



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**A SENSIBILIDADE EM CAVIDADE ORAL E
OROFARÍNGEA E PESQUISA DO *Mycobacterium leprae*
NA SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

FERNANDA BOROWSKY DA ROSA

MANAUS, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA BOROWSKY DA ROSA

A SENSIBILIDADE EM CAVIDADE ORAL E
OROFARÍNGEA E PESQUISA DO *Mycobacterium leprae*
NA SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Epidemiologia e diagnóstico das doenças prevalentes na Amazônia”.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria da Graça Souza Cunha

MANAUS, 2011

FERNANDA BOROWSKY DA ROSA

**A SENSIBILIDADE EM CAVIDADE ORAL E
OROFARÍNGEA E PESQUISA DO *Mycobacterium leprae*
NA SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Epidemiologia e diagnóstico das doenças prevalentes na Amazônia”.

Aprovada em _____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca, Presidente
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Lucia de Paula, Membro Interno
Fundação Alfredo da Matta

Prof^a. Dr^a. Carolina Lisboa Mezzomo
Universidade Federal de Santa Maria, Membro Externo

Dedico esta dissertação

*Aos meus pais, Mário e Joaquina pela eterna dedicação, amor e
incentivo*

A minha irmã Fabiana pelo carinho e apoio em todos os momentos

*Ao meu marido Fernando pelo abraço carinhoso nos momentos
difíceis, pelo incentivo e pela alegria com as minhas conquistas.*

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Felipe Gomes Naveca**, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Por ter me aceitado como orientanda e me apresentar, com muita paciência e sabedoria, a incrível Biologia Molecular. Serei eternamente grata!

À **Dra. Maria da Graça Souza Cunha**, pelo incentivo à pesquisa, pelo acolhimento, e por todos os ensinamentos.

À Direção da Fundação Alfredo da Matta, na pessoa da diretora **Adele Schwartz Benzaken** e a todos seus funcionários, que possibilitaram a realização deste estudo.

À **Sra Carmélia** e **Meg** pela atenção e apoio dispensados à mim.

Ao **Felicien**, pelas incansáveis explicações na análise estatística.

Ao **Everton** pela contribuição ao trabalho, com explicações e na leitura das lâminas de baciloscopia.

Ao **Paulinho, Valdinei** e **Rodolfo** pela ajuda na coleta dos raspados intradermicos.

Às "meninas" do ambulatório de hanseníase da FUAM: **Marlice, Cilene, Damiana, Raquel, Niza** e **Olívia**, pela disponibilidade em ajudar sempre.

À coordenação do laboratório de biologia molecular da FUAM. Ao **André, Daniel** e **Cintia**, pelo acolhimento e apoio.

À todos os colegas do laboratório da FUAM, em especial à **Maressa, Maysa, Isabela, George, Matilde** e **Tiago**, pelo apoio, amizade e ensinamentos.

À **Fundação Osvaldo Cruz**, por permitir a utilização dos laboratórios para a realização dos procedimentos de biologia molecular da pesquisa.

Aos parceiros de laboratório e amigos, **Tati, Val, Victor** e **Leka**, por toda força que me deram, pelos ensinamentos e colaboração na execução da parte laboratorial deste estudo. Saibam que vocês estão no meu coração!

À Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), na pessoa da Fonoaudióloga **Suzana Areosa**, pela incansável disponibilidade para ajudar na realização das videofluoroscopias da deglutição.

Ao **Dr. Wilton Shoji** pela amizade, disponibilidade e valiosas contribuições nos laudos das videofluoroscopias.

Ao Ambulatório Araújo Lima, na pessoa do **Dr Renato Telles de Souza** e dos residentes, **Dra Renata** e **Dr Rafael**, por realizar as avaliações otorrinolaringológicas dos sujeitos do estudo.

Às minhas amigas queridas de todas as horas, **Rebecca Viana e Yasmin Andreza Angrizane**, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Às minhas amigas e colegas **Adriana Machado, Adriane Lima, Sheila Cassidy e Alessandra Castro** pelo carinho, pelas palavras de incentivo e apoio nesta caminhada.

Ao meu marido, **Fernando**, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo amor dedicado.

Ao meu cunhado, **Dr. Marcelo**, pelo incentivo, pelas orientações e por ser um modelo de dedicação à pesquisa.

Aos **pacientes**, que são o sentido da realização deste trabalho, que gentilmente aceitaram participar deste estudo e colaboraram com a pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

"Conheças todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana."

Carl Gustav Jung

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele, nervos periféricos e membranas mucosas. Sabe-se que o bacilo de Hansen tem predileção pelas células de Schwann que envolvem os axônios dos nervos periféricos, causando perdas sensoriais conforme a localização do nervo afetado. Dentre os nervos cranianos mais afetados em sujeitos com hanseníase estão o nervo trigêmeo, responsável pela motricidade dos músculos mastigatórios e pela sensibilidade tátil, térmica e dolorosa da face, da mucosa da nasofaringe, palato mole e duro, bem como, dos 2/3 anteriores da língua, e o nervo facial, que é responsável pela sensibilidade gustativa dos 2/3 anteriores da língua e motricidade dos músculos da mímica facial. Sendo assim, investigou-se alterações sensório-motoras em cavidade oral e orofaringe e pesquisou-se a presença do *Mycobacterium leprae* na saliva em pacientes com hanseníase virgens de tratamento atendidos num Centro de Referência em Dermatologia Tropical do Estado do Amazonas no período de julho à outubro de 2010. Realizou-se um estudo transversal do tipo detecção de casos, com 45 sujeitos com hanseníase e 45 sujeitos com outras dermatoses incluídos no estudo como grupo controle. Os sujeitos com hanseníase foram submetidos à anamnese, avaliação da sensibilidade da cavidade oral e orofaringe, avaliação otorrinolaringológica (exame clínico, nasofibroscópico e laringoscópico), videofluoroscopia da deglutição, bem como, procedimentos moleculares – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) – e bacteriológicos para pesquisar a presença do DNA do *M. leprae* na saliva. Os sujeitos do grupo controle foram submetidos a avaliação da sensibilidade oral. Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva e indutiva, constatando-se que 15/45 (33,3%) dos sujeitos com hanseníase apresentaram alteração na sensibilidade oral. Sendo este dado estatisticamente significativo ($p = 0,002$) quando comparado com o grupo controle. Na pesquisa do DNA do *M. leprae* na saliva, por meio da técnica de PCR Tempo-Real, foram detectados 16 (35,5%) exames positivos do total de 45 sujeitos com hanseníase. Não foi observada relação direta entre a presença do *M. leprae* na saliva e alteração da sensibilidade oral, porém a positividade da PCR Tempo Real na saliva (PCR da saliva) em seis (31,6%) dos 19 pacientes paucibacilares sugere a possibilidade de um novo sítio de coleta das amostras. Ao somarmos os resultados das técnicas para diagnóstico (baciloscopia do raspado intradérmico, PCR do raspado intradérmico e PCR da saliva) verificamos o aumento da positividade dos resultados para 55,55%. Este aspecto é especialmente importante nos casos de diagnósticos mais difíceis, como por exemplo, nos pacientes paucibacilares.

Palavras-chave: hanseníase; sensibilidade orofaríngea; Reação em Cadeia da Polimerase Tempo Real (qPCR).

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which affects mainly the skin, peripheral nerves and mucous membranes. It is known that the Hansen bacillus has a predilection for Schwann cells that surround the axons of peripheral nerves, causing sensory loss as the location of the affected nerve. Among the most affected cranial nerves in subjects with leprosy are the trigeminal nerve, responsible for motor function of the masticatory muscles and the tactile, thermal and pain of the face, mucosa of the nasopharynx, hard and soft palate, as well as the 2 / 3 previous tongue, and facial nerve, which is responsible for the taste sensitivity of the anterior 2 / 3 of the tongue and movement of the facial muscles. In the present study, we investigated sensorimotor disorders in the oral cavity and oropharynx as well as the presence of *Mycobacterium leprae* in saliva from patients with leprosy attending in a Reference Center of Tropical Dermatology in Amazonas State from July to October 2010. We conducted a cross sectional study of case detection, with 45 subjects with leprosy and 45 subjects with other skin diseases as a control group. Subjects with leprosy were submitted to anamnesis, evaluation of the sensitivity of the oral cavity and oropharynx, ENT examination (clinical examination, nasal endoscopy and laryngoscopy), videofluoroscopy, and, molecular procedures – Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) - and bacteriological to investigate the presence of DNA of *M. leprae* in saliva. The control group subjects were assessed of oral sensitivity. The results were analyzed using descriptive and non-parametric statistics, noting that 15/45 (33.3%) of subjects with leprosy showed abnormalities in the oral sensitivity, and this data is statistically significant ($p=0,002$) when compared with the control group. In search of *M leprae* DNA in saliva, using the technique of Real-Time PCR, we detected 16 (35.5%) tested positive results of 45 subjects with leprosy. No direct relationship was observed between the presence of *M. leprae* in saliva and oral changes in sensitivity, but the positivity of the Real Time PCR in saliva (PCR in saliva) in six (31.6%) of 19 paucibacillary (PB) patients suggests the possibility of a new site of sample collection. The sum of the techniques for diagnosis (Slit-skin smear, PCR in saliva and PCR Slit-skin smear) increases the positive results to 55.55%. This is particularly important in difficult diagnosis cases, like paucibacillary patients.

Keywords: leprosy; oropharyngeal sensitivity; Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Nervo Trigêmeo (V par craniano) – Ramo Maxilar.....	26
Figura 2	Ilustração esquemática da coleta dos raspados intradérmicos.....	42
Figura 3	Fluxograma da coleta das amostras da saliva.....	43
Figura 4	Identificação dos microtubos da coleta.....	44
Figura 5	Protocolo de extração do DNA com kit da Qiagen DNeasy Blood & Tissue.....	44
Figura 6	Curva de Amplificação do alvo 85AC, amostra 006-R.....	59
Figura 7	Curva de Desnaturação do alvo 85AC, amostra 006-R.....	60
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do alvo 85AC..	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de frequência segundo dados sócio-demográficos.....	51
Tabela 2	Relação dos dados pessoais e de sensibilidade oral e os grupos.....	53
Tabela 3	Relação entre variáveis de sensibilidade e os Grupos.....	54
Tabela 4	Relação entre variáveis de sensibilidade e a Baciloscopia do raspado intradérmico.....	56
Tabela 5	Relação da baciloscopia do raspado intradérmico, PCR da saliva, PCR do raspado intradérmico e a classificação operacional.....	61
Tabela 6	Relação da PCR da saliva, PCR do raspado intradérmico e a baciloscopia de raspado intradérmico.....	63
Tabela 7	Relação da PCR da saliva e a Sensibilidade Oral.....	64
Tabela 8	Relação da Sensibilidade e Grupos.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Índice Bacteriológico (IB).....	24
Quadro 2	Protocolo para Reação da PCR Tempo-Real: alvo 85 A-C.....	45
Quadro 3	Programa de Reação da PCR Tempo-Real: alvo 85 A-C.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
+	Cruzes
≥	Maior ou igual
'	Minutos
μM	Micromolar
"	Segundos
μl	Microlitro
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
μm	micrometro
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
D	Dimorfo
DD	Dimorfo-dimorfo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Conjunto de Desoxirribonucleotídeos trifosfato
dsDNA	DNA fita-dupla
DT	Dimorfo-tuberculóide
DV	Dimorfo-virchowiano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
FUAM	Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta
g	Gramas
Hab.	Habitantes
I	Indeterminada
IB	Índice Baciloscópio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
M	Molar
ml	Mililitro
MB	Multibacilares
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
PB	Paucibacilares
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGL	Glicolípídios Fenólicos
pH	Potencial hidrogeniônico
PQT	Poliquimioterapia
T	Tuberculóide
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tm	Temperatura de dissociação
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Virchowiano
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
	2.1 Hanseníase.....	20
	2.2 Sensibilidade Orofaríngea.....	25
	2.3 Relação da Cavidade Oral com a Hanseníase.....	27
3	OBJETIVOS.....	32
	3.1 Geral.....	32
	3.2 Específicos.....	32
4	METODOLOGIA.....	33
	4.1 Modelo de Estudo.....	33
	4.2 Universo de Estudo.....	33
	4.2.1 População de Estudo.....	33
	4.2.2 Amostras.....	33
	4.2.3 Critérios de Seleção.....	34
	4.3 Informações Éticas.....	35
	4.4 Procedimentos.....	37
	4.4.1 Fluxograma de Procedimentos.....	37
	4.4.2 Anamnese.....	37
	4.4.3 Avaliação da Sensibilidade Intra-Oral.....	38
	4.4.4 Avaliação Otorrinolaringológica.....	40
	4.4.5 Videofluoroscopia da Deglutição.....	40
	4.4.6 Coleta das Amostras.....	41
	4.4.6.1 Coleta dos raspados intradérmicos.....	41
	4.4.6.2 Descontaminação e esterelização do material de coleta.....	42
	4.4.6.3 Coleta da saliva.....	42
	4.4.6.4 Conservação do material coletado.....	43
	4.4.7 Procedimento Molecular – PCR.....	43
	4.4.7.1 Identificação dos microtubos de coleta.....	43
	4.4.7.2 Extração do DNA.....	44
	4.4.7.3 Leitura dos resultados.....	46
	4.4.8 Procedimentos Bacteriológicos.....	48
	4.5 Análise Estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
7	CONCLUSÕES.....	71
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	APÊNDICES.....	77
	ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele, nervos periféricos e membranas mucosas, de forma lenta e insidiosa (MARGARIDO; RIVITTI, 2005). A doença pode gerar deformidades e incapacidades físicas, provocando sérias implicações sociais.

De acordo com a *World Health Organization* (WHO) a manutenção dos esforços para o controle mundial da hanseníase tem resultado em avanços importantes, com a redução da detecção de novos casos da doença em muitos países endêmicos. Porém países como o Brasil, Nepal e Timor Leste, com população acima de 1 milhão de habitantes, ainda permanecem com alto índice de casos novos detectados, somando 17% dos novos casos detectados em 2007 no mundo (WHO, 2008).

Embora o Brasil tenha registrado diminuição na detecção de casos novos, a hanseníase ainda constitui um problema de saúde pública no país, principalmente, nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, que concentram 53,5% dos casos detectados em apenas 17,5% da população brasileira (BRASIL, 2008). O Estado do Amazonas apresentou uma redução de 85,2% no coeficiente de detecção de casos novos no período entre 1981 a 2008, o que permitiu a mudança da classificação epidemiológica de hiperendêmica ($\geq 40,0/100.000$ hab) para muito alto ($40,0 - | 20,0/ 100.000$ hab) desde o ano de 2003 (FUAM, 2008). Contudo, os esforços em ações educativas, detecção precoce e tratamento efetivo, precisam ser mantidos para que se possa alcançar taxas de prevalência de hanseníase inferiores a 1 caso/10.000 habitantes preconizadas pela WHO.

O mecanismo de transmissão da hanseníase não está claro, porém acredita-se que aconteça pelo contato íntimo e prolongado com o doente através das secreções nasais e orofaríngeas e/ou pelas lesões cutâneas (D'ABREU et al., 2000; MARGARIDO; RIVITTI, 2005; PONTES et al., 2008).

O *Mycobacterium leprae* tem predileção pelas células de Schwann que envolvem os axônios dos nervos periféricos, desencadeando perda progressiva da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, e, na maioria dos doentes, as lesões e manifestações neurais antecedem os sinais cutâneos (MARGARIDO; RIVITTI, 2005).

Os locais no corpo que são refrigerados pela passagem do ar parecem ser acometidos mais usualmente, demonstrando a preferência do bacilo por temperaturas mais baixas (KÜSTNER et al., 2006). Na cavidade oral, quando comprometida, os locais frequentes das lesões são: palato duro e mole, úvula, língua e gengivas na porção anterior da maxila (NEVILLE et al., 2009).

As lesões orais na hanseníase desenvolvem-se insidiosamente, geralmente assintomáticas e secundárias às alterações nasais. Porém, atualmente, devido ao diagnóstico mais precoce e ao uso da poliquimioterapia (PQT), as lesões orais não são frequentemente observadas. Entretanto, a mucosa oral sem lesões evidentes pode estar comprometida nos pacientes em estágios menos avançados da doença como constatado em diferentes estudos anteriores (FUCCI DA COSTA et. al., 2003; ABREU et. al., 2006).

Dentre os nervos cranianos, o mais afetado pela hanseníase é o trigêmeo (V par) responsável pela sensibilidade da face, dos 2/3 anteriores da língua e do palato duro e mole, e, em seguida, o nervo facial (VII par) responsável pela inervação dos

músculos da mímica facial e pela sensibilidade gustativa dos 2/3 anteriores da língua. (MARGARIDO; RIVITTI, 2005)

O prejuízo sensorial ou motor em cavidade oral e orofaringe pode causar alterações na deglutição, pois para que a deglutição ocorra de forma adequada, exige-se uma complexa coordenação neuromuscular que envolve sensibilidade, mobilidade e tensão muscular da orofaringe. Sendo assim, indivíduos com hanseníase podem apresentar disfagia, que, segundo Macedo Filho et al. (2000) é qualquer dificuldade de deglutição, decorrente de processo agudo ou progressivo, que interfere no transporte do bolo alimentar da boca ao estômago.

A disfagia é diagnosticada através de avaliação clínica e instrumental, sendo a videofluoroscopia da deglutição o melhor método de avaliação instrumental. Segundo Barros et al. (2009) a videofluoroscopia da deglutição é um exame que consiste em uma imagem radiográfica dinâmica, que possibilita a visualização de todas as estruturas envolvidas no processo da deglutição e da fonoarticulação.

Na Motricidade Orofacial, área da fonoaudiologia responsável pelos estudos sobre sensibilidade e motricidade orofacial, pouco se encontram pesquisas referentes à hanseníase. Revisando a literatura na área da hanseníase, encontram-se estudo sobre as sequelas da hanseníase na cavidade oral, abordando temas como presença de lesões ósseas e na mucosa oral. Quanto a avaliação da sensibilidade na cavidade oral, encontrou-se apenas um artigo sobre distúrbios gustativos na hanseníase (SONI & CHATTERJI, 1981), demonstrando ser, a cavidade oral, um tema pouco abordado em pesquisas na área da hanseníase.

Em um estudo realizado por Villar et al. (2004) sobre disfagia orofaríngea em indivíduos portadores de hanseníase, observaram comprometimento da mobilidade de palato e hipoatividade do reflexo de gag em 55% dos sujeitos com disfagia leve.

O diagnóstico da hanseníase pode ser complementado por meio de exames laboratoriais como a baciloscopia, Teste de Mitsuda, sorologia para o glicolípido fenólico (PGL-1) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). De acordo com Bang et. al. (2009) a sensibilidade e a especificidade do método de PCR fornecem uma abordagem promissora para o diagnóstico precoce e tratamento da hanseníase.

Segundo Goulart e Goulart (2008) a técnica de PCR possibilita a detecção, quantificação e determinação da viabilidade do bacilo em locais específicos, através da detecção do DNA ou RNA.

Baseando-se na predileção do bacilo de Hansen pelos nervos periféricos, na hipótese da cavidade oral ser rota de entrada e saída do bacilo no organismo, e pelo resultado de estudos utilizando a PCR que confirmaram a presença do bacilo na cavidade oral (Santos et al., 2007; Abdalla, 2009), percebe-se a necessidade de avaliar a sensibilidade intra-oral dos sujeitos com hanseníase para identificar a presença ou não de comprometimento dos nervos periféricos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente pele, nervos periféricos e mucosas (MARTINS et. al., 2007).

Embora a forma de transmissão exata não seja conhecida, o alto número de micro-organismos nas secreções nasais sugere que, em alguns casos, o sítio inicial de infecção possa ser a mucosa nasal ou orofaríngea (NEVILLE, 2009).

