos na biópsia de nervo periférico compatíveis com formas MB. Portanto, nem sempre a quantidade de nervos alterados pela doença é concordante com o padrão histopatológico encontrado (DE FREITAS et al., 2004; VITAL et al., 2013).

O comprometimento neural inclui tanto o comprometimento de troncos nervosos como de ramos cutâneos distais. Os sintomas sensitivos geralmente correspondem às queixas iniciais e são mais prevalentes. O comprometimento de fibras finas (sensibilidade térmica e dolorosa) é predominante nos estágios iniciais, enquanto o comprometimento de fibras grossas e motor ocorre tardiamente (NASCIMENTO, 2013; TOMASELLI, 2015; KUMAR et al., 2016).

Dentre as formas de apresentação clínica mais comumente citadas por alguns autores, podemos citar: mononeurite, mononeurite múltipla e polineuropatia (mononeuropatia confluyente) (NASCIMENTO, 2013). Em estudo recentemente publicado, Kumar et al. (2016) confirma este padrão ao avaliar 46 pacientes com o diagnóstico de neuropatia hansênica distribuídos em suas diferentes formas clínicas. Neste trabalho, 60.86% dos casos apresentaram mononeuropatia múltipla como forma de apresentação, seguido por mononeuropatia em 23.9% e polineuropatia em 15.2%. A literatura nacional também corrobora com a predominância do padrão de mononeuropatia múltipla como principal apresentação desta neuropatia (JARDIM et al., 2003; GARBINO et al., 2005; TOMASELLI, 2015; DOS SANTOS, 2016). O predomínio de achados compatíveis com uma mononeuropatia múltipla ocorre tanto nas formas PB como nas MB (ANDRADE, 2010).

A avaliação eletroneuromiográfica é muito importante na neuropatia hansênica, pois possibilita o reconhecimento da disfunção neural mesmo antes do aparecimento dos sintomas (VITAL et al., 2012; CHAURASIA, 2011). Estudos apontam que até 47% dos pacientes já apresentam algum comprometimento neural no momento do diagnóstico, 12% cursam com esta injúria após o início do tratamento e apenas 33% não apresentam indícios de comprometimento neural em nenhum momento da doença. (SAUDERSON et al., 2000)

Destaca-se que estes dados refletem sobretudo o atraso entre o início dos sintomas e o diagnóstico, que inclusive pode consistir em anos, nos quais a neuropatia hansênica evolui de forma lenta e progressiva, por vezes referida como

neuropatia silenciosa. (VAN BRAKEL; KHAWAS, 1994; VAN BRAKEL; NICHOLLS; DAS, 2005; VAN BRAKEL et al., 2008; KHAMBATI, 2009). O tempo de evolução da doença deve ser considerado na avaliação neurofisiológica destes pacientes, já que este fator influencia a forma de expressão e as manifestações clínicas desta neuropatia (TOMASELLI, 2015). Deve-se ressaltar que a maioria dos estudos disponíveis na literatura descreve o padrão eletroneuromiográfico em pacientes com uma evolução já prolongada desta neuropatia.

Ainda relação aos achados no exame de ENMG, há uma dificuldade em se estabelecer qual é o padrão neurofisiológico mais encontrado nesta neuropatia, principalmente pelos diferentes protocolos de avaliação eletroneuromiográfica descritos nos diferentes estudos. No estudo de Andrade (2010), foi realizado uma avaliação retrospectiva de 77 pacientes com diagnóstico confirmado de hanseníase, em diferentes formas clínicas, quanto aos dados epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. Neste trabalho, o padrão neurofisiológico mais encontrado foi de neuropatia sensitivo-motora assimétrica, com alentecimento focal de condução. Outros autores confirmaram o predomínio deste padrão neurofisiológico, inclusive em casos de HNP (TOMASELLI, 2015; DOS SANTOS, 2016).

As alterações assimétricas de latências distais, velocidades de condução ou amplitudes foram vistas em todos os trabalhos que realizaram uma avaliação neurofisiológica extensa e minuciosa de pacientes com neuropatia hansênica, mesmo naqueles com um comprometimento mais difuso dos nervos, sugerindo uma mononeuropatia múltipla confluyente, não se encontrando padrão de polineuropatia simétrica comprimento-dependente (DE FARIA, 1990; NASCIMENTO, 2013; TOMASELLI, 2014; ANDRADE, 2010).

Os nervos mais acometidos pela doença são os nervos fibulares superficiais, ulnares sensitivos, surais, ulnares motores e auriculares. No nervo ulnar motor, encontra-se redução da velocidade de condução no segmento do

cotovelo em mais de 50% dos casos, que associado a latências prolongadas e sinais de dispersão temporal, confirma um componente desmielinizante nesta neuropatia, que é predominantemente axonal para a maioria dos autores. (BATHALA et al., 2012; NASCIMENTO, 2013; TOMASELLI, 2014; ANDRADE, 2010; KUMAR et al., 2016)

O acometimento de troncos nervosos ocorre principalmente nos segmentos em que o nervo segue um trajeto mais superficial, com temperaturas mais baixas. Além disso, um dado de extrema importância nesta neuropatia é o comprometimento neural em áreas próximas a túneis osteofibrosos, como as regiões proximais ao túnel cubital (nervo ulnar) (Figura 13) e ao túnel do carpo (nervo mediano), que são particularmente propensas ao espessamento de nervos em pacientes com hanseníase (MARTINOLI et al, 2000).

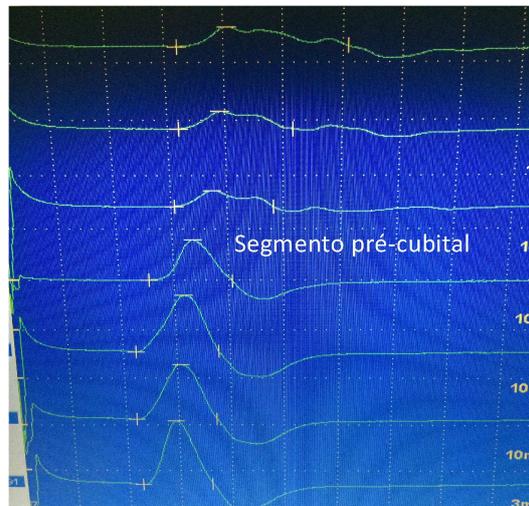


Figura 13 – Estudo da condução motora no nervo ulnar em paciente com diagnóstico de hanseníase. Paciente da forma clínica dimorfo-tuberculóide, apresentando comprometimento desmielinizante no segmento pré canal cubital, conforme demonstrado pela técnica inching. Imagens cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Além do comprometimento de troncos neurais classicamente descritos na neuropatia hanseníca, pode-se observar o acometimento de fibras neurais limitado a ramos distais intradérmicos, assim como referido anteriormente na forma HNP,

com conseqüente redução das sensibilidades térmica, dolorosa e tátil inclusive em áreas delimitadas da pele sem lesões cutâneas visíveis, assim como hipoestesia em regiões mais frias do corpo, como na região posterior do cotovelo e do antebraço, joelhos e lóbulos das orelhas. Este padrão pode inclusive corresponder a um dos sinais mais precoces na doença, por vezes acompanhado por uma redução de sudorese e pelos locais, sinalizando comprometimento de fibras finas autonômicas, nem sempre acompanhado pelo acometimento de troncos de nervos periféricos, justificando a normalidade do estudo eletroneuromiográfico em alguns pacientes (BRITON; LOCKWOOD, 2004; DOS SANTOS, 2010; TOMASELLI, 2015; DOS SANTOS, 2016).

O processo inflamatório local pode gerar um espessamento do nervo, que por vezes se tornam palpáveis e dolorosos. O espessamento neural pode ser encontrado de 40 a 75% dos casos. (NASCIMENTO, 2013). Entretanto, em alguns estudos indianos a prevalência desta alteração foi de até 94% (VAN BRAKEL; NICHOLLS; DAS, 2005). É importante ressaltar que as anormalidades eletroneuromiográficas podem ser encontradas tanto em nervos espessados como naqueles sem espessamento, assim como a presença de espessamento neural pode ser observada em nervos sem anormalidades eletroneuromiográficas, evidenciando uma dissociação clinico-neurofisiológica (VAN BRAKEL; NICHOLLS; DAS, 2005; KUMAR, 2016).

A realização da ENMG nos pacientes com diagnóstico de hanseníase é, portanto, essencial, pois possibilita não somente a estratificação da gravidade e padrão de comprometimento neural periférico, mas também a detecção de formas iniciais, contribuindo com o diagnóstico precoce. Muitos pacientes apresentam uma neuropatia subclínica, de modo que a avaliação eletroneuromiográfica, sobretudo com um estudo da condução sensitiva e motora detalhado é superior à avaliação quantitativa da sensibilidade térmica, vibratória, força muscular e, também, à avaliação sensitiva por meio de monofilamentos, conforme recomendado atualmante. Por isso, a presença de anormalidades no estudo de

condução sensitivo pode ocorrer em pacientes com hanseníase em uma fase muito precoce (VAN BRAKEL et al., 2008; KHAMBATI et al., 2009; BATHALA et al., 2012).

Lima et al. (2016) avaliou 166 pacientes com o diagnóstico de neuropatia hansênica, com objetivo de comparar os testes clínicos e a avaliação eletroneuromiográfica no diagnóstico desta condição. Neste estudo, 67.5% apresentaram espessamento neural à palpação, 95.8% hipoestesia/anestesia e 38.6% fraqueza muscular, enquanto na avaliação eletroneuromiográfica 77.1% apresentaram alguma alteração detectada pelo método. Em contrapartida, a concordância entre a avaliação clínica e a ENMG foi classificada como baixa a moderada, reforçando a necessidade de uma avaliação combinada.

Na avaliação eletroneuromiográfica de um paciente com hanseníase é fundamental o entendimento da fisiopatologia desta neuropatia, que além de um comprometimento sensitivo, pode apresentar um dano em fibras finas, não avaliadas por este exame complementar, de modo que é possível se observar a presença de alterações sensitivas em um território neural específico, com estudo da condução sensitiva normal, o que inclusive motiva a aplicação de outras técnicas neurofisiológicas na avaliação destes pacientes (RAO, 1993; MARQUES, 2003; LIMA et al., 2016).

Além disso, a avaliação eletroneuromiográfica pode ser útil quando se propõe um acompanhamento periódico, considerando por exemplo a sua contribuição no acompanhamento de estados reacionais. Garbino (2010) avaliou periodicamente durante seis meses o nervo ulnar de 28 pacientes em estados reacionais, encontrando alterações neurofisiológicas sugestivas de comprometimento tanto axonal quanto desmielinizante. De forma interessante, a presença de bloqueio de condução ocorreu sobretudo durante a reação tipo 2, enquanto no estado reacional tipo 1 foi mais observado a presença de dispersão temporal (Figura 14).

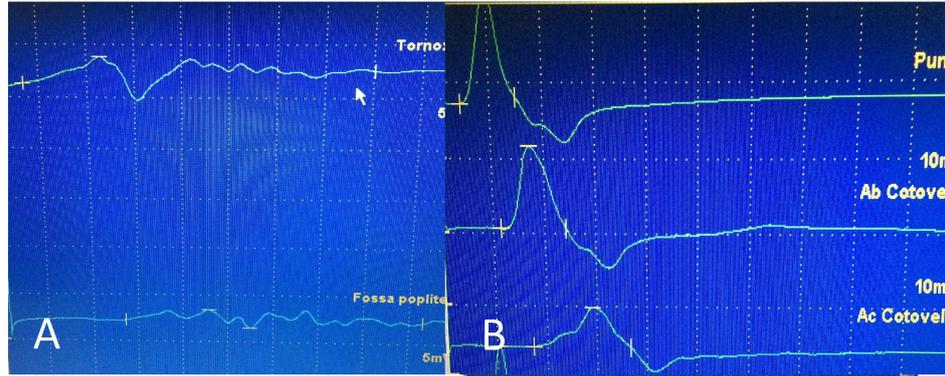


Figura 14 – Estudo da condução motora durante episódios reacionais.

Estudo da condução motora no nervo tibial (A) evidenciando sinais de dispersão temporal e no nervo ulnar (B) evidenciando a presença de bloqueio de condução no segmento do cotovelo, em pacientes com diagnóstico de hanseníase, durante episódios reacionais tipo 1 e 2 respectivamente. Imagens cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Em relação ao estudo neurofisiológico em contatos domiciliares assintomáticos de pacientes com o diagnóstico de hanseníase, existem poucos estudos na literatura sobre o tema. Alguns trabalhos avaliaram apenas a presença de anormalidades autonômicas neste grupo, inferindo a presença de uma neuropatia subclínica, o que poderia contribuir com o diagnóstico precoce, embora estudos prospectivos sejam necessários para corroborar estes achados (WILDER-SMITH, 1996; WILDER-SMITH, 1997; ABBOT, 1991).

No estudo de Furini-Bazan (2008) foram recrutados 321 contatos domiciliares de pacientes com diagnóstico de hanseníase, atendidos no período entre 2000-2007. Durante a seleção dos participantes, alguns na verdade já estavam doentes e apenas 38 foram submetidos à ENMG. Neste estudo, a maioria dos contatos com alteração eletroneuromiográfica eram contactantes de um caso índice MB. Entretanto, não houve relação entre a soropositividade ao teste ELISA anti-PGL1 e a presença de alterações na ENMG. Este estudo, embora tenha encontrado alterações eletroneuromiográficas em uma proporção considerável dos indivíduos, não avaliou contatos domiciliares que estavam em um protocolo de acompanhamento anual rigoroso, o que aumentou a prevalência de doentes e do comprometimento neural neste grupo.

2.9- Tratamento da Hanseníase

O MS do Brasil em cumprimento às recomendações da OMS regulamenta o tratamento ambulatorial da hanseníase através de esquemas terapêuticos padronizados de acordo com a classificação operacional do paciente. Os casos PB devem ser tratados com regime de 6 doses: rifampicina (600mg) com administração supervisionada mensal e dapsona (100mg mensal e dose diária autoadministrada de 100mg). Na sexta dose, os pacientes PB devem ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica, do grau de incapacidade física e receber alta por cura (BRASIL, 2016).

Os casos MB devem ser tratados com regime de 12 doses: rifampicina (600mg), dapsona (100mg) e clofazimina (300mg) com administração supervisionada mensal, e dose diária com dapsona (100mg) e clofazimina (50mg) autoadministrada. Na décima segunda dose, os pacientes MB devem ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica, do grau de incapacidade física e receber alta por cura.

Pacientes MB que não apresentarem melhora clínica ao final do tratamento devem ser encaminhados para avaliação nas unidades de maior complexidade para verificar a necessidade de um segundo ciclo de tratamento com 12 doses. Em crianças ou adultos com peso inferior a 30 kg deve-se ajustar a dose de acordo com o peso. Em casos de intolerância ou contraindicação esquemas terapêuticos substitutivos com a combinação de ofloxacina e/ou minociclina são recomendados (BRASIL, 2016).

Em relação ao tratamento da forma HNP, existem algumas dificuldades na classificação operacional destes doentes. Entretanto, desde 1998, a OMS propôs critérios clínicos que levam em consideração o número de nervos acometidos, classificando como PB aqueles que apresentam apenas um nervo e como MB aqueles que apresentam dois ou mais nervos alterados (BRASIL, 2016). Essa

classificação é questionável, pois é limitada, por não levar em consideração inúmeros fatores como, por exemplo, o tempo de evolução da doença e momento do diagnóstico, de modo que pode levar a um tratamento insuficiente.

2.10- Estratégia de Controle da Hanseníase por meio da avaliação de contatos domiciliares

Embora a poliquimioterapia tenha reduzido a infectividade dos pacientes, ela parece não ter efeito sobre o aparecimento de novos casos. Especula-se que este efeito seja devido ao diagnóstico tardio ou ainda pela incapacidade, pelos métodos atuais, de detecção de infecção subclínica entre os comunicantes de pacientes com hanseníase (GOULART; GOULART, 2008).

A vigilância de contatos tem por finalidade a descoberta de casos novos entre aqueles que convivem ou conviveram, de forma prolongada com o caso novo de hanseníase diagnosticado (caso índice). Além disso, visa também descobrir suas possíveis fontes de infecção no domicílio (familiar) ou fora dele (social), independentemente de qual seja a classificação operacional do doente (BRASIL, 2016).

Considera-se contato domiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase. Contato social é qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido em relações familiares ou não, de forma próxima e prolongada. Os contatos sociais, que incluem vizinhos, colegas de trabalhos e de escola, entre outros, devem ser investigados de acordo com o grau e tipo de convivência, ou seja, aqueles que tiveram contato muito próximo e prolongado com o paciente não tratado. Atenção especial deve ser dada aos contatos familiares do paciente (pais, irmãos, avós, tios etc.) (BRASIL, 2016).

Estima-se que os contatos domiciliares de pacientes MB têm um risco relativo de desenvolvimento de hanseníase 5 a 10 vezes maior do que o da

população em geral. A magnitude deste risco está relacionada à carga bacteriana do caso índice, sendo até duas vezes maior nos contatos de pacientes MB quando comparados aos PB (MOET, 2004; DOUGLAS et al. 2004; PENNA et al., 2016).

A investigação epidemiológica de contatos consiste em uma anamnese dirigida aos sinais e sintomas da hanseníase, exame dermatoneurológico de todos os contatos dos casos novos e vacinação com BCG para os contatos sem presença de sinais e sintomas de hanseníase no momento da avaliação, não importando se são contatos de casos PB ou MB. A aplicação da vacina BCG depende da história vacinal e/ou da presença de cicatriz vacinal, de forma que os contatos com ausência ou apenas uma cicatriz, devem receber uma nova dose da BCG (BRASIL, 2016).

A vacinação com BCG tem sido usada como estratégia de prevenção contra a hanseníase desde 1960 (YANAGISAWA, 1960). Desde então, alguns trabalhos tem corroborado com este efeito protetor, com uma redução de até 95% do risco de adoecimento nos contatos com duas ou mais cicatrizes vacinais (MULIYIL; NELSON; DIAMOND, 1991; CONVIT et al. 1992, 1993; SETIA et al. 2006; ARAUJO, 2015).

Um dos indicadores propostos pelo Ministério da Saúde no acompanhamento dos serviços de hanseníase é a proporção de contatos de casos novos examinados, pois mede a capacidade dos centros em realizar a vigilância epidemiológica de contatos domiciliares, aumentando a detecção oportuna de casos novos. Idealmente, a proporção de contatos examinados deve ser maior que 90% (BRASIL, 2016).

Devido às relações complexas entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais, a maioria dos contatos não serão infectados nem irão desenvolver a hanseníase (GOULART; GOULART, 2009). No entanto, eles podem disseminar o *M. leprae* para indivíduos susceptíveis, sendo este um modo plausível de transmissão da doença. Estudos na literatura demonstraram que a soropositividade no ELISA anti-PGL-I é um fator de risco elevado para o

desenvolvimento de doença em contatos assintomáticos, principalmente diante de um caso índice MB. A soropositividade do teste anti-PGL-I indica que bacilos entraram com êxito no sistema circulatório, o que pode indicar uma infecção subclínica, além de representar um risco relativo de quase seis vezes maior para o aparecimento da doença. Entretanto, o número de pacientes soropositivos não indica a verdadeira prevalência de contatos infectados, já que os pacientes PB raramente produzem anticorpos específicos, de modo que o número de contatos infectados pode ser subestimado (DOUGLAS et al., 2004; GOULART et al., 2008; GOULART; GOULART, 2008; PENNA et al., 2016).

A existência de portadores assintomáticos e infectados subclínicos tem sido observada após a realização destes estudos sorológicos e moleculares em nosso serviço, embora o papel desses indivíduos e as condutas neste grupo não estejam bem definidas. Sabe-se que este grupo é constituído por pessoas infectadas, porém sem nenhum sintoma clínico muito evidente, apesar da presença do bacilo na pele e/ou na mucosa nasal, o que os leva inclusive a ser uma fonte de disseminação da doença. Além disso, esses indivíduos podem apresentar alterações neurológicas periféricas, ainda não indentificadas pelo exame físico, considerando-se a idéia de que a hanseníase é uma doença primariamente neural.

A investigação da transmissão e infectividade do *M. leprae* por meio das ferramentas moleculares e imunológicas, assim como a documentação de comprometimento neural subclínico neste grupo é fundamental, pois tornará possível discutir a quimioprofilaxia ou mesmo o tratamento precoce, como estratégia complementar ao controle da hanseníase (GOULART; GOULART, 2008).

3- Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar os aspectos clínicos, moleculares, sorológicos e neurofisiológicos no diagnóstico precoce da neuropatia hansênica, em pacientes com suspeita de hanseníase neural primária e em contatos domiciliares com infecção subclínica.

