



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**



**PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* NO PERIODONTO,  
SALIVA E EM RASPADOS INTRADÉRMICOS DE  
PACIENTES COM HANSENÍASE**

**LIGIA FERNANDES ABDALLA**

**MANAUS**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**LIGIA FERNANDES ABDALLA**

**PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* NO PERIODONTO,  
SALIVA E EM RASPADOS INTRADÉRMICOS DE  
PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Processo Saúde e Doença” e na linha de pesquisa “Estratégias para o controle e/ou diagnóstico”.

Orientador: **Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca**

Co-orientadora: **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria da Graça Souza Cunha**

**MANAUS**

**2009**

**LIGIA FERNANDES ABDALLA**

**PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* NO PERIODONTO,  
SALIVA E EM RASPADOS INTRADÉRMICOS DE  
PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Processo Saúde e Doença” e na linha de pesquisa “Estratégias para o controle e/ou diagnóstico”.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr. Felipe Gomes Naveca (Presidente)  
Fundação Oswaldo Cruz/ Fundação Alfredo da Matta

Prof. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira (Membro Interno)  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dra. Lúcia de Paula (Membro Externo)  
Fundação Alfredo da Matta

## ***DEDICO ESTE TRABALHO***

### ***A DEUS,***

Pelo Dom da Vida, pela faculdade da inteligência, pela presença constante e pela oportunidade de ser útil ao meu próximo.

Agradeço-te senhor por guiar meus passos, pelo amparo, proteção, saúde, família e por preencher de sentido minha existência,

Agradeço também pelas coisas que eu ainda não sou capaz de enxergar.

### ***AOS MEUS PAIS EVENILDA E JORGE FERNANDES,***

A quem devo o meu crescimento profissional e moral, me estimulando sempre com amor e carinho para que eu pudesse atingir esta conquista. Por me apoiarem nas minhas decisões e me ensinarem os verdadeiros valores da vida, sendo exemplos de perseverança, dignidade e honestidade.

Dedico este trabalho com toda minha devoção e agradecimentos.

### ***AO MEU MARIDO JOÃO HUGO,***

Pela alegria constante, pelo incansável incentivo, companherismo, pelo conforto nas horas tristes e pela vibração nas minhas vitórias.

E simplesmente... por me amar e por acreditar em nós. Sem você nada disso seria possível!

Te amo!

### ***AOS MEUS IRMÃOS, DOUTORES, DAVID E HORÁCIO***

Que me deram a oportunidade de conviver e crescer ao lado de pessoas maravilhosas e pelos seus exemplos na busca do meu sonho do mestrado.

Vocês são motivos de imenso orgulho pra mim!

### ***A DEBBY,***

Por ter escrito da primeira à última linha desta dissertação ao meu lado, alegrando e festejando cada momento.

## AGRADECIMENTOS

Graças a várias pessoas este projeto se concretizou. Não poderia deixar de agradecer cada uma delas.

Ao Dr. **Felipe Gomes Naveca**, por ter acreditado desde o primeiro momento em meu potencial e ter me aceito como sua orientanda. Pelo exemplo de seriedade, devoção e paciência. Por ter me ensinado desde a segurar a pipeta até a me apaixonar por essa ciência linda que é a Biologia Molecular. Por ter sido grande motivador na minha busca por respostas. Espero ter merecido sua confiança e amizade, jamais vou esquecer.

À Dra. **Maria da Graça Souza Cunha**, por ter aberto as portas da FUAM pra mim, pela paciência e carinho.

À **FAPEAM**, que sempre investiu em todos os meus projetos desde a graduação. Pelo apoio institucional e financeiro, elevando sua importância deste trabalho ao financiá-lo.

À coordenação do Mestrado, no nome do Dr. **Nelson Abrahim Fraiji**, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho e ter apostado numa recém-formada que tinha apenas um sonho.

À Direção da Fundação “Alfredo da Matta”, na pessoa da Diretora **Adele Schwartz Benzaken** e a todos seus funcionários, que possibilitaram meu trabalho e minha convivência em um ambiente sempre muito agradável.

À **Valderiza Lourenço Pedrosa**, pela pesquisa epidemiológica e pelo sorriso sempre presente em seu rosto

À querida e inesquecível **Meg**, por todo seu amor ao trabalho e pela atenção e carinho a mim dispensada.

Ao **Eliezer da Silva Pinto**, pelo auxílio na realização da parte estatística deste trabalho.