Acredita-se que lesões na mucosa oral são fonte de infecção em pacientes virchowianos que expõem grande número de bacilos ao espirrar, cuspir, tossir ou falar, pois têm sido encontrados bacilos viáveis nestas lesões (FUCCI DA COSTA et. al., 2003).

A transmissão é direta do paciente bacilífero não-tratado, que elimina os bacilos pelas vias aéreas superiores durante convivência íntima e prolongada, principalmente, intradomiciliar. Também são contaminantes os hansenomas ou qualquer lesão erosada da pele de pacientes bacilíferos. O *M. leprae* apesar de altamente infeccioso tem baixa patogenicidade e virulência (OSUGUE; OSUGUE, 2005).

O quadro clínico da doença manifesta-se de forma variada com sinais dermatológicos e neurológicos. As lesões de pele se apresentam com diminuição ou ausência de sensibilidade, sendo as mais comuns manchas hipocrômicas ou eritematosas, além de pápulas, infiltrações, tubérculos e nódulos. Com relação ao

comprometimento neurológico o paciente apresenta acometimento dos nervos periféricos, que pode ser causado tanto pela ação do bacilo nos nervos como pela reação do organismo ao bacilo ou por ambos. O comprometimento dos nervos periféricos pelo bacilo pode levar ao espessamento destes nervos, podendo evoluir com dor espontânea ou à palpação desses troncos nervosos (neurites) e com perda da sensibilidade e dano motor nas áreas inervadas (BRASIL, 2009).

O período de incubação da doença é longo, variando com o estado imune do indivíduo e ou tipo de resposta desencadeada, em média de 3 a 7 anos ou mais (PONTES et.al., 2008). Após a penetração do bacilo no organismo, ocorre uma infecção subclínica, com cura espontânea, na grande maioria dos casos. Num menor número de indivíduos, os bacilos se propagam para os nervos periféricos e para a pele, onde são fagocitados pelos macrófagos e pelas células de Schwann. No interior dessas células, os bacilos se reproduzem lentamente por divisão binária (12 a 21 dias), o que lhe confere a características de uma doença crônica. Dentro dos macrófagos, que servem como seu habitat, e, mediada pelos receptores do complemento CR1 e CR3, que se ligam ao antígeno de superfície específico do *M. leprae* – glicolípido fenólico (PGL1), desencadeia-se uma reação, que, na dependência do padrão genético do hospedeiro, resultará nas diferentes formas clínicas da doença (OSUGUE; OSUGUE, 2005).

De acordo com Margarido; Rivitti (2005) a classificação da hanseníase está estruturada no quadro clínico, na Imunologia (teste de Mitsuda), na baciloscopia e na histopatologia.

Fundamentado nos aspectos citados anteriormente, Rabello em 1953 propôs a Teoria da Polaridade que contribuiu para o estabelecimento da Classificação de Madri,

classificando a hanseníase em dois pólos estáveis e opostos. O pólo com resposta imune Th1, ou celular que confere resistência à infecção – hanseníase tuberculóide (HT) e o pólo com resposta imune Th2, ou humoral, que torna o indivíduo suscetível à progressão da doença – hanseníase virchowiana (HV). E dois pólos instáveis: hanseníase indeterminada (HI) e hanseníase dimorfa (HD), que podem evoluir para um dos pólos no curso natural da doença (BARRETO, 2005; OSUGUE; OSUGUE, 2005).

Osugue e Osugue (2005) relatam que Ridley e Jopling mantiveram as formas polares de Rabello, porém, com base nos detalhes histológicos do granuloma, no índice baciloscópico e no espectro imunológico do hospedeiro, propuseram outra classificação considerando a forma indeterminada (HI) como forma inicial da doença e uma forma intermediária entre os pólos, denominada *Borderline* (limítrofe), que foi subdividida por esses autores em *Borderline Tuberculóide* (BT); *Borderline-Borderline* (BB) e *Borderline-Lepromatosa* (BL), de acordo com a classificação do paciente dentro do espectro clínico.

Para fins operacionais e instituição de tratamento poliquimioterápico, a WHO recomenda o uso de classificação simplificada, sendo considerados paucibacilares (PB) os pacientes com baciloscopia negativa e com até cinco lesões cutâneas disestésicas, e multibacilares (MB), os pacientes com baciloscopia positiva e com mais de cinco lesões cutâneas disestésicas (MARGARIDO; RIVITTI, 2005).

Durante a evolução crônica da hanseníase, às vezes, podem ocorrer fenômenos agudos, que são chamados de episódios reacionais, os quais têm relação com o estado imunológico do indivíduo, podendo aparecer tanto no tratamento quanto após a alta. Os episódios reacionais são do tipo I, II e neural. As reações do tipo I são mediadas por células (imunidade celular), e ocorrem principalmente nos pacientes com a forma

dimorfa tuberculoide. As reações do tipo II são mediadas por anticorpos (imunidade humoral) e ocorrem nas formas virchowiana e dimorfa virchowiana (MARTINS et al., 2005).

O diagnóstico da hanseníase para o Ministério da Saúde do Brasil (MS) e WHO baseia-se no aspecto clínico, sendo considerado como caso de hanseníase a pessoa que apresenta lesões ou áreas de pele com alteração da sensibilidade; acometimento neural com espessamento de nervo, acompanhado ou não de alteração de sensibilidade e/ou de força muscular; bem como, através da presença de microrganismos álcool-ácido resistentes em esfregaço ou no tecido (OSUGUE; OSUGUE, 2005; NEVILLE et al., 2009).

Entre os exames laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase, a baciloscopia é um procedimento de fácil execução e de baixo custo, porém com baixa sensibilidade, não devendo, por isso, ser considerada como critério diagnóstico da hanseníase. Tem como finalidade ajudar no diagnóstico e na classificação clínica da doença, pela identificação do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). O material examinado é o raspado intradérmico colhido nos lóbulos das orelhas, dos cotovelos, e da lesão cutânea com infiltração. O esfregaço corado pela técnica de Ziehl-Neelsen permite identificar *M. leprae* em material que contenha pelo menos 10^4 bacilos/mL. Nas formas tuberculoide e indeterminada a baciloscopia é geralmente negativa o que não afasta o diagnóstico de hanseníase, e nas formas dimorfa (exceto na forma dimorfa tuberculóide que pode ser negativa) e virchowiana o exame é positivo (OSUGUE; OSUGUE, 2005; BRASIL, 2009).

O cálculo do Índice Baciloscópico (IB) é adotado pelo MS (2009) e foi, inicialmente, proposto por Ridley em 1964. Este cálculo baseia-se em uma escala

logarítmica com variação entre 0 a 6+. É o método de avaliação quantitativo mais correto utilizado na leitura da baciloscopia da hanseníase (Quadro 1).

Quadro 1
Índice Bacteriológico (IB)

IB	Bacilo/Campo
Negativo (0)	Ausência de bacilos em 100 campos examinados.
Positivo (1+)	Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados.
Positivo (2+)	Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados.
Positivo (3+)	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado.
Positivo (4+)	Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado.
Positivo (5+)	Presença de 100 a 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado.
Positivo (6+)	Presença de mais de 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado.

Fonte: BRASIL (2009)

Com a evolução da biologia molecular, estudos têm demonstrado alta sensibilidade da técnica da PCR na identificação do DNA do *M. leprae*, permitindo a detecção do bacilo em diferentes amostras clínicas, como, raspado celular, sangue, biópsia de pele e nervo e secreção nasal (PONTES et al., 2008).

Abdalla (2009) em pesquisa de *M. leprae* no periodonto, saliva e em raspados intradérmicos de pacientes com hanseníase, concluiu que a positividade da PCR nas amostras do periodonto e da saliva foi bem maior nos pacientes paucibacilares do que nos multibacilares. Neste estudo verificou-se também que pacientes paucibacilares que tiveram PCR negativos nos raspados intradérmicos, foram positivos no periodonto e na saliva. Esses dados sugerem que se pode aumentar o índice de positividade da PCR analisando a linfa, periodonto e saliva em pacientes com hanseníase.

O tratamento da hanseníase, indicado pelo MS, é a poliquimioterapia (PQT) padronizada e recomendada pela WHO. A PQT tem como finalidade a cura da doença, reduzindo a fonte de infecção, surtos reacionais e prevenindo incapacidades físicas.

Deste modo, a PQT é fundamental para o controle da endemia e eliminação da hanseníase enquanto problema de saúde pública (OSUGUE; OSUGUE, 2005).

O tratamento PQT é administrado de acordo com a classificação operacional do doente. O paciente deve comparecer mensalmente à unidade de saúde para uma consulta e para receber dose supervisionada da medicação. A duração do tratamento no paciente PB é de seis doses do medicamento em até nove meses, e no paciente MB é de doze doses em até dezoito meses (OSUGUE; OSUGUE, 2005). O esquema de tratamento para os casos PB, pacientes adultos, consiste em doses mensais supervisionadas de 600 mg de Rifampicina associadas a 100 mg de Dapsona seguidos de 100 mg diários de Dapsona, auto-administrados. Para os casos MB é acrescido ao esquema, 300 mg de Clofazimina com administração mensal supervisionada e 50 mg de Clofazimina diárias, auto-administradas (BRASIL, 2002).

2.2 Sensibilidade Orofaríngea

A sensibilidade da face e cavidade oral é inervada pelos nervos trigêmeo (V par craniano) e facial (VII par craniano). O nervo trigêmeo dividi-se em três ramos: oftálmico, maxilar e mandibular. O ramo oftálmico apresenta ramos sensitivos dos olhos, da conjuntiva e do conteúdo das órbitas, inclusive da glândula lacrimal. O ramo maxilar é responsável pela sensação térmica, tátil e dolorosa da mucosa da nasofaringe, palato mole e duro, gengivas, dentes superiores e tonsila palatina. Já o ramo mandibular é responsável pela sensação térmica, tátil e dolorosa dos 2/3 anteriores da língua, mucosa jugal, assoalho bucal, gengivas, dentes inferiores, articulação temporomandibular, pele do lábio inferior e região mandibular (Figura 1). O ramo mandibular do nervo trigêmeo tem fibras motoras responsáveis pela

motricidade da musculatura mastigatória. O nervo facial controla a motricidade dos músculos da mímica facial e a sensibilidade gustativa dos 2/3 anteriores da língua (ESTRELA et al., 2009).

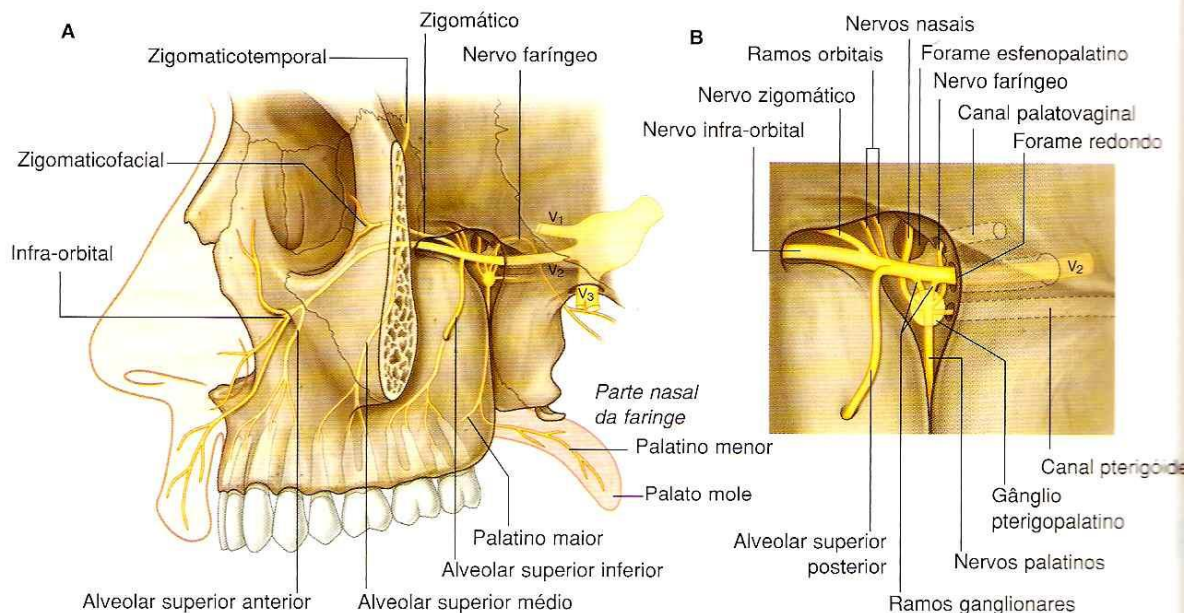


Figura 1. Nervo Trigêmeo (V par craniano) – Ramo Maxilar
Fonte: DRAKE (2005)

De acordo com Miller (2008) a parte da faringe mais inervada é na transição da cavidade nasal para oral, com maior número de terminações nervosas livres. Para Douglas (2002) os proprioceptores estomatognáticos têm enorme relevância fisiológica e patofisiológica, pois estes receptores captam informações sensoriais orais que induzirão reflexos adaptativos ou compensadores.

Para Miller (2008) a recepção de estímulos sensoriais pelo nervo trigêmeo contribui com o desencadear dos processos fisiológicos da fase oral da deglutição.

Estímulos térmicos (frio) e gustativos têm mostrado efeito sobre a deglutição, o que sugere que quimiorreceptores aferentes da orofaringe podem facilitar a deglutição (TEISMANN et al., 2009).

Costa e Monteiro (2003) afirmam que todas as características físicas e químicas, como o volume, consistência, densidade, grau de umidificação e sabores do bolo alimentar, que importam para a eficiência da ejeção oral, são percebidos e qualificados na fase oral da deglutição.

A literatura reflete a importância da sensibilidade oral para uma deglutição eficiente, como relata Teismann et al. (2007). Além disso, o déficit de sensibilidade altera respostas motoras e a anestesia local em orofaringe causa um significativo aumento na duração da deglutição e diminuição do volume deglutido, podendo, algumas vezes, resultar em aspiração.

2.3 Relação da cavidade oral com a Hanseníase

Uma característica importante na evolução da hanseníase nas vias aerodigestivas superiores é o caráter descendente, ou seja, início da doença (infecção) pelas fossas nasais e a seguir, acometimento da boca e laringe (NEVES, 1984).

O envolvimento da mucosa oral tem sido relatado em até 60% de pacientes com a hanseníase virchowiana (HV), porém nas formas tuberculóide e dimorfa lesões orais são raramente observadas (MARTINS et al., 2007).

A lesão oral na hanseníase se desenvolve insidiosamente, é geralmente assintomática e são secundárias as alterações nasais. A região mais frequentemente afetada é o palato duro (FUCCI DA COSTA et al., 2003).

Os locais que são refrigerados pela passagem do ar parecem ser acometidos mais usualmente na hanseníase. Os locais afetados em ordem de frequência são: palato duro, palato mole, gengiva anterior superior vestibular, língua, lábios, gengiva

vestibular superior, gengiva vestibular anterior inferior e mucosa jugal. Os tecidos moles afetados apresentam-se inicialmente como pápulas firmes, amareladas ou vermelhas, sésseis, de tamanho crescente, que ulceram e necrosam, sendo seguidas por uma tentativa de cicatrização por segunda intenção. Pode ocorrer a perda completa da úvula e fixação do palato mole. As lesões linguais surgem, principalmente, no terço anterior e, muitas vezes, começam como áreas de erosão, que podem resultar em grandes nódulos (NEVILLE et al., 2009).

A menor incidência de lesões orais observadas recentemente, comparado com os relatos mais antigos (GIRDHAR; DESIKAN, 1979; BUCCI ET AL., 1987; SCHEEPERS ET AL, 1993; SCHEEPERS, 1998; SCOLLARD; SKINSNES, 1999; D'ABREU ET AL., 2000) pode ser explicada pelo fato do tratamento poliquimioterápico vigente ser mais efetivo e iniciado precocemente, e provavelmente também pelo melhoramento da higiene oral (FUCCI DA COSTA et al., 2003).

Fucci da Costa et al. (2003) avaliaram 26 pacientes com hanseníase (11 virchowianos, 14 *borderline* e 1 tuberculóide), virgens de tratamento ou que tivessem recebido apenas uma dose da PQT, sendo que 69% apresentaram alterações orais clínicas e 50% destes mostraram alterações histopatológicas em áreas sem lesão.

Souza et al (2009) relatam com base em trabalhos anteriores de outros autores, que a mucosa oral oferece uma resistência natural para o surgimento da hanseníase e que lesões orais podem estar restritas a estágios avançados de doença, e sugere que a invasão da mucosa oral pode ocorrer quando há uma bacteremia de *M. leprae*. Entretanto, comentam que a mucosa oral pode ser um local para a localização do *M. leprae*, até mesmo sem sinais macroscópicos e que isto precisa ser confirmado usando técnicas histológicas e Biologia Molecular.

Em pesquisa realizada por Santos et al. (2007) através da PCR com biópsias em mucosa aparentemente normal de palato duro e mole em sete pacientes multibacilares em tratamento, obteve-se positividade em seis dos sete casos (85,7%) para detecção molecular do *M. leprae*.

O *M. leprae* pode estar presente na mucosa bucal sem apresentar qualquer alteração morfológica, e somente métodos laboratoriais mais sensíveis detectam sua presença. Dentre os exames de alta sensibilidade, a PCR, método da Biologia Molecular, destaca-se pela possibilidade de amplificar ou multiplicar fragmentos ou vestígios de DNA de células, incluídas as bacterianas, permitindo assim sua fácil detecção (SANTOS et al., 2007).

Para Bucci et al. (1987) extensas infiltrações no palato observadas em pacientes com hanseníase, tem sido frequentemente associadas com significativo prejuízo sensorial. Villar et al. (2004) encontraram em pesquisa realizada sobre a presença de disfagia em pacientes com hanseníase, diminuição da mobilidade de palato e hipoatividade do reflexo de gag. As autoras referem que os pacientes com hanseníase, avaliados nesta pesquisa e que apresentaram sinais e sintomas de alteração no processo de deglutição, principalmente os classificados na disfagia leve, desenvolvem estratégias facilitadoras, como preferência por alimento pastoso grosso, utilização de líquido para auxiliar a ingestão de alimentos sólidos e manobras de deglutições múltiplas como jogar a cabeça para trás compensando assim, suas dificuldades decorrentes dessas alterações.

Segundo Margarido e Rivitti (2005) dentre os nervos cranianos, o mais afetado é o trigêmeo e, em seguida, o facial. A paralisia facial pode ser unilateral ou bilateral

e o déficit sensorial pode afetar qualquer ramo do nervo trigêmeo, porém o ramo maxilar é o mais afetado (NEVILLE et al., 2009).

Bretan et al. (2007) comentam que a infiltração de micobactérias na mucosa e nas terminações nervosas dos nervos sensoriais e motores da laringe podem causar paralisia ou paresia de pregas vocais e possível alteração na sensibilidade da mucosa. A deteriorização sensorial ou motora pode causar aspiração e broncopneumonia, devido a disfagia orofaríngea, o que pode ser investigado através de videoendoscopia e videofluoroscopia da deglutição.

Macedo Filho et al. (2000) relatam que a videoendoscopia é o método escolhido para avaliação da sensibilidade mucosa da faringe e laringe, preconizado por Aviv em 1997. A técnica endoscópica consiste na introdução do nasofaringolaringoscópio pela narina do paciente para avaliar a anatomia e fisiologia da região da faringe e da laringe.

Em estudo retrospectivo realizado por Martins et al. (2005) sobre endoscopia das cavidades nasais de 173 pacientes com hanseníase, obtiveram como resultado que em 100% dos pacientes avaliados identificaram lesões da mucosa nasal, mesmo naqueles (52 pacientes) que não apresentavam queixas otorrinolaringológicas relacionadas ao nariz, justificando a realização do exame endoscópico das cavidades nasais em todos os pacientes com hanseníase.