3.2 - Objetivos Específicos

3.2.1- Estudo 1

- Descrever os sinais e sintomas encontrados no diagnóstico da HNP.
- Determinar os nervos mais comprometidos na HNP.
- Caracterizar as síndromes clínicas periféricas encontradas na HNP: mononeuropatia, mononeuropatia múltipla, polineuropatia.
- Caracterizar o padrão eletroneuromiográfico mais frequentemente encontrado na HNP.
- Descrever a positividade dos métodos complementares diagnósticos em pacientes com HNP.
- Correlacionar o padrão clínico (mononeuropatia x mononeuropatia múltipla) com o perfil clínico e outros exames complementares.
- Correlacionar o padrão sorológico (soropositivos x soronegativos) com o perfil clínico e outros exames complementares.

3.2.2- Estudo 2

- Descrever o perfil epidemiológico dos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase com infecção subclínica.
- Descrever os sinais e sintomas encontrados no diagnóstico precoce da neuropatia hansênica.
- Descrever a incidência de alterações eletroneuromiográficas em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.
- Determinar os nervos mais acometidos nos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase com sorologia e/ou exames moleculares positivos.
- Caracterizar as síndromes clínicas periféricas encontradas neste grupo de contatos: mononeuropatia, mononeuropatia múltipla, polineuropatia.
- Estabelecer o padrão neurofisiológico mais frequente encontrado nos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.
- Correlacionar os achados eletroneuromiográficos com outros exames complementares relacionados à doença, identificando fatores de risco para o comprometimento neural periférico (baciloscopia e qPCR de raspado intradérmico, ELISA anti-PGL1, qPCR de sangue periférico, qPCR de biópsia de pele, presença de cicatriz vacinal pelo BCG).

4- Material e Métodos

O projeto foi realizado por meio de uma avaliação de casos suspeitos de hanseníase neural primária e de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase acompanhados regularmente no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Faculdade de Medicina, da Universidade de Uberlândia (UFU).

Mais informações sobre a metodologia utilizada, sobretudo referentes à casuística, critérios de seleção dos pacientes e dos contatos domiciliares, critérios de inclusão e de não inclusão, instrumentos de avaliação clínica e análise estatística utilizada em cada trabalho, estão descritos separadamente em cada um dos estudos apresentados.

Serão descritos detalhadamente a seguir apenas os métodos clínicos, neurofisiológicos, sorológicos e moleculares que foram utilizados de forma rotineira em ambos os estudos.

4.1- Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (CAEE 48293215.7.0000.5152) (Anexo A). Os contatos e pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento esclarecido (Apêndice A) e foram submetidos aos protocolos de avaliação clínica já realizados de rotina no serviço (Apêndices B e C).

Todos os pacientes submetidos à biópsia de nervo periférico e que, portanto, concordaram com a realização do procedimento, também assinaram um termo de consentimento específico (Apêndice D).

4.2- Eletroneuromiografia

Os estudos eletroneuromiográficos foram realizados no aparelho MEB 4200K (NIHON-KODHEN). As técnicas e configurações do exame foram as já padronizadas pelo serviço. Os estímulos foram realizados por pulsos retangulares com duração de 0,1 ms e a intensidade do estímulo foi aquela suficiente para obtenção da resposta supra-máxima, chegando até 1 ms de acordo com o grau da excitabilidade do nervo avaliado. As amplitudes dos potenciais de ação sensitivos (PAS) foram medidas do pico da deflexão positiva inicial até o pico da deflexão negativa, enquanto as amplitudes dos potenciais de ação musculares compostos (PAMC) foram medidas da linha de base até o pico negativo. As latências dos PAS foram obtidas do artefato de estímulo até o primeiro pico de deflexão positiva ou início da deflexão negativa, enquanto as latências dos PAMC foram medidas do artefato de estímulo ao início da deflexão negativa (Figura 15). Os filtros de frequência utilizados foram de 10 a 10.000Hz para a condução sensitiva e de 2 a 10.000Hz para a condução motora.

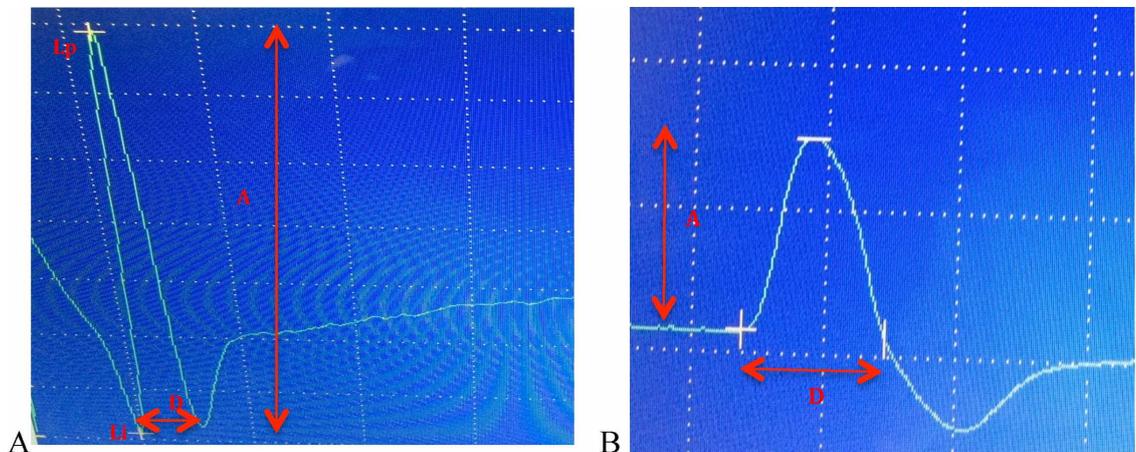


Figura 15 – Potencial de ação sensitivo e potencial de ação muscular composto. A- Representação do potencial de ação sensitivo (PAS), em que se observa um potencial geralmente bifásico ou trifásico. A latência de início (L_i) é avaliada a partir do estímulo para a deflexão inicial negativa para PAS bifásicos ou ao pico positivo inicial para um PAS trifásico. A amplitude (A) é medida da linha de base ao pico negativo ou pico a pico. B- Representação do potencial de ação muscular composto (PAMC), no qual observamos um potencial bifásico, com uma deflexão negativa inicial. A latência é o tempo desde o estímulo até a deflexão negativa inicial. A amplitude (A) é medida da linha de base ao pico negativo.

O estudo da condução sensitiva avaliou os nervos mediano, ulnar, cutâneo dorsal da mão, radial, cutâneo medial do antebraço, cuâncl lateral do antebraço,

sural, safeno, fibular superficial e plantar medial bilateralmente. Foram utilizados como estimulador eletrodos de garfo e de anel. O catodo foi sempre posicionado mais proximalmente do eletrodo de registro ativo do que o anodo. A captação dos PAS foi feita com eletrodos de agulha subdérmicos (com exceção de crianças, em que o registro foi feito com eletrodo de superfície), com o eletrodo ativo sendo posicionado próximo ao nervo e o de referência a uma distância de 3 cm, com uma montagem bipolar. As respostas sensitivas obtidas foram promediadas para se obter um sinal mais nítido, principalmente quanto ao ponto de início do potencial.

O estudo da condução motora avaliou os nervos mediano, ulnar, fibular comum e tibial bilateralmente. A avaliação do nervo radial foi realizada apenas em alguns pacientes com suspeita clínica de hanseníase neural primária, de acordo com as queixas do paciente e outras alterações encontradas no estudo de condução sensitiva e motora. A captação dos PAMC foi obtida com eletrodos de superfície, sendo colocado o eletrodo ativo sobre o ventre do músculo estudado e o de referência na superfície óssea mais próxima, 3 cm distalmente ao eletrodo ativo.

Tanto no estudo da condução sensitiva, quanto no estudo da condução motora não foram estabelecidas distâncias fixas para a estimulação e, portanto, não foram avaliadas as medidas absolutas das latências distais.

As ondas F foram obtidas distalmente com estímulo supramáximo e o catodo proximal ao anodo, com obtenção de 10 ondas e registrando-se as latências mínimas e médias.

A avaliação eletromiográfica foi feita com eletrodo de agulha monopolar de acordo com os achados no estudo da condução sensitiva e motora. Especificamente nos contatos domiciliares com estudo da condução sensitiva e motora normal, foi avaliado apenas um músculo de cada miótomo correspondentes aos segmentos cervicais e lombossacros.

Abaixo, encontra-se uma descrição da técnica empregada em cada um

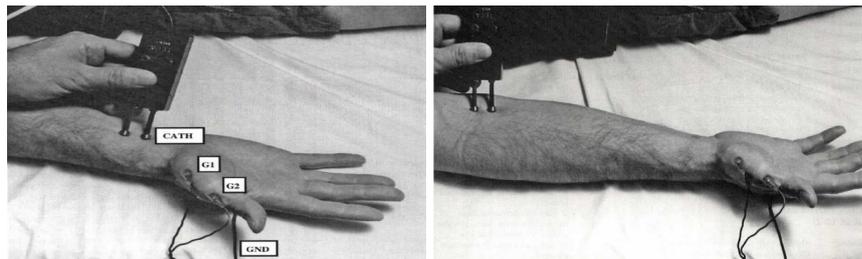
desses nervos (PRESTON; SHAPIRO, 2005):

A.1 Nervo mediano sensitivo

- a. Registro obtido no punho.
- b. Estímulo: 2º e 3º dedo.
- c. Valores normativos: Amp: $\geq 10,0 \mu\text{V}$, VC: $\geq 50,0 \text{ m/s}$.

A.2 Nervo mediano motor (Figura 16)

- a. Registro: eletrodo ativo no músculo abductor curto do polegar e o de referência na base do primeiro metacarpo.
- b. Estimulação: punho, fossa antecubital e axila (ponto de Erb apenas em casos selecionados).
- c. Valores normais (VN): Amplitude (Amp) $\geq 4,0 \text{ mV}$, velocidade de condução (VC): $\geq 50,0 \text{ m/s}$.



Fonte: PRESTON; SHAPIRO, 2005.

Figura 16 - Estudo da condução motora no nervo mediano com estímulo no punho e cotovelo. G1 = eletrodo ativo (músculo abductor curto do polegar). G2 = eletrodo referência.

A.3 Nervo mediano – onda F

- a. Registro: semelhante ao item A.2.
- b. Estimulação no punho.
- c. VN: Lat $\leq 31 \text{ mseg}$.

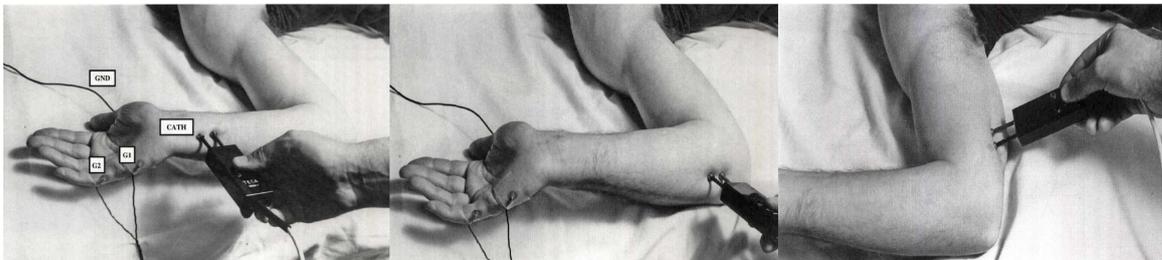
B.1. Nervo ulnar sensitivo

- a. Registro no punho.

- b. Estimulação no dedo V.
- c. VN: Amp: $\geq 10,0\mu\text{V}$, VC: $\geq 50,0$ m/s.

B.2 Nervo ulnar motor (Figura 17)

- a. Registro: com o eletrodo ativo no músculo abdutor do dedo mínimo, e o de referência na base do quinto metacarpo.
- b. Estimulação: punho, abaixo e acima do epicôndilo medial (segmento do cotovelo), axila (ponto de Erb apenas em casos selecionados).
- c. VN: Amp: $\geq 6,0$ mV, VC: $\geq 50,0$ m/s. Diferença entre o segmento Antebraço-Cotovelo: ≤ 10 m/s.



Fonte: PRESTON; SHAPIRO, 2005.

Figura 17 - Estudo da condução motora no nervo ulnar com estímulo no punho, abaixo e acima do cotovelo. G1 = eletrodo ativo (músculo abdutor do dedo mínimo). G2 = eletrodo referência.

B.3. Nervo ulnar – onda F

- a. Registro: semelhante ao ítem B.2.
- b. Estimulação no punho;
- c. VN: Lat $\leq 32,0$ msec.

C.1. Nervo radial sensitivo

- a. Registro na tabaqueira anatômica.
- b. Estimulação na face lateral do 1/3 distal do antebraço.
- c. VN: Amp: $\geq 15,0 \mu\text{V}$, VC: $\geq 50,0$ m/s.

D.1. Nervo cutâneo lateral do antebraço

- a. Registro na face lateral do antebraço.
- b. Estimulação no cotovelo (lateral ao tendão do músculo bíceps braquial).
- c. VN: Amp: $\geq 10 \mu\text{V}$, VC: $\geq 50,0 \text{ m/s}$.

E.1. Nervo cutâneo medial do antebraço

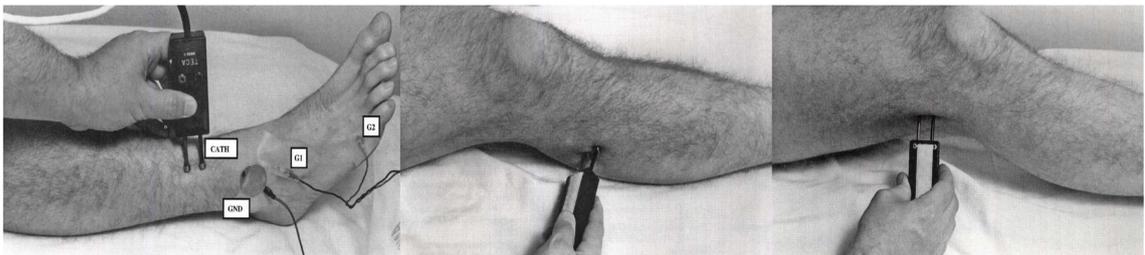
- a. Registro na face medial do antebraço.
- b. Estimulação no cotovelo (próximo ao epicôndilo medial).
- c. VN: Amp: $\geq 5 \mu\text{V}$, VC: $\geq 50,0 \text{ m/s}$.

F.1. Nervo fibular superficial

- a. Registro no tornozelo anterior.
- b. Estimulação no 1/3 distal da perna.
- c. VN: Amp: $\geq 6 \mu\text{V}$, VC: $\geq 40 \text{ m/s}$.

F.2. Nervo fibular (Figura 18)

- a. Registro: com o eletrodo ativo no músculo extensor curto dos dedos e o de referência na base do 5º pododáctilo.
- b. Estimulação no 1/3 distal da perna, abaixo e acima da cabeça da fíbula.
- c. VN: Amp: $\geq 2,0 \text{ mV}$, VC: $\geq 40 \text{ m/s}$. Diferença entre o segmento Perna/Abaixo da cabeça da fíbula-Acima da cabeça da fíbula: $\leq 10 \text{ m/s}$.



Fonte: PRESTON; SHAPIRO, 2005.

Figura 18 - Estudo da condução motora no nervo fibular comum, com estímulo no tornozelo, abaixo e acima da cabeça da fíbula. G1 = eletrodo ativo (músculo extensor curto dos dedos). G2 = eletrodo referência.

F.3. Nervo fibular – onda F

- a. Registro: idem ao ítem F.2.
- b. Estimulação no 1/3 distal da perna (tornozelo anterior).
- c. VN: Lat \leq 56 ms.

G.1. Nervo sural

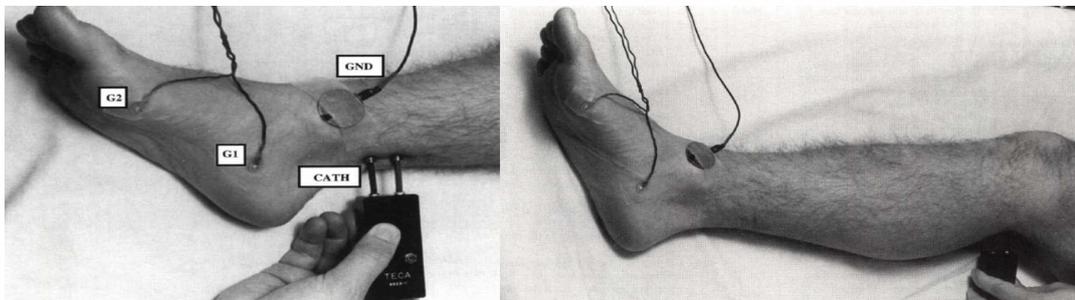
- a. Registro no tornozelo, adjacente ao maléolo lateral.
- b. Estimulação na panturrilha.
- c. VN: Amp: \geq 6,0 μ V, VC: \geq 40 m/s.

H.1. Nervo plantar medial

- a. Registro no tornozelo, adjacente ao maléolo medial.
- b. Estimulação na planta dos pés.
- c. VN: Amp: \geq 2,0 μ V, VC: \geq 40 m/s.

H.2. Tibial (Figura 19)

- a. Registro: eletrodo ativo no músculo abductor do hálux e o de referência na base do hálux.
- b. Estimulação no tornozelo, adjacente ao maléolo medial e fossa poplítea.
- c. VN: Amp: \geq 4,0 mV, VC: \geq 40 m/s.



Fonte: PRESTON; SHAPIRO, 2005.

Figura 19 - Estudo da condução motora no nervo tibial com estímulo no tornozelo e fossa poplítea. G1 = eletrodo ativo (músculo abductor do hálux). G2 = eletrodo referência.

H.3. Tibial – onda F

- a. Registro: idem ao ítem H.2.

- b. Estimulação no tornozelo.
- c. VN: Lat: ≤ 56 ms.

I.1. Nervo safeno

- a. Registro no tornozelo, adjacente ao maléolo medial.
- b. Estimulação no 1/3 distal da perna (face medial).
- c. VN: Amp: $\geq 4,0$ μ V, VC: ≥ 40 m/s.

4.3- Sorologia ELISA anti PGL-I

Para detecção de anticorpos IgM no soro, foi realizado ensaio de ligação imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) contra a molécula PGL-I nativa purificada da parede celular do *Mycobacterium leprae*, doado pelo Dr. John Spencer (Colorado State University, USA), conforme metodologia previamente descrita (LOBATO *et al.*, 2011). Resumidamente, 50 μ l de PGL-I 10 μ g/ml diluído em álcool etílico absoluto será adicionado a cada poço de uma placa de 96-poços (Maxisorp®, Nunc). Após incubação em temperatura ambiente, 300 μ l de BSA-PBS 1% será adicionado a cada poço e a placa incubada a 37°C/ 1h. Os poços serão lavados duas vezes com PBS e 50 μ l de amostras de soro diluídas 1:100 em 1% BSA-PBS serão adicionados, e a placa incubada a 37°C/ 1h. Então os poços serão lavados seis vezes com PBS, incubados com 50 μ l do conjugado de anti-IgM humana e peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), diluído 1:10.000 em 1% BSA-PBS à 37°C/ 1h, e lavado seis vezes com PBS. Após, será adicionado 50 μ l do substrato enzimático dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e a placa incubada no escuro em temperatura ambiente até a coloração. A reação é interrompida com 25 μ l de ácido sulfúrico 4N e mensurada com um espectrofotômetro à 492nm. Cada amostra foi testada em duplicata. Os resultados do ELISA foram analisados com base no índice ELISA, um procedimento utilizado quando o anticorpo alvo não

está presente em todas as amostras e os valores negativos são utilizados para normalizar as informações de diferentes ensaios e reduzir variações entre os testes. O cálculo do valor do ponto de corte foi realizado adicionando quatro desvios padrões (3 DP) na média da densidade ótica (DO), de três amostras em branco (sem amostra) e três amostras de controles negativos por placa, que foi definida para cobrir um intervalo de confiança de 99.99%. As amostras controle negativas foram estabelecidas previamente com indivíduos sem história de hanseníase, com PCR negativa (em sangue, esfregaço dérmico, swab nasal e bucal) e com soro negativo para anticorpos anti PGL-I. Dois controles positivos também foram utilizados em cada placa para verificação após a normatização dos dados. A titulação dos anticorpos foi expressa como índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula $IE = DO_{amostra}/DO_{ponto\ de\ corte}$. Valores acima de 1,0 foram considerados positivos.

4.4- Extração de DNA

Para a extração do DNA de amostras de esfregaço dérmico e biópsia (nervo e pele), as mesmas são incubadas com SDS 10% (*sodium dodecyl sulfate*) 37°C/ 1h, e posteriormente a 65°C/ 5h em uma solução de Proteinase K (10 mg/ml). Após, são adicionadas 1/3 V(µl) de NaCl saturado (6 M), agitando manualmente com vigor. Centrifugação por 15 minuto a 10.000 rpm. O sobrenadante é transferido para um novo tubo e adicionado 600 µl de etanol absoluto. Os tubos são agitados e centrifugados por 15 minuto a 10.000 rpm. O etanol absoluto é descartado e adicionado 600 µl de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o pellet. Os tubos são centrifugados por 5 minuto a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Repete-se a lavagem com etanol 70% mais uma vez.

Para a extração de DNA de amostras de sangue, o tubo de sangue é homogeneizado, e 500 µl transferido para um novo tubo contendo 500 µl fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1), e 500 µl de Tris-HCl (1M), colocado em

repouso por 10 min. e centrifugado (10.000 rpm a 4°C) por 20 min. Após, a fase aquosa (até 600µl) é coletada e depositada em um tubo limpo estéril. Para a precipitação do DNA, 500µl de álcool etílico absoluto é adicionado, homogeneizado por inversão e os tubos centrifugados (10.000 rpm a 4°C) por 15 min. Os sedimentos são lavados com álcool etílico 75% por centrifugação (10.000 rpm a 4°C) por 5 minutos, após desprezar o sobrenadante, os tubos permanem abertos por 30min para evaporação do etanol residual.

O DNA de sangue e biópsia de pele e nervo são dissolvidos em 50µl e o de esfregaço em 30µl de TE (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM) e estocados a -20 °C até a hora do uso.

Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (*Real Time PCR*)

Para a detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de sangue, esfregaço e biópsia (pele e nervo), um par de iniciadores na concentração de 10 µM cada; (*forward*: 5'-GCAGTATCGTGTAGTGAACAGTGCA-3' e *reverse*: 5'-CGCTAGAAGGTTGCCGTATGTGC-3'), e 5 µM de sonda taqman® VIC-TCGATGATCCGGCCGTCGGCG-TAMRA, tendo como alvo a região RLEP3 (X17153) do genoma do *M. leprae*, utilizado para amplificar um fragmento de 70 pb, utilizando condições previamente descritas (TRUMAN *et al.*, 2008).

As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. O resultado foi analisado utilizando o programa 7300 System SDS Software vs. 1.4.

Análise Quantitativa (qPCR)

Para realizar a análise quantitativa (qPCR), foi utilizada curva padrão com pelo menos 4 pontos de diluições seriadas do produto de PCR de sequência com 819 pb da região RLEP3 de *Mycobacterium leprae*.

O *software* SDS 7300 (*Applied Biosystems*) fornece o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R^2 , o *slope* (inclinação da curva) e o *y-intercept*. O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de *Ct* das amostras padrão (um valor de 1 indica uma juste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência), e o *y-intercept* indica o valor esperado de *Ct* para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se o *slope* pode se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

Para o cálculo de cópias de DNA e número de bacilos foram realizados os seguintes cálculos:

Sangue: Na reação utilizou-se aproximadamente 200 ng (2 μL) do DNA extraído, de um volume total de 50 μL , por isso:

Quantificação média (fornecida pelo *software*) da triplicata x 25 = **CÓPIAS DE DNA**

Uma única bactéria possui 19 cópias de RLEP3, por isso:

Cópias de DNA = **BACILOS**

19

Esfregaço: Na reação utilizou-se aproximadamente 200 ng (2 μL) do DNA extraído, de um volume total de 30 μL , por isso:

Quantificação média (fornecida pelo *software*) da triplicata x 15 = **CÓPIAS DE DNA**

Uma única bactéria possui 19 cópias de RLEP3, por isso:

Cópias de DNA = **BACILOS**

19

Biópsia (Nervo e Pele): Na reação utilizou-se aproximadamente 200 ng (2 μL) do DNA extraído, de um volume total de 50 μL , por isso:

Quantificação média (fornecida pelo *software*) da triplicata x 25 = CÓPIAS DE DNA/g

Peso biópsia

Uma única bactéria possui 19 cópias de RLEP3, por isso:

Cópias de DNA/g = BACILOS

19

4.5- Baciloscopia e Coleta de esfregaço dérmico.

Uma alíquota de cada esfregaço dérmico dos seis sítios (lóbulos das duas orelhas, os dois cotovelos e os dois joelhos), coletada para exame baciloscópico, foi depositada em um único tubo estéril contendo 800 µl de tampão de lise nuclear (TLN – NaCl 400mM, EDTA, pH 8,0 50 mM e Tris-Cl pH 8,0 25 mM).

O índice bacteriano foi realizado em esfregaços cutâneos de no mínimo seis sítios cutâneos: os lóbulos das duas orelhas, os dois cotovelos e os dois joelhos. A coloração usada para o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), foi de Fite-Faraco. O resultado foi registrado de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (1990), baseada no número de bacilos vistos em um campo microscópico médio, utilizando-se objetiva de imersão como descrito abaixo:

IB = 0 – nenhum bacilo em 100 campos de imersão

IB = 1 – 1 a 10 bacilos, em média em 100 campos

IB = 2 – 1 a 10 bacilos, em média em 10 campos

IB = 3 – 1 a 10 bacilos, em 1 campo médio

IB = 4 – 10 a 100 bacilos, em 1 campo médio

IB = 5 – 100 a 1.000 bacilos, em um campo médio

IB = 6 – acima de 1.000 bacilos, em um campo médio

4.6- **Biópsia de pele:**

Considerando a ausência de lesões cutâneas tanto nos contatos domiciliares assintomáticos, como nos casos suspeitos de hanseníase neural primária, foi estabelecido a realização de uma biópsia de pele em região próxima ao cotovelo, por se tratar de uma área fria e com possível comprometimento intradérmico.

O procedimento inicia-se com anti-sepsia da região com álcool iodado, seguida de anestesia local subcutânea de lidocaína a 2%. Incisa-se, em cunha, com bisturi, obedecendo as linhas de tensão da pele, retirando um fragmento de aproximadamente 1 cm na sua maior extensão e atingindo a hipoderme. Faz-se a sutura com mononylon 2-0 pontos separados e curativo.

Uma parte da amostra de pele é acondicionada em papel alumínio esterilizado e mergulhada em seguida em nitrogênio líquido para ser encaminhada ao Laboratório de Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/Hanseníase (CREDSH), Hospital de Clínicas de Uberlândia, UFU/SUS-MG. A outra parte é enviada ao Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas - UFU, em frasco com formol tamponado a 10%, para avaliação histopatológica. A coloração usada para a pesquisa do *Mycobacterium leprae* foi de Fite-Faraco.

4.7- **Biópsia de nervo periférico**

Para biópsia de nervo, o paciente foi submetido a anestesia local da área a ser biopsiada. Os nervos periféricos biopsiados foram selecionados de acordo com a clínica do paciente, sendo escolhidos nervos que apresentem alteração da sensibilidade e/ou espessamento e alterações eletrofisiológicas tais como ausência de resposta uni/bilateralmente, redução das medidas das amplitudes dos PAS uni/bilateralmente (considerando os valores de referência) e redução relativa das medidas das amplitudes dos PAS (queda de 50% em comparação ao lado

contralateral). Durante a biópsia, o nervo foi fasciculado e completamente transeccionado (Figura 20 e 21).

Foram selecionados ramos puramente sensitivos, buscando o mínimo prejuízo para o paciente, o qual foi alertado sobre isto e também para o fato de que não haveria prejuízo de qualquer função motora, em decorrência da biópsia. Todos os pacientes submetidos à biópsia de nervo periférico assinaram um termo de consentimento específico ao procedimento (Apêndice D).

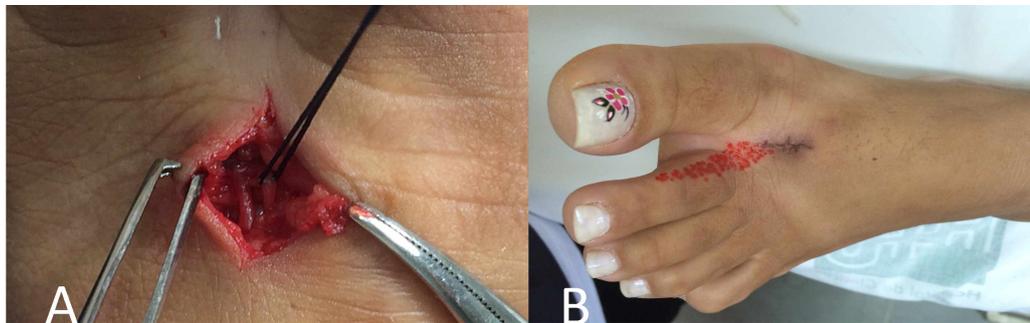


Figura 20 - Biópsia de nervo periférico (fibular profundo).

Contato domiciliar assintomático com estudo de condução evidenciando comprometimento das fibras sensitivo motoras do nervo fibular profundo no segmento do tornozelo anterior, de natureza desmielinizante, mas com sinais de perda axonal secundária. A – Biópsia do nervo fibular profundo. B- Região hipoestésica correspondente ao território do nervo biopsiado. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

Durante a biópsia de nervo, foi realizada ainda uma biópsia cutânea suprajacente, em região correspondente ao território do nervo biopsiado.

Uma parte de cada amostra de pele de nervo foi acondicionada em papel alumínio esterilizado e mergulhada em seguida em nitrogênio líquido para ser encaminhada ao Laboratório de Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/Hanseníase (CREDSH), Hospital de Clínicas de Uberlândia, UFU/SUS-MG. A outra parte é enviada ao Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas - UFU, em frasco com formol tamponado a 10%, para avaliação histopatológica. A coloração usada para a pesquisa do *M. leprae* foi de Fite-Faraco. Não foi realizada a análise por meio de cortes semifinos.



Figura 21 - Biópsia de nervo periférico (cutâneo dorsal da mão).

Biópsia de nervo periférico de paciente com diagnóstico de hanseníase neural primária cujo estudo de condução evidenciou comprometimento das fibras sensitivo motoras do nervo ulnar no segmento do cotovelo, de natureza desmielinizante, mas com sinais de perda axonal secundária. Biópsia do nervo ulnar sensitivo – ramo cutâneo dorsal da mão. Imagens autorizadas pelos pacientes e cedidas pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH-UFU).

5- Resultados

Estudo 1

Revisiting Primary Neural Leprosy: clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects.

Artigo submetido à revista Plos Neglected

Fator de impacto: 4.45

**Revisiting Primary Neural Leprosy: clinical, serological,
molecular, and neurophysiological aspects.**

Diogo Fernandes dos Santos^{1,3}, Matheus Rocha Mendonça¹, Douglas Eulálio Antunes^{1,3}, Elaine Fávaro Pípi Sabino^{1,3}, Raquel Campos Pereira¹, Luiz Ricardo Goulart^{1,2,3} Isabela Maria Bernardes Goulart^{1,3} *

¹ National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy, Clinics' Hospital, School of Medicine, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG. Brazil.

² Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG. Brazil.

³ Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG. Brazil.

*Corresponding Author: imbgoulart@gmail.com (IMBG)

The authors have equally contributed to this work.

Abstract

Background: Leprosy neuropathy is considered the most common peripheral neuropathy of infectious etiology worldwide, representing a public health problem. Clinical diagnosis of primary neural leprosy is challenging, since no skin lesions are found and the intradermal smear bacilloscopy is negative. However, there are still controversial concepts regarding the primary-neural versus pure-neural leprosy definition, which will be explored by using multiple clinical-laboratory analyses.

Methodology/Principal Findings: Seventy patients diagnosed with primary neural leprosy from 2014 to 2016 underwent clinical, laboratorial and neurophysiological evaluation. All patients presented an asymmetric neural impairment, with nerve thickening in 58.6%. Electroneuromyography showed a pattern of mononeuropathy in 51.4%. Positivity for ELISA anti-PGL1 was 52.9%, while the qPCR of intradermal smear was 78.6%. The qPCR of nerve biopsies was positive in 60.8%. Patients with multiple mononeuropathy pattern showed lower levels of anti-PGL-1 ($p=0.0006$), and higher frequency of neural thickening ($p=0.0008$) and sensorial symptoms ($p=0.01$) than those with mononeuropathy.

Conclusions/Significance: Immunological, molecular, and neurophysiological tools must be implemented for diagnosing primary neural leprosy to achieve effective treatment and reduction of its resultant disabilities that still represent a public health problem in several developing nations. Finally, we propose a new algorithm and recommendations for the diagnosis of primary neural leprosy based on the combination of the three clinical-laboratorial tools.

Keywords: leprosy, primary neural leprosy, pure neural leprosy, electroneuromyography, peripheral neuropathy.

Author Summary

The long incubation period, insidious symptoms and signs of leprosy produce difficulties in its diagnosis and correct clinical classification, especially in its primary neural form characterized by negative bacilloscopy and lack of cutaneous lesions. Despite significant progress in leprosy control in recent years, early identification of cases remains one of the primary goals of leprosy control programs. In addition, the failure of current therapeutic schemes on the incidence of leprosy shows that elimination of this disease, a public health problem, depends on incisive action to interrupt its transmission chain. Therefore, efforts must be focused on improving the leprosy diagnosis. However, because it is a primarily neural disease, the use of neurophysiological, serological and molecular methods in this group of patients may contribute not only to early diagnosis, but also to a correct classification and treatment, preventing sequelae and controlling outbreaks of infection. Therefore, in order to improve the leprosy elimination program in many countries, we propose the implementation of a combination of specific tools for detecting *M. leprae* and its neural impairment, which may further break down the transmission chain, enabling a more effective control of the disease.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae*, an alcohol- and acid-resistant obligatory intracellular bacillus with predilection to infect peripheral nerves and skin. Its clinical forms are defined by the host immune response and bacillary load, resulting in a wide clinical spectrum [1,2,3].

Leprosy neuropathy is considered the most common peripheral neuropathy of infectious etiology worldwide, representing a public health problem, mainly due to its incapacitating potential and strong social discrimination and stigma [4].

Leprosy is classified into five clinical forms according to the Ridley-Jopling, proposed in the 1960s, which is based on skin lesion histopathology and bacterial load. According to this classification, cases with cellular immune response mediated by T lymphocytes are classified as tuberculoid (TT), while anergic patients with humoral response are considered to be suffering from lepromatous leprosy (LL). Patients between these two extremes are defined as borderline, presenting intermediate immune responses. For operational purposes aiming to achieve proper treatment regimens, patients are divided into paucibacillary (PB) or multibacillary (MB) forms, according to their bacilloscopic index (BI), the number of skin lesions and affected nerves [5,6,7].

The *M. leprae* bacillus causes multiple mononeuropathy, which may result in autonomic, sensory and motor dysfunction. Histopathologically, there are myelinic and axonal dysfunctions, followed by substitution of the nervous tissue by connective tissue and fibrosis. The peripheral neural impairment includes nerve trunks as well as distal cutaneous branches. Sensory symptoms often correspond to the initial and most common complaints, always with an asymmetrical impairment. Mononeuropathy, multiple mononeuropathy and confluent mononeuropathy are the most common clinical presentations [8,9,10].

Primary neural leprosy (PNL), also known as pure neural or neuritic leprosy form, was initially described by the Indian classification of 1955 [11]; since then it became a challenging clinical diagnosis. This clinical form is characterized by no skin lesions and negative slit skin smear bacilloscopy. Therefore, diagnosis is mainly based on supplementary tests, such as electroneuromyography, nerve biopsy, serology and molecular analyses [12,13,14,15,16]. However, most of the leprosy reference services do not have access to advanced diagnostic methods; therefore, diagnosis is based mainly on clinical manifestations, such as the absence of skin lesions and negative slit skin smears bacilloscopy. But the scarcity of symptoms at the disease onset has commonly led to diagnostic errors and under diagnosis of the neural clinical form. For this reason, several laboratory tools are required for the investigation of this neuropathy, enabling not only early diagnosis, but contributing to the prevention of incapacities [12,17,18].

Our aim was to characterize the clinical, neurophysiological, serological, and molecular patterns of patients with PNL diagnosis, which led us to propose the combination of these tools to achieve an early diagnosis and to better control the disease.

Patients and Methods

Seventy individuals with diagnosis of PNL were recruited among 317 new cases from July 2014 to July 2016 treated at the National Reference Center of Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDSH), Uberlandia, MG, Brazil, under the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia.

The PNL diagnosis fulfilled the following criteria: clinical evidence of peripheral neuropathy associated with the absence of skin lesions and negative intradermal smear bacilloscopy [12]. Patients who showed other possible etiologies of peripheral neuropathies during diagnosis were excluded, namely

those with: chronic alcoholism, diabetes mellitus, thyroid disease and/or other hormonal dysfunctions, malnutrition, hereditary neuropathy, hepatitis B or C, HIV, rheumatic and/or autoimmune diseases.

Clinical Characterization

Epidemiological (age, gender, previous contact with leprosy cases) and clinical (initial symptoms, sensory impairment modalities, presence of muscle weakness and amyotrophy, neural thickening, deep reflexes evaluation) data were examined. The level of functional disability was evaluated, according to the recommended protocol of the Ministry of Health [19], which evaluates the neural function integrity and the degree of physical disability during diagnosis, through muscle strength, and sensitivity tests of the hands and feet. In relation to the grade 2 disability caused by leprosy, observations were based on the presence of visible deficiencies, such as claws (clawing of digits), bone resorption, muscular atrophy, contractures and wounds. All patients underwent a rigorous dermatoneurological evaluation by expert professionals.

Laboratory Analyses

Bacilloscopy – Bacilloscopic analyses were performed on intradermal smears from six sites (two ear lobes, two elbows, two knees), and skin and/or nerve biopsy samples.

ELISA anti-PGL-1 serology – Serum IgM antibodies were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed against the purified native PGL-I from the *Mycobacterium leprae* cell wall, as described elsewhere [20].

DNA Extraction and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) – DNA extraction from dermal smear samples, nerve biopsies,

and superjacent skin was performed. To detect *M. leprae* DNA, a previously described quantitative real-time PCR (qPCR) primer/probe assay targeting the *M. leprae* species-specific genomic element of dispersed repeats (RLEP) was performed in the real-time PCR system ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [11,21,22,23].

Electroneuromyography

Electroneuromyographic studies were performed using a MEB 4200K (NIHON-KODHEN) electroneuromyographer. For the sensory conduction analysis, the median, ulnar, dorsal hand cutaneous, radial, lateral antebrachial cutaneous, median antebrachial cutaneous, sural, and fibular superficial bilaterally nerves were examined. For the motor conduction analysis, the median, ulnar, common fibular, and tibial bilaterally nerves were examined, supplemented by specific techniques for focal impairment research at compression sites often affected in leprosy neuropathy, such as median nerve at the wrist, ulnar nerve at the elbow, fibular nerve at the fibular head and tibial nerve at the ankle.

Skin Biopsy

According to the PNL concept, none of the patients presented skin lesions. For this reason, biopsies were performed on the small elbow skin fragment, which is the coldest region with a possible intradermal impairment, and a site often attacked in leprosy neuropathy, even without an evident local skin lesion.

Nerve Biopsy

Nerves that underwent biopsy were selected according to the patient's clinical condition, and included exclusively sensory nerves that presented clinical changes and/or thickening, and also one of the following electrophysiological changes in the sensory conduction analysis: absence of response on both sides; unilateral absence of response; bilaterally decreased amplitude of the sensorial action potential (SAP), considering reference values; and over 50% decrease in the amplitude of the SAP, compared with the contralateral side. During the biopsy, the nerve was fasciculated and completely transected. All patients signed a specific informed consent form referring to this process. During the procedure, a skin biopsy of the area superjacent to the corresponding territory of the nerve also underwent a biopsy procedure. The biopsied nerve and skin were processed and studied according to routine standard procedures. Formalin-fixed paraffin-embedded were cut longitudinally and transversely at 5 μ thickness and stained with hematoxylin and eosin stain. In addition special stains like Masson Trichome to assess fibrosis. Fite-Faraco stain was performed for bacilli identification.

Statistical Analysis

Continuous and dichotomous variables were applied to evaluate differences of clinical and laboratory factors among groups. The Shapiro Wilk test was applied to verify data normality prior to applying parametric or non-parametric analyses. The Wilcoxon-Mann-Whitney U Test was carried out to compare differences between independent groups when the dependent variables were not normally distributed. The Binomial Test was applied to evaluate dichotomous variables. The statistical software used was GraphPad Prism version 7 (La Jolla, CA, USA), and all tests presenting a probability below 5% were considered significant.

Results

Seventy patients diagnosed with PNL, from 2014 to 2016, were included in this study and 44.3% (31/70) of these were household contacts of patients with a previous leprosy diagnosis. The average age was 42.9 (± 17.3) years, and 52.9% (37/70) were male. Intradermal smear bacilloscopy of the six sites (ear lobes, elbows, and knees) was negative in all patients, who also did not present any skin lesions compatible with leprosy.

Among patients, 61.4% (43/70) were clearly symptomatic. All asymptomatic patients (27/70) were household contacts of leprosy patients, who were annually assisted by epidemiological surveillance, throughout a 7-year period, and presented some electroneuromyographic abnormality, reinforcing the need for a detailed interview and an active search for neurological signs and symptoms in this high-risk group.

All symptomatic patients presented an asymmetric neural impairment, with a predominance of sensory symptoms, particularly hypoesthesia, paresthesia and pain, evidenced by thermal, painful, and tactile impairment, in addition to an intradermic sensory involvement in 69.8% (30/43). Deep reflexes and vibration sensitivity changes were present in only 8.6% (6/70) of the cases, while 30% (21/70) complained of muscular weakness and/or amyotrophy, besides the sensory symptoms.