A utilização da videoendoscopia em pacientes com hanseníase oferece uma melhor acurácia na identificação de lesões mucosas e precocidade no diagnóstico (MARTINS et al., 2005).

Villar et al. (2004) sugerem na discussão da pesquisa “Disfagia orofaríngea em indivíduos portadores de hanseníase”, que o acréscimo de um exame mais objetivo, como a nasofibrosopia e/ou o videodeglutograma (videofluoroscopia da deglutição), seria muito importante, possibilitando uma investigação mais completa e uma visão mais dinâmica da deglutição, oferecendo maior precisão no diagnóstico da disfagia.

O exame da videofluoroscopia da deglutição é um exame de imagem radiográfica dinâmica que possibilita a visualização de todas as estruturas envolvidas no processo da deglutição (BARROS et al., 2009). Embora a videofluoroscopia usualmente exponha a baixas doses de radiação, esta se tornará desnecessariamente elevada se não tivermos um estruturado protocolo de avaliação (COSTA; MONTEIRO, 2003).

O Protocolo de Avaliação Videofluoroscópica da Deglutição, proposto por Carrara-de-Angelis et al. (2009), analisa a fisiologia das fases da deglutição (oral preparatória, oral e faríngea) nas posições lateral e ântero-posterior, com oferta de diferentes texturas alimentares (líquido, líquido-pastoso, pastoso e sólido) em três volumes (5, 10 e 20 ml).

Pelo descrito acima, aponta-se a necessidade de realizar avaliação da sensibilidade intra-oral em pacientes com hanseníase associada a exames complementares como a nasofibrosopia e a videofluoroscopia da deglutição. Percebe-se também a importância dos exames laboratoriais como a baciloscopia e a PCR em pacientes com hanseníase (especialmente nos PB), para investigar possíveis alterações na sensibilidade orofaríngea decorrentes da presença do bacilo na cavidade oral, bem como, contribuir com a literatura atual sobre o comprometimento da mucosa oral pela hanseníase no período vigente da poliquimioterapia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar alterações sensório-motoras em cavidade oral e orofaringe e pesquisar a presença do *Mycobacterium leprae* na saliva de pacientes com hanseníase virgens de tratamento.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Verificar a presença de alterações na sensibilidade tátil, gustativa e térmica em cavidade oral e orofaringe produzida por infecção pelo *M. leprae*;

3.2.2 Verificar se pacientes com hanseníase, com presença de alteração na sensibilidade em cavidade oral e orofaringe apresentam disfagia;

3.2.3 Verificar alterações otorrinolaringológicas em pacientes com hanseníase;

3.2.4 Verificar se resultados baciloscópicos, estão relacionados com presença de alteração na sensibilidade oral e orofaríngea em pacientes com hanseníase;

3.2.5 Avaliar a presença de DNA do *M. leprae* na saliva, comparando com os resultados da baciloscopia.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Para a realização deste trabalho optou-se por um estudo transversal do tipo detecção de casos para pesquisar a presença do *Mycobacterium leprae* na saliva e investigar alterações sensório-motoras em cavidade oral e orofaringe em pacientes com hanseníase virgens de tratamento.

4.2 Universo de Estudo

4.2.1 População de Estudo

Fizeram parte da pesquisa sujeitos com hanseníase virgens de tratamento e sujeitos com outras dermatoses, atendidos na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM), localizada no Bairro Cachoeirinha, no Município de Manaus, por ser instituição referência no tratamento da hanseníase no Estado do Amazonas.

4.2.2 Amostras

Foram coletadas amostras e dados clínicos de pacientes de primeira vez com hanseníase, que procuraram atendimento na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM) – Manaus/AM, nos meses de julho, agosto, setembro e outubro de 2010, de segunda a sexta-feira, no período da manhã.

Baseando-se no número de pacientes de primeira vez, maiores de 18 anos, atendidos no período de abril a junho de 2009 na Fundação de Dermatologia Tropical

e Venereologia Alfredo da Matta, essa pesquisa estimava coletar dados de aproximadamente 70 sujeitos com hanseníase e 70 sujeitos com outras dermatoses como parte do grupo controle (FUAM, 2010).

Participaram deste estudo 45 sujeitos com hanseníase e 45 sujeitos com outras dermatoses. A escolha de sujeitos com outras dermatoses atendidos na FUAM para o grupo controle foi baseada no fato de que esta instituição possui profissionais treinados para detectar a hanseníase, como também, fazer o diagnóstico diferencial da hanseníase com outras dermatoses. Sendo assim, se reduz consideravelmente o risco de incluir no grupo controle sujeitos com hanseníase.

Outro fator considerado para a escolha do grupo controle foi utilizar uma população com perfil sócio-demográfico semelhante ao grupo de estudo. Por este motivo, o grupo controle foi formado por sujeitos que buscaram atendimento na mesma instituição de saúde do grupo de estudo.

4.2.3 Critérios de Seleção

Para composição do grupo de sujeitos com hanseníase, foram inclusos neste estudo sujeitos de demanda espontânea, maiores de 18 anos e com idade inferior a 60 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de hanseníase, virgens de tratamento.

Foram excluídos da pesquisa, sujeitos de etnia indígena, mulheres grávidas, sujeitos que apresentem sequelas de lesão no Sistema Nervoso Central e/ou sequela de tratamento de câncer de cabeça e pescoço.

Foram critérios de inclusão no grupo controle sujeitos de demanda espontânea, maiores de 18 anos e com idade inferior a 60 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de outras dermatoses e que não tivessem

parentesco com sujeitos com hanseníase, nem tivessem realizado tratamento prévio para hanseníase. Os mesmos critérios de exclusão dos pacientes com hanseníase foram mantidos também para os indivíduos controle.

4.3 Informações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa para sua realização, com parecer número 015/ 2010 – CEP/FUAM.

Aos interessados em participar da pesquisa, foram esclarecidos pelo pesquisador os objetivos da pesquisa, assim como os riscos e os benefícios para o participante, para os profissionais da saúde e para a população. Estiveram expostos a certo grau de risco, sujeitos com alteração na sensibilidade intra-oral que foram encaminhados para realização da videofluoroscopia da deglutição, pois neste exame, apesar de baixas doses, o sujeito fica exposto à radiação. O grupo controle foi submetido apenas à anamnese e avaliação da sensibilidade oral, não sendo exposto aos riscos. Quanto aos benefícios, os participantes da pesquisa tiveram suas cavidades orais e orofaringe avaliadas quanto à sensibilidade, pelo pesquisador (fonoaudiólogo responsável pelo estudo). Os participantes que apresentaram alteração na sensibilidade oral foram encaminhados para o médico otorrinolaringologista avaliar aspectos da mucosa oral e orofaríngea, prevenindo desta forma, possíveis sequelas orais decorrentes da hanseníase.

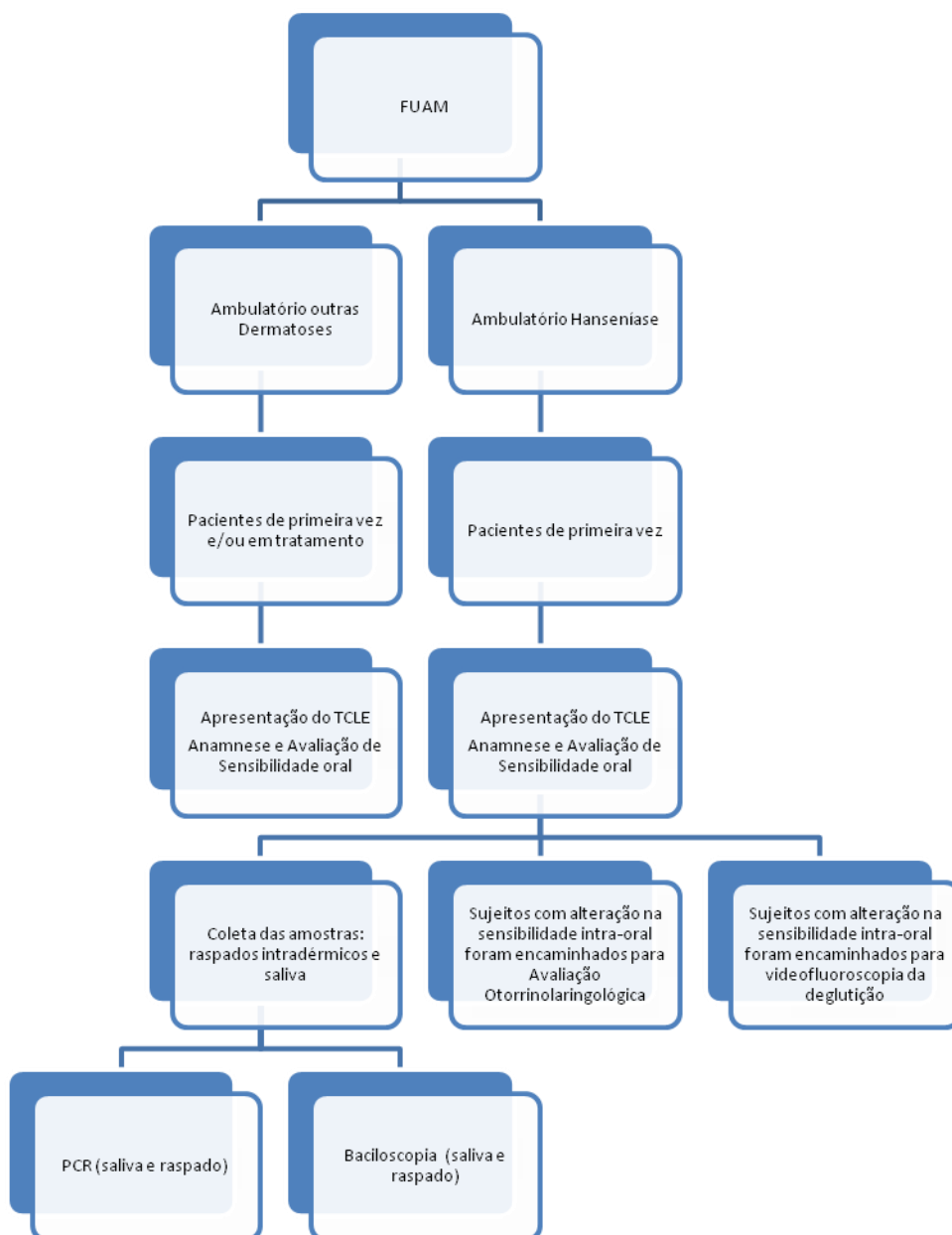
Quando os sujeitos eram encaminhados para os exames com o médico otorrinolaringologista e videofluoroscopia da deglutição, foram ofertados aos participantes da pesquisa quatro vales transportes para o deslocamento.

Os sujeitos interessados em participar do referido estudo puderam participar de outros estudos concomitantes e não foram submetidos a outros procedimentos

invasivos que não a escarificação para baciloscopia realizada na rotina. Após o processo de esclarecimento da pesquisa foi lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE (Apêndice A.1 e A.2) para que o participante entendesse todos os procedimentos da pesquisa. Após a concordância do sujeito em relação ao TCLE e as explicações fornecidas, o mesmo assinou o TCLE em duas vias (uma do sujeito da pesquisa e outra do pesquisador) e, posteriormente, deu-se início a avaliação. Os participantes tinham o direito de retirar seu consentimento de participar da pesquisa a qualquer momento, antes ou durante a mesma, sem nenhuma penalidade ou prejuízo ao seu tratamento, conforme as diretrizes da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

4.4 Procedimentos

4.4.1 Fluxograma de Procedimentos



4.4.2 Anamnese

Realizou-se inicialmente entrevista, com perguntas fechadas, adaptada do questionário elaborado por Furkim e Silva (1999) apud Villar et al. (2004), seguida de coleta de dados no prontuário dos pacientes em avaliação sobre a classificação

operacional da doença, resultados da baciloscopia e tempo de evolução da doença. Quanto ao grupo controle foram coletados do prontuário apenas dados sobre o diagnóstico da doença (outras dermatoses).

Na entrevista coletaram-se dados demográficos referentes a nome, endereço, telefone, data de nascimento, idade, etnia, escolaridade, sexo e estado civil, seguidos por questionamentos sobre dados pessoais e médicos como: etilismo, tabagismo, uso de drogas, uso de medicamentos, se tinha outros problemas de saúde e quantas vezes escovava os dentes por dia. Quanto aos dados relevantes a sensibilidade intra-oral questionou-se sobre: se o paciente sentia dificuldade para perceber o sabor dos alimentos; se sentia a boca seca; se apresentava dificuldade para respirar pelo nariz; se sentia um “bolo” na garganta; se apresentava tosse ou engasgo durante ou depois de comer; se apresentava rouquidão, pigarro ou voz presa durante ou depois de comer, se a comida voltava pelo nariz; se houve perda de peso; se sentia dificuldade de engolir; quais alimentos melhoravam a deglutição; qual (is) medicamento (s) utilizava e se tinha outro problema de saúde. As informações coletadas foram anotadas em uma ficha padronizada (apêndice B.1 e B.2)

4.4.3 Avaliação da Sensibilidade Intra-Oral

A avaliação da sensibilidade intra-oral foi realizada pelo mesmo profissional em todos os participantes da pesquisa. Testaram-se as sensibilidades: térmica, através do toque em dorso de língua, palato duro e palato mole com hastes flexíveis com ponta de algodão molhado em água temperatura ambiente e morna (45°C), sendo considerado normal quando o paciente sentia a temperatura apresentada (quente ou frio) e alterado quando ele não distinguia a temperatura; a sensibilidade tátil, através do toque com hastes flexíveis com ponta de algodão seco em dorso de língua, palato

duro e palato mole, sendo considerado normal quando o sujeito percebia e localizava a região do toque (palato duro, mole e língua) e alterado quando ele não conseguia perceber o toque; e a sensibilidade gustativa, através da oferta de estímulos gustativos sobre a língua, com colher descartável. Foi solicitado ao paciente que descrevesse qual sabor estava sentindo, sendo considerado normal quando o paciente relatava o sabor apresentado e alterado quando ele não identificava o sabor apresentado. Os estímulos gustativos utilizados foram doce (solução de água com açúcar), salgado (solução de água com sal), amargo (chá de boldo) e azedo (limão), que estavam acondicionados em frascos de vidro previamente identificados, porém sem identificação visual pelo paciente. Após a avaliação realizou-se a marcação na ficha do paciente (apêndice C) sobre a presença ou não de alterações na sensibilidade intra-oral.

Os indivíduos com hanseníase e do grupo controle que tiveram detectada alguma alteração na sensibilidade oral foram encaminhados para avaliação otorrinolaringológica.

A escolha das regiões para avaliação da sensibilidade intra-oral (palato mole, palato duro e língua) seguiu as regiões anatômicas da cavidade oral mais frequentemente afetadas pela hanseníase, conforme o mapa topográfico da WHO para lesões orais em sujeitos com hanseníase realizado por Scheepers et al. (1993).

Na avaliação da sensibilidade térmica intra-oral foram utilizadas as mesmas temperaturas (ambiente e quente, não ultrapassando o valor de 45°C) recomendadas pelo MS para a avaliação da sensibilidade nas lesões de pele (BRASIL, 2002).

4.4.4 Avaliação Otorrinolaringológica

Após avaliação da sensibilidade intra-oral, os sujeitos que apresentaram alteração na sensibilidade oral foram encaminhados para avaliação otorrinolaringológica, realizada no Ambulatório Araújo Lima do Hospital Universitário Getúlio Vargas (Anexo 1). A avaliação otorrinolaringológica consistiu de anamnese, exame físico através da rinoscopia, oroscopia e exame complementar com aparelho de ótica rígida Endoview para avaliação nasal (0° com 4 mm de diâmetro) e laríngea (70° com 8 mm de diâmetro). Realizou-se este procedimento para melhor acurácia na avaliação da cavidade nasal, rino e orofaringe e teste da sensibilidade orofaríngea.

4.4.5 Videofluoroscopia da deglutição

Os sujeitos que apresentaram alteração da sensibilidade intra-oral foram encaminhados para realizar a videofluoroscopia da deglutição na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) (Anexo 2). A avaliação da deglutição foi realizada com alimentos nas texturas líquida (suco), pastosa (iogurte) e sólida (pão), sendo cada textura misturada em quantidades iguais de contraste (sulfato de bário) e de alimento.

O exame foi realizado na sala de Raio X, tendo como base o Protocolo de Avaliação Videofluoroscópica da Deglutição de Carrara-de-Angelis et al. (2009) (Anexo 3). Iniciou-se o exame com o paciente na posição em pé ântero-posterior para gravar as imagens das estruturas anatômicas (cavidade oral, laringe e pulmões), e posteriormente iniciava-se a avaliação funcional da deglutição (BARROS et al., 2009). Colocou-se o paciente em posição em pé látero-lateral e o foco da imagem fluoroscópica foi definido anteriormente pelos lábios, superiormente pelo palato duro,

posteriormente pela parede posterior da faringe e inferiormente pela bifurcação de via aérea e esôfago na altura da 7ª vértebra cervical. Após o posicionamento do paciente iniciou-se o exame procurando adequar a melhor consistência e quantidade para cada indivíduo. Após análise das fases preparatória, oral e faríngea na posição látero-lateral, o paciente foi colocado novamente na posição ântero-posterior e foi oferecido alimento de textura sólida com contraste para avaliar a mastigação e a movimentação medial da laringe. A avaliação foi gravada em máquina fotográfica digital, marca KODAK EASYSHARE, modelo M763, posteriormente analisada para preenchimento do protocolo. Os resultados foram apresentados conforme as seguintes escalas: Escala de Penetração e Aspiração (adaptada de ROSENBEK et al, 1996 apud Carrara-de-Angelis, 2009) (Anexo 4) e Escala de Severidade das Disfagias (O'Neil, 1999 apud Carrara-de-Angelis, 2009) (Anexo 5).

4.4.6 Coleta das Amostras

4.4.6.1 Coleta dos raspados intradérmicos

Os raspados intradérmicos foram coletados conforme a rotina do serviço na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM). O técnico responsável pela coleta realizou a anti-sepsia do local com álcool 70% e com os dedos indicador e polegar enluvados, fez a isquemia da região a ser coletada. Posteriormente, realizou corte superficial com lâmina de bisturi descartável para extração do material. A coleta foi realizada em quatro regiões diferentes, para a lâmina da baciloscopia de rotina, conforme padronização da WHO, sendo distendida em uma mesma lâmina de microscopia os quatro esfregaços. A obtenção de material utilizado para a PCR foi realizada com uma micropipeta, marca Eppendorf, modelo research (ponteiros com filtros descartáveis) diretamente da amostra coletada no

lóbulo da orelha direita, contida na lâmina de bisturi (aproximadamente de 5 a 10 μ L no total) sendo introduzida em um microtubo de 1,5 mL contendo 200 μ L de isotiocianato de guanidina 6M (Figura 2).

4.4.6.2 Descontaminação e esterilização do material de coleta

Os tubos de látex que foram utilizados na coleta da saliva (Auriflex 202 (DI-5,00 mm, DE-10,00 mm), Lote N. 07/A) foram previamente lavados, cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm, deixados no álcool 70% por 10 minutos e em seguida esterilizados individualmente por autoclavação.

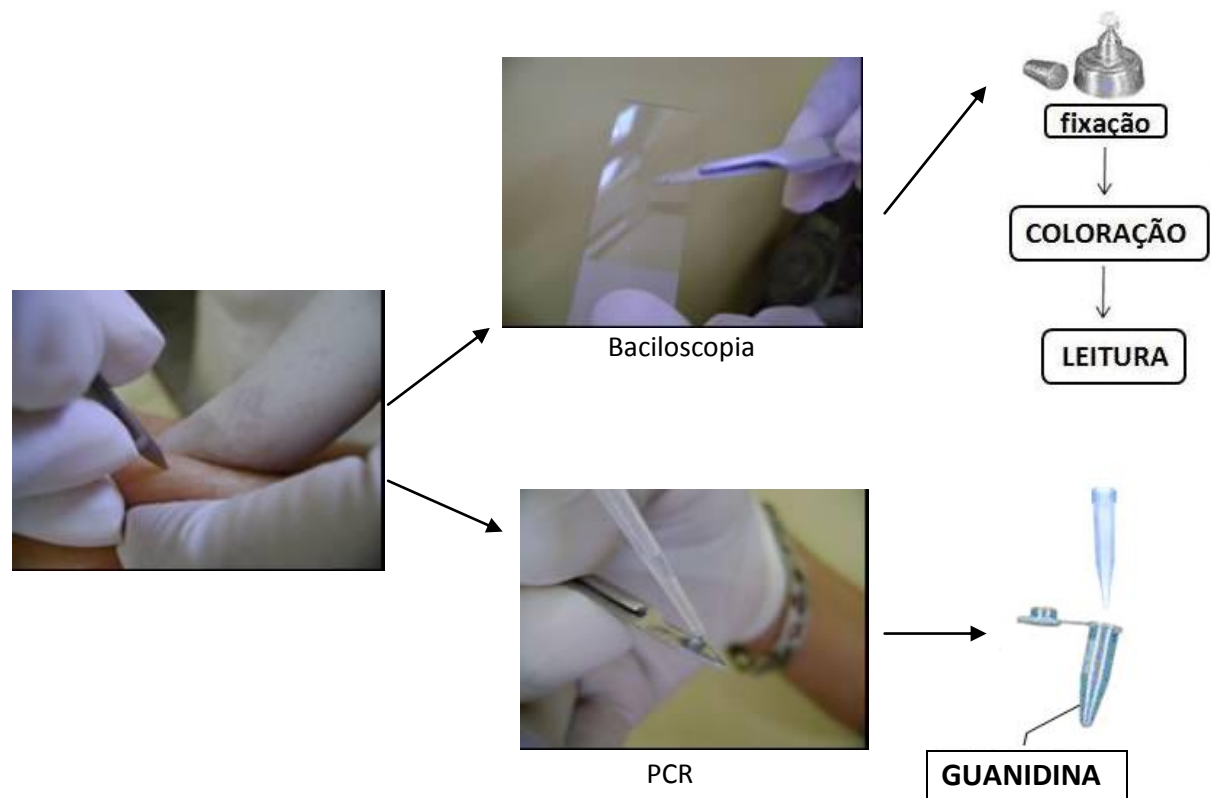


Figura 2. Ilustração esquemática da coleta dos raspados intradérmicos
Fonte: Adaptado de ABDALLA (2009)

4.4.6.3 Coleta da saliva

Para a coleta da saliva empregou-se a metodologia utilizada por Abdalla (2009) na qual os participantes da pesquisa foram orientados a mastigar um pedaço de aproximadamente 1 cm de um tubo de látex, previamente esterilizado para estimular a

produção da mesma. O participante foi orientado a deglutir a saliva produzida durante os primeiros 30 segundos, para posteriormente coletá-la durante 5 minutos em coletor universal estéril com capacidade de 70 ml (J. Prolab Ind. Com. Prod. Para Laboratório LTDA). Com o auxílio de uma micropipeta, marca Eppendorf, modelo research (ponteiras com filtros descartáveis), 500 μ L de saliva foram coletados do copo e assepticamente transferidos para um microtubo de 1,5 ml vazio. Uma gota da saliva foi dispersa, com a própria micropipeta, sobre a lâmina de microscopia para a realização da baciloscopia direta (Figura 3).

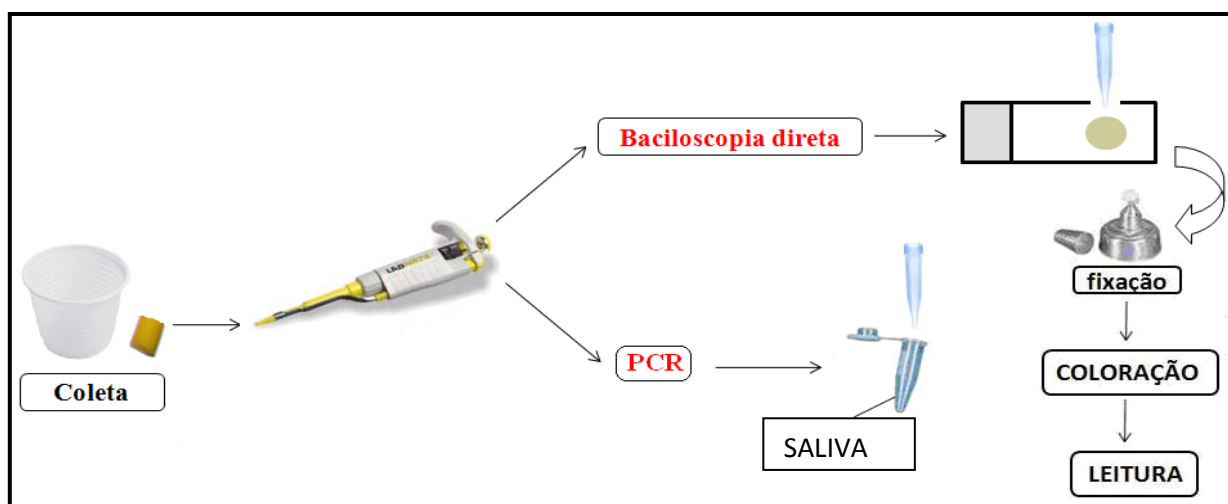


Figura 3. Fluxograma da coleta das amostras da saliva

Fonte: Adaptado de ABDALLA (2009)

4.4.6.4 Conservação do material coletado

Após a realização das coletas os microtubos com as amostras foram acondicionados a - 70°C até o momento da extração do DNA.

4.4.7 Procedimento molecular – PCR

4.4.7.1 Identificação dos microtubos de coleta

Os microtubos com 500 μ L de saliva e 200 μ L de guanidina contendo as amostras do raspado foram identificados através de um número para cada paciente. Para um único paciente foram utilizados dois microtubos com o mesmo número

seguido da letra correspondente ao local da coleta. Para a coleta dos raspados intradérmicos o número foi seguido pela letra R, e da saliva pela letra S (Figura 4).

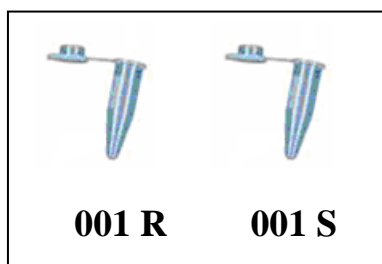


Figura 4. Identificação dos microtubos da coleta
Fonte: adaptado de Abdalla (2009)

4.4.7.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras utilizou-se o Kit da Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506) (Anexos 6 e 7).

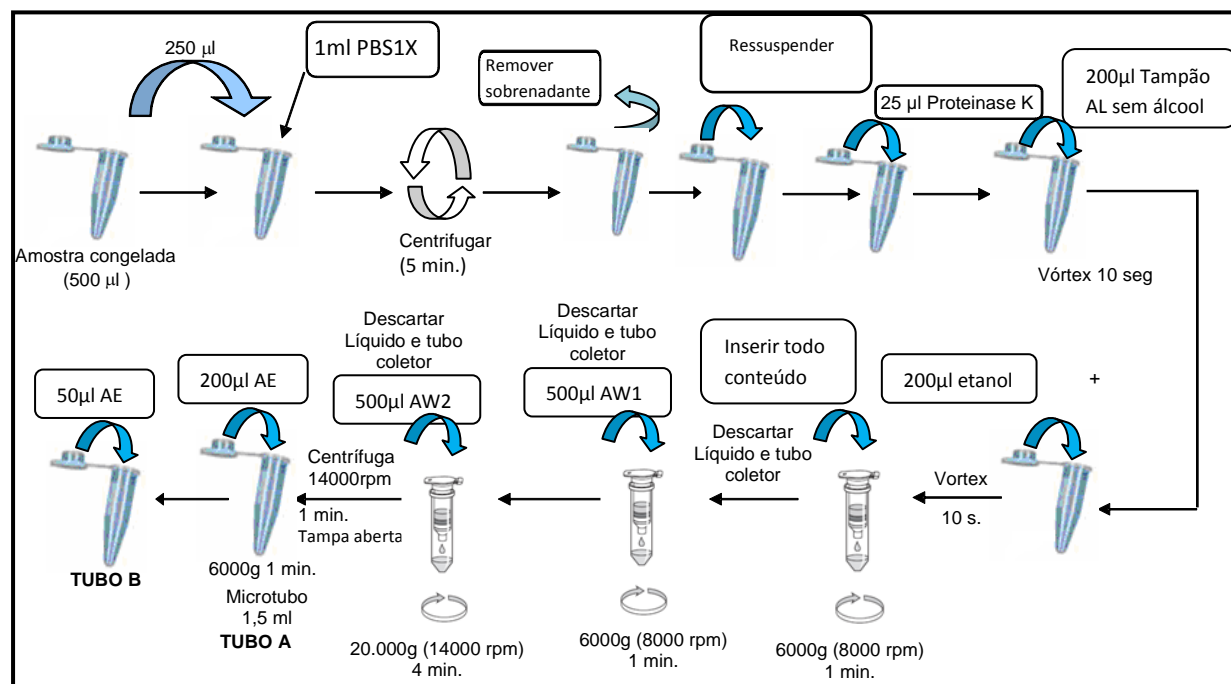


Figura 5. Protocolo de extração do DNA com kit da Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506)

Fonte: Rosa (2011)

Após a extração do DNA das amostras foi feita a quantificação do DNA por espectrofotômetro de microvolume (ACTGene, modelo ASP-3700).

Para detecção do DNA do *M. leprae* foi utilizado um protocolo de amplificação para PCR usando um par de iniciadores para produzir um fragmento de 250 pb da região intergênica 85AC (senso, 5' - ATA CTG TTC ACG CAG CAT CG - 3'; anti-senso, 5' – GTT GAA GGC ATC AAG CAG GT – 3'). O produto 85A-C abrange a região entre os genes *fbpA* e *fbpC* (Martinez, 2006). Este protocolo foi originalmente estabelecido para PCR convencional e adaptado para detecção em tempo real no presente trabalho utilizando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Cat. A6001).

A reação de amplificação foi preparada de acordo com o quadro 2.

Quadro 2

Protocolo para Reação da PCR Tempo-Real: alvo 85 A-C

ITEM	QUANTIDADE (μL)
Iniciadores de 85 A-C [5 μM]	2
GoTaq qPCR 2X	10
Água ultra pura	5,8
CXR 100X	0,2
Amostra	2
Volume Reação Final	20

Fonte: ROSA (2011)

Os iniciadores e o PCR mix foram adicionados em uma estação de trabalho pré-PCR enquanto que as amostras foram posteriormente inseridas em uma cabine de segurança biológica para não haver contaminação cruzada de DNA.

Para cada grupo de reações de PCR Tempo-Real (qPCR) que foram realizadas houve um controle branco e um positivo. O controle branco constaram apenas os iniciadores e PCR mix e o controle positivo foi feito com uma amostra de saliva de um paciente multibacilar que teve seu resultado positivo para *M.leprae* na qPCR e comprovação no sequenciamento do DNA.

Nos ensaios preliminares foi possível verificar que a especificidade da reação era aumentada com a utilização de um protocolo de qPCR com dois ciclos, o primeiro com PCR *touchdown* e um segundo com condições convencionais. A detecção de

fluorescência se deu a cada etapa de extensão da fita de DNA. As condições dos ciclos da qPCR estão detalhadas no quadro 3.

Quadro 3

Programa de Reação da PCR Tempo-Real: alvo 85 A-C

Amplificação			
Etapas	Repetições	Temperatura	Tempo
Incubação Inicial	1 X	95°C	10'
Ciclo 1	8 X	95 °C	15''
		72 °C (-1 °C/ciclo)	30''
		72 °C	30''
Ciclo 2	40 X	95 °C	15''
		64 °C	30''
		72 °C	30''
Extensão Final	1X	72 °C	10'
Curva de Desnaturação		95 °C	15''
		60 °C	1'
		95 °C	15''

Fonte: Protocolo desenvolvido no presente estudo.

4.4.7.3 Leitura dos resultados

Os resultados da qPCR foram avaliados em função dos gráficos das curvas amplificação (Intensidade de fluorescência em função do ciclo da PCR) e de dissociação (derivada da intensidade de fluorescência em função da temperatura) de cada amostra obtidos pelo software do equipamento de PCR em tempo real (StepOne Plus, Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram ainda submetidos à eletroforese em gel de agarose (Anexo 8).

Uma vez que este procedimento foi uma adaptação do protocolo de PCR convencional de Martinez et al. (2006), foram necessários alguns cuidados para confirmar os resultados positivos.

A qPCR utiliza como princípio a detecção do aumento de fluorescência gerada em função do processo de amplificação de um alvo de DNA. Duas estratégias são as mais utilizadas, as que utilizam-se da propriedade de algumas moléculas de emitir

fluorescência quando ligadas as moléculas de DNA fita-dupla (dsDNA) e os ensaios que detectam aumento de fluorescência em função da hidrólise de uma sonda.

Decidiu-se utilizar a primeira estratégia, no nosso caso com a detecção da fluorescência da molécula BRYT™ Green (Promega, Cat. A6001) ligada ao produto de amplificação. No caso de uma amostra positiva, a cada ciclo da PCR, há um acúmulo de moléculas fita-dupla de DNA, conseqüentemente mais moléculas do fluoróforo irão se ligar aumentando o nível de fluorescência detectado.

Todavia essa estratégia tem a desvantagem de que, se houver formação de produto inespecífico esse também se ligará ao fluoróforo gerando sinal. Por isso, é necessário acrescentar uma etapa de avaliação da curva de desnaturação, que consiste em detectar a temperatura de dissociação (T_m) da molécula de DNA alvo. Uma vez determinada essa temperatura é possível, com grande grau de confiança, determinar a correta amplificação do alvo.

Assim, durante a padronização da técnica para detecção em tempo real foi necessário determinar a temperatura de dissociação do alvo 85AC. Este procedimento foi realizado em conjunto a eletroforese em gel de agarose, utilizada rotineiramente para revelar as reações de PCR convencional.

Primeiramente, amostras que mostraram sinal de amplificação (curva de amplificação) foram submetidas a curva de dissociação, onde os valores obtidos para cada amostra foram registrados. Posteriormente, os mesmos produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para detectar produtos de amplificação com o tamanho correto de 250pb. Ao cruzarmos os dados dos valores obtidos com as curvas de desnaturação verificamos que esses produtos apresentavam uma T_m de 90,0°C (+/- 0,5°C). De maneira a não deixar dúvidas quanto a especificidade da reação, de forma aleatória, alguns produtos de amplificação de 250pb foram

escolhidos e submetidos ao sequenciamento nucleotídico com o kit BigDye Terminator v3.1 (Cat. 4337455) e lido em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). Os resultados do sequenciamento foram analisados no servidor BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmando que se tratava de produto de amplificação da região intergênica 85AC do *M. leprae*.

Assim, para que uma amostra fosse considerada positiva pelo qPCR era necessário cumprir os seguintes quesitos: 1) apresentar curva de amplificação acima do limiar basal; 2) apresentar na curva de dissociação T_m igual a $90,0^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

4.4.8 Procedimentos bacteriológicos

Os procedimentos bacteriológicos como a fixação das amostras, coloração do esfregaço e exame baciloscópico seguiram o estipulado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). (Anexo 9).

4.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva com apresentação em tabelas, sendo que no cálculo das variáveis quantitativas foi calculada ainda a média e desvio padrão. Na comparação dos pacientes com alteração de sensibilidade intra-oral em relação às variáveis categóricas foi utilizada a estatística de teste do Qui-Quadrado. Na comparação das médias das variáveis quantitativas foram utilizados os testes de Análise de Variância (ANOVA) e o teste *t student*, nos casos em que foram constatadas a normalidade dos dados. A concordância entre os resultados dos testes de PCR da saliva, PCR do raspado intradérmico e baciloscopia do raspado foi analisada através do índice kappa não ponderado (COHEN, 1960).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período da coleta de dados foram abordados 87 sujeitos com suspeita de hanseníase. Dos casos suspeitos de hanseníase, 24 não confirmaram a doença na avaliação médica, 12 não retornaram para concluir avaliação, 3 sujeitos não participaram da pesquisa por fazerem parte dos critérios de exclusão e 3 não aceitaram participar. Sendo assim, participaram do estudo um total de 45 sujeitos com hanseníase. Outros 45 sujeitos classificados como portadores de outras dermatoses foram convidados a participar do estudo e incluídos como o grupo controle.

Dos 45 sujeitos com hanseníase que participaram do estudo, 34 eram do gênero masculino (75,6%) e 11 do gênero feminino (24,4%), mostrando predominância do gênero masculino em relação ao feminino. Estes resultados apontam proporção semelhante àquela encontrada no estudo de Khambati et al. (2009) no qual constataram 78% dos casos do gênero masculino e 22% do gênero feminino. Este estudo buscava determinar a sensibilidade e especificidade de quatro testes neurológicos usados para o estudo da condução nervosa em indivíduos com hanseníase. A pesquisa recrutou 357 sujeitos MB, no período de fevereiro de 2001 a abril de 2005 na Índia. Em contrapartida, Souza et al. (2009) encontraram 50,5% do gênero feminino e 49,5% do gênero masculino em pesquisa realizada no município de Serra – ES, de março de 2005 a maio de 2007, em 99 sujeitos com hanseníase, com o objetivo de descrever doença dental e periodontal e lesões orais em pacientes virgens de tratamento.

No grupo controle ocorreu o oposto, predominando o gênero feminino (62,8%) sobre o gênero masculino (37,8%).

Kumar et al. (2006) colocam que a hanseníase é conhecida por afetar mais comumente homens do que mulheres, o que foi também notado neste estudo, sendo estatisticamente significativo quando comparados os grupos (casos e controles) em relação ao gênero (Tabela 1).

A média de idade dos sujeitos com hanseníase foi de 36,7 anos, com predomínio de sujeitos na faixa etária entre 18 – 30 anos, sendo estes dados compatíveis com os achados de Abdalla (2009). No grupo controle a média de idade dos sujeitos foi muito similar, de 36,8 anos, também apresentando predomínio de sujeitos na faixa etária de 18 – 30 anos.

Em relação ao estado civil dos sujeitos com hanseníase, 14 (31,1%) eram casados, 26 (57,8%) eram solteiros e 5 (11,1%) enquadravam-se em outras categorias de estado civil. No grupo controle, dos 45 entrevistados, 18 (40,0%) eram casados, 18 (40,0%) eram solteiros e 9 (20,0%) eram outras categorias.

Na variável escolaridade, observou-se que no grupo controle o nível de escolaridade era maior, tendo 29 sujeitos (64,4%) com nível fundamental completo e 16 (35,5%) com nível fundamental incompleto. No grupo com hanseníase 17 (37,7%) sujeitos possuíam o nível fundamental completo e 28 (62,2%) enquadravam-se no nível fundamental incompleto, sendo estes dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) (Tabela 1). Estes dados vão ao encontro dos dados apresentados pelo MS (2008) sobre a escolaridade dos casos novos de hanseníase informados em 2007, onde 53,4% de sujeitos foram registrados como tendo nível fundamental incompleto, evidenciando a conhecida relação da hanseníase com as populações socialmente excluídas (BRASIL, 2008). Segundo dados do IBGE (2006) 59,5% de pessoas com

25 anos ou mais de idade, completou 8 anos de estudo no Estado do Amazonas (IBGE, 2006).