Neural thickening of one or more nerves was observed in 58.6% (41/70) of the patients, of which 75.6% (31/41) presented focal myelin impairments in the electroneuromyographic evaluation. As to the incapacity degree during diagnosis, 20% (14/70) presented grade 2 disability, mostly evidenced by the presence of muscular weakness and amyotrophy.

In relation to the electroneuromyographic evaluation, an average of only 2.3 altered nerves per patient was observed. The most frequently affected nerves were the ulnar in the elbow segment (34.4%; 56/163), common fibular in the

fibula head segment (30.2%; 33/163), followed by the sensory ulnar (12.8%; 20/163), superficial fibular (10.4%; 17/163), and sural nerve (6.1%; 10/163) (Table 1).

As to the neurophysiological pattern observed in electroneuromyography, 51.4% (36/70) presented only one altered nerve (mononeuropathy), while 48.6% (34/70) presented two or more affected nerves (asymmetrical multiple mononeuropathy). The electromyographic pattern and its distribution are detailed in Table 2.

The ELISA anti-PGL1 IgM serology was positive in 52.9% (37/70) of the cases. The qPCR test in intradermal smears was positive in 78.6% (55/70) of the cases, which was much higher than bacilloscopy (negative in all cases). It should be emphasized that only 21.4% (15/70) of the neural cases showed negative qPCR in intradermal smears.

In relation to the skin biopsy in the elbow area (routine lab services in all cases with absence of suspected dermatological lesions), a positivity of 30% (21/70) for *M leprae* DNA was observed, whereas only one case (1.4%) showed positive bacilloscopy in the biopsy of this area.

According to clinical data and the electroneuromyography results, 57.1% (40/70) of patients demonstrated at least one eligible nerve for biopsy, but only 70% (28/40) of those were submitted to this process. The most frequent nerve submitted to biopsy was the sensory ulnar - dorsal cutaneous of the hand (82.1%; 23/28), followed by superficial fibular (10.7%; 3/28), sural (3.6%; 1/28), and deep fibular (3.6%; 1/28). Only 46.4% (13/28) of the nerves that underwent biopsy presented some histopathological alterations, suggestive of leprosy, such as endoneural or epineural infiltrate, presence of fibrosis, perineural thickening or presence of endoneural granuloma. Only one case (3.5%) presented positive bacilloscopy in the peripheral nerve biopsy. On the other hand, qPCR of nerve biopsies was positive in 60.8% (17/28) of the cases. The qPCR of the superjacent

skin area was positive in only 10.7% (3/28) of the nerve biopsies, with negative bacilloscopy in all samples.

To achieve a better understanding of the disease phenotype and clinical progression, patients were divided into two groups: one composed of individuals presenting electroneuromyographic pattern of mononeuropathy (51.4%; 36/70), and the other of those presenting a multiple mononeuropathy pattern (48.6%; 34/70) (Table 3).

For the group of patients with multiple mononeuropathy patterns, lower levels of ELISA antiPGL-1 were observed ($p=0.0006$), as well as higher neural thickening frequency ($p=0.0008$), and sensory symptoms ($p=0.01$). A tendency for higher motor symptom incidence, although not significant, was also found in this group ($p=0.1440$), reinforcing the greater severity of neural damage. The positivity of the qPCR in intradermal smears was smaller in this group ($p=0.03$) (Table 3).

Table 4 details a new analysis of the clinical and laboratory profile of two new groups of PNL patients, defined by their seropositivity to the ELISA anti-PGL1 test. The seronegative group presented a larger number of impaired nerves ($p=0.003$), higher proportion of neural thickening ($p=0.001$), sensory symptoms ($p<0.0001$) and motor symptoms ($p=0.001$). Lower positivity of qPCR in the peripheral blood, intradermal smear and skin biopsy were observed, reinforcing that the bacillary load in this group was lower, although not statistically different (Table 4).

The combined evaluation of all diagnostic tools (Table 5) demonstrated a highly variable presentation, with 17.1% of patients being positive only in intradermal smear qPCR and 8.6% being negative in all tests, reinforcing the importance of peripheral nerve biopsy in some cases.

Discussion

The present study characterizes for the first time the clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects of 70 patients with PNL diagnosis, assisted in a leprosy national reference center in Brazil from 2014 to 2016, evidencing the importance of using multiple analytical tools for proper diagnosis of this neuritic leprosy form.

The prevalence of this clinical form was 22.1%, considering the 317 diagnosed cases during this period, contrasting with the very low prevalence (5.5% to 17.1%) found elsewhere [12,13,14,16,24], evidencing the difficulty in diagnosing this leprosy form. Probably, this difficulty is due to the absence of serological, molecular, and neurophysiological diagnostic tools, thus accounting for the under diagnosed of many cases, leading to the late diagnosis of this disease. In the present study, we have observed not only a high proportion of neural cases, but also a premature recognition of this clinical form, obtained by a combination of diagnostic tools and an active search of cases through the evaluation of household contacts.

Interestingly, 38.6% of the patients were diagnosed during an epidemiological surveillance and follow-up of household contacts of leprosy patients, supporting the need for control measures and early disease recognition in this high risk population. It is estimated that household contacts of multibacillary patients may present a relative risk of developing leprosy 5 to 10 times higher than the general population [25,26,27].

The clinical presentation pattern was defined in all patients, and the asymmetric impairment of symptoms was observed in all cases. The sensory symptoms were the most dominant, and were present in all symptomatic patients, supporting previous findings demonstrated elsewhere, such as an asymmetric peripheral neuropathy that is predominantly sensorial [12,13,14,16,28,29,30].

The most affected nerves were the ulnar in the elbow segment and the common fibular nerve in the fibular head segment, followed by the ulnar sensory nerves, superficial fibular, and sural. Although controversial, most of the

researchers identify the ulnar as the nerve most compromised by leprosy, although any peripheral nerve can be affected by this neuropathy. The ulnar, median, common fibular, tibial, facial, cutaneous radial, and major auricular are the nerves most frequently reported in different studies [12,13,15,29,31,32]. This variability may be due to the different electroneuromyography protocols used, emphasizing the importance of an extensive and careful evaluation of leprosy neuropathy, mostly through an extended analysis of motor and sensory conductions, including nerves that are not evaluated in the routine.

The deep sensation and deep tendon reflex impairment, as well as the presence of muscular weakness and amyotrophy, generally occur in cases of prolonged evolution. In this study, motor impairment was more frequent in ulnar and fibular nerves. Apparently, the bacillus's preference for colder areas of the body will lead to a focal reduction of the conduction velocity, which can be detected at some preferential sites, such as the ulnar nerve in the elbow area and the common fibular nerve in the fibula head area [13,16,33,34]

Neural thickening was present in the majority of the cases. However, the clinical evaluation of neural thickening is subjective, especially for professionals with limited experience, which may explain the very large data variation found among different examiners [35,36]. Besides that, the neural thickening is not a pathognomonic finding of leprosy neuropathy, which can be observed in compressive, inflammatory focal neuropathy, and even in hereditary neuropathies [13,14]. It should be emphasized that thickened nerves can also present a normal electroneuromyographic result [37], as observed in some of our patients.

The electroneuromyography of leprosy patients is very important, because it allows the stratification of the severity, the definition of patterns of the peripheral neural impairment, and also the early detection of PNL. These findings were reinforced by the large percentage of household contacts detected with this neuritic leprosy form, classified as oligo/asymptomatic patients, who do not always present neural thickening or other signs of this neuropathy.

In leprosy neuropathy, some patients seem to present a subclinical form, in which the sensory conduction study is superior to thermal sensitivity, vibratory, strength, and monofilament tests, with capability of detecting neural impairment in earlier phases [32,36]. Detection of patients with high incapacity level (grade 2) during diagnosis reinforces the complexity of these cases, leading to treatment delays in a clinical form whose neural damage is much more aggressive than the damage observed in other forms of the disease.

The absence or amplitude reduction of the sensorial action potential of ulnar nerves in leprosy patients can precede the disease's classic clinical symptoms [38], which is corroborated by our electroneuromyography findings in oligosymptomatic patients, reinforcing the fact that the ulnar sensory nerve is the most biopsied nerve. Besides that, an early focal myelinic impairment of ulnar or fibular nerves was observed, also preceding the clinical manifestations of the disease [39]. However, there are doubts as to the electrophysiological changes most frequently found in this peripheral neuropathy, which reflects a disease with differential phenotypes that can evolve insidiously or through reactional episodes, accentuating neural damage and leading to functional disabilities and sequelae [40].

In relation to diagnostic tools, the diagnostic tests used for leprosy pursue direct demonstration of bacilli through biopsy and bacilloscopy, or indirect detection through serological or molecular analyses. These methods differ in sensitivity, specificity, reproducibility, and do not present a homogeneous response across leprosy forms; therefore, it is reasonable to investigate and adopt new methods to elucidate the neural forms [2].

The positivity of ELISA anti-PGLI during diagnosis in most cases emphasizes its importance as screening and as a risk indicator, particularly for oligo/asymptomatic patients. The anti-PGL-I seropositivity indicates that the bacillus has successfully penetrated the circulatory system, and represents a relative risk almost six times higher for disease occurrence, corroborating the

leprosy neuropathy diagnosis. Nevertheless, the number of seropositive patients does not indicate existing infection prevalence, which reached 47.1% of our cases, since paucibacillary patients rarely produce specific antibodies [11,17,26,27,41].

The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *M. leprae* DNA has been reported as a useful diagnostic tool for all clinical forms of leprosy, including the primary neural form, and is considered an important tool for early diagnosis [17,42,43]. Our study demonstrated a 78.6% positivity of *M. leprae* DNA in the intradermal smears, although all these patients were diagnosed with leprosy in their primary neural form, considering the current diagnostic criteria, which only require negativity in intradermal smear bacilloscopy. Therefore, it is important to emphasize that the concept of a pure neural form cannot be accepted, although it is often used as a synonym of the primary neural form, since only 21.4% of our cases presented a clinical and laboratory presentation that supports a uniquely neural involvement.

The qPCR of peripheral nerves was positive in 60.8%, which has significantly contributed to the leprosy diagnosis. There is a great variation in the literature related to the bacillus identification and to the histopathological analysis in peripheral nerve biopsy through conventional bacilloscopy, reinforcing the importance of qPCR use in these cases due to its greater sensitivity [16,17,44,45].

According to current recommendations for the operational classification of leprosy patients, which defines the multidrug therapy regimens, those cases with primary neural form that present more than one affected nerve, properly documented by loss or reduction of sensation in the respective areas, should be treated as a multibacillary form [19]. However, as observed in this study, many mononeuropathy patients presented high titers of anti-PGL-1 serology, which implies the patients' bacillary load status and defines them as multibacillary cases with predominance of humoral immune response, considered a less aggressive disease, and also an early diagnosis, since other leprosy clinical signs were not

present during diagnosis. If one considers only the number of affected nerves, treatment failures may occur, including disease relapse due to insufficient treatment.

Contrarily, lower anti-PGL-1 serology levels, characterizing the paucibacillary form, were observed in the multiple mononeuropathy patient group, suggesting a stronger cellular response and corroborating the greater immune aggression of nerves, which is evidenced by the greater severity of the peripheral neuropathy, with greater number of altered nerves, higher proportion of sensory-motor symptoms, and thickened nerves. Thus, diagnosis of both clinical and operational classifications of patients with the primary neural form still represents a big challenge.

Due to their hazardous and highly disabling neuropathy, we believe that all PNL cases should be treated with multibacillary treatment regimen, especially because of the lack of clear diagnostic criteria to distinguish paucibacillary from multibacillary patients, and also on account of the lack of association between the number of altered nerves and the bacillary load.

Early diagnosis of suspected leprosy neuropathy cases has been always posed a problem due to the long incubation period of the disease, the variable and insidious symptoms and clinical signs in both early and advanced cases, a context that reinforces the notion that PNL is underdiagnosed, causing severe disabilities and favoring the maintenance of the infection transmission chain.

We propose a new algorithm and recommendations for PNL diagnosis (Figure 1) considering that for early recognition of the leprosy neural form, a severe public health problem in several developing countries and regions, the implementation of specific methods is an urgent requirement, including immunological, molecular and neurophysiological tools, which are necessary to elucidate the epidemiology of this disabling clinical form, thus contributing not only to an effective treatment, but also to the reduction of disabilities, deformities, and sequelae.

Table 1 – Distribution of the most affected peripheral nerves in patients with primary neural leprosy diagnosis.

Affected Nerve	n	%
Ulnar (Elbow)	56	34.4
Common fibular	33	20.2
Sensory ulnar	20	12.8
Superficial fibular	17	10.4
Sural	10	6.1
Motor median	8	4.9
Superficial radial	6	3.7
Sensory median	4	2.4
Tibial	4	2.4
Median antebrachial cutaneous	2	1.2
Lateral antebrachial cutaneous	2	1.2
Deep fibular	1	0.6
Total nerves	163	100

Table 2 – Distribution of the electroneuromyographic pattern in patients with primary neural leprosy diagnosis.

Electroneuromyographic pattern	n	%
Focal demyelinating mononeuropathy	19	27.1
Sensory axonal mononeuropathy	17	24.3
Asymmetrical sensory and motor demyelinating neuropathy	21	30.0
Asymmetrical sensory and motor axonal neuropathy with focal slowing of conduction velocity	13	18.6
Total	70	100

Table 3 – Distribution of patients with primary neural leprosy according to the electroneuromyographic pattern, and comparisons of proportions.

Parameters	Mononeuropathy	Multiple Mononeuropathy	<i>p</i> value
ELISA antiPGL-1 index	1.54 ±1.1	0.82 ±0.63	p=0.0006
Neural thickening	33.3% (12/36)	73.6% (25/34)	p=0.0008
Sensory symptoms	47.2% (17/36)	76.5% (26/34)	p=0.0120
Muscular weakness	22.2% (8/36)	38.3% (13/34)	p=0.1440
Peripheral blood qPCR	38.9% (14/36)	23.5% (8/34)	p=0.1665
Slit skin smear qPCR	88.9% (32/36)	67.65% (23/34)	p=0.0304

qPCR = Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

Table 4 – Distribution of patients with primary neural leprosy according to ELISA anti-PGL1 seropositivity and comparisons of proportions.

Parameters	ELISA anti-PGL1	ELISA anti-PGL1	<i>p</i> value
	Negative	Positive	
ELISA index	0.52 ±0.32	1.79 ±1.0	p<0.0001
Number of altered nerves	3.18 ±4.1	1.43 ±0,86	p=0.0033
Neural thickening	78.8% (26/33)	40.5% (15/37)	p=0.0012
Sensory symptoms	90.1% (30/33)	35.1% (13/37)	p< 0.0001
Muscular weakness	48.5% (16/33)	13.5% (5/37)	p=0.0014
Peripheral blood qPCR	27.3% (9/33)	35.1% (13/37)	p=0.48
Slit skin smear qPCR	72.7% (24/33)	83.8% (31/37)	p=0.26
Skin biopsy qPCR	21.2% (7/33)	37.8% (14/37)	p=0.12

qPCR = Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

Table 5 – Combination of diagnostic tools for primary neural leprosy diagnosis, considering suspicious clinical cases with positive electroneuromyography.

ELISA anti-PGL-1	Peripheral blood qPCR	Slit skin smears qPCR	Skin biopsy qPCR	Number of Patients (%)
+	+	+	+	3 (4.3)
			-	8 (11.4)
		-	+	-
			-	2 (2.9)
	-	+	+	9 (12.9)
			-	11 (15.7)
		-	+	2 (2.9)
			-	2 (2.9)
-	+	+	+	1 (1.4)
			-	6 (8.6)
		-	+	-
			-	2 (2.9)
	-	+	+	5 (7.1)
			-	12 (17.1)
		-	+	1 (1.4)
			-	6 (8.6)

qPCR = Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

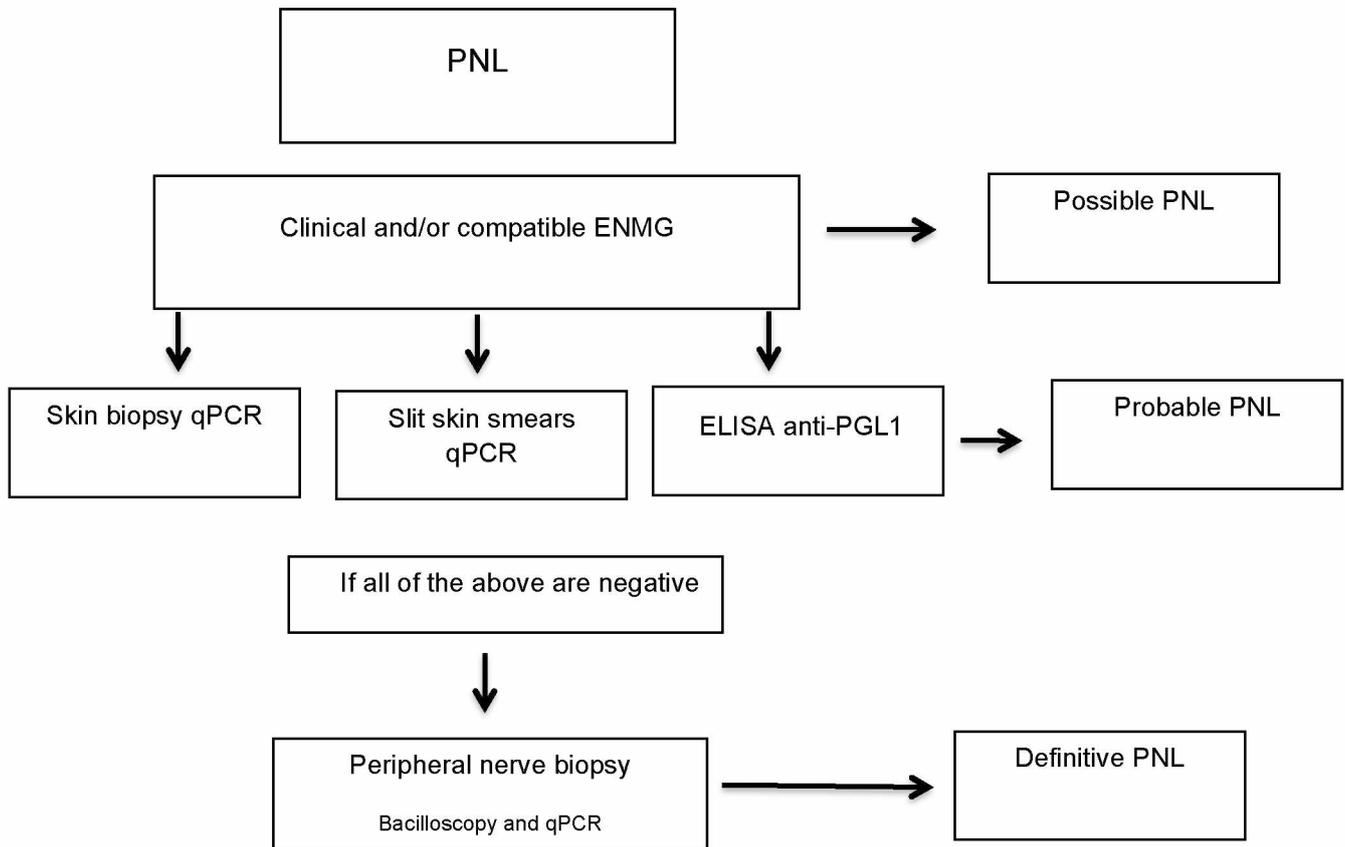


Figure 1 - Algorithm and recommendations for PNL diagnosis.

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. PNL = primary neural leprosy.

References

1. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Rio de Janeiro 2003;36:373-382.
2. Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* 2011;11:464-470.
3. Who. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. *Weekly epidemiological record* 2015;90(36):461-474.
4. Yawalkar SJ. Leprosy: for medical practitioners and paramedical workers. 7th ed. Basle, Novartis Foundation for Sustainable Development; 2002.
5. Goulart IMB, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth Factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol* 1996;148(3):911-917.
6. Hastings RC. Classifications of leprosy. *Leprosy*. Edinburg: Churchill Livingstone 1985;88-99.
7. Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* 1962;33:119-128.
8. De Freitas MRG, Nascimento OJM, Quaglino EAM. Small-fiber polyneuropathy in leprosy without skin changes: study of 17 cases. *Arq Bras Neuropsiquiatr* 2003;61:545-546.
9. Nascimento OJM. Neuropatia da lepra: apresentações clínicas. *Arq neuropsiquiatr* 2013;71:661-666.
10. Van Brakel WH, Nicholls PG, Das L. The INFIR Cohort Study: assessment of sensory and motor neuropathy in leprosy at baseline. *Lepr Rev* 2005;76:277-295.

11. Wade HW. The classification of leprosy: a proposed synthesis based primarily on the Rio de Janeiro-Havana System. *Int J Lepr* 1952; 20: 429-62.
12. Garbino JA, Jardim MR, Marques JRW, Antunes SL, Soares CT, Heise CO, et al. Hanseníase Neural Primária. Projeto Diretrizes (AMBCFM) 2011;1-26.
13. Garbino JA, Marques JRW, Barreto JA, Heise CO, Rodrigues MMJ, Antunes SL, et al. Primary neural leprosy: systematic review. *Arq Neuropsiquiatr* 2013;397-404.
14. Garbino JA. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. *Hansen Int* 2007;203-206.
15. Girdhar BK. Neuritic leprosy. *Indian J Lepr* 1996;68:35-42.
16. Jardim MR, Antunes SJG, Santos AR, Nascimento OJM, Nery JAC, Sales AM, et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol* 2003;(250):806-809.
17. Cunha FMB, Werneck MCM, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle & Nerve* 2006;33:409-414.
18. Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev* 2005 Sep;76(3):232-240.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde 2016;58 p.
20. Lobato J, Costa MP, Reis EM, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 2011;82:1-14.
21. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis

- TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2(11):e328
22. Araújo S, Freitas OL, Goulart RL, Goulart IMB. Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clin Infect Dis* 2016;63(11):1412-1420.
 23. Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa AV, Gonçalves MA, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical microbiol infect* 2014;20(5):447-452.
 24. Noordeen SK. Epidemiology of (poly) neuritic type of leprosy. *Lepr India* 1972;44:90-96.
 25. Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012;107(1): 55-59.
 26. Araujo S, Rezende MMF, Sousa DCR, Rosa MR, Santos DC, Goulart LR, et al. Risk-benefit assessment of *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2015;48(6):739-745.
 27. Goulart IM, Bernardes DOS, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:101-105.
 28. Antunes SL, Chimelli LM, Rabello ET, Valentim VC, Cortereal S, Sarno EN, et al. An immunohistochemical, clinical and electroneuromyographic correlative study of the neural markers in the neuritic form of leprosy. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1071-1081.

29. Jardim MR, Chimelli L, Faria SCR, Fernandes PV, Da Costa JAN, Sales AM, et al. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. *Lepr Rev* 2004;75:242-253.
30. Kaur G, Girdhar BK, Gordhar A, Malaviya GN, Mukherjee A, Sengupta U, et al. A clinical, immunological and histological study of neuritic leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1991;59:385-391.
31. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 1999;353:655-660.
32. Van Brakel WH, Nicholls PG, Wilder-Smith EP, Das L, Barkataki P, Lockwood DN. Early diagnosis of neuropathy in leprosy - comparing diagnostic tests in a large prospective study (INFIR cohort study). *PLoS Negl Trop Dis* 2008;4:e212.
33. Jardim MR, Illarramendi X, Nascimento OJM, Nery JAC, Sales AM, Sampaio EP, et al. Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65(4):969-973.
34. Rodrigues G, Sanches W, Chalela JG, Soto J. Primary neuritic leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:1050-1052
35. Chen S, Wang Q, Chu T, Zheng M. Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Lepr Rev* 2006;77:371-376.
36. Lima PO, Cunha FM, Gonçalves HS, Aires MA, De Almeida RL, Kerr LR. Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. *Lepr Rev.* 2016 Mar;87(1):60-70.
37. Rao SP, Bharambe MS. Electroneurophysiological studies in early tuberculoide leprosy. *Indian J Lepr* 1993;65:181-187.
38. Bathala L, Kumar K, Pathapati R, Jain S, Visser LH. Ulnar neuropathy in Hansen disease: clinical, high-resolution ultrasound and electrophysiologic correlations. *Journal of Clinical Neurophysiology* 2012;2:190-193.
39. Wilder-Smit E, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its

- management. *Nature Clinical Practice - Neurology* 4, 2008 Dec;12:656-663.
40. Van Brakel WH, Khawas IB. Silent neuropathy in leprosy: an epidemiological description. *Lepr Rev.* 1994;65(4):350-360
 41. Douglas JT, Cellona RV, Fajardo JR, Abalos RM, Balagon MV, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:897-900.
 42. Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Goncalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Archives of dermatological research* 2007;299(5-6):267-271.
 43. Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS immunology and medical microbiology* 2005;44(3):311-316.
 44. Freitas MRG, Nascimento OJM, Quaglino EAM, Oliveira A, Hahn M. Small-fiber polyneuropathy in leprosy without skin changes. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:542-546.
 45. Garbino JA, Ura S, Belone AFF, Marciano LHSC, Fleury RN. Clinical and diagnostic aspects of the primarily neural leprosy. *Hansen Int* 2004;130-136.

Estudo 2

Molecular, immunological and neurophysiological evaluations in leprosy household contacts for early diagnosis and treatment.

Artigo submetido à revista *Clinical Infectious Diseases*

Fator de impacto: 8.216

Molecular, immunological and neurophysiological evaluations in leprosy household contacts for early diagnosis and treatment.

Diogo Fernandes dos Santos¹, Matheus Rocha Mendonça¹, Douglas Eulálio Antunes¹, Elaine Fávaro Pípi Sabino¹, Raquel Campos Pereira¹, Luiz Ricardo Goulart^{1,2} Isabela Maria Bernardes Goulart¹

¹ Leprosy National Reference Center, Clinics' Hospital, School of Medicine, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil.

² Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil.

Corresponding Author:

Prof. Dr. Isabela Maria Bernardes Goulart, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFU. Av. Pará, 1720, Bloco 2H – Campus Umuarama, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil. imbgoulart@gmail.com

Tel: 55 (34) 3218-2246 Fax: 55 (34) 3218- 2349 or 55 (34) 3216-7872

Number of words in abstract: 240

Number of words in manuscript: 2972

Running title: Neural impairment in household leprosy contacts.

Ethical Publication Statement: We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

Disclosure of Conflicts of Interest: None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Abstract

Molecular, immunological and neurophysiological evaluations in leprosy household contacts for early diagnosis and treatment.

Background: Household contacts (HHC) constitute a recognizable group at high risk for leprosy development; despite significant progress in controlling this disease in recent years, early identification of cases remains one of the primary goals and challenges of leprosy control programs.

Methods: From January 2014 to December 2016, 175 seropositive household contacts (SPHHC) with subclinical infection and a control group of 35 seronegative household contacts (SNHHC) were recruited and subjected to an extensive protocol, that included clinical, molecular (peripheral blood qPCR, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR) and electroneuromyographic evaluation.

Results: In the analysis of peripheral blood qPCR of the SPHHC, 40.6% presented positivity versus only 8.6% in SNHHC ($p=0.0003$). In the intradermal smear analysis, only 4% of the SPHHC presented positive bacilloscopy, whereas qPCR in this sample detected 47.4% positivity in this group compared with only 17.1% in SNHHC ($p = 0.0009$). In the ENMG evaluation, 31.4% of the SPHHC presented some neural impairment and 13.3% in SNHHC ($p=0.0163$). The presence of neural thickening conferred a 2.94-fold higher chance of ENMG abnormality (OR, 2.94; $p=0.0031$). SPHHC presented a 4.04-fold higher chance of neural impairment ($p=0.0206$).

Discussion: The implementation of methods that employ immunological, molecular and neurophysiological tools for the detection of *M. leprae* and its neural impairment, are clearly necessary to elucidate the epidemiology of leprosy, to break its chain of transmission, thus enabling effective control of the disease.

Keywords: leprosy, household contacts, electroneuromyography, peripheral neuropathy, ELISA anti-PGL1, real-time PCR.

Introduction:

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite with a predilection for infecting peripheral nerves and skin. Leprosy is a current and challenging disease, because it still represents a problem for public health programs in developing countries such as Brazil, which ranks second worldwide in the number of new cases [1].

The predominance of multibacillary (MB) cases and also of those with neural disabilities, indicates a delay in the diagnosis, reinforcing the ineffective epidemiological control not only in Brazil, but in many other countries [2]. In addition, new cases not only of high functional impairment but also in children reflect a failure of early leprosy detection and indicate its ongoing transmission [3,4,5].

Leprosy household contacts (LHHC) of MB patients have a relative risk of developing leprosy 5 to 10 times higher than the general population [6,7]. Because of the complex relationships between genetic, immunological and environmental factors, most infected contacts will not develop leprosy, although recent studies have reported that they can be healthy carriers and spread *M. leprae* to susceptible individuals [8,9,10].

The investigation of the transmission and infectivity of *M. leprae* through molecular and immunological tools has shown that half of the LHHC are healthy carriers while about 18% present subclinical infection with high risk of illness [10,11,12]. Although subclinical neural involvement in this group has not yet been well defined in the literature, its documentation is fundamental. Such elucidation would enable the discussion of chemoprophylaxis or even early treatment, as a complementary strategy for leprosy control.

The objective of this study was to evaluate the neural impairment in LHHC with subclinical infection (seropositive to anti-PGL1 ELISA) through electroneuromyography (ENMG), aiming at early diagnosis, timely treatment and

prevention of disabilities.

Patients and Methods:

We recruited seropositive household contacts (SPHHC) of leprosy patients from a national leprosy referral center in Brazil, under the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia. At this center, LHHC are regularly followed up for a period of at least 7 years, annually, when they are evaluated by a multidisciplinary team and submitted to dermatoneurological examination and serological (ELISA anti-PGL1) screening.

From January 2014 to December 2016, 373 new cases of leprosy and 2125 of LHHC were reported, totaling an average of 5.7 LHHC per patient. A total of 1902 LHHC (90.5%, 1902/2125) were examined and 18% (342/1902) were seropositive. In this study, 175 (51.2%, 175/342) SPHHC and a control group of 35 seronegative householdcontacts (SNHHC) were recruited, all of them without skin lesions or other clinical abnormalities that allowed leprosy diagnosis.

We excluded those who in the initial evaluation already showed clinical evidence of the disease (coprevalence cases), those who presented other etiologies for peripheral neuropathy: chronic alcoholism, diabetes mellitus, thyroid disease, hormonal dysfunctions, malnutrition, hereditary neuropathy, hepatitis B or C, HIV, autoimmune diseases; individuals who resided in other cities, and those who refused to undergo ENMG.

The systematic evaluation of LHHC recruited in this study is described in Figure 1.

Clinical Characterization:

Epidemiological (age, gender, type of contact), clinical (sensory modality impairment, presence of muscle weakness and/or amyotrophy, neural thickening,

evaluation of deep reflexes) data were examined. All the patients underwent a rigorous dermatoneurological evaluation by expert professionals.

Laboratory Research:

Bacilloscopy – A bacilloscopy of intradermal smears from six sites was performed: the two ear lobes, both elbows and the two knees, as well as from skin and/or nerve biopsy samples. The sample collection was preceded by topical application of cream containing lidocaine (7%) and tetracaine (7%) at all sites, awaiting the anesthetic effect for one hour.

ELISA anti PGL-1 serology – In order to detect IgM antibodies in the serum, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed on all household contacts, against the purified native PGL-I molecule from the *M. leprae* cell wall, according to a methodology previously described in the literature [13].

DNA Extraction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) – the DNA extraction from blood, dermal smear samples, and nerve and skin biopsies were performed. To detect *M. leprae* DNA, a previously described quantitative real-time PCR (qPCR) primer/probe assay targeting the *M. leprae* species-specific genomic element of dispersed repeats (RLEP) was performed in the real-time PCR system ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [10,14,15].

Electroneuromyography:

ENMG studies were carried out utilizing the MEB 4200K (NIHON-KODHEN) device. In the sensory conduction study, the median, ulnar, dorsal hand cutaneous, radial, lateral antebrachial cutaneous, median antebrachial cutaneous, sural, fibular superficial, saphenous and medial plantar nerves were

examined bilaterally. In the motor conduction study, the median, ulnar, common fibular, and tibial bilaterally nerves were examined, including specific techniques for focal impairment research at compression sites often affected in leprosy neuropathy.

Skin Biopsy:

All of the LHHC selected in this study did not present any skin lesion. For this reason, the biopsy of a small elbow skin fragment was performed, considering that it is a cold region with possible intradermal impairment, and therefore a site often altered in leprosy neuropathy.

Nerve Biopsy:

Nerves that underwent biopsy were selected according to the patient's clinical condition, being chosen exclusively sensory nerves that presented sensory changes and/or thickening, and also one of the following electrophysiological changes in the sensory conduction study: absence of response on both sides; unilateral absence of response; bilaterally decreased amplitude of the sensorial action potential (SAP), considering reference values; and SAP amplitude decreased by over 50%, compared with the contralateral side. During the biopsy the nerve was fasciculated and completely transected. All the patients had signed a specific consent form referring to this process.

During the procedure, a skin biopsy was performed on an area suprajacent to the territory corresponding to the nerve that had previously undergone biopsy.

Statistical Analysis:

The Shapiro Wilk test was used to test the data normality in these groups in order to apply the ideal test (parametric or non-parametric). The Wilcoxon-Mann-Whitney U Test was carried out, and the Binomial Test was applied to the Study of Dichotomous Variables, with significance defined as a p value of less than 0.05. The measure of association adopted was the Odds Ratio (OR). Multiple logistic regression was used to verify the dependence relationship between the presence of ENMG abnormality (categorical variable) and the independent variables (ELISA anti-PGL1, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR, peripheral blood qPCR and BCG scar). After verifying the dependence between variables, the OR was determined and the probability of outcomes analyzed. The statistical program used was the software *GraphPad Prism* version 7.

Results:

In relation to the epidemiological characteristics, we observed that among the 175 SPHHC recruited, the majority (76%, 133/175) were female. In the SNHHC, females were also the majority (73.3%, 22/30). The mean age in the SPHHC was 30.9 years, and in the SNHHC 33.1 years. As to the type of contact, in the SPHHC 76.6% (134/175) were intradomiciliar contacts compared with 80% in the SNHHC (24/30). In the SPHHC group, 82.9% (145/175) were contacts of MB patients and in the SNHHC, 80.0% (24/30). The comparison between all the epidemiological characteristics mentioned above did not show a significant difference between the groups. (Table 1)

The mean anti-PGL1 ELISA index was 2.05 in the SPHHC and 0.52 in the SNHHC ($p < 0.0001$). In the analysis of the peripheral blood qPCR from the SPHHC, 40.6% (71/175) presented positivity, versus only 8.6% (3/35) in the SNHHC ($p = 0.0003$). In the slit skin smear analysis, only 4% (7/175) of the SPHHC presented positive bacilloscopy, whereas the evaluation by the qPCR in this sample showed positivity of 47.4% (83/175) in this group and only 17.1% (6

/ 35) in the SNHHC ($p = 0.0009$), all with negative bacilloscopy in the latter group (Table 1).

In relation to the clinical evaluation in the SPHHC, 18.3% (32/175) presented a pattern of intradermal impairment, compared with 14.3% (5/35) in the SNHHC ($p=0.5717$), defined as multifocal painful hypoesthesia, especially with a greater involvement in the elbow, knee and earlobe regions, setting a temperature-dependent pattern. Sensorial impairment with a specific territory distribution (truncal pattern) was present in 17.1% (30/175) of the SPHHC and in 8.6% (3/35) of the SNHHC ($p=0.2079$). The impairment of the deep sensitivity (vibratory and kinetic postural) was not observed in any case, nor was the presence of areflexia or evident impairment of deep osteotendin reflexes. Only 2.3% (4/175) of the SPHHC and 2.8% (1/35) of the SNHHC presented some motor manifestation ($p=0.8598$). The presence of neural thickening and/or pain upon palpation of one or more nerves was observed in 21.1% (37/175) of the SPHHC versus 8.6% (3/35) of the SNHHC ($p=0.0838$). Among the contacts with thickening, the ulnar nerve was the most frequently altered (72.5%, 29/40). None of the evaluated contacts presented skin alteration or impairment of fanners such as madarose or even alteration in hair distribution.

ENMG evaluation detected some neural impairment in 31.4% (55/175) of the SPHHC. In the SNHHC group, only 13.3% (4/35) showed changes in this exam ($p=0.0163$). (Table 1) Of the 59 contacts with altered electroneuromyography, 81.3% (48/59) were contacts of MB index cases, although this antecedent did not confer a greater chance of alteration in this examination (OR, 0.99; CI95%, 0.45 to 2.15; $p=0.9865$).

Only 32.2% (19/59) presented neural thickening in the clinical evaluation. However, the presence of neural thickening at the physical examination conferred a 2.94-fold higher chance of presenting ENMG abnormality (OR, 2.94; CI95%, 1.43 to 6.00; $p=0.0031$). The mean number of nerves affected was 1.44 per contact. The nerves most frequently affected were the common fibular in the

fibula head segment (38.8%; 33/85), followed by the sensory ulnar (27.1%; 23/85), ulnar in the elbow segment (12.9%; 11/85) and superficial fibular (9.5%; 8/85) (Table 2).

In the neurophysiological pattern observed in ENMG, 69.5% (41/59) presented only one altered nerve (mononeuropathy), and 30.5% (18/59) two or more altered nerves (asymmetrical multiple mononeuropathy). The ENMG pattern and its distribution are detailed in Table 3.

According to clinical data and the ENMG results, 50.8% (30/59) of LHHC demonstrated at least one nerve eligible for biopsy, but only 60.0% (18/30) of those were submitted to this process. The nerve most frequently submitted to biopsy was the sensory ulnar - dorsal cutaneous of the hand (72.3%; 13/18), followed by superficial fibular (16.7%; 3/18), sural (5.5%; 1/18), and deep fibular (5.5%; 1/18). Only 27.8% (5/18) of the nerves that had undergone biopsy presented some anatomopathological alterations, suggestive of leprosy, such as endoneural or epineural infiltrate, presence of fibrosis, perineural thickening or presence of endoneural granuloma. No LHHC presented positive bacilloscopy in the peripheral nerve biopsy. On the other hand, qPCR of nerve biopsies was positive in 61.1% (11/18) of the cases. The qPCR of the suprajacent skin area was positive in only 16.7% (3/18) of the nerve biopsies, whereas bacilloscopy was negative in all samples.

Among LHHC with abnormalities in ENMG, 93.2% (55/59) were positive to ELISA anti-PGL1 test, against a positivity of 79.5% (120/151) among LHHC without ENMG abnormalities, representing a 3.55-fold greater chance for the occurrence of neural impairment (CI95%, 1.15 to 10.55; $p=0.0225$). In reference to the peripheral blood qPCR test, LHHC with positive results presented a 2.06-fold higher chance for the occurrence of the neural impairment (CI95%, 1.11 to 3.82; $p=0.0216$). LHHC with one or more BCG scars displayed a protective effect of 0.66 against the appearance of neural impairment (CI95%, 0.31 to 1.42), although the difference was not statistically significant ($P > 0.05$) (Table 4).

In order to further explore the complex interaction among the test results, a multivariate statistical method was conducted to confirm the dependence relation of the variables elucidated above with the chance of occurrence of ENMG abnormalities, demonstrating that ELISA anti-PGL-1 positivity confers a 4.04-fold greater chance of neural damage (OR, 4.04; CI95%, 1.24 to 13.21; $p=0.020$), while peripheral blood qPCR positivity gives a 2.08-fold higher chance (OR, 2.08; CI95%, 1.08 to 4.02; $p=0.028$); and the presence of at least one BCG vaccine scar demonstrated 2.44-fold greater protection against neural impairment (OR, 0.41; CI95%, 0.18 to 0.98; $p=0.044$). There was no dependence relation with the variables intradermal smear qPCR or skin biopsy qPCR. (Table 5)

The combination of unfavorable results from the three assays (no BCG scars, seropositivity to ELISA anti-PGL1 and positive qPCR in peripheral blood) indicated the highest probability (62.6%) of neural impairment in the contacts. The presence of the positive results for BCG scars in the other combinations of risk factors reduced the probability of neural impairment. In the group of contacts with favorable results (presence of BCG scars, negative ELISA anti PGL-1 and negative qPCR in peripheral blood) presented the lowest probability (7.6%) of neural damage (Table 6).

Discussion:

This is an epidemiological study in southeastern Brazil, where leprosy is endemic, that measured the risks of neural impairment in asymptomatic LHHC over a 2-year period. This was the first study that evaluated the neural involvement in asymptomatic LHHC, through a combination of serological, molecular and neurophysiological tests.

The prevalence of abnormalities in the ENMG was 31.4% in the SPHHC, 2.4-fold higher than in SNHHC, reinforcing the importance of epidemiological surveillance and follow-up of LHHC, and allowing early recognition, by a

combination of diagnostic tools, of neural impairment in this population.

Previous studies have already documented the occurrence of neural involvement in LHHC. In endemic countries, subclinical neural impairment may be the first and only clinical manifestation of leprosy, and when appropriately recognized may contribute to early diagnosis and treatment of leprosy, which by definition is primarily neural [16,17,18,19,20].

Some ENMG abnormalities may precede the classic clinical symptoms of leprosy, such as the absence or amplitude reduction of the SAP of some nerves, early focal myelinic impairment, which is corroborated by our findings in this asymptomatic HHC [20-22].

Although theoretically asymptomatic, some LHHC already had at least one abnormality detected in the detailed neurologic physical examination, mainly sensory impairment and neural thickening, corroborating the pattern described in the classical forms of leprosy, an asymmetric peripheral neuropathy that is predominantly sensorial. These contacts present a subclinical form in which the ENMG is superior to the evaluation of the thermal, tactile and vibratory sensitivity, with capacity for early detection of neural impairment [23,24,25].