Tanto no grupo de sujeitos com hanseníase, quanto no grupo controle, a cor da pele mais prevalente foi a parda com 35 (77,8%) e 32 (71,1%) respectivamente. Este dado confirma os dados apresentados pelo IBGE (2006), que 74,8% da população do Estado do Amazonas tem a cor da pele parda.

Tabela 1

Distribuição de frequência dos dados sócio-demográficos nos diferentes grupos

Variáveis	Grupos				Total	p
	Casos (n=45)		Controle (n=45)			
	fi	%	fi	%		
Gênero						<0,001*
Feminino	11	24,4	28	62,8	39	
Masculino	34	75,6	17	37,8	51	
Idade						0,971**
18 --30	17	37,8	18	40,0	35	
30 --40	13	28,9	9	20,0	22	
40 --50	9	20,0	9	20,0	18	
50 -- 60	6	13,3	9	20,0	15	
Média ± DP	36,8 ± 11,3		36,9 ± 12,1			
Estado Civil						0,212*
Solteiro	26	57,8	18	40,0	44	
Casado	14	31,1	18	40,0	32	
Outros	5	11,1	9	20,0	14	
Escolaridade						0,011*
Fundamental Incompleto	28	62,2	16	35,5	44	
Fundamental Completo	17	37,7	29	64,4	46	
Raça						****
Branca	6	13,3	9	20,0	15	
Negra	2	4,4			2	
Mulata	1	2,2	2	4,4	3	
Oriental			2	4,4	2	
Parda	35	77,8	32	71,1	67	
Outras	1	2,2			1	
Tempo de Evolução da doença						0,584***
Media		12,0		12,0		
Q ₁ /Q ₃		6/20		2/36		

fi = frequência absoluta simples; Qi = quantil; * Qui-quadrado de Pearson; ** Teste *t* de Student para comparação de médias; *** Teste não paramétrico de Mann-Whitney, **** Não foi possível aplicar a estatística de testes devido as restrições do teste qui-quadrado

Quanto a classificação operacional dos sujeitos com hanseníase, a maior prevalência ocorreu na forma MB, com 26 (58%) sujeitos, sendo este dado próximo ao obtido por Martinez et al. (2010), que encontrou 67,66% (226/334) de sujeitos classificados como MB.

O presente estudo não constatou significância estatística entre a presença de alteração de sensibilidade intra-oral e o tempo de evolução da doença (Tabela 1). Acredita-se que a explicação para este fato seja pela diversidade do tempo de evolução da doença apresentada pelos sujeitos com hanseníase (de 1 mês à 10 anos) virgens de tratamento e pelo número reduzido de participantes do estudo.

Embora tenha sido constatada significância estatística entre o uso de medicamentos e os grupos (caso e controle), como mostra a tabela 2, não se encontrou na literatura relatos sobre este achado, como também não foi possível encontrar uma explicação coerente para o fato.

Na relação das variáveis dos dados pessoais e de sensibilidade oral com os grupos de sujeitos com hanseníase e controle, teve significância estatística a variável sobre “sentir dificuldade para respirar pelo nariz”, conforme apresentado na Tabela 2. Este achado corrobora ao que vem sendo exposto na literatura sobre o comprometimento das fossas nasais em pacientes com hanseníase. (MARTINS et al., 2005; BHAT et al., 2007; SILVA et al., 2008; THOMAS; EMMANUEL, 2009; NEVILLE et al., 2009)

Na relação dos grupos e as variáveis da sensibilidade oral não houve significância estatística em relação a alteração da sensibilidade tátil e gustativa (Tabela 3), porém constatou-se significância estatística ($p < 0,05$) quanto a alteração da sensibilidade térmica intra-oral nos sujeitos com hanseníase quando comparada com os sujeitos do grupo controle. Este dado corrobora com o descrito na literatura, que a

diminuição da sensibilidade térmica está entre os sintomas iniciais da hanseníase.

(MARGARIDO; RIVITTI, 2005)

Tabela 2

Relação dos dados pessoais e de sensibilidade oral nos dois grupos estudados

Variáveis	Grupos				Total	p*
	Casos (n=45)		Controle (n=45)			
	fi	%	fi	%		
Consumo de tabaco						
Tabagista	10	22,2	6	13,3	16	0,392
Não-tabagista	23	51,1	29	64,4	52	
Ex-tabagista	12	26,7	10	22,2	22	
Consumo de bebida alcoólica						0,803
Nunca	25	55,6	25	55,6	50	
Raramente	12	26,7	14	31,1	26	
Frequentemente	8	17,8	6	13,3	14	
Uso de drogas ilícitas	3	6,7	-	-	3	0,121**
Uso de medicamentos	2	4,4	16	35,6	18	<0,001**
Se possui doença sistêmica	13	28,9	19	42,2	32	0,186
Quantidade de escovação diária						0,655
< 3	16	35,6	14	31,1	30	
≥ 3	29	64,4	31	68,9	60	
Dificuldade para perceber o sabor dos alimentos	1	2,2	3	6,7	4	0,308**
Sente a boca seca	16	35,6	18	40,0	34	0,664
Sente dificuldade para respirar pelo nariz	17	37,8	8	7,8	25	0,034
Globus faríngeo	11	24,4	11	24,4	22	0,999
Tosse ou engasgo durante ou antes de comer	2	4,4	6	3,3	8	0,133**
Rouquidão, pigarro ou a voz presa durante ou depois de comer	3	6,7	5	11,1	8	0,357**
Refluxo nasal do alimento	3	6,7	-	-	3	0,121**
Perda de peso	10	22,2	10	22,2	20	0,999
Teve pneumonia	2	4,4	2	4,4	4	0,999
Sente dificuldade para engolir	2	4,4	3	6,7	5	0,500

fi = frequência absoluta simples; * Qui-quadrado de Pearson; ** Teste Exato de Fisher

Conforme exposto na tabela 3, a presença de alteração na sensibilidade térmica intra-oral em sujeitos com hanseníase demonstra a necessidade de avaliação da sensibilidade oral como meio de detecção de comprometimento de nervos periféricos na cavidade oral, que podem gerar alterações nas funções estomatognáticas. Wani et al. (2009) sugerem na conclusão do estudo sobre o envolvimento dos nervos

cranianos na hanseníase, que todos os sujeitos com hanseníase, deveriam ser monitorados no começo da doença a fim de detectar precocemente danos nervosos e para prevenir permanentes perdas funcionais.

Durante a coleta de dados observou-se no prontuário a avaliação das incapacidades e pode-se perceber que em alguns casos a alteração na sensibilidade oral antecede a instalação de incapacidades. Verificou-se também que a forma clínica mais prevalente nos casos de alteração na sensibilidade oral foi a *boderline tuberculoide* (BT), conforme a classificação de Ridley e Jopling, o que concorda com os achados de Wani et al. (2009) que dos 100 casos avaliados, 22 apresentaram envolvimento de nervos cranianos, sendo destes, a maioria casos BT (32%).

O grupo *borderline* é imunológico e clinicamente instável, podendo sofrer reações imune-celulares e mudar seu posicionamento no espectro da doença quando houver variação da carga bacilar (MARGARIDO & RIVITTI, 2005). Segundo Goulart e Goulart (2008) este grupo é o mais importante no espectro da doença, levando-se em consideração o número de pacientes acometidos e a severidade do dano neural, responsável pelas desabilidades e deformidades vistas na hanseníase.

Tabela 3

Relação entre variáveis de sensibilidade e os grupos estudados

Variável	Grupos				Total	p*
	Caso (n=45)		Controle (n=45)			
	fi	%	fi	%		
Sensibilidade Tátil						0,121
Normal	42	93,3	45	100,0	87	
Alterado	3	6,7	-	-	3	
Sensibilidade Térmica						<0,001
Normal	33	73,3	45	100,0	78	
Alterado	12	26,7	-	-	12	
Sensibilidade Gustativa						0,500
Normal	41	91,1	42	93,3	83	
Alterado	4	8,9	3	6,7	7	

fi = freqüência absoluta simples; * Teste Exato de Fisher

Com base nesta observação, nota-se a necessidade de realizar um estudo abrangendo um número maior de sujeitos para relacionar a forma clínica com a presença de incapacidades e a sensibilidade oral, bem como, suas relações com o tempo de evolução da doença.

A sensibilidade térmica intra-oral pode estar alterada em pacientes com hanseníase pelo acometimento dos ramos periféricos do nervo trigêmio (V par craniano), responsável pela aferência de estímulos táteis e térmicos da face e cavidade oral. O comprometimento do nervo trigêmio em sujeitos com hanseníase também foi detectado em estudo realizado por Reichart et al (1982) que encontraram hipoestesia e anestesia em áreas da face inervadas pelo trigêmio em 29 sujeitos dos 43 participantes do estudo.

Neville et al. (2009) afirmam que o déficit sensorial pode afetar qualquer ramo do nervo trigêmio em sujeitos com hanseníase, porém o ramo maxilar é o mais afetado.

Na pesquisa realizada por Kumar et al. (2006) sobre o envolvimento dos nervos cranianos em pacientes com hanseníase, encontraram 9/51 (18%) de sujeitos com alteração, sendo que os nervos cranianos mais afetados foram o nervo facial (VII par craniano) e o nervo trigêmio (V par craniano).

No presente estudo 4 sujeitos com hanseníase apresentaram alteração na sensibilidade gustativa, o que caracteriza envolvimento do nervo facial. Em estudo realizado por Soni e Chatterji (1981) sobre distúrbios gustativos na hanseníase, mostrou que 12/30 (40%) sujeitos com hanseníase apresentavam algum grau de comprometimento gustativo e isto estava relacionado com a severidade da doença.

Conforme tabela 4, relação das variáveis da sensibilidade oral com os resultados da baciloscopia do raspado intradérmico, mostrou significância estatística

($p < 0,05$) na ocorrência de alteração na sensibilidade tátil em sujeitos com baciloscopia do raspado positiva. Estes sujeitos estavam classificados como MB, a maioria estava com tempo de evolução da doença menor ou igual a um ano e surpreendentemente não apresentavam alteração de sensibilidade térmica e gustativa.

Tabela 4

Variável	Relação entre variáveis de sensibilidade e a Baciloscopia do raspado intradérmico					
	Baciloscopia do raspado intradérmico				Total	p*
	Positivo (n=45)		Negativo (n=45)			
	fi	%	fi	%		
Sensibilidade Tátil						0,002
Normal	9	21,4	33	78,6	42	
Alterado	3	100,0	-	-	3	
Sensibilidade Térmica						0,093
Normal	11	33,3	22	66,7	33	
Alterado	1	8,3	11	91,7	12	
Sensibilidade Gustativa						0,937
Normal	11	26,8	30	73,2	41	
Alterado	1	25,0	3	75,0	4	

fi = frequência absoluta simples; * Qui-quadrado

De acordo com o comentado por Margarido e Rivitti (2005) a sensibilidade tátil é a última a ser comprometida e, nos pacientes MB, quando afetada no início da doença, apresenta-se apenas como hipoestesia, evoluindo para anestesia em fase avançada da hanseníase. Como no presente estudo a sensibilidade foi testada de forma subjetiva não foi possível mensurar o grau de comprometimento (hipoestesia ou anestesia), mas sim afirmar que a sensibilidade tátil estava alterada.

Dos 15 sujeitos com alteração na sensibilidade oral, 9 (60,0%) foram classificados como MB e 6 (40,0%) como PB. Em relatos antigos a maioria dos sujeitos acometidos com lesões em cavidade oral estavam classificados como Virchowianos que compõe o grupo de pacientes MB (SCHEEPERS et al., 1993).

Os 15 (33,3%) sujeitos que apresentaram alteração na avaliação da sensibilidade intra-oral foram encaminhados para realização do exame de videofluoroscopia da deglutição e para avaliação otorrinolaringológica e a realização de exames complementares como a nasofibrosopia e laringoscopia para detectar possível alteração na sensibilidade orofaríngea.

Para o exame de videofluoroscopia da deglutição, compareceram apenas 4 sujeitos dos 15 encaminhados. Nenhum dos sujeitos apresentou disfagia na conclusão do exame, porém um achado interessante, foi que 3 dos 4 sujeitos apresentaram discreta estase em recessos faríngeos para diferentes consistências alimentares, o que levanta dúvidas sobre a integridade sensorial e motora das estruturas envolvidas na dinâmica da deglutição.

Barros e Portas (2008) comentam que em casos de redução da sensibilidade, o bolo alimentar pode ficar parado na cavidade oral e na faringe, caindo para a faringe ou vias aéreas inferiores antes do ato da deglutição, podendo ser broncoaspirado silenciosamente.

Em estudos anteriores sobre a cavidade oral em sujeitos com hanseníase (BHAT et al, 2007; VILLAR et al., 2004) foram observados regurgitação nasal de fluídos e diminuição da mobilidade do palato mole, demonstrando a necessidade de uma investigação mais precisa na área, utilizando softwares para análise quantitativa da videofluoroscopia da deglutição.

Quanto a avaliação otorrinolaringológica, dos 15 sujeitos encaminhados apenas 5 compareceram para avaliação, sendo que 1 (um) deles apresentou hipoestesia em orofaringe na videolaringoscopia.

Conforme afirmam Silva et al. (2008) pelo fato das vias aéreas superiores serem via de entrada e saída do bacilo no organismo e a evolução da doença

apresentar caráter descendente, ou seja, inicia pelas fossas nasais e, a seguir boca e laringe, torna-se imprescindível a avaliação otorrinolaringológica destes sujeitos.

Na avaliação otorrinolaringológica foi utilizado pelo médico o aparelho de ótica rígida Endoview para avaliação nasal (0° com 4 mm de diâmetro) e laríngea (70° com 8 mm de diâmetro), que segundo a literatura, oferece melhor acurácia na identificação de lesões antes não visualizadas e na avaliação da sensibilidade orofaríngea. (MARTINS et al., 2005; SWANSON et al., 2009)

Os principais achados na avaliação otorrinolaringológica foram: desabamento da pirâmide nasal (em um sujeito da forma Virchowiana), epistaxe, crostas, rinite atrófica, obstrução nasal e palidez da mucosa nasal.

Em estudo retrospectivo de dez anos em endoscopia das cavidades nasais de pacientes com hanseníase, realizado por Martins et al. (2005) observaram que 70% dos sujeitos do estudo apresentavam queixas otorrinolaringológicas relacionadas ao nariz, porém muitos destes não relacionavam os sintomas nasais à hanseníase. E cabe destacar que neste mesmo estudo, todos os sujeitos avaliados apresentaram lesões na mucosa nasal, confirmando a importância da avaliação otorrinolaringológica em sujeitos com hanseníase.

Durante a coleta de dados foi explicado aos participantes da pesquisa sobre a importância e os benefícios da realização dos exames de videofluoroscopia da deglutição e da nasofibroscopia e videolaringoscopia, bem como, foram fornecidos vale-transporte para a locomoção dos sujeitos ao local dos exames. Infelizmente poucos sujeitos participaram das avaliações complementares.

Para a realização dos procedimentos moleculares, inicialmente, pretendia-se realizar a extração do DNA pelo método fenol-clorofórmio e a PCR convencional, porém, após alguns testes optou-se pelo Kit para extração da Qiagen DNeasy Blood

& Tissue (Cat. N^o. 69506) e pela realização da qPCR. Como também, para obtenção de controle positivo, foram realizadas reações de seqüenciamento para algumas amostras.

Com relação a pesquisa do DNA do *M. leprae* na saliva, por meio da técnica de qPCR, foram detectados 16 (35,5%) exames positivos e 29 (64,4%) negativos do total de 45 sujeitos (Figura 6 e 7). Abdalla (2009), por meio de PCR convencional detectou 10 (20,8%) de 48 sujeitos avaliados e Martinez et al. (2010) obtiveram 51 (17,59%) exames positivos de 290 exames realizados com swab em cavidade oral por meio da PCR convencional.

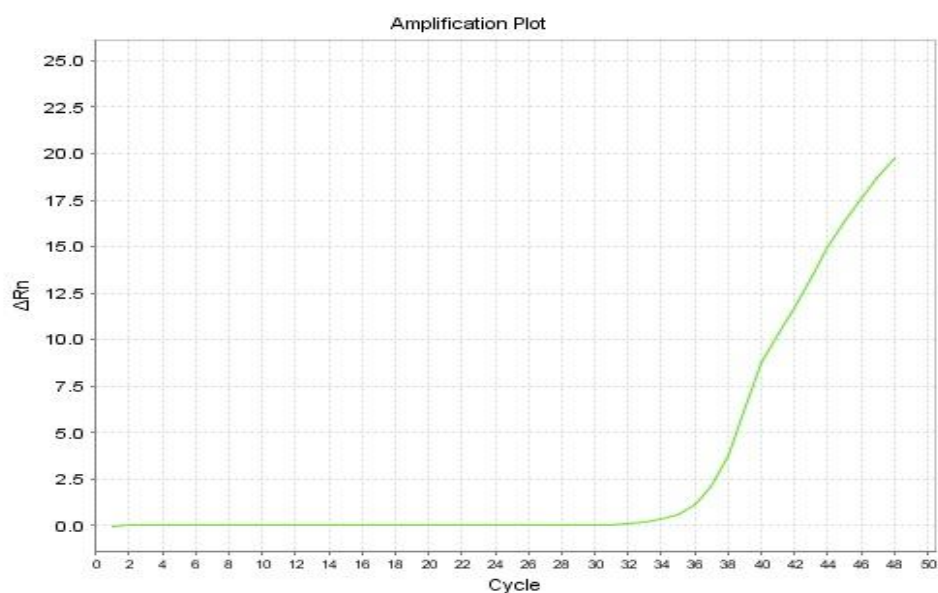


Fig. 6: Curva de Amplificação do alvo 85AC, amostra 004-R. Mix GoTaq qPCR (Promega)

Quanto a relação da classificação operacional e a PCR do raspado intradérmico, 10 (38,5%) dos 26 pacientes MB tiveram PCR do raspado positivo e 3 (15,8%) dos 19 pacientes PB apresentaram PCR do raspado intradérmico positivo. Na relação da classificação operacional e a PCR da saliva, 10 (38,5%) dos 26 pacientes MB tiveram PCR da saliva positiva e dos 19 pacientes PB, seis (31,6%) tiveram resultado positivo, como mostra a Tabela 5.

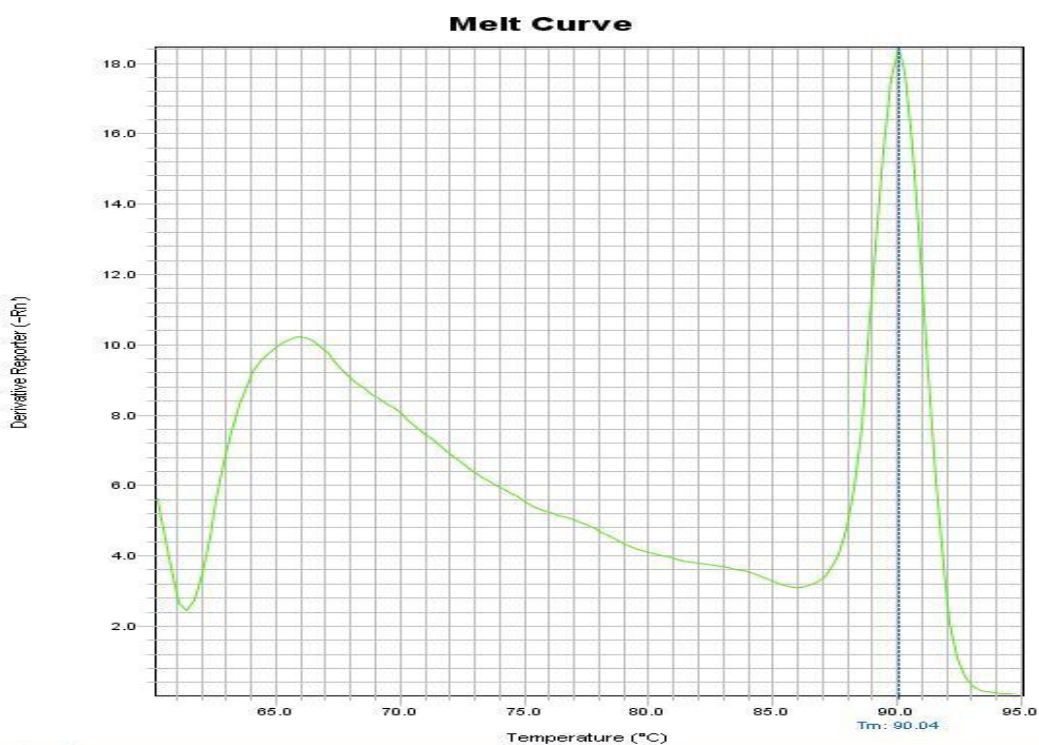


Fig. 7: Curva de Desnaturação do alvo 85AC, amostra 004-R. Mix GoTaq qPCR (Promega)

A relação entre a classificação operacional e a baciloscopia do raspado intradérmico apresentou significância estatística, pois está ressaltando o fato da baciloscopia ter grande positividade nos casos MB mas ausência de positividade nos casos PB, o que demonstra a importância de inserir outros exames laboratoriais, como a qPCR, para auxiliar no diagnóstico de sujeitos PB.