Neural thickening, despite being one of the cardinal signs in leprosy and a risk factor for the presence of ENMG abnormalities as demonstrated in the present study, is a subjective parameter and does not always show agreement with the ENMG, since only one third of the LHHC with abnormality in ENMG presented neural thickening [24,25,26].

The LHHC of MB patients did not present a higher risk of neural impairment, although this factor is associated with an increase in the disease outcome in several prospective studies [6,9,10,11,12], which only evaluated the natural history of the disease, but without a neurophysiological, serological or molecular intervention for early diagnosis as in this paper.

Our results have demonstrated that ELISA anti-PGL1 is the most important test in determining the increased chance of neural impairment in asymptomatic

LHHC, corroborating previous studies that have also demonstrated its importance as a screening test in the definition of LHHC that present a higher risk of illness. The use of the ELISA anti-PGL-1 test is justified due to its high correlation with MB clinical forms, being directly proportional to bacillary load and also its association with an increased risk of developing leprosy in SPHHC [7,10,12,13,27,28,29].

BCG vaccination has been associated with the prevention of leprosy in different studies, especially MB forms [7,30,31,32,33]. Based on our results, the presence of one or more BCG scars provided protection against neural damage evaluated by ENMG, especially in cases found negative in the ELISA anti-PGL1 and peripheral blood qPCR tests. Thus, an additional intradermal BCG booster dose should be maintained in leprosy control programs for LHHC, aiming for protection against leprosy, including neural forms [7,34,35].

As to molecular evaluation, several studies have shown good prospects regarding the detection of *M. leprae* in several samples (blood, skin, swabs, smear) of leprosy patients and LHHC with qPCR, contributing to the definition of the existence of asymptomatic carriers and subclinical infection [10,11,14,15,36,37]. In a previous paper by our group, the positivity of peripheral blood qPCR was 6.7% with a 5.54-fold risk for disease outcome [10]. Our results reinforce these data, thus demonstrating an increased chance of neural involvement in HHC with positive peripheral blood qPCR.

Although the qPCR positivity of intradermic smear and skin biopsy did not determine an increased risk of neural damage in the present study, these tools play a role in diagnostic confirmation, even allowing the start of treatment in asymptomatic HHC.

LHHC constitute a recognizable group of individuals at high risk for disease development so that their participation in the dissemination of *M. leprae* to susceptible individuals in endemic communities cannot be neglected [10]. Despite significant progress in controlling leprosy in recent years, early

identification of cases remains one of the primary goals and challenges of leprosy control programs.

Therefore, with the prospect of eliminating leprosy as a public health problem in Brazil, the development and implementation of more specific and sensitive methods for the detection of *M. leprae* and its neural impairment, using immunological, molecular and neurophysiological tools are mandatory to increase the knowledge of leprosy epidemiology, to break its chain of transmission, thereby enabling effective control of this disease.

We propose a new guideline and recommendations for LHHC follow-up (Figure 2). We suggest annual monitoring through serological (ELISA anti-PGL1) evaluation for at least 5-7 years, considering its better risk-benefit in relation to neural impairment and development of MB clinical forms [28].

The use of the three assays in combination (ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR and BCG scars) may identify individuals at high risk of developing leprosy neuropathy, not only justifying the early start of treatment in those whose diagnosis is confirmed by intradermal smear qPCR and/or altered ENMG, but also indicating chemoprophylaxis in those who do not yet present clinical and neurophysiological evidence of neural impairment.

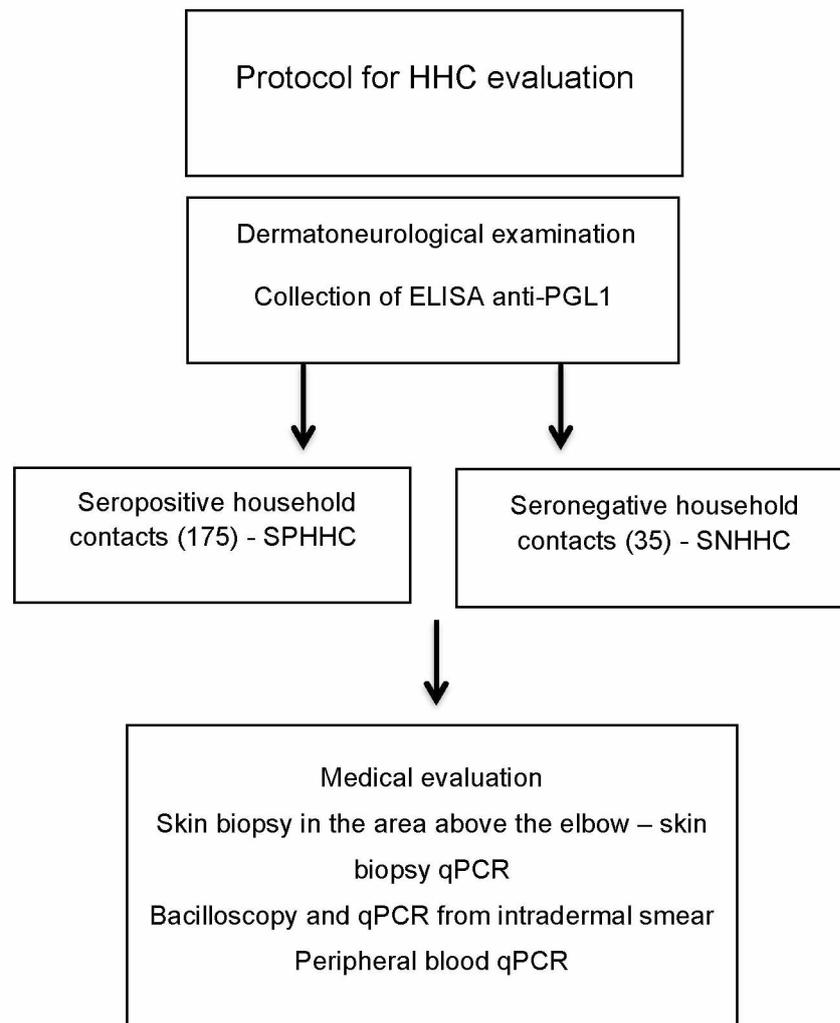


Figure 1- Protocol for recruitment of asymptomatic household contacts of patients with leprosy.

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. ENMG = Electroneuromyography. HHC = household contact. SPHHC = seropositive household contacts. SNHHC = seronegative household contacts.

Table 1 – Epidemiological, clinical and laboratory characteristics among the household contacts of patients diagnosed with leprosy.

	Seropositive HHC n=175	Seronegative HHC n=35	p value
Age	30.9±16.2	33.1 ±14.6	0.2297
Sex	24.0% (42/175)	22.9% (8/35)	0.8848
Male	76% (133/175)	77.1% (27/35)	
Female			
Type of contact	76.6% (134/175)	82.9% (29/35)	0.4154
Intradomiciliary	23.4% (41/175)	17.1% (6/35)	
Extradomiciliary			
Index case	82.9% (145/175)	82.9% (29/35)	1.0
Multibacillary	17.1% (30/175)	17.1% (6/35)	
Paucibacillary			
ELISA index	2.05 ±0.82	0.52 ±0.18	0.0001
Peripheral blood qPCR	40.6% (71/175)	8.6% (3/35)	0.0003
Slit skin smear qPCR	47.4% (83/175)	17.1% (6/35)	0.0009
Bacilloscopy	4% (7/175)	0.0% (-/35)	-
Neural thickening	21.1% (37/175)	8.6% (3/35)	0.0838
Sensory symptoms (intra-dermal)	18.3% (32/175)	14.3% (5/35)	0.5717
Sensory symptoms (truncal)	17.1% (30/175)	8.6% (3/35)	0.2079
Muscular weakness	2.3% (4/175)	2.8% (1/35)	0.8598
BCG scar			
Absent	13.1% (23/175)	40.0% (14/35)	0.0001
Present (≥1)	86.9% (152/175)	60.0% (21/35)	
Abnormal ENMG	31.4% (55/175)	13.3% (4/35)	0.0163

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. HHC = household contact. ENMG = Electroneuromyography. BCG = Bacillus Calmette-Guérin.

Table 2 – Distribution of peripheral nerves most involved in the electroneuromyographic evaluation of the household contacts of patients with leprosy diagnosis.

Affected Nerves	n	%
Common fibular	33	38.8
Sensorial ulnar	23	27.1
Motor ulnar	11	12.9
Superficial fibular	8	9.5
Sensorial median	2	2,3
Superficial radial	2	2,3
Medial cutaneous of the forearm	2	2,3
Sural	1	1,2
Lateral cutaneous of the forearm	1	1,2
Motor median	1	1,2
Deep fibular	1	1,2
Total nerves	85	100

Table 3 – Distribution of the electroneuromyographic pattern in the neurophysiological evaluation of household contacts of patients with leprosy diagnosis.

Electroneuromyographic pattern	n	%
Sensory axonal mononeuropathy	25	42.4
Focal demyelinating mononeuropathy	16	27.1
Asymmetrical sensory and motor demyelinating multiple mononeuropathy	10	16.9
Asymmetrical sensory and motor axonal neuropathy with focal slowing of conduction velocity	6	10.2
Asymmetrical sensory axonal multiple mononeuropathy	2	3.4
Total	59	

Table 4 – Evaluation of the chance of peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography in household contacts of patients with leprosy according to ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR and BCG scar.

	Abnormal ENMG N=59	Normal ENMG N=151	ODDS	CI 95%	p value
ELISA anti-PGL1					
Positive	55	120	3.55	1.155-10.555	0.0225
Negative	4	31			
Peripheral blood qPCR					
Positive	28	46	2.06	1.111-3.822	0.0216
Negative	31	105			
Intradermal smear qPCR					
Positive	26	63	1.10	0.599-2.020	0.7572
Negative	33	88			
Skin biopsy qPCR					
Positive	15	37	1.05	0.525-2.101	0.8895
Negative	44	114			
BCG scar					
≥1	46	127	0.66	0.314-1.422	0.3963
Absent	13	24			

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. ENMG = electroneuromyography
HHC = household contact. BCG = Bacillus Calmette-Guérin.

Table 5 – Analyses of dependence relationship between peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography and the variables ELISA anti-PGL1, intradermal smear qPCR, skin biopsy qPCR, peripheral blood qPCR and BCG scar, through multiple logistic regression.

Risk factor	p	ODDS	CI 95%	Dependence Relation
ELISA anti-PGL1	0.0206	4.04	1.24-13.21	Yes
Peripheral blood qPCR	0.0288	2.08	1.08-4.02	Yes
Slit skin smear qPCR	0.4186	0.75	0.38-1.49	No
Skin biopsy qPCR	0.9376	0.97	0.46-2.06	No
BCG scar	0.0442	0.41	0.18-0.98	Yes

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. BCG = Bacillus Calmette-Guérin.

Table 6- Probability of peripheral neural impairment demonstrated by electroneuromyography in household contacts of patients with leprosy according to risk factor combinations (ELISA anti-PGL1, peripheral blood qPCR and BCG scar)

Risk factor combinations	Probability of neural impairment (%)
ELISA anti-PGL1 +/- Peripheral blood qPCR +/- BCG -	62.6
ELISA anti-PGL1 +/- Peripheral blood qPCR -/BCG -	44.5
ELISA anti-PGL1 +/- Peripheral blood qPCR +/-BCG +	41.2
ELISA anti-PGL1 -/ Peripheral blood qPCR +/-BCG -	29.2
ELISA anti-PGL1 +/- Peripheral blood qPCR -/BCG +	25.2
ELISA anti-PGL1 -/ Peripheral blood qPCR -/BCG -	16.5
ELISA anti-PGL1 -/ Peripheral blood qPCR -/BCG +	7.6

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. BCG = Bacillus Calmette-Guérin.

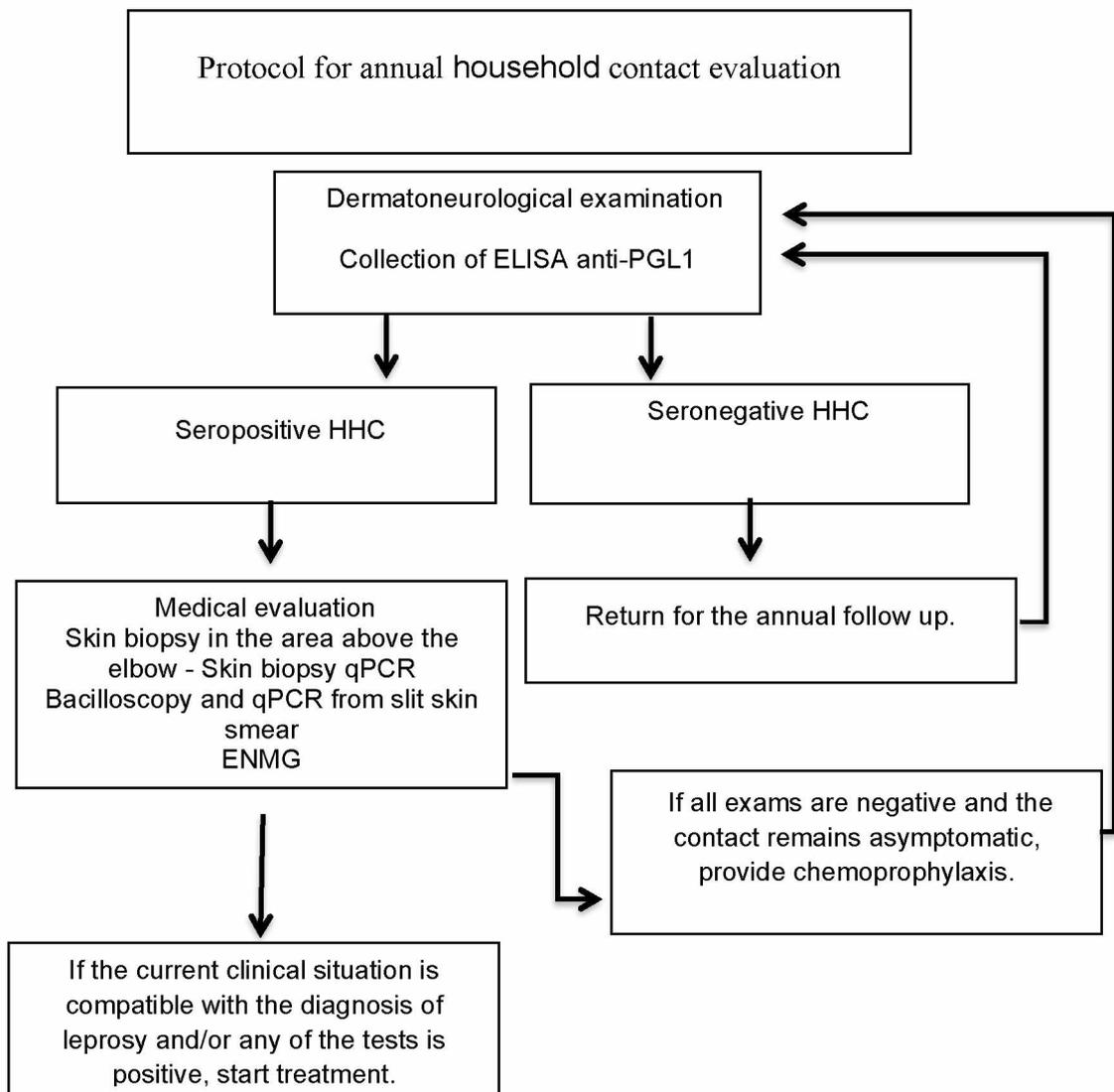


Figure 2- Protocol proposed for annual household leprosy contacts evaluation.

qPCR = Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. ENMG = electroneuromyography. HHC = household contact.

References

- 1- World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. September 2016. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/249601/1/WER9135.pdf?ua=1>. Accessed April 2017.
- 2- Carneiro M, Possuelo LG, Valim ARM. Leprosy neuropathy: delayed diagnosis or a difficult diagnosis? *Cad. Saúde Pública*, 2011; 27:2069-2070.
- 3- Chaptini C, Marshman G. Leprosy: a review on elimination, reducing the disease burden, and future research. *Lepr Rev*, 2015; 86:307-315.
- 4- Tiwari A, Richardus JH. Investment case concepts in leprosy elimination: A systematic review. *Lepr Rev*, 2016; 87:2-22.
- 5- Smith CS, Aerts A, Kita E, Virmond M. Time to define leprosy elimination as zero leprosy transmission? *Lancet Infect Dis*, 2016; 16:398-399.
- 6- Goulart IM, Souza DOB, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol*, 2008; 15:101-105.
- 7- Araujo S, Rezende MMF, Sousa DCR, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2015; 48:739-745.
- 8- Goulart LR, Goulart IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res*, 2009; 301:123-137.

- 9- Moet FJ, Meima A, Oskam I, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev*, 2004; 75:310-326.
- 10- Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IMB. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clinical Infectious Diseases*, 2016; 63:1412-1420.
- 11- Reis EM, Araujo S, Lobato J, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20:447-452.
- 12- Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012; 107:55-59.
- 13- Lobato J, Costa MP, Reis EM, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev*, 2011; 82:1-14.
- 14- Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008; 2:e328
- 15- Goulart IM, Araujo S, Filho AB, de Paiva PH, Goulart LR. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. *Journal of clinical microbiology*, 2015; 53:3345-3348.
- 16- Abbot NC, Beck JS, Samson PD, et al. Impairment of fingertip vasomotor reflexes in leprosy patients and apparently healthy contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1991; 59:537-47

- 17- Wilder-Smith E, Wilder-Smith A, Egger M. Peripheral autonomic nerve dysfunction in asymptomatic leprosy contacts. *J Neurol Sci*, 1997; 150:33-38.
- 18- Wilder-Smith E, Wilder-Smith A, Van Brakel WH, Egger M. Vasomotor reflex testing in leprosy patients, healthy contacts and controls: a cross-sectional study in Western Nepal. *Lepr Rev*, 1996; 67:306-317.
- 19- Wilder-Smith E, Wilder-Smith A. Electrophysiological evaluation of peripheral autonomic function in leprosy patients, leprosy contacts and controls. *International Journal of Leprosy*, 1996; 64:433-440.
- 20- Furini-Bazan R. Early detection of peripheral nerve impairment in household contact of leprosy patients. 2008. p. 73. Dissertation (Máster Degree) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- 21- Bathala L, Kumar K, Pathapati R, Jain S, Visser LH. Ulnar neuropathy in Hansen disease: clinical, high-resolution ultrasound and electrophysiologic correlations. *Journal of Clinical Neurophysiology* 2012; 2:190-193.
- 22- Wilder-Smit E, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its management. *Nature Clinical Practice - Neurology*, 2008; 12:656-663.
- 23- Lima PO, Cunha FM, Gonçalves HS, Aires MA, De Almeida RL, Kerr LR. Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. *Lepr Rev*, 2016; 87:60-70.
- 24- Van Brakel WH, Nicholls PG, Wilder-Smith EP, Das L, Barkataki P, Lockwood DN. Early diagnosis of neuropathy in leprosy - comparing diagnostic tests in a large prospective study. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008; 4:e212.
- 25- Garbino JA, Marques JRW, Barreto JA, et al. Primary neural leprosy: systematic review. *Arq Neuropsiquiatr*, 2013; 71:397-404.
- 26- Jardim MR, Antunes SJG, Santos AR, et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol*, 2003; 250:806-809.

- 27-Jardim MR, Antunes SLG, Simons B, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy, 2005; 76:232-240.
- 28-Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diag Lab Immunol*, 2004; 11:897–900.
- 29-Penna ML, Penna GO, Iglesias PC, Natal S, Rodrigues LC. Anti-PGL-1 positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and metanalysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016; 10:e0004703.
- 30-Yanagisawa K. On the immunological relationship between tuberculosis and leprosy with special reference to the effect of BCG administration upon the prophylaxis of Leprosy. *La Lepro*, 1960; 26:37-47.
- 31-Setia MS, Steinmaus C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect*, 2006; 6:162–170.
- 32-Convit, J, Smiths PG, Zuniga M, et al. BCG vaccination protects against leprosy in Venezuela: a case-control study. *Int. J. of Lepr. and other Mycobact. Dis*, 1993; 61:185–191.
- 33-Muliyil J, Nelson KE, Diamond EL. Effect of BCG on the risk of leprosy in an endemic area: a case-control study. *Int. J. of Lepr. and other Mycobact. Dis*, 1991; 59:229–236.
- 34-Convit J, Sampson C, Zuniga M, et al. Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. *Lancet*, 1992; 339:446–450.
- 35-Ministério da Saúde do Brasil. Guidelines for surveillance, care and elimination of Leprosy as a Public Health problem: technical and operational manual. Available at: http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/diretrizes_par

a_.eliminacao_hanseniose_-_manual_-_3fev16_isbn_nucom_final_2.pdf.

Accessed April 2017.

- 36-Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Goncalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect*, 2011; 17:1653-1658.
- 37-Martinez AN, Talhari C, Moraes MO. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014; 8:e2655.

6- Considerações Finais

A hanseníase é uma doença primariamente neural.

A neuropatia hansênica se apresenta sempre de forma assimétrica, com predomínio de sintomas sensitivos, com um maior comprometimento de fibras finas.

A presença de espessamento neural embora não patognomônico, é um sinal importante no diagnóstico da neuropatia hansênica.

O nervos mais alterados foram o ulnar no segmento do cotovelo, fibular comum no segmento da cabeça da fibula, ulnar sensitivo e fibular superficial.

A maioria dos pacientes com diagnóstico de HNP e contatos domiciliares com diagnóstico de infecção subclínica apresentaram padrão de mononeuropatia, reforçando a importância do diagnóstico precoce.

A sorologia ELISA anti-PGL1 é um importante método diagnóstico complementar, pois está presente em mais da metade dos casos de HNP, e confere uma maior chance de comprometimento neural periférico em contatos domiciliares soropositivos.

A avaliação molecular por meio da qPCR em amostras de raspado intradérmico e biópsia de pele demonstra positividade na maior parte dos pacientes com HNP, confirmando que apesar de primariamente neural, esta neuropatia na maioria das vezes não é neural pura.

A biópsia de nervo periférico é uma importante ferramenta diagnóstica, sobretudo quando é submetida à baciloscopia, histopatologia e avaliação molecular por meio da qPCR.

A quantidade de nervos comprometidos não pode definir isoladamente o perfil imune dos pacientes com HNP, já que os pacientes com padrão de mononeuropatia apresentaram maiores índices ELISA anti-PGL1, inferindo um espectro multibacilar, com predomínio de resposta humoral.

O tratamento de pacientes com HNP não pode ser fundamentado apenas na quantidade de nervos alterados.

A presença de uma ou mais cicatriz vacinal de BCG confere um efeito protetor contra o comprometimento neural em contatos domiciliares.

A combinação de métodos complementares sorológicos, moleculares e neurofisiológicos é essencial para o diagnóstico precoce da neuropatia hansênica.

7- Referências

- ABBOT, N.C. et al. Impairment of fingertip vasomotor reflexes in leprosy patients and apparently healthy contacts. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, V. 59, P. 537-47, 1991.
- AGRAWAL, A. et al. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. **Clinical Neurology And Neurosurgery**, v. 107, n. 6, p. 445-454, out. 2005.
- ANDRADE, G.B. Aspectos neurofisiológicos da hanseníase. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. 2010.
- ANTUNES, D.E. et al. Number of leprosy reactions during treatment: clinical correlations and laboratory diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 741-745, nov/dec. 2016.
- ANTUNES, D. E. et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 901-8, Nov. 2013.
- ANTUNES, S.L. et al. An immunohistochemical, clinical and electroneuromyographic correlative study of the neural markers in the neuritic form of leprosy. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, p. 1071-1081, 2006.
- ANTUNES, S.L. et al. Histopatological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 246-253, 2012.
- APPLIED BIOSYSTEMS, Real-Time PCR handbook. 2nd Edition, 2012.
- ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.
- ARAÚJO, S. Epidemiologia molecular da hanseníase: Sorologia anti PGL-I e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares. 2012. 41f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia/UFU. Uberlândia. 2012a.
- ARAÚJO, S. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, supl. 1, p. 55-59, dec. 2012b.
- ARAÚJO, S. et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin

vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 739-745, 2015.

ARAUJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Cinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, dec. 01 2016.

BATHALA, L. et al. Ulnar neuropathy in Hansen disease: clinical, high-resolution ultrasound and electrophysiologic correlations. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 2, p. 190-193, 2012.

BHAT, R.M. et al. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

BOKU, N.; LOCKWOOD, D.N.; BALAGON, M.V. Impacts of the diagnosis of leprosy and of visible impairments amongst people affected by leprosy in Cebu, the Philippines. **Lepr Rev**, v. 81, p. 111–20, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde 2016;58p.

BRITO, M.F.M. et al. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, supl. 2, p. 67-72, 2008.

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

BUHRER-SEKULA, S. et al. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.58, n.2, p.133-6, 1998.

CARNEIRO, M.; POSSUELO, L.G.; VALIM, A.R.M. Neuropatia por hanseníase: atraso no diagnóstico ou um diagnóstico difícil? **Cad. Saúde Pública**, v. 27, n. 10, p. 2069-2070, 2011.

CHAPTINI, C.; MARSHMAN, G. Leprosy: a review on elimination, reducing the disease burden, and future research. **Lepr Rev**, v. 86, p. 307-315.

CHAURASIA, R.N. et al. Nerve conduction studies in paucibacillary and multibacillary leprosy: a comparative evaluation. *Lepr* 2011, v. 83, p. 15-22, 2011.

CHELH, S.; JOB, C. K.; HASTINGS, R. C. Transmission of leprosy in nude mice. *Am J Trop Med Hyg*, v. 34, n. 6, p. 1161-6, 1985.

CHEN, S. et al. Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Lepr Rev*, v. 77, p. 371-376, 2006.

CHIMELLI, L.; FREITAS, M. R. G.; NASCIMENTO, O. J. M. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. *J Neurol*, n. 4, p. 318-23, 1997.

CHO, S.N. et al. Detection of Phenolic Glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in Sera from Leprosy Patients before and after Start of Multidrug Therapy. *Clinical And Vaccine Immunology*, v. 8, n. 1, p.138-142, jan. 2001.

CONVIT, J. et al. Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. *Lancet*, v. 339, p. 446-450, 1992.

CONVIT, J. et al. BCG vaccination protects against leprosy in Venezuela: a case-control study. *Int. J. of Lepr. and other Mycobact. Dis*, v. 61, p. 185-191, 1993.

CUNHA, F.M.B et al. Pure neural leprosy: Diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle & Nerve*, v. 33, n. 3, p.409-414, 2006.

CURY, L. M. **Excluir, isolar e conviver: um estudo sobre a lepra e a hanseníase no Brasil**. 394f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

DASTUR, D. K.; RAMAMOCHAN, Y.; SHAH, J. S. Ultrastructure of lepromatous nerves. Neural pathogenesis in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 41, p. 147-80, 1973.

DE FARIA, C.R.; SILVA, I.M. Electromyographic diagnosis of leprosy. *Arq Bras Neuropsiquiatr*, v.48, p.404-413, 1990.

DE FREITAS, M.R.G.; NASCIMENTO, O.J.M.; QUAGLINO, E.A.M. Small-fiber polyneuropathy in leprosy without skin changes: study of 17 cases. *Arq Bras Neuropsiquiatr*, v.61, p.542-546, 2003.

DE FREITAS, M.R.G. et al. Isolated superficial peroneal nerve lesion in pure neural leprosy: case report. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, p. 535-539, 2004.

DE WIT, M.Y.L. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n.5, p. 906-910, 1991.

DE WIT, M.Y.L. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n.3, p. 502-506, 1993.

DESFORGES, S. et al. Specific anti-M leprae PGL-I antibodies and Mitsuda reaction in the management of household contacts in New Caledonia. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 57, n. 4, p. 794-800, 1989.

DHARMENDRA, L.J. The immunological skin tests in leprosy. Part II. The isolated protein antigen in relation to the classical Mitsuda reaction and the early reaction to lepromin. 1942. **The Indian journal of medical research**, v. 136, n. 3, p. 502-511, 2012.

DONOGHUE, H.D.; SPIGELMAN, M.; HOLTON, J. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p.177-182, fev. 2001.

DOS SANTOS, C.B.A. Estudo da distribuição da perda sensitiva na hanseníase. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. 2011.

DOS SANTOS, ACJ. Diagnóstico da hanseníase com base nas características da neuropatia hansênica. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. 2015.

DOUGLAS, J.T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, p. 897-900, 2004.

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

FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. **PloS one**, v. 8, n.11, 2013.

FLEURY, R.N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansen Int.**, v.14, n.2, p.101-106, 1989.

FLEURY, R.N. Patologia e manifestações viscerais. In: Opromolla DVA, editor. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; p. 63-71, 2000.

FOSS, N.T., OLIVEIRA, E.B., SILVA, C.L. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. **Int. j. Lepr.**, v. 61, p. 218-226, 1997.

FOSS, N. T, et al. **Hanseníase: episódios reacionais**. In FB Jatene, Projeto diretrizes, Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, Brasília, p. 161-179, 2005.

FREEDMAN, V.H.; WEINSTEIN, D.E.; KAPLAN, G. How Mycobacterium leprae infects peripheral nerves. **Leprosy**, v.70, p. 136-9, 1999.

FREITAS, L.R.S.; DUARTE, E.C.; GARCIA, L.P. Leprosy in Brasil and its association with characteristics of municipalities: ecological study, 2009-2011. **Tropical Medicine and International Health**, v.19, p.216-225, 2014.

FREITAS, M.R.G. et al. Isolated superficial peroneal nerve lesion in pure neural leprosy: case report. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo , v. 62, n. 2b, p. 535-539, June 2004 .

FREITAS, M.R.G. Infectious Neuropathies. **Curr. Opin. Neurol.**, London, v. 20, p.548-552, 2007.

FURINI, R. B. Detecção precoce do comprometimento de nervo periférico em comunicantes intradomiciliares de pacientes com hanseníase. Dissertação de Mestrado, área Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2008.

GARBINO, J.A. et al. Clinical and diagnostic aspects of the primarily neural leprosy. **Hansen Int.**, p. 130-6, 2004.

GARBINO, J.A. et al. Clinical and diagnostic aspects of the primarily neural leprosy. **Hansen Int**, p. 130-6. 2005.

GARBINO, J.A. et al. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. **Hansen Int**, p. 203-6 2007.

GARBINO, J.A. et al. A Randomized Clinical Trial of Oral Steroids for Ulnar

Neuropathy in Type 1 and 2 Leprosy Reactions. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v. 66 (4), p. 861-867, 2008

GARBINO, et al. Neurophysiological patterns of ulnar nerve neuropathy in leprosy reactions. **Lepr Rev**, v. 81, n. 3, p. 206-15, 2010.

GARBINO, J.A. et al. Hanseníase Neural Primária. **Projeto Diretrizes**, p. 1-26, 2011.

GARBINO, J.A. et al. Primary neural leprosy: systematic review. **Arq Neuropsiquiatr**, p.397-404, 2013.

GARBINO, J.A.; HEISE, C.O.; MARQUES, W.JR. Assessing nerves in leprosy. **Clin Dermatol**, v. 34, n. 1, p. 51-8, 2016.

GIRDHAR, B.K. Neuritic leprosy. **Indian J Lepr** , v. 68, p. 35-42, 1996.

GODAL, T., NEGASSI, K. Subclinical infection in leprosy. **British Med. J.**, v.3, p.557 559, 1973.

GORODEZKY, C. et al. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 82-92, 2004.

GOULART, I.M.B. et al. Detection of transforming growth Factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **Am. J. Pathol.**, v.148, n. 3, p. 911-917, 1996.

GOULART, I.M.B; MINEO, J.R.; FOSS, N.T. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.122, n.3, p.330-4, 2000.

GOULART, I.M; PENNA, G.O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 365-75, 2002.

GOULART, I.M.B. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Archives Of Dermatological Research**, v. 299, n. 5-6, p.267-271, maio 2007.

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

GOULART, I.M. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, p. 101-105, 2008.

GOULART, L.R.; GOULART, I.M.B. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res** v. 301, p. 123-137, 2009.

GOULART, I.M. et al. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3345-3348, 2015.

HARTSKEERL, R. A.; WIT, M. Y. L. de; KLATSER, P. R.. Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae*. **Microbiology**, v. 135, n. 9, p.2357-2364, set. 1989.

HASTINGS, R. C. *Medicine in the tropics, leprosy*. London: Churchill Livingstone. p. 1-14, 1985.

HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+ T cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **International immunology**. 2016.

HUI, M. et al. Pure neuritic leprosy: Resolving diagnosis issues in acid fast bacilli (AFB)-negative nerve biopsies: A single centre experience from South India. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 18, n. 2, p. 292-297, 2015.

HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728-35, 1981.

HUNTER, S.W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15072-8, 1982.

HUSSAIN, R. et al. Quantification of IgM antibodies to the *M. leprae* synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.58, p.491-502, 1990.

ILANGUMARAN, S. et al. Immunological profiles of leprosy patients and healthy family contacts toward *M. leprae* antigens. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 64, n. 1, p. 6-14, 1996.

JACOBSON, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Leprosy. **Lancet**, v. 353, p. 655-660, 1999.

JARDIM, M. R. et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J. Neurol.**, Berlin, v. 250, p. 806-809, 2003.

JARDIM, M. R. et al. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. **Lepr Rev**, v. 75, p. 242-53, 2004.

JARDIM, M. R.; ANTUNES, S. L.; SIMONS, B. Role of PGL-1 antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. **Lepr Rev**, n. 76, p. 232-40, 2005.

JARDIM, M. R. et al. Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 4, p. 969-973, 2007.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518-21, mar. 2008.

JUCKER-KUPPER. Gerhard Henrik Armauer Hansen biography. Who Named It. Disponível em: www.whonamedit.com.

KABELITZ, D.; MEDZHITOV, R. Innate immunity — cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. **Current Opinion In Immunology**, v. 19, n. 1, p.1-3, fev. 2007.

KHAMBATI, F.A. et al. Sensitivity and specificity of nerve palpation, monofilament testing and voluntary muscle testing in detecting peripheral nerve abnormality, using nerve conduction studies as gold standard, a study in 357 patients. **Lepr Rev**, v. 80, p.34-50, 2009.

KAUFMANN, S.H.; KABELITZ, D. Immunology of Infection: Academic Press, 2010.

KAUR, G. et al. A clinical, immunological and histological study of neuritic leprosy patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 59, p. 385-391, 1991.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317-37, apr. 2009.

KERR-PONTES, L.R. et al. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, p. 262–269, 2004.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-32, maio 2003.

KUMAR, B. et al. Pure Neuritic Leprosy in India: an Appraisal. **Int J Lepr**, v. 72, n 3, p. 284-90, 2004.

KUMAR, N. et al. Comprehensive electrophysiology in leprosy neuropathy – Is there a clinico-electrophysiological dissociation? **Clinical Neurophysiology**, v. 127, p. 2747–2755, 2016.

KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J.J. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 5, p. 1352-1356, 1998.

LIMA, P.O. et al. Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. **Lepr Rev**, v. 87, n. 1, p. 60-70, 2016.

LOBATO, M.P. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, p. 389–401, 2011.

LOCKWOOD, D. N.; SAUNDERSON, P. R. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. **International Health**, v. 4, n.2, p. 77–85, 2012.

LUGAO, H.B. et al. Asymmetric Nerve Enlargement: A Characteristic of Leprosy Neuropathy Demonstrated by Ultrasonography. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 12, p. e0004276, 2015.

MARQUES, W.JR. et al. Near-nerve potential in lepromatous leprosy. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 4, p. 460-3, 2003.

MARTINEZ, T.S. et al. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 17, n. 11, p.1653-1658, nov. 2011.

- MARTINEZ, A.N.; TALHARI, C.; MORAES, M.O. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, p. 2655, 2014.
- MATSUMURA, K. et al. A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. **Journal Biology Chem.** v. 272, n.13, p. 904-10, 1997.
- MATTOS, K. A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **J Leukocyte Biol**, v. 87, p. 371-84, 2010.
- MENICUCCI, L.A. et al. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, v. 52, n. 4, p.648-652, abr. 2005.
- MENZEL, S. et al. Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae in healthy household contacts of patients with leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 55, n. 4, p. 617-25, 1987.
- MODLIN, R.L.; REA, T.H. Leprosy: new insight into an ancient disease. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.17, n.1, p.113, 1987.
- MODLIN, R.L.; REA, T.H. Immunopathology of leprosy granulomas. **Springer seminars in immunopathology**, v.10, n. 4, p. 359-74, 1988.
- MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Current opinion in immunology**, v.22, n. 1, p. 48-54, 2010.
- MOET, F.J.; MEIMA, A.; OSKAM, I.; RICHARDUS, J.H. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev**, v. 75, p. 310-26, 2004.
- MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell host & microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-353, 2009.
- MOURA, R.S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 11-18, 2008.
- MULIYIL, J.; NELSON, K.E.; DIAMOND, E.L. Effect of BCG on the risk of leprosy in an endemic area: a case-control study. **Int. J. of Lepr. and other Mycobact. Dis**, v. 59, p. 229-236, 1991.
- NAAFS, B. Leprosy reactions: new knowledge. **Trop. Geogr. Med.**, v.46, n.2, p.80-84, 1994.

NASCIMENTO, O. J. M. Leprosy neuropathy: clinical presentations. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 71, n. 9-B, p. 661-6, 2013.

NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-24, 2000.

NOORDEEN, SK. Epidemiology of (poly) neuritic type of leprosy. **Lepr India**, p. 4490-4496, 1972.

NOORDEEN, SK. The epidemiology of leprosy. In; Hastings, RC. **Medicine in the tropics**, p15-30, 1985.

OOI, W. W.; SRINIVASAN, J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. **Muscle Nerve**, v. 30, n. 4, p. 393-409, 2004.

OPROMOLLA, D.V.A. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

PALERMO, M.D.L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p. 167-73, 2012.

PARENTE, J.N. et al. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **Anais brasileiros de dermatologia**, v.90, n.1, p. 41-7, 2015.

PATROCINIO, L.G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 311-6, 2005.

PENNA, M.L. et al. Anti-PGL-1 positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and metanalysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, p. 4703, 2016.

PFALTZGRAFF, R.R.; BRYCESON, A. Clinical leprosy. In: Hastings RC. **Medicine in the tropics**, p. 140-176, 1985.

PRESTON, C.; SHAPIRO, B.E. **Electromyography and neuromuscular disorders**: clinical-electrophysiologic correlations. 2nd ed. 2005.

RAMBUKKANA, A. et al. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. **Cell**, p. 811-21, 1997.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 21-7, 2001.

RAMBUKKANA, A. et al. Contact dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science**, v. 296, p. 927-31, 2002.

RAO, S.P.; BHARAMBE, M.S. Electroneurophysiological studies in early tuberculoide leprosy. **Indian J Lepr**, v. 65, p. 181-187, 1993.

REIS, E.M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical microbiology and infection**, v. 20, n.5, p 447-52, 2014.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. **Lepr Rev**, v. 33, p. 119–28, 1962.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to imunity: a five group system. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-273, 1966.

RIDLEY , D.S. Reactions in leprosy. **Lepr. Rev.**, v.40, p.77-81, 1969.

RIDLEY, D.S. Skin biopsy in leprosy. **Documenta Geigy** 3rd ed. Basle: CIBA-GEIGY, 63p, 1990.

RODRIGUES, G. et al. Primary neuritic leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 29, p. 1050-1052, 1993.

RODRIGUES, L.C.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy now: epidemiology, progress, challengres, and research gaps. **Lancet Infect Dis.**, v.11, p.464-70, 2011.

SABIN, T. D.; SWIFT, T. R.; JACOBSON, R. R. Leprosy. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. **Peripheral neuropathy**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005. p. 2081-2108.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v.10, n.1, 2016.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N. Expression and cytokinesecretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.69-76, 1998.

SANTOS, C. B. A. Estudo da distribuição da perda sensitiva na hanseníase. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. 2010.

SAUDERSON, P. et al. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risc factors and outcome. **Lepr Rev** v.

71, n. 3, p. 285-308, set. 2000.

SAUNDERSON, P. The epidemiology of reactions and nerve damage. **Lepr Rev**, v. 71, p. 106–10, 2000.

SCOLLARD, D. M. “The biology of nerve injury in leprosy.” **Lepr Rev**, v. 79, p. 242-53, 2008.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, p. 46-54, 2015.

SEHGAL, V. N.; BHATTACHARYA, S. N.; JAIN, S. Relapse or late reversal reaction? **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 58, n. 1, p. 118-21, mar. 1990.

SETIA, M.S. et al. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. **Lancet Infect**, v. 6, p. 162-170, 2006.

SHEPARD, C.C.; MCRAE, D.H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.36, n.1, p. 78-82, 1968.

SHIMOJ, Y. et al. A 21-KDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9857-62, 1999.

SMITH, C.S. et al. Time to define leprosy elimination as zero leprosy transmission? **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 398-399, 2016.

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

SOUSA, A. L. et al. Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 829-33, Nov. 2007.

SOUZA A.D.; EL-AZHARY, R.A.; FOSS, N.T. Management of chronic diseases: an overview of the Brazilian governmental leprosy program. **International Journal of Dermatology**, v. 48, p.109–116, 2009.

SPENCER, J.S.; BRENNAN, P.J. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 344-57, 2011.

SPIERINGS, E. et al. Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human schwann cells by CD4 th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. **J. Immunol.**, v. 166, p. 5883-5888, 2001.

SUNEETHA, S. et al. Histological changes in the nerve, skin and nasal mucosa of patients with primary neuritic leprosy. **Acta Leprol**, p.11-8, 2001.

SUNEETHA, S. et al. The development of cutaneous lesions during follow-up of patients with primary neuritic leprosy. **Int J Dermatol**, p. 224-9, 2005.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 291, n. 5508, p. 1544-7, feb. 2001.

TIWARI, A.; RICHARDUS, J.H. Investment case concepts in leprosy elimination: A systematic review. *Lepr Rev*, 2016; 87:2-22.