Analisando separadamente as três técnicas laboratoriais utilizadas (Tabela 5), a PCR da saliva foi aquela com maior sensibilidade (16/45), seguida da PCR do raspado intradérmico (13/45) e da baciloscopia do raspado (12/45). Quando analisamos separadamente em função da classificação operacional verificamos que nos pacientes MB (26) 12 (46,2%) foram positivos pela baciloscopia, 10 (38,5%) pela PCR da saliva e 10 (38,5%) pela PCR do raspado intradérmico. Nos pacientes PB

(19) seis (31,6%) foram positivos na PCR da saliva, três (15,8%) na PCR do raspado intradérmico e nenhum positivo na baciloscopia do raspado.

Tabela 5

Relação da baciloscopia do raspado intradérmico, PCR da saliva, PCR do raspado intradérmico e a classificação operacional

Variável	Classificação Operacional				Total	p
	Multibacilar (n=26)		Paucibacilar (n=19)			
	fi	%	fi	%		
Baciloscopia do raspado intradérmico						<0,001*
Positivo	12	46,2	-	-	12	
Negativo	14	53,8	19	100,0	33	
PCR da saliva						0,872**
Positivo	10	38,5	6	31,6	16	
Negativo	16	61,5	13	68,4	29	
PCR do raspado intradérmico						0,185**
Positivo	10	38,5	3	15,8	13	
Negativo	16	61,5	16	84,2	32	

fi = frequência absoluta simples; * Teste Exato de Fisher; **Qui-quadrado com correção de Yates

Quando cruzamos os resultados das três abordagens foi possível verificar que uma amostra foi positiva somente na baciloscopia, oito somente na PCR da saliva e três somente na PCR do raspado intradérmico.

A positividade da PCR da saliva em seis (31,6%) dos 19 pacientes PB sugere a possibilidade de um novo sítio de coleta das amostras. É importante comentar que a coleta da saliva em sujeitos com hanseníase além de proporcionar a detecção do DNA em sujeitos MB e principalmente PB, é também um método de coleta menos invasivo que a coleta do raspado intradérmico.

A detecção do bacilo na saliva é um fato importante porque sugere que a cavidade oral, mesmo em sujeitos PB (Tabela 5), pode ser foco de localização do

bacilo e colaborar com a transmissão da doença. Fato este também destacado por Martinez et al. (2010).

Nos 33 casos negativos para baciloscopia (Tabela 6) a PCR da saliva aparentemente foi mais eficiente, visto que 10 (30,3%) amostras (4MB e 6PB) foram positivas por esta técnica, enquanto que 5 (15,2%) foram positivas pela PCR do raspado intradérmico (2MB e 3PB). Entre as 10 amostras positivas pela PCR da saliva, oito (3MB e 5PB) tiveram esse resultado somente por esta técnica, enquanto que das cinco positivas na PCR do raspado intradérmico, em três (1MB e 2PB) o resultado positivo foi obtido somente nesta técnica (Tabela 6). Este achado merece destaque, pois a qPCR pode auxiliar nas situações de impasse no diagnóstico clínico quando não se encontra o bacilo nas amostras pesquisadas na baciloscopia e/ou biópsia.

Considerando como amostras com resultado positivo no diagnóstico laboratorial aquelas que apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das técnicas, foram totalizadas 25 amostras positivas, ou 55,55% do total analisado. Apesar deste ainda ser um valor relativamente baixo, é superior às três técnicas separadamente (baciloscopia 26,66%, PCR da saliva 35,55% e PCR do raspado intradérmico 28,88%). Na verdade é possível verificar que a aplicação da técnica de PCR (saliva + raspado) em somatória a baciloscopia do raspado intradérmico realizada na rotina mais do que dobra o valor de casos positivos.

Abdalla (2009) em estudo anterior sobre a pesquisa de *M. leprae* no periodonto, saliva e em raspados intradérmicos de pacientes com hanseníase sugeriu utilizarmos a técnica da PCR coletando amostras em diferentes sítios, neste caso, saliva e raspado, inseridos numa mesma reação. Na nossa casuística essa abordagem

de somar os métodos diagnósticos teve maior destaque para os casos de pacientes PB, visto que obtivemos resultados positivos em 8 de 19 (42,1%).

Tabela 6

Relação da PCR da saliva, PCR do raspado intradérmico e a baciloscopia de raspado intradérmico

Variáveis	Baciloscopia do raspado intradérmico				Total	P*
	Positivo (n=12)		Negativo (n=33)			
	fi	%	fi	%		
PCR da saliva						0,192
Positivo	6	50,0	10	30,3	16	
Negativo	6	50,0	23	69,7	29	
PCR do raspado intradérmico						0,002
Positivo	8	66,7	5	15,2	13	
Negativo	4	33,3	28	84,8	32	

fi = frequência absoluta simples; * Teste Exato de Fisher

A concordância entre os testes utilizados foi analisada através do índice kappa não ponderado (Cohen, 1960) e caracterizada como fraca (0 – 0,20), baixa (0,21 – 0,40), média (0,41 – 0,60), boa (0,61 e 0,80) e excelente (0,81 – 1) de acordo com o proposto por Landis and Koch (1977).

Os melhores resultados de concordância foram encontrados entre a baciloscopia e PCR do raspado intradérmico ($k = 0,50$), assim como quando relacionados os resultados da baciloscopia do raspado intradérmico e a PCR do raspado intradérmico, foi observada associação estatisticamente significativa (Tabela 5), corroborando com a possibilidade da qPCR ser utilizada como metodologia alternativa no diagnóstico da hanseníase. A qPCR além de ser um método com alta sensibilidade e especificidade, é capaz de detectar baixo número de bactéria no organismo, possibilitando um diagnóstico e tratamento precoce, contribuindo para redução das incapacidades geradas pela evolução da doença.

Apesar de a baciloscopia ser o método comumente utilizado por ser de fácil execução, pouco invasivo e de baixo custo, é fato que apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico laboratorial da hanseníase, dificultando muitas vezes o diagnóstico clínico, a indicação terapêutica e o prognóstico. Por esse motivo, acredita-se que metodologias alternativas devem ser pesquisadas de maneira a estabelecer um teste com maior sensibilidade e especificidade. De acordo com os resultados deste estudo mesmo a PCR do raspado intradérmico não apresentou melhores resultados que a baciloscopia do raspado. Acreditamos que no caso da PCR esse resultado esteja relacionado com a dificuldade de extrair o DNA do *M leprae* e que, aparentemente, o fato de preservar a amostra em guanidina (protocolo que só foi utilizado nas amostras de raspado para PCR) não aumentou a detecção do bacilo.

Tabela 7

Relação da PCR da saliva e a Sensibilidade Oral

Sensibilidade Oral	PCR da saliva				Total
	Positivo		Negativo		
	fi	%	fi	%	
Normal	13	81,2	17	58,6	30
Alterado	3	18,8	12	41,4	15
Total	16	100,0	29	100,0	45

p= 0,226 (Qui-quadrado com correção de Yates); fi = frequência absoluta simples

Os resultados da relação entre a PCR da saliva e a sensibilidade oral não foram estatisticamente significativos, como mostra a Tabela 7. Embora este estudo não tenha conseguido relacionar a alteração na sensibilidade intra-oral com a presença do bacilo na saliva, novos estudos devem ser realizados, avaliando um número maior de sujeitos para melhor compreender a fisiopatologia das alterações na sensibilidade intra-oral em pacientes com hanseníase já que 15 (33,3%) dos 45 sujeitos com

hanseníase nesta pesquisa apresentaram alguma alteração na sensibilidade oral (Tabela 8).

Tabela 8

Relação da Sensibilidade nos grupos estudados

Sensibilidade Oral	Grupos				Total
	Caso (n=45)		Controle (n=45)		
	fi	%	fi	%	
Normal	30	66,7	42	93,3	72
Alterado	15	33,3	3	6,7	18
Total	45	100,0	29	100,0	90

p= 0,002 (Qui-quadrado de Pearson); fi = frequência absoluta simples

Variações na positividade dos resultados da PCR tem sido relatados na literatura, devido a utilização de diferentes iniciadores, tamanho dos amplicons e protocolos de amplificação (Goulart; Goulart, 2008), destacando a necessidade de padronização da técnica da qPCR para a hanseníase. Todavia acreditamos que a principal variável para qualquer técnica de detecção molecular de micobactérias seja a extração de DNA do alvo. No presente estudo avaliamos diferentes formas de extração de DNA, sendo que a utilização do kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506) foi a mais promissora.

Como as amostras de raspado intradérmico (aproximadamente 5µl) estavam armazenadas em 200 µl de guanidina, optou-se pela adaptação do protocolo de extração de DNA do kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506) (Anexo 6), eliminando as etapas 2, 3 e 5 que tinham por objetivo a adição de PBS e Tampão AL para fazer a lise da parede bacteriana. Para as amostras de saliva (250µl) manteve-se o protocolo padrão.

Durante a pesquisa foi testado também um protocolo para amplificação do DNA de micobactérias em geral, utilizando os iniciadores TB11-12 (fragmento de 439 pb), conforme descrito por Telenti et al. (1993), porém não obtivemos resultados

satisfatórios pois os resultados da PCR aplicados no gel de agarose mostravam bandas compatíveis com o tamanho esperado, mas quando analisado o seqüenciamento dos amplicons, constatou-se a amplificação de outros gêneros de bactérias.

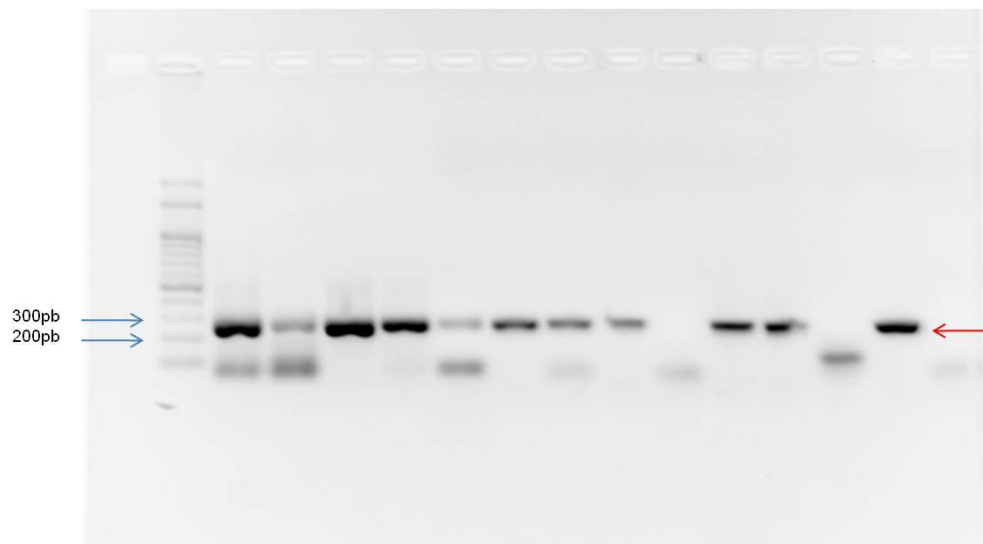


Fig. 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação para o alvo 85AC. Padrão de peso molecular de 100pb.
Fonte: Rosa (2011)

Como forma de consolidar os resultados obtidos na qPCR, realizava-se a eletroforese em gel de agarose 1,5%, considerando como resultado positivo a presença de bandas com 250 pb. (Figura 8)

Na realização da baciloscopia da saliva, apenas um sujeito apresentou resultado positivo. Apesar de ser uma ocorrência isolada, é importante relatar, pois trata-se de um sujeito classificado como MB, com tempo de evolução da doença de 5 anos e baciloscopia de raspado positiva (6+), ou seja, como comentado por Souza et al. (2009), a invasão da mucosa oral pode ocorrer quando há uma bacteremia de *M. leprae*.

A presença do *M. leprae* na saliva aponta que a cavidade oral pode ser um sítio de localização do *M. leprae*, sem necessariamente apresentar sinais de lesão. Este fato

deve ser melhor investigado utilizando técnicas da biologia molecular para avaliar a viabilidade do bacilo na saliva.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu detectar alterações sensoriais intra-orais em pacientes com hanseníase, quando comparados com o grupo de sujeitos com outras dermatoses.

Não foi possível, na conclusão da pesquisa, afirmar que a presença do bacilo na cavidade oral provoca alterações na sensibilidade oral por acometimento dos nervos periféricos. Contudo, a utilização da técnica da qPCR para detectar a presença do bacilo na saliva foi de extrema importância, pois identificou o DNA do bacilo em sujeitos classificados como PB, o que não ocorre na baciloscopia, que é considerada exame padrão no diagnóstico da hanseníase.

A comparação dos resultados dos métodos de diagnóstico laboratorial da qPCR e baciloscopia, mostrou a possibilidade de se combinar estas diferentes metodologias para aumentar a positividade do diagnóstico. Percebeu-se também a alternativa de, em novos estudos, coletar as amostras de diferentes sítios (raspado intradérmico da lesão e da orelha e coleta da saliva), armazenando-as num mesmo tubo.

Cabe destacar a necessidade de realizar novos estudos investigando a viabilidade do bacilo na saliva de sujeitos paucibacilares, visto que este fato tem relevância epidemiológica, pois levanta a possibilidade dos sujeitos paucibacilares também contribuírem com a transmissão da doença.

Durante o estudo foi possível observar a tímida relação da fonoaudiologia com a hanseníase no Brasil, tanto no atendimento clínico desta população, quanto nas pesquisas realizadas na área.

A fonoaudiologia pode contribuir com a avaliação, detecção e reabilitação de alterações sensório-motoras orais destes pacientes.

No decorrer da pesquisa observou-se a baixa adesão dos participantes aos exames complementares. Este fato dificultou a análise mais aprofundada dos achados referentes a avaliação otorrinolaringológica e videofluoroscópica da deglutição.

O uso de instrumentos de avaliação objetiva, como a nasofibrosopia, videolaringoscopia e videofluoroscopia da deglutição demonstraram auxiliar na identificação e diagnóstico de alterações sensório-motoras orofaríngeas em pacientes com hanseníase. Porém, se sabe sobre a pouca disponibilidade destes exames na rede pública de saúde, dificultando a utilização dos mesmos como exames de rotina em sujeitos com hanseníase.

Apesar da diminuição de casos de hanseníase detectados no Brasil, a doença ainda permanece endêmica, principalmente nos estados do norte e centro-oeste do país. Sendo assim, é possível afirmar que um número significativo de indivíduos pode ser beneficiado pelo atendimento fonoaudiológico.

Para os fonoaudiólogos que atuam na área da hanseníase, é importante conhecer as manifestações orais da doença, bem como, o comprometimento dos nervos cranianos. Na avaliação fonoaudiológica clínica, nota-se a necessidade de se estabelecer um protocolo, de preferência mais objetivo, para avaliação da sensibilidade intra-oral.

Dessa forma, percebe-se a importância de realizar novas pesquisas na área da hanseníase, abordando temas como: alteração da sensibilidade oral e o tempo de evolução da doença; analisar alterações na sensibilidade oral pré e pós tratamento poliquimioterápico; relacionar alteração na sensibilidade oral e a presença de incapacidades físicas instaladas e elaborar um método de avaliação objetiva da sensibilidade oral.

7. CONCLUSÕES

7.1 Não foi observada relação direta entre a presença do *M. leprae* na saliva e alteração da sensibilidade oral.

7.2 Verificaram-se a presença de alteração na sensibilidade térmica em sujeitos com hanseníase quando comparados com o grupo controle, sendo este resultado estatisticamente significativo.

7.3 Pacientes com hanseníase e alteração na sensibilidade oral não apresentaram disfagia em avaliação qualitativa da videofluoroscopia da deglutição, porém sugere-se novos estudos sobre disfagia em pacientes com hanseníase utilizando avaliação quantitativa da videofluoroscopia da deglutição e um número maior de participantes da pesquisa.

7.4 Foram observadas alterações otorrinolaringológicas em pacientes com hanseníase, porém novos estudos devem ser realizados abordando um número maior de sujeitos.

7.5 Não foi verificada relação entre alteração da sensibilidade oral e os resultados baciloscópicos.

7.6 Não houve relação entre os resultados da baciloscopia e da PCR da saliva, porém o fato de detectar o DNA do *M. leprae* na saliva em sujeitos com resultado negativo na baciloscopia, sugere a possibilidade de um novo sítio de coleta das amostras para auxiliar no diagnóstico clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, Lígia Fernandes. *Pesquisa de Mycobacterium leprae no periodonto, saliva e em raspados intradérmicos de pacientes com hanseníase*. Manaus: UFAM, 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2009.

ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado de; MICHALANY, Nilceo Schwery; WECKX, Luc Louis Maurice; PIMENTEL, Dalva Regina Neto; HIRATA, Cleonice Hitomi Watashi; ALCHORNE, Maurício Mota de Avelar. A mucosa oral na hanseníase: um estudo clínico e histopatológico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 312-6, 2006.

BANG, Pham Dang; SUZUKI, Koichi; PHUONG, Le Thi; CHU, Tran Man; ISHII, Norihisa; KHANG, Tran Hau. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. In: **Journal of Dermatology**, v. 36, p. 269-276, 2009.

BARRETO, Jaison Antonio. **Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008. Dissertação (mestrado)—Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008.

BARROS, Ana Paula Brandão; PORTAS, Juliana Godoy. Sensibilidade – a importância da avaliação para fonoterapia. In: SILVA, Patrícia Barbosa; DAVID, Rejane Helmlinger Fernandes. **Cadernos da Fonoaudiólogo – Motricidade Oral**. São Paulo: Editora Lovise, v. 1, p.61-68, 2008.

BARROS, Ana Paula Brandão; SILVA, Simone Aparecida Claudino da; CARRARA-DE-ANGELIS, Elisabete. Videofluoroscopia da deglutição orofaríngea. In: JOTZ, Geraldo Pereira; CARRARA-DE-ANGELIS, Elisabete; BARROS, Ana Paula Brandão. **Tratado da deglutição e disfagia – No adulto e na criança**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2009.

BHAT, Radhakrishna; SHARMA, Vinod; DEKA, Ramesh C. Otorrinolaringologic manifestations of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 46, p. 600-606, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília: Núcleo de Comunicação, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRETAN, Onivaldo; SOUZA, Lucijane B. de; LASTÓRIA, Joel C. Laryngeal lesion in leprosy and the risk of aspiration. **Leprosy Review**, v. 78, p. 80-81, 2007.