TOMASELLI, P.J. Hanseníase forma neural pura: aspectos clínicos e eletroneuromiográficos dos pacientes avaliados no serviço de doenças neuromusculares do HCRP da USP no período de março de 2001 a março de 2013. 2014. 95f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. 2014.

TRUMAN, R. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of Mycobacterium leprae. **Journal of clinical microbiology**, v.42, n. 6, p. 2558-65, 2004.

TRUMAN, R.W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2 n.11, p. 328, 2008.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B. Nerve damage in leprosy: an epidemiological and clinical study of 396 patients in West Nepal - Part 1. Definitions, methods and frequencies. **Lepr Rev**, p. 242-53, 1994.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B. Silent neuropathy in leprosy: an epidemiological description. **Lepr Rev**, v. 65, n. 4, p. 350-60, 1994.

VAN BRAKEL, W. H.; NICHOLLS, P. G.; DAS, L. The INFIR cohort study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reaction in leprosy. Methods and baseline of cohort of multibacillary leprosy patients in North India. **Lepr Rev**, p. 14-34, 2005.

VAN BRAKEL, W. H. et al. International workshop on neuropathology in leprosy--consensus report. **Leprosy Review**, v. 78, p. 416-433, 2007.

VAN BRAKEL, W. H. et al. Early diagnosis of neuropathy in leprosy- comparing diagnostic tests in a large prospective study (the INFIR cohort study). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. e212, 2008.

VIRMOND, M.; VIETH, H. Prevenção de incapacidades na hanseníase: uma análise crítica. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, n.3, p.358-363, 1997.

VITAL, R. T. et al. Progression of leprosy neuropathy: a case series study. **Brain and Behavior**, v. 2, n3, p. 249-55, 2012.

VITAL, R. T. et al. Isolated neuropathy as the first symptom of leprosy. **Muscle nerve**, v. 48, p. 179-184, 2013.

WADE, HW. The classification of leprosy: a proposed synthesis based primarily on the Rio de Janeiro-Havana System. **Int J Lepr**, v. 20, p. 429-62, 1952.

WHO. World Health Organization Expert Committee on leprosy. Sixth report, 1988. Tech.Rep. Ser.768.

WHO. World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, n.14, 2002.

WHO. World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, n.90, 2014.

WHO. Classification of leprosy. 2011. World Health Organization: Leprosy today. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/lep/en> (acesso em 2017).

WHO. World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, n.35, 2016.

WICHTWECHKARN, J. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.1, p. 45-49, 1995.

WILDER-SMITH, E. et al. Vasomotor reflex testing in leprosy patients, healthy contacts and controls: a cross-sectional study in Western Nepal. **Lepr Rev**, v. 67, p. 306-317, 1996.

WILDER-SMITH, E.; WILDER-SMITH, A. Electrophysiological evaluation of peripheral autonomic function in leprosy patients, leprosy contacts and controls. **International Journal of Leprosy**, v. 64, p. 433-440, 1996.

WILDER-SMITH, E.; WILDER-SMITH, A.; EGGER, M. Peripheral autonomic nerve dysfunction in asymptomatic leprosy contacts. **J Neurol Sci**, v. 150, p. 33-38, 1997.

WILDER-SMITH, E.P.; VAN BRAKEL, W.H. Nerve damage in leprosy and its management. **Nature Clinical Practice - Neurology**, v. 4, n. 12, p. 656–63, 2008.

WILLIAMS, D.L. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of infectious diseases**, v. 162, n. 1, p. 193-200, 1990.

WOODS, S.A.; COLE, S.T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS microbiology letters**, v.53, n. 3, p. 305-9, 1989.

YAMAMURA, M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 255, p. 5040-12, 1992.

YAMANOUCHI, A. A. et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 6, p. 396-404, nov/dez. 1993.

YANAGISAWA, K. On the immunological relationship between tuberculosis and leprosy with special reference to the effect of BCG administration upon the prophylaxis of Leprosy. **La Lepro**, v. 26, p. 37-47, 1960.

YAWALKAR, S.J. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**. 7ed. Basle: Novertis Foudation for Sustainable Development, 2002. 132p.

YOON, K. H. et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*: specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n.4, p.895-899, 1993.

8- Apêndices

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes.

Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes.

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada: ASPECTOS MOLECULARES, SOROLOGICOS E NEUROFISIOLOGICOS EM CONTATOS ASSINTOMATICOS DE PACIENTES COM DIAGNOSTICO DE HANSENIASE, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart e Dr. Diogo Fernandes dos Santos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Diogo Fernandes dos Santos e será entregue quando for realizada a avaliação inicial no Centro de Referência Nacional em Hanseníase/ Dermatologia Sanitária (CREDESH). A participação é espontânea, sendo que sua colaboração em nosso projeto de pesquisa certamente ajudará na condução e controle de pacientes com problemas semelhantes aos que V.S. possui. As informações relevantes e as etapas da pesquisa serão descritas a seguir, para que V.S. tome ciência do teor do protocolo a ser desenvolvido:

A hanseníase é uma doença que afeta principalmente a pele e os nervos. No início da doença, os sintomas são dificilmente notados e, durante o seu desenvolvimento, as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves seqüelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo. Por isso, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção. Para isso, a equipe de saúde do CREDESH/UFU está propondo esta pesquisa com objetivo de promover um diagnóstico precoce desta doença.

Espera-se que com este estudo seja possível detectar possíveis portadores sadios e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe do CREDESH/UFU, a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares, diminuir o risco de contágio da população e dessa forma, interromper a cadeia de transmissão da hanseníase.

Todos participantes deverão ser submetidos aos exames já realizados de rotina para o diagnóstico da hanseníase nos contatos de pacientes com diagnóstico de hanseníase, independente da realização desta pesquisa. Além disso, todos serão submetidos a realização de uma eletroneuromiografia (um exame complementar utilizado de rotina no diagnóstico de diversas doenças neuromusculares). Antes da realização do mesmo, V.S. será orientado (a) sobre os objetivos do exame e a forma de sua realização. O protocolo do exame consiste basicamente no estudo de condução motora e sensitiva, no qual será submetido a estímulos elétricos intermitentes, que, eventualmente, podem ser percebidos de forma incômoda. Caso o V.S. refira dor, os estímulos serão imediatamente interrompidos e retomados somente após sua autorização. Os estímulos elétricos utilizados durante o exame não provocam dano a sua saúde, pois seguem os critérios já padronizados de segurança elétrica, não havendo o risco de lesão tecidual ou mesmo manutenção de qualquer desconforto após a finalização do procedimento.

É direito do paciente e seus contatos pedirem esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, se concordarem em participar da pesquisa, poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Você não terá gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Cabe ressaltar que os participantes desse estudo receberão vale transporte (ida e volta) e alimentação durante o período que estiver no CREDESH.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart e Dr. Diogo Fernandes dos Santos– CREDESH. Avenida Aspirante Mega, n. 125, bairro: Jaraguá – Uberlândia-MG. Fone: (34)32167872.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, ____/____/____

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

Apêndice B – Protocolo de abordagem e seguimento de contato em hanseníase.

Caso Índice: _____ Prontuário _____

Grau de Parentesco: _____

Tempo Exposição (meses): _____

Idade na Abordagem: _____

Tratou anteriormente: () Não () Sim ___/___/___ a
___/___/___ Local: _____

Tipo de Contato:

Intradomiciliar Extradomiciliar

Intradomiciliar-intimo Extradomiciliar-intimo

Ocupacional Ignorado

Forma Clínica:

I T Ts DT DD DV Vsp VV

TR DTR DDR DVR

HNPT HNPDT HNPDD

Cicatriz do BCG: **Profilaxia do BCG - Data da Administração da dose**

0 1 2 ___/___/___ 1ª Dose ___/___/___

Se 0 cicatriz aplica 1º dose; 2ª Dose ___/___/___

Se 1 cicatriz aplica 2º dose;

Se 2 cicatriz não aplica .

Classificação Operacional: PB MB

1. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

2. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

3. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

4. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

5. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

6. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

7. Realização Exame Dermato Neurológico: Não Sim: ___/___/___

1. Mitsuda Aplicado ___/___/___ Leitura ___/___/___ 2. Mitsuda: Aplicado ___/___/___ Leitura ___/___/___

Negativo ___mm Positivo ___mm Negativo ___mm Positivo ___mm

Perdeu Leitura Uso de corticóide Não fez Perdeu Leitura Uso de corticóide Não fez

Flutuante Ulcerado Flutuante Ulcerado



Universidade Federal de
Uberlândia

Av. Aspirante Mega, 77 – Bairro Jaraguá – 38413-018 – Uberlândia-MG

☎/Fax (034) 3216-7872 / 3238-1530

☑ www.credesh.ufu.br credsh@hc.ufu.br

05/01/2015



Hospital de Clínicas
de Uberlândia



1. Esfregaço – Baciloscopia: Data da Coleta ___/___/___ Data Resultado ___/___/___
 Resultado Baciloscópico: Neg. Pos. MIB: _____ **1. PCR de Esfregaço:** Neg. Pos CT: / /
 LD _____ CD _____ JD _____ L1 _____ Local: _____
 LE _____ CE _____ JE _____ L2 _____ Local: _____

2 Esfregaço – Baciloscopia: Data da Coleta ___/___/___ Data Resultado ___/___/___
 Resultado Baciloscópico: Neg. Pos. MIB: _____ **2. PCR de Esfregaço:** Neg. Pos CT: / /
 LD _____ CD _____ JD _____ L1 _____ Local: _____
 LE _____ CE _____ JE _____ L2 _____ Local: _____

1. Biópsia de Pele Data: ___/___/___ Baciloscopia: Neg. Pos. ___

1.PCR de Pele: Neg. Pos CT: / /

Descrição: _____

2. Biópsia de Pele Data: ___/___/___ Baciloscopia: Neg. Pos. ___

2. PCR de Pele: Neg. Pos CT: / /

Descrição: _____

Exames Sorológicos e Moleculares no Acompanhamento/Seguimento do Contato

Exames	Data	Resultado	Exames	Data	Resultado
01 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	01 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
02 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	02 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
03 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	03 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
04 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	04 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
05 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	05 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
06 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	06 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
07 ELISA	___/___/___	qNeg qPos _____	07 PCR Sangue	___/___/___	qNeg qPos _____
01 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
02 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
03 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
04 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
05 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
06 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			
07 Teste Rápido	___/___/___	qNeg qPos _____			

Situação de Acompanhamento do Contato:

Data último comparecimento: ___/___/___ Data retorno próximo ano: ___/___/___

qEm acompanhamento qÓbito qAbandono q Mudou-se

q Adoeceu - PACIENTE ___/___/___ q Adoeceu – PACIENTE Co-prevalência ___/___/___

qAcompanhado de 5 a 7 anos (alta) qNão compareceu ao acompanhamento anual

Observação:

Apêndice C – Atendimento neurológico em pacientes suspeitos de neuropatia.

Nome: _____ Prontuário: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Profissão: _____

QP: _____

HMA: _____

Antecedentes Pessoais: _____

Antecedentes familiares: _____

Resultado do Exames de Eletro-neuromiografia - Alterado: ()SIM ()NÃO Data Exame: ___/___/___

Laudo: _____

Exame Neurológico Dirigido:

FORÇA BRAÇO	D	E	FORÇA PERNA	D	E	REFLEXOS PROFUNDOS	D	E
Flexão pescoço			Flexão quadril			Bicipal		
Extensão pescoço			Extensão quadril			Estilorradial		
Rot lat pescoço			Adução coxa			Tricipital		
Elevação ombro			Abdução coxa			Flexor dos dedos		
Rotação lat braço			Extensão perna			Patelar		
Rotação med braço			Flexão perna			Aquileo		
Adução braço			Flexão dorsal pé			Flexor artelhos		
Abdução braço <15°			Flexão plantar pé			Outros		
Abdução braço >15°			Inversão pé					
Flexão antebraço			Eversão pé			REFLEXOS CUTÂNEOS	D	E
Supinação			FI dorsal dedos			Cutâneo abdominal superior		
Pronação			FI plantar dedos			Cutâneo abdominal médio		
Extensão			Outros			Cutâneo abdominal inferior		
Punho								
Flexão Punho			Palpação Nervos	D	E		SIM	NÃO
Extensão dedos			Ulnar			Sensibilidade		
FI falange distal polegar			Radial			Fadiga		
FI falange distal DII			Fibular			Miotonia		
FI falange distal DV			Tibial			Fasciculações		
Abdução do polegar			Outros			Trofismo		
Abdução dedo V						Tônus		

Legenda: Força Braço e Perna: 0, 1, 2, 3, 4, 5 Reflexos Profundos e Cutâneos: 0, 1, 2, 3, 4 Palpação Nervos: N, E, D, C

Diagnóstico: _____

Sindrômico: _____

Topográfico: _____

Etiológico: _____

Informação Requisitada: _____



Universidade Federal de
Uberlândia

Página 1 de 2

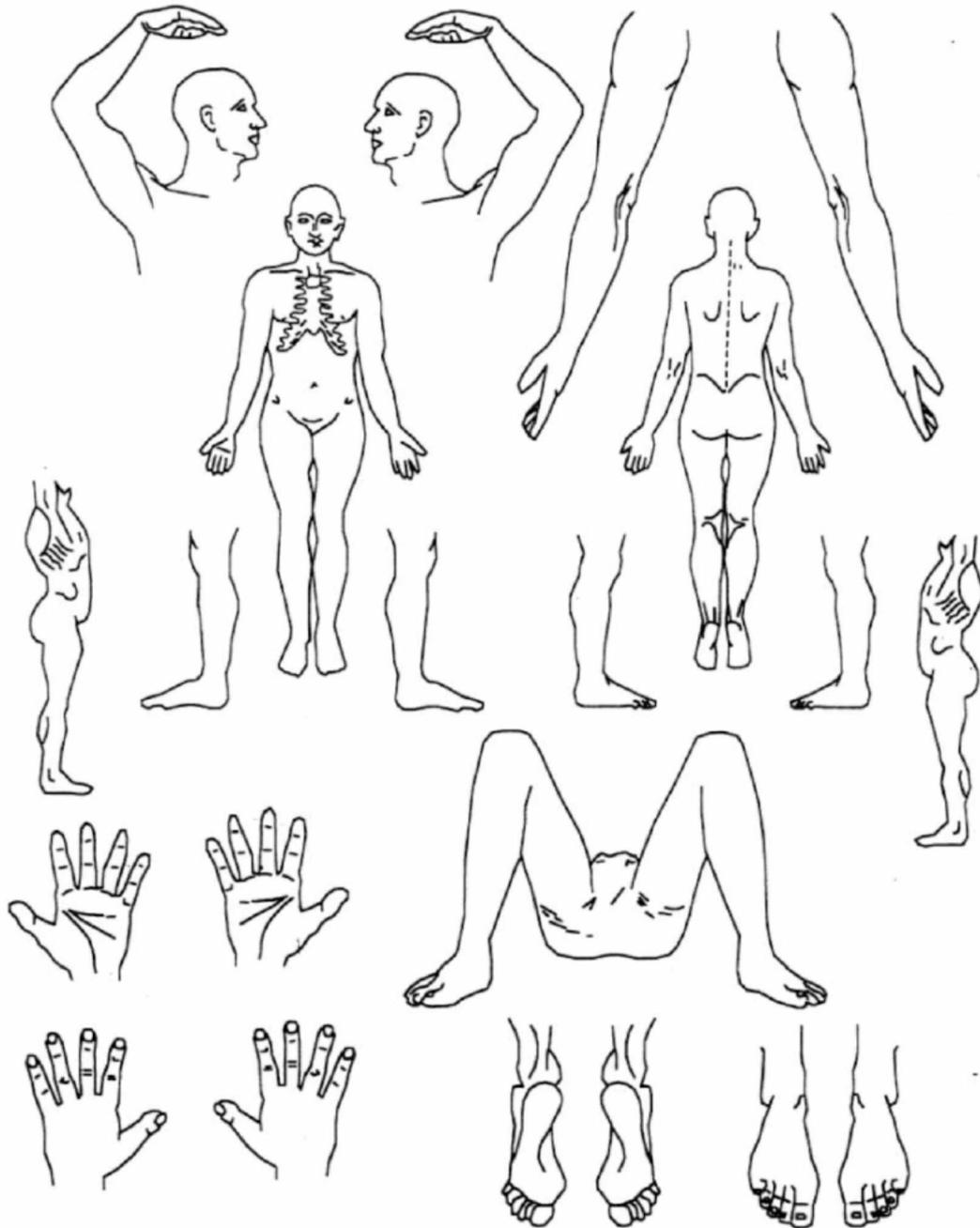
Av. Aspirante Mega, 77 – Bairro Jaraguá – 38413-018 – Uberlândia-MG

☎/Fax (034) 3216-7872 / 3238-1530

✉ www.credsh.ufu.br credsh@hc.ufu.br



Hospital de Clínicas
de Uberlândia



Apêndice D – Termo de esclarecimentos, ciência e consentimento da biópsia de nervo periférico.

Paciente: _____ Prontuário: _____ Sexo: F/M

Médico responsável pelo procedimento:

Eu _____, nº de identidade _____,

() Paciente / () Responsável (Parentesco: _____), declaro que: Fui informado (a) pelo médico (a) de que as avaliações e o exame de eletroneuromiografia (ENMG) realizado neste serviço revelou-se alterado conforme descrito abaixo

Recebi todas as explicações necessárias quanto aos riscos, benefícios, alternativas de tratamento, bem como fui informado(a) sobre os riscos e/ou benefícios de não ser tomada nenhuma atitude propedêutica diante da natureza da(s) enfermidade(s) diagnosticada(s);

Estou ciente de que, durante o procedimento de biópsia do nervo:

SURAL () FIBULAR SUPERFICIAL () / RAMO CUTANEO DORSAL DO ULNAR () / RADIAL SUPERFICIAL () / RAMO SENSITIVO DO FIBULAR PROFUNDO () ou outro nervo selecionado pela equipe médica _____ localizado à DIREITA () / ESQUERDA (), podem ocorrer situação(ões) imprevisível(eis) e o tratamento/procedimento médico pode necessitar de cuidados diferentes daqueles inicialmente previstos.

Estou ciente que em procedimentos médicos invasivos, como o citado, podem ocorrer complicações gerais como sangramento, infecção, alergias, problemas vasculares e respiratórios. Além disso, as principais complicações associadas especificamente a este procedimento são: hipoestesia e/ou anestesia do território do nervo biopsiado, dor local, dor neuropática, infecção da ferida operatória, neuroma no coto do nervo, cicatriz hipertrófica, queiloide.

Estou ciente de que para realizar o(s) procedimento(s) acima especificado(s) será necessário o emprego de anestesia local, que será administrada pelo próprio médico. Compreendo e aceito que a administração de anestésicos locais podem causar efeitos adversos ou complicações, ainda que isto seja pouco freqüente. Estas complicações estão relacionadas à alergia ao medicamento administrado ou sua absorção direta por uma veia, causando intoxicação aguda e suas consequências.

Por livre iniciativa autorizo que o(s) procedimento(s) seja(m) realizado(s) da forma como foi exposto no presente termo, excluindo-se os procedimentos necessários para tentar solucionar as situações imprevisíveis, emergenciais, as quais deverão ser conduzidas e resolvidas de acordo com as particularidades de cada evento;

Tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas relativas ao(s) procedimento(s), e fui informado dos cuidados locais posturais e os curativos após o procedimento para uma melhor e mais rápida cicatrização e após ter lido e compreendido todas as informações deste documento, antes de sua assinatura; **consinto**, portanto, ao(a) médico(a) supra identificado a realizar o(s) procedimento(s) e permito que utilize seu julgamento técnico para que sejam alcançados os melhores resultados possíveis através dos recursos conhecidos na atualidade pela Medicina e disponíveis no local onde se realiza o(s) tratamento(s). Também entendi que a qualquer momento e sem necessidade de dar nenhuma explicação poderei revogar este consentimento, antes que o procedimento seja realizado.

Autorizo ainda a realização de fotos e/ou vídeos para documentação científica e fins de pesquisa ou publicação de trabalhos em cursos , aulas, congressos e revistas médicas , sempre preservando minha identidade em sigilo.

Uberlândia , _____ de _____ de _____ . _____

Assinatura Testemunhas:

Testemunhas:

Nome completo: _____

Nº de identidade: _____

Assinatura: _____

Nome completo: _____

Nº de identidade: _____

Assinatura: _____

Deve ser preenchido pelo médico: Deve ser preenchido pelo médico:

Confirmo que expliquei detalhadamente para o paciente e/ou seu(s) familiar(es), ou responsável(eis), o propósito, os riscos, os benefícios e as alternativas para o tratamento(s)/procedimento(s) acima descritos.

Uberlândia _____ de _____ de _____ .

ASSINATURA E CARIMBO DO MÉDICO

Anexo A – Parecer do CEP.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Aspectos moleculares, sorológicos e neurofisiológicos em contatos assintomáticos de pacientes com diagnóstico de hanseníase.

Pesquisador: Diogo Fernandes dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48293215.7.0000.5152

Instituição Proponente: HOSPITAL DE CLINICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.382.960

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 31 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)