BUCCI, Frank Junior; MESA, Mayra; SCHWARTZ, Robert A.; MCNEIL, Gloria; LAMBERT, Clark. Oral lesion in lepromatous leprosy. **Journal of Oral Medicine**, v. 42, n. 1, p. 4-6, jan-mar 1987.

CARRARA-DE-ANGELIS, Elisabete; VALE-PRODOMO, Luciana Passuello do; SILVA, Simone Aparecida Claudino da. Protocolo de avaliação videofluoroscópica da deglutição. In: JOTZ, Geraldo Pereira; CARRARA-DE-ANGELIS, Elisabete; BARROS, Ana Paula Brandão. **Tratado da deglutição e disfagia – No adulto e na criança**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2009.

COHEN, Jacob. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COSTA, Milton; MONTEIRO, Jorge de Sá. Exame Videofluoroscópico das Fases Oral e Faríngea da Deglutição. In: COSTA, Milton; CASTRO, Luiz de Paula. **Tópicos em Deglutição e Disfagia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003.

D'ABREU, Paula Cardoso; DURÃES, Sandra Maria Barbosa; ESTRELA, Rogério Ribeiro; BALTAZAR, Maria do Carmo N. P.; ROCHAEL, Mayra Carrijo. Hanseníase virchowiana diagnosticada através de exame histopatológico de lesão oral em paciente com pênfigo foliáceo. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 73, n. 3, p. 339-346, 2000.

DOUGLAS, Carlos Roberto. Sensibilidade Proprioceptiva Estomatognática. In: _____. **Tratado de Fisiologia Aplicada à Fonoaudiologia**. São Paulo: ROBE Editorial, 2002.

DRAKE, Richard L.; VOGL, Wayne; MITCHELL, Adam W. M. **Gray's, anatomia para estudantes**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ESTRELA, Fabiana; SCHNEIDER, Felipe Luis; AQUINI, Mauro Guidotti; MARRONE, Antônio Carlos; STEFFANI, Marco Antonio; JOTZ, Geraldo Pereira. Controle Neurológico da Deglutição. In: JOTZ, Geraldo Pereira; CARRARA-DE-ANGELIS, Elisabete; BARROS, Ana Paula Brandão. **Tratado da Deglutição e Disfagia – no adulto e na criança**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2009.

FUAM – Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta. In: **Boletim Epidemiológico**. Ano X, n. 016, 1-2, 2008.

FUAM - Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta. Setor de Epidemiologia. In: **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINANINET)**, 2010.

FUCCI DA COSTA, Ana Paula; NERY, José Augusto da Costa; OLIVEIRA, Maria Leide Wan-del-Rey; CUZZI, Tullia; RAMOS-E-SILVA, Marcia. Oral lesion in

leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 69, p.381-5, 2003.

GIRDHAR, B. K.; DESIKAN, K. V. A clinical study of the mouth in untreated lepromatous patients. **Leprosy Review**, v. 50, p. 25-35, 1979.

GOULART, Isabela Maria Bernardes; GOULART, Luiz Ricardo. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Síntese de Indicadores Sociais, 2006.

KHAMBATI, Fatema Abbas; SHETTY, Vanaja Prabhakar; GHATE, Sunil Dattatraya; CAPADIA, Gospi Dolly. 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. **Leprosy Review**, v. 80, p. 34-50, 2009.

KUMAR, Sudhir; ALEXANDER, Mathew; GNANAMUTHU, Chandran. Cranial nerve involvement in patients with leprous neuropathy. **Neurology India** [serial online], v. 54, n. 3, p.283-285, 2006.

KÜSTNER, Eduardo Chimenos; CRUZ, Montserrat Pascual; DANSIS, Cristina Piñol; IGLESIAS, Helena Viñals; CAMPILLO, Maria Eugenia Rodríguez de Riviera; LÓPEZ, José López. Lepromatous Leprosy: A review and case report. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. 474-9, 2006.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

MACEDO FILHO, Evaldo Dacheux de; GOMES, Guilherme F.; FURKIM, Ana Maria. **Manual de Cuidados do Paciente com Disfagia**. São Paulo: Editora Lovise Ltda, 2000.

MARCHESAN, Irene, Queiroz. Avaliação e terapia dos problemas da respiração. In: _____ **Fundamentos em Fonoaudiologia: Aspectos clínicos da motricidade oral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

MARGARIDO, Leontina da Conceição; RIVITTI, Evandro A. Hanseníase. In: FOCACCIA, Roberto (Editor Científico). **Veronesi: Tratado de Infectologia**. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

MARTINS, Ana Cristina da Costa; CARVALHO E CASTRO, Jair de; MOREIRA, João Soares. Estudo retrospectivo de dez anos em endoscopia das cavidades nasais de pacientes com hanseníase. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 5, p. 609-16, set./out., 2005.

MARTINS, Manoela Domingues; RUSSO, M. P.; LEMOS, J.B.D.; FERNANDES, Kristianne Porta Santos; BUSSADORE, Sandra Kalil; CORRÊA, C.T.; MARTINS, Marco Antônio Trevizani. Orofacial lesions in treated southeast Brazilian leprosy patients: a cross-sectional study. **Oral Diseases**, v. 13, p. 270-273, 2007.

MARTINEZ, A. N.; BRITTO, C.F.P.; NERY, J.A.C.; SAMPAIO, E.P.; JARDIM, M.R.; SARNO, E.N.; MORAES, M.O. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 gene for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy sample from patients diagnosed with leprosy. **J.C.M.**, v. 44, n. 9, p. 3154-9, 2006.

MARTINEZ, T. S.; FIGUEIRA, M. M. N. R.; COSTA, A. V.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Oral mucosa as a source for *M. leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010.

MILLER, Arthur. The Neurobiology of swallowing and dysphagia. **Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 14, p. 77-86, 2008.

NEVES, René Garrido. **Hansenologia I**. Manaus: Editora Calderaro Ltda, 1984.

NEVILLE, Brad W.; DAMM, Douglas D.; ALLEN, Carl M.; BOUQUOT, Jerry. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OSUGUE, Saeko Miyazato; OSUGUE, Jo Yoshikuni. Hanseníase. In: TAVARES, Walter; MARINHO, Luiz Alberto Carneiro. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

PONTES, Ana Rosa Botelho; ALMEIDA, Maria das Graças Carvalho; XAVIER, Marília Brasil; QUARESMA, Juarez Antonio Simões; YASSUI, Edna Aoba. Detecção do DNA de *Mycobacterium Leprae* em secreção nasal. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61(esp), p. 734-7, 2008.

REICHART, Peter A., SRISUWAN, Sampan; METAH, Date. Lesions of the facial and trigeminal nerve in leprosy. **International Journal of Oral Surgery**, v. 11, p. 14-20, 1982.

RIDLEY. Bacterial Indices. In: COCHRANE, R.G.; DAVEY, T. F. (Editores). **Leprosy in Theory and Practice Bristol**. John Wright and Sons Ltd, p. 620-22, 1964.

RINK DE WIT, T. F.; BEKELIE, S.; OSLAND, A.; WIELES, B.; JANSON, A. A.; THOLE, J. E. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. **Infect. Immun.**, v.61, p. 3642-7, 1993.

SANTOS, Geraldo Gomes dos; MARCUCCI, Gilberto; GUIMARÃES JÚNIOR, Jayro; MARGARIDO, Leontina da Conceição; LOPES, Luiz Heraldo Câmara. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia da polimerase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.82, p. 245-9, 2007.

SCHEEPERS, Anton; LEMMER, J.; LOWNIE, J. F. Oral manifestations of leprosy. **Leprosy Review**, v. 64, p. 37-43, 1993.

SCHEEPERS, Anton. Correlation of oral surface temperatures and the lesions of leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 66, n. 2, p. 214-217, 1998)

SCOLLARD, David M. The biology of nerve injury in leprosy. **Leprosy Review**, v. 79, p. 242-253, 2008.

SILVA, Giselle Mateus da; PATROCÍNIO, Lucas Gomes; PATROCÍNIO, José Antonio; GOULART, Isabela Maria Bernardes. Avaliação Otorrinolaringológica na hanseníase: Protocolo de um Centro de Referência. *Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia*, v. 12, n. 1, p. 77-81, 2008.

SONI, N. K.; CHATTERJI, P. Disturbance of taste in leprosy. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 95, p. 717-720, 1981.

SOUZA, Vania A.; EMMERICH, Adauto; COUTINHO, Elizabeth M.; FREITAS, Margareth G.; SILVA, Eraci H.; MERÇON, Flavia G.; SOUZA, Aline C.; BALLA, Viviane A.C.; ZANDONADI, Eliana; PEIXOTO, Rebeca; DEPS, Patrícia D. Dental and oral condition in leprosy patients from Serra, Brazil. **Leprosy Review**, v. 80, p. 156-163, 2009.

STEFANI, M.M.; MARTELLI, C.M.; GILLIS T.P.; KRAHENBUHL, J.L. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **J. Infect.**

TEISMANN, Inga K.; STEINSTRÄETER, Olaf; STOECKIGT, Kati; SUNTRUP, Sonja; WOLLBRINK, Andreas; PANTEV, Christo; DZIEWAS, Rainer. Functional oropharyngeal sensory disruption interferes with the cortical control of swallowing. **BMC Neuroscience**, v. 8, p.62, 2007.

TELENTI, Amalio; MARCHESI, Francine; BALZ, Marianne; BALLY, Frank; BOTTGER, Erik C.; BODMER, Thomas. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

THOMAS, M.; EMMANUEL, M. A case of advanced lepromatous leprosy with rhino-oro-laryngological involvement in the post-elimination era. *Indian Journal Leprosy*, v. 81, p. 81-82, 2009.

VILLAR, Vergínia Mara; FURIA, Cristina Lemos Barbosa; MELLO JUNIOR, Edgard José Franco. Disfagia orofaríngea em indivíduos portadores de Hanseníase. **Revista CEFAC**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 151-7, abr-jun, 2004.

WANI, Aejaz Ali; GUPTA, Vipin; JAN, Nighat. A clinical study of the cranial nerve involvement in leprosy. **Egyptian Dermatology Online Journal**, v. 5, n. 2: 3, dec, 2009.

WHO – World Health Organization. **Weekly epidemiological record**. Geneva: World Health Organization, v. 83, n. 33, p. 293-300, 2008.

World Health Organization (WHO). **Leprosy elimination**. Disponível em: < <http://www.WHO.int/lep/mdt/regimens/en/index.html> > Acesso em: 21 mar. 2011.

APÊNDICE A.1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **A SENSIBILIDADE EM CAVIDADE ORAL E OROFARÍNGEA E PESQUISA DO *Mycobacterium leprae* NA SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

A justificativa e objetivo da pesquisa

Este é um estudo que estamos fazendo na Fundação Alfredo da Matta, com o objetivo de saber se as pessoas com hanseníase, que vêm se consultar aqui na Fundação, têm dificuldade na boca para sentir o toque, a temperatura e o sabor dos alimentos. O médico continuará cuidando dos problemas na pele, e o fonoaudiólogo avaliará a sensibilidade da sua boca.

Participando deste estudo você receberá auxílio para se deslocar para a avaliação do médico otorrinolaringologista, que examinará seu nariz, orelha e garganta, no Ambulatório Araújo Lima do Hospital Getúlio Vargas e para o exame da videofluoroscopia da deglutição na Fundação CECON para avaliar sua deglutição, caso seja necessário e você queira participar.

Com a sua participação, você estará contribuindo para que seja feito um estudo sobre a saúde bucal das pessoas com hanseníase que procuram tratamento aqui na Fundação. Além disso, você receberá do fonoaudiólogo orientações sobre a sua deglutição e voz, e do médico otorrinolaringologista orientações sobre os cuidados com o nariz, orelha e garganta. O fato de participar deste estudo não lhe impede de participar de outros estudos do seu interesse aqui na Fundação Alfredo da Matta.

Caso você aceite participar da pesquisa, você assinará este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra via ficará com você.

I. Os procedimentos a serem utilizados:

No consultório examinaremos a sua boca e, se você permitir, faremos toques na sua boca com cotonetes molhados na água temperatura ambiente e aquecida, e lhe será oferecido quatro diferentes sabores para você identificar. Também será coletado um pouco da sua saliva num copo descartável para exames laboratoriais. O material utilizado será todo descartável e esterilizado, não gastando muito do seu tempo nem oferecendo nenhum risco. Não serão utilizados materiais invasivos, ou seja, que cortam ou furam, como lâminas e agulhas.

II. Os desconfortos ou riscos esperados:

O exame da sensibilidade da boca é rápido, muito fácil de ser feito e não causa dor. Pode causar, em algumas pessoas, um leve incômodo pelo toque com o cotonete, mas nada que atrapalhe o funcionamento da sua boca para comer ou falar, nem da sua vida.

III. Benefícios que se pode obter:

Se eu encontrar alguma coisa que precise ser tratada, eu falarei com você, e tratarei imediatamente. Se não for possível, vou encaminhá-lo para algum serviço de saúde público para tratar.

IV. Os procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:

Será disponibilizada avaliação otorrinolaringológica para os participantes da pesquisa.

V. Garantia de resposta a qualquer pergunta:

Todas as dúvidas que você tiver e perguntas que você quiser fazer serão respondidas da melhor forma possível, basta perguntar.

VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Você só participará do estudo se quiser podendo desistir da participação do estudo a qualquer momento. Mesmo assim, terá todas as orientações iguais aos que permanecerão na pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo.

VII. Garantia de privacidade:

Todos os exames e informações são guardados sob sigilo neste estudo, só podendo ser divulgados dados que não identifiquem você ou exponha sua privacidade, segurança e conforto.

VIII. Compromisso com informação atualizada do estudo:

Você ficará sabendo dos resultados do seu exame e informações atualizadas sobre a pesquisa a qualquer momento que você quiser. O pesquisador responsável estará na Fundação Alfredo da Matta todas as manhãs, das 7:30 às 11:30h, durante o período da pesquisa (Julho a Outubro/2010).

IX. Garantia de custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa:

Os exames são totalmente grátis, e não terão nenhum custo para você. Todo custo que vier a aparecer será pago pela pesquisa.

Tendo recebido as informações anteriores e, esclarecido dos meus direitos, concordo em participar deste estudo.

Nome do participante: _____

RG: _____ Assinatura: _____



Nome do responsável pelo estudo: Fernanda Borowsky da Rosa

Telefone para contato: (92) 9281-6880

Assinatura: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE A.2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

GRUPO CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **A SENSIBILIDADE EM CAVIDADE ORAL E OROFARÍNGEA E PESQUISA DO *Mycobacterium leprae* NA SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

A justificativa e objetivo da pesquisa

Este é um estudo que estamos fazendo na Fundação Alfredo da Matta, com o objetivo de saber se as pessoas com hanseníase, que vêm se consultar aqui na Fundação, têm dificuldade na boca para sentir o toque, a temperatura e o sabor dos alimentos. O médico continuará cuidando dos problemas na pele, e o fonoaudiólogo avaliará a sensibilidade da sua boca.

Como parte do projeto, convidamos pessoas que NÃO tenham hanseníase para fazer a avaliação da sensibilidade da boca, para ao final do estudo comparar a sensibilidade da boca de pessoas com hanseníase e sem a doença.

Caso você aceite participar da pesquisa, você assinará este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra via ficará com você.

X. Os procedimentos a serem utilizados:

No consultório examinaremos a sua boca e, se você permitir, faremos toques na sua boca com cotonetes molhados na água temperatura ambiente e aquecida, e lhe será oferecido quatro diferentes sabores para você identificar. O material utilizado será todo descartável e esterilizado, não gastando muito do seu tempo nem oferecendo nenhum risco. Não serão utilizados materiais invasivos, ou seja, que cortam ou furam, como lâminas e agulhas.

XI. Os desconfortos ou riscos esperados:

O exame da sensibilidade da boca é rápido, muito fácil de ser feito e não causa dor. Pode causar, em algumas pessoas, um leve incômodo pelo toque com o cotonete, mas nada que atrapalhe o funcionamento da sua boca para comer ou falar, nem da sua vida.

XII. Benefícios que se pode obter:

Se eu encontrar alguma alteração na sensibilidade da sua boca, você será encaminhado para avaliação otorrinolaringológica.

XIII. Os procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:

Você estará recebendo uma avaliação que não faz parte da rotina, tendo sua cavidade oral avaliada quanto à sensibilidade, pelo fonoaudiólogo (responsável pelo estudo) e receberá orientações sobre funções orais como: mastigação, deglutição, respiração, fala e voz).

XIV. Garantia de resposta a qualquer pergunta:

Todas as dúvidas que você tiver e perguntas que você quiser fazer serão respondidas da melhor forma possível, basta perguntar.

XV. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Você só participará do estudo se quiser podendo desistir da participação do estudo a qualquer momento. Mesmo assim, terá todas as orientações iguais aos que permanecerão na pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo.

XVI. Garantia de privacidade:

Todos os exames e informações são guardados sob sigilo neste estudo, só podendo ser divulgados dados que não identifiquem você ou exponha sua privacidade, segurança e conforto.

XVII. Compromisso com informação atualizada do estudo:

Você ficará sabendo dos resultados do seu exame e informações atualizadas sobre a pesquisa a qualquer momento que você quiser. O pesquisador responsável estará na Fundação Alfredo da Matta todas as manhãs, das 8:00 às 12:00h, durante o período da pesquisa (Outubro a Novembro/2010).

XVIII. Garantia de custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa:

Os exames são totalmente grátis, e não terão nenhum custo para você. Todo custo que vier a aparecer será pago pela pesquisa.

Tendo recebido as informações anteriores e, esclarecido dos meus direitos, concordo em participar deste estudo.

Nome do participante: _____

RG: _____ Assinatura: _____

Nome do responsável pelo estudo: Fernanda Borowsky da Rosa

Telefone para contato: (92) 9281-6880

Assinatura: _____ Data: __/__/__

APÊNDICE B.1 – Formulário de Anamnese**FORMULÁRIO DE ANAMNESE**

A. IDENTIFICAÇÃO

Nº Prontuário

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ anos completos Sexo: () F () M

Endereço: _____

_____ Telefone: _____

Estado civil: () Solteiro () Casado () Divorciado () Viúvo () Outros

Raça/Etnia: () Branca () Negra () Mulata () Oriental () Parda () Outras

Escolaridade Completa: () Analfabeto () Fundamental () Médio () Superior () Pós-Graduada

B. DADOS DO PRONTUÁRIO

1) Classificação Operacional: () Multibacilar () Paucibacilar

2) Resultado da Baciloscopia: () Positiva () Negativa

3) Tempo de evolução da doença: _____

C. DADOS PESSOAIS E MÉDICOS

1) Fuma? () sim () não

2) Ingere bebida alcoólica? () Nunca () Raramente () Frequentemente () Sempre

3) Faz uso de qualquer outra droga? () Sim () Não Qual? _____

4) Faz uso de medicamentos? () Sim () Não Qual? _____

5) Tem outro problema de saúde? () Sim () Não Qual? _____

6) Quantas vezes escova os dentes por dia? ()

D. DADOS SOBRE SENSIBILIDADE INTRA-ORAL

1) Sente dificuldade para perceber o sabor dos alimentos? () Sim () Não

2) Sente a boca seca? () Sim () Não

3) Sente dificuldade para respirar pelo nariz? () Sim () Não

4) Tem a sensação de um “bolo” na garganta? () Sim () Não

5) Tem tosse ou engasgo durante ou depois de comer? () Sim () Não

6) Tem rouquidão, pigarro ou voz presa durante ou depois de comer? () Sim () Não

7) A comida volta pelo nariz quando está comendo? () Sim () Não

8) Teve perda de peso desde o início da doença até o momento? () Sim () Não

9) Teve pneumonia desde o início da doença até o momento? () Sim () Não

10) Sente dificuldade de engolir? () Sim () Não

11) Quais alimentos melhoram a deglutição? () Líquido () pastoso () sólido

APÊNDICE B.2 – Formulário de Anamnese. Grupo Controle

FORMULÁRIO DE ANAMNESE – Grupo Controle

- A. IDENTIFICAÇÃO
- Nº Prontuário
- Nome: _____
- Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ anos completos Sexo: () F () M
- Endereço: _____
- _____ Telefone: _____
- Estado civil: () Solteiro () Casado () Divorciado () Viúvo () Outros
- Raça/Etnia: () Branca () Negra () Mulata () Oriental () Parda () Outras
- Escolaridade Completa: () Analfabeto () Fundamental () Médio () Superior () Pós-Graduada
- B. DADOS DO PRONTUÁRIO
- 1) Diagnóstico: _____
- 2) Tempo de evolução da doença: _____
- C. DADOS PESSOAIS E MÉDICOS
- 1) Fuma? () sim () não () parei
- 2) Ingere bebida alcoólica? () Nunca () Raramente () Frequentemente () Sempre
- 3) Faz uso de qualquer outra droga? () Sim () Não Qual? _____
- 4) Faz uso de medicamentos? () Sim () Não Qual? _____
- 5) Tem outro problema de saúde? () Sim () Não Qual? _____
- 6) Quantas vezes escova os dentes por dia? ()
- D. DADOS SOBRE SENSIBILIDADE INTRA-ORAL
- 1) Sente dificuldade para perceber o sabor dos alimentos? () Sim () Não
- 2) Sente a boca seca? () Sim () Não
- 3) Sente dificuldade para respirar pelo nariz? () Sim () Não
- 4) Tem a sensação de um “bolo” na garganta? () Sim () Não
- 5) Tem tosse ou engasgo durante ou depois de comer? () Sim () Não
- 6) Tem rouquidão, pigarro ou voz presa durante ou depois de comer? () Sim () Não
- 7) A comida volta pelo nariz quando está comendo? () Sim () Não
- 8) Teve perda de peso desde que percebeu a doença até o momento? () Sim () Não
- 9) Teve pneumonia desde que percebeu a doença até o momento? () Sim () Não
- 10) Sente dificuldade de engolir? () Sim () Não
- 11) Quais alimentos melhoram a deglutição? () Líquido () pastoso () sólido

APÊNDICE C – Formulário de Avaliação da Sensibilidade Intra-Oral

Avaliação da Sensibilidade Intra-Oral

Nome: _____ N° Protocolo

Data: ___/___/___

1 – SENSIBILIDADE TÁTIL: Toque com hastes flexíveis com ponta de algodão seco.

Estrutura	Normal	Alterado
Língua: dorso direito		
dorso esquerdo		
Palato duro: direito		
esquerdo		
Palato mole: direito		
esquerdo		

2 – SENSIBILIDADE TÉRMICA: Toque com hastes flexíveis com ponta de algodão molhado com água temperatura ambiente e quente (45°C)

Estrutura	Frio		Quente	
	Normal	Alterado	Normal	Alterado
Língua: dorso direito				
dorso esquerdo				
Palato duro: direito				
esquerdo				
Palato mole: direito				
esquerdo				

3 – SENSIBILIDADE GUSTATIVA: Ofertado estímulo gustativo sobre o dorso da língua.

Estímulo	Normal	Alterado
Doce (açúcar)		
Azedo (gotas de limão)		
Salgado (sal)		
Amargo (gotas de chá de boldo)		

ANEXO 1 – Carta de Anuência Hospital Universitário Getúlio Vargas

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA

**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA 01/2010**

Título: “Pesquisa do Mycobacterium Leprae na Saliva e Avaliação da Sensibilidade em Cavidade oral e Orofaríngea em Pacientes com Hanseníase”.

Responsáveis: Fernanda Borowsky da Rosa

Início: 22/03/2010

Término:

Sujeito a Pesquisa: HUGV

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS
[Handwritten signature]
Prof. Dr. Fernando Luiz Westphal
Coordenador de Ensino e Pesquisa

PARA o controle das Ações de Pesquisa no HUGV é IMPRESCINDÍVEL que após o término da pesquisa, o Serviço Responsável retorne este formulário a Coordenação de Ensino e Pesquisa.

ANEXO 2 – Carta de Anuência FCECON



FCECON

Fundação Centro de Controle de Oncologia
do Estado do Amazonas

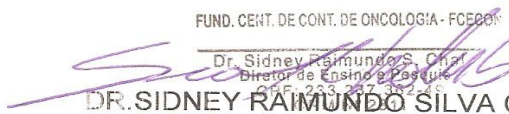


AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Atendendo a solicitação feita através do OFÍCIO Nº.011/10-COPPGMCS da PROF^a.DRA. TATIANA NAYARA LIBÓRIO DOS SANTOS, Coordenadora do mestrado em Ciências da Saúde – UFAM para realização do exame de videofluoroscopia da deglutição da pesquisa intitulada “**Pesquisa do *Mycobacterium leprae* NA SALIVA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE OROFARÍNGEA EM PACIENTES COM HANSENÍASE**” da discente **FERNANDA BOROWSKY DA ROSA** o qual fica autorizado à execução sob a co-orientação Fga. Esp. Motricidade Oral e Oncologia Suzana Zuani Areosa.

Manaus, 25 fevereiro de 2010.

FUND. CENT. DE CONT. DE ONCOLOGIA - FCECON


Dr. Sidney Raimundo S. Chalub
Diretor de Ensino e Pesquisa
CPF: 223.267.381-45
DR. SIDNEY RAIMUNDO SILVA CHALUB
DIRETOR DE ENSINO E PESQUISA

ANEXO 3 – Protocolo de Avaliação Videofluoroscópica da Deglutição de Carrara-de-Angelis, Vale-Prodromo e Silva (2009)

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO VIDEOFUOROSCÓPICA DA DEGLUTIÇÃO

Elisabete Carrara-de Angelis ♦ Luciana Passuello do Vale-Prodromo ♦ Simone Aparecida Claudino da Silva

A seguir, apresentaremos uma sugestão de protocolo de avaliação videofluoroscópica da deglutição, por nós utilizado no Hospital A. C. Camargo. Há 12 anos realizando exames nesta instituição, este protocolo sofreu muitas modificações em sua concepção inicial e, embora longe de estar em sua apre-

sentação ideal, reflete as necessidades da clínica fonoaudiológica. Embora cada vez mais se discuta a “irrealidade” da divisão da deglutição em fases, ainda optamos pelo protocolo neste formato, por facilitar o raciocínio clínico nas condutas sobre ele estabelecidas.

Data: _____ Fita: _____

1. Identificação

Nome: _____ RGH: _____

Idade: _____ D.N.: _____ Categoria: _____

Encaminhamento: _____

Diagnóstico: _____

2. Tratamentos

a) Data: _____ Tipo de cirurgia: _____ Intercorrências: _____

b) Radioterápico – dose: _____ Período: _____ Complicações: _____

c) Quimioterápico – período: _____

Queixa: _____

3. História progressiva da enfermidade atual: _____

4. Avaliação fonoaudiológica clínica

a) SSMO: _____

b) Comunicação oral: _____

c) Deglutição: _____

<i>Visão lateral</i>	<i>L</i>			<i>LP</i>			<i>P</i>			<i>S</i>
Estase nos recessos piriformes										
• Penetração após deglutição										
• Aspiração após deglutição										
• Aspiração silente										
Alteração do fechamento do vestibulo laríngeo										
Alteração do fechamento laríngeo										
• Penetração durante a deglutição										
• Aspiração durante a deglutição										
• Aspiração silente										
Aumento do tempo do trânsito faríngeo										
Alteração da sensibilidade laríngea										
• Aspiração silente										

<i>Visão ântero-posterior</i>	<i>sólido</i>	
Alteração na lateralização do bolo		
Alteração na mastigação U/B		
Estase no sulco lateral		
Estase no assoalho da boca		
Estase na valécula U/B		
Estase no recesso piriforme U/B		
Redução mov. medial de laringe		
Deglutição funcional		

Número de deglutições para limpar a valécula:

(1) não limpa (2) 2 a 3 (3) 4 a 5 (4) mais que 5

Manobras espontâneas: _____

Postura de cabeça: (1) frente (2) trás (3) virada E (4) virada D (5) inclinada E (6) inclinada D

Manobra de proteção: (1) SG (2) SSG (3) Mendelsohn (4) deglutições múltiplas (5) esforço

Efetividade das manobras: _____

Conclusão: _____

ESCALA DE SEVERIDADE DA DISFAGIA:

(7) (6) (5) (4) (3) (2) (1)

ESCALA DE PENETRAÇÃO/ASPIRAÇÃO (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)

Examinadores:

Fonoaudiólogo: _____ Radiologista: _____

ANEXO 4 - Escala de Penetração e Aspiração (adaptada de ROSENBEK et al, 1996 apud Carrara-de-Angelis, 2009)

Escala de Penetração e Aspiração

<i>Categoria</i>	<i>Pontuação</i>	<i>Descrição</i>
Penetração	1	Contraste não entra em VA
	2	Contraste entra até acima das ppv, sem resíduo
	3	Contraste permanece acima das ppv, visível resíduo
	4	Contraste atinge ppv, sem resíduo
	5	Contraste atinge ppv, resíduo visível
Aspiração	6	Contraste passa o nível glótico, mas não há resíduos no nível subglótico
	7	Contraste passa o nível glótico, com resíduo no subglótico, apesar de o paciente responder
	8	Contraste passa a glote com resíduo na subglote, mas o paciente não responde

ANEXO 5 - Escala de Severidade das Disfagias (O'Neil, 1999 apud Carrara-de-Angelis, 2009)

Escala de Severidade das Disfagias

VO Dieta normal

Nível 7 – *Normal em todas as situações.* Nenhuma estratégia ou tempo extra necessário.

Nível 6 – *Dentro dos limites funcionais/compensações espontâneas.*

- Dieta normal, deglutição funcional.
- O paciente pode ter: discreto atraso oral ou faríngeo, estase ou vestígio cobrindo a epiglote, mas consegue clarear espontaneamente.
- Pode necessitar de tempo extra para as refeições. Não há aspirações ou penetrações em todas as consistências.

VO Dieta modificada e/ou independência

Nível 5 – *Disfagia discreta:* supervisão distante, pode necessitar de restrição de uma consistência. O paciente pode apresentar:

- Aspiração somente de líquidos, mas com forte reflexo de tosse para completo clareamento.
- Penetração supra ppw com uma ou mais consistências, ou sobre ppw com uma consistência, mas com clareamento espontâneo.
- Estase na faringe, que é clareada espontaneamente; discreta disfagia oral com redução da mastigação e/ou estase oral, que é clareada espontaneamente.

Nível 4 – *Disfagia discreta/moderada:* supervisão intermitente, restrição a uma ou 2 consistências. O paciente pode apresentar:

- Estase na faringe, clareada com orientação.
- Aspiração com 1 consistência, com reflexo de tosse fraco ou ausente:
 - Ou penetração no nível das ppw com tosse com 2 consistências.
 - Ou penetração no nível das ppw sem tosse com 1 consistência.

Nível 3 – *Disfagia moderada:* total assistência, supervisão ou estratégias, restrição a 2 ou mais consistências. Pode apresentar:

- Estase moderada na faringe, clareada por orientação.
- Estase moderada na cavidade oral, clareada por orientação.
- Penetração no nível das ppw sem tosse com 2 ou mais consistências.
 - Ou aspiração com 2 consistências, com reflexo de tosse fraco ou ausente.
 - Ou aspiração com 1 consistência, sem tosse na penetração.

VO Suspensa – necessidade de nutrição não-oral

Nível 2 – *Disfagia moderada/grave:* máxima assistência ou uso de estratégias com V.O. parcial (tolerância ao menos a 1 consistência com segurança, com uso total das estratégias). O paciente pode apresentar:

- Estase grave na faringe, incapaz de clarear ou necessita de vários comandos.
- Estase grave ou perda do bolo na fase oral, incapaz de limpar ou necessita de vários comandos.
- Aspiração com 2 ou mais consistências, sem reflexo de tosse, tosse voluntária fraca.
 - Ou aspiração de 1 ou mais consistências, sem tosse e penetração até ppw com 1 ou mais consistências, sem tosse.

Nível 1 – *Disfagia grave:* V.O. suspensa. O paciente pode apresentar:

- Estase grave na faringe, sendo incapaz de clarear.
- Estase ou perda do bolo grave na fase oral, sendo incapaz de clarear.
- Aspiração silente com 2 ou mais consistências, com tosse voluntária não-funcional ou incapaz de deglutir.

ANEXO 6

PROTÓCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA DA SALIVA

Kit da Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506)

A extração do DNA das amostras de saliva foi realizada com base no seguinte protocolo:

1. Colocar 250 μ L de amostra de saliva em um microtubo de 1,5mL previamente identificado contendo 1mL de PBS 1X, pH 7,4;
2. Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente, a 1.800g e remover o sobrenadante;
3. Ressuspender em 180 μ L de PBS 1X, pH 7,4;
4. Adicionar 25 μ L de proteinase K, agitar o microtubo com a mão e centrifugar 15 segundos;
5. Adicionar 200 μ L de Tampão AL sem etanol;
6. Misturar no vórtex durante 10 segundos;
7. Incubar a 56°C por 45 minutos, no Termomixer confort com agitação de 500 rpm a cada 3 minutos durante 15 segundos;
8. Adicionar 200 μ L de Etanol (96-100%);
9. Misturar no vórtex durante 10 segundos;
10. Colocar todo o conteúdo em uma coluna com tubo coletor previamente identificado e centrifugar 6.000g (8.000 rpm) durante 1 minuto, descartar o líquido e o tubo coletor;
11. Colocar a coluna em um novo tubo coletor, adicionar 500 μ L de tampão AW1, centrifugar 6.000g (8.000 rpm) durante 1 minuto, descartar o líquido e o tubo coletor;

12. Colocar a coluna em um novo tubo coletor, adicionar 500 μ L de tampão AW2, centrifugar 20.000g (14.000 rpm) durante 4 minutos, descartar o líquido;
13. Centrifugar novamente com a tampa do tubo aberta durante 1 minuto a 20.000g (14.000 rpm);
14. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5mL e pipetar 200 μ L do tampão AE direto na membrana da coluna (sem encostar), incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, centrifugar a 6.000g durante 1 minuto para eluir, nomear este tubo como "A";
15. Para melhor rendimento repetir a eluição colocando 50 μ L do tampão AE, nomear este tubo como "B".

ANEXO 7

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA DO RASPADO INTRADÉRMICO

Kit da Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Cat. Nº. 69506)

Para extração do DNA das amostras de raspado seguiu-se o seguinte protocolo:

1. Adicionar 25 μ L de proteinase K no tubo contendo 200 μ L de guanidina com a amostra de raspado;
2. Misturar no vórtex durante 10 segundos;
3. Incubar a 56°C por 45 minutos, no Termomixer confort com agitação de 500 rpm a cada 3 minutos durante 15 segundos;
4. Adicionar 200 μ L de Etanol (96-100%);
5. Misturar no vórtex durante 10 segundos;
6. Colocar todo o conteúdo em uma coluna com tubo coletor previamente identificado e centrifugar 6.000g (8.000 rpm) durante 1 minuto, descartar o líquido e o tubo coletor;
7. Colocar a coluna em um novo tubo coletor, adicionar 500 μ L de tampão AW1, centrifugar 6.000g (8.000 rpm) durante 1 minuto, descartar o líquido e o tubo coletor;
8. Colocar a coluna em um novo tubo coletor, adicionar 500 μ L de tampão AW2, centrifugar 20.000g (14.000 rpm) durante 4 minutos, descartar o líquido;
9. Centrifugar novamente com a tampa do tubo aberta durante 1 minuto a 20.000g (14.000 rpm);
10. Colocar a coluna em um microtubo de 1,5mL e pipetar 200 μ L do tampão AE direto na membrana da coluna (sem encostar), incubar a temperatura ambiente

durante 1 minuto, centrifugar a 6.000g durante 1 minuto para eluir, nomear este tubo como "A";

11. Para melhor rendimento repetir a eluição colocando 50 μ L do tampão AE, nomear este tubo como "B".

ANEXO 8

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose foi preparado para uma cuba de eletroforese da marca Loccus (LCH 12 X 14) onde 1,5g de agarose (Ludwig Biotec – 080416) foram pesados em uma balança (Marte-Balanças e Equipamentos, AL 500) e colocada em um erlenmeyer contendo 100ml de tampão TAE 1X (Tris 40mM, Ac. Acético 20 mM, EDTA 1 mM). A mistura foi aquecida em microondas em torno de 2 minutos, até estar transparente, resfriado em água corrente e adicionado 5 μ L de GelRed 10.000X em DMSO (Biotium – 41003-T). Posteriormente, espalhou-se no suporte do gel onde os pentes com espessura de 1mm estavam posicionados, esperou-se a geleificação em temperatura ambiente e os pentes foram removidos. O suporte foi posicionado na cuba de eletroforese e adicionado aproximadamente 600 ml do tampão TAE 1X até cobrir o gel.

A aplicação no gel de agarose foi realizada em uma cuba de eletroforese e a quantidade de poços teve variação conforme a quantidade de amplicons a serem aplicados, da seguinte forma:

- a) Cortou-se um pedaço de parafilm e colocou-se, com o auxílio de micropipeta, alíquotas de 3 μ L de Loading dye 6X (0,025% de azul de bromofenol, 60% de glicerol, 1% de SDS, 100mM de EDTA pH 8,0, em TAE1X), correspondentes ao número de amplicons a serem aplicados mais dois padrões de peso molecular para cada pente;
- b) 7 μ L de amplicon foi adicionado para cada alíquota do tampão e 1 μ L do padrão de peso molecular foi utilizado em uma das alíquotas;
- c) A mistura foi transferida com a micropipeta para cada um dos poços do gel de agarose assim como o padrão de 100pb (RBC – N^o Cat. RD002).

- d) O tempo de corrida do DNA no gel de agarose foi de 1 hora e 15 minutos;
- e) A visualização das bandas foi feita em um transiluminador de luz azul da *Loccus* (L-PIX)

ANEXO 9

GUIA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS PARA BACILOSCOPIA EM HANSENÍASE/ BRASIL (2010)

Fixação das amostras

A fixação das amostras foi realizada do seguinte modo:

- a) As lâminas contendo os raspados intradérmicos e a saliva, foram deixadas em superfície plana e à temperatura ambiente durante cinco a dez minutos até estarem completamente secos, e posteriormente foram passadas duas a três vezes, rapidamente, na chama de uma lamparina, com os esfregaços voltados para cima.
- b) Um porta-lâminas foi utilizado para o transporte ao laboratório de baciloscopia da FUAM onde realizou-se a coloração e a leitura baciloscóptica.

Coloração do Esfregaço pelo Método de Ziehl-Neelsen à Frio

- a) Colocar as lâminas em suporte apropriado, separadamente uma da outra;
- b) Cobrir todo o esfregaço com a solução de fucsina de Ziehl-Neelsen, previamente filtrada, durante 20 minutos;
- c) Retirar a lâmina do suporte e lavar em água corrente sob baixa pressão;
- d) Descorar os esfregaços com solução de álcool-ácido a 1%, até que os mesmos tomem uma coloração rosada;
- e) Lavar novamente a lâmina em água corrente sob baixa pressão;
- f) Cobrir todo o esfregaço com solução de azul de metileno a 0,3% por 1 minuto;
- g) Lavá-la em água corrente sob baixa pressão e deixar secar a temperatura ambiente.

Exame Baciloscóptico

A leitura da baciloscopia foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão, com aumento de 100x. Na interpretação dos resultados das amostras utilizou-se o índice bacteriológico (IB), proposto por Ridley em 1964, que baseia-se em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6+, dependendo do número de bacilos visualizados em cada campo microscópico examinado (quadro 1).