Ao **Everton** pelo auxílio na leitura das lâminas de baciloscopia.

À coordenação do laboratório da FUAM, em especial ao **André**, pela amizade e preocupação constante. Pelo carinho de sempre conseguir uma caixinha de luva XP pra mim.

À todo o pessoal do ambulatório de hanseníase da FUAM, em especial ao **Paulinho** que realizou as coletas das linfas para este trabalho.

À Dra. **Evenilda Braga Fernandes de Oliveira**, por ter sido meu elo com a FUAM, por ter transmitido sua enorme experiência de vida profissional e moral, ensinando-me, não somente o valor da ciência e da saúde, como o grande valor do ser humano.

Às companheiras de laboratório **Tatiana Amaral** e **Elaine Veras** pela colaboração na parte experimental deste trabalho e pelo exemplo do jovem e estimulante caráter profissional.

À Dra. **Maria Fulgência Costa Lima Bandeira** e ao Dr. **Paulo José Benevides dos Santos** por participarem da minha banca de qualificação e contribuírem consideravelmente para este trabalho.

Ao amigo **Daniel Dutra** pelas sugestões e amizade de tantos anos.

À Dra. **Júlia Salem**, pela idéia inicial desta dissertação e estimulante caráter profissional.

Ao meu marido **Dr. João Hugo Abdalla** pelas idéias, paciência e amor dedicado a mim.

Aos amigos do curso de mestrado 2007: **Dr. Rafael Saulo**, **Dr. Luiz Carvalho**, **Dra. Patrícia Motta** e **Dr. José Jorge**, pelo companheirismo, pela harmoniosa divisão de responsabilidades e pela oportunidade de grande crescimento científico através do trabalho em conjunto.

À **Francisca**, que cuidava do meu lar e da minha filhinha Debby enquanto eu fazia o mestrado. Obrigada pelo carinho e dedicação à minha família.

Aos **meus pacientes**, imprescindíveis na concepção deste trabalho. Agradeço-lhes e deixo meu carinho a todos a quem pude ter o prazer de conhecer. Que Deus os abençoe.

A todos os meus amigos de graduação e pós-graduação, que estiveram ao meu lado durante esta etapa, tornando nossa jornada muito mais agradável.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos**



*"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol."*

Pablo Picasso

## RESUMO

**Objetivo:** verificar através da Baciloscopia e da Reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença do *M. leprae* no periodonto, saliva e raspados intradérmicos de pacientes com hanseníase.

**Metodologia:** realizou-se um estudo transversal do tipo detecção de casos numa instituição referência de hanseníase no Amazonas.

**Resultados:** O trabalho foi composto por 48 pacientes sendo 15 multibacilares (MB) e 33 paucibacilares (PB). Os pacientes MB tiveram o diagnóstico confirmado pela baciloscopia e PCR de raspados intradérmicos, enquanto que, 16 (33,3%) dos PB foram positivos na PCR e nenhum na baciloscopia. Quatro pacientes PB negativos na PCR de raspados intradérmicos foram positivos no periodonto e na saliva, 1 positivo na saliva e 2 no periodonto. Nenhuma amostra do periodonto e da saliva foi positiva na baciloscopia. Verificou-se uma prevalência de doença periodontal (DP) de 58,3%.

**Conclusões:** não houve relação entre a DP e a presença do *M. leprae*; a baciloscopia não mostrou ser uma técnica eficiente para análise da saliva e periodonto; a técnica de PCR de raspado dérmico mostrou ser um método mais eficaz no diagnóstico dos PB do que a baciloscopia; a positividade da PCR para detecção do *M. leprae* nos PB pode ser aumentada coletando raspado intradérmico, periodonto e saliva.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*, Baciloscopia, PCR, Periodonto, Saliva, Raspado Intradérmico.

## ABSTRACT

**Objective:** to verify through bacteriological examination and polymerase chain reaction (PCR) the presence of *M. leprae* in periodontium, saliva and skin slit smears of the leprosy patients.

**Methodology:** A case detection transversal study took place in a leprosy reference center in the Amazon State.

**Results:** The study included 48 leprosy patients being 15 multibacillary (MB) cases and 33 paucibacillary (PB) cases. The diagnosis of MB patients was confirmed through bacteriological examination and PCR of the skin slit smears, while, 16 (33%) of PB patients were positive in PCR and none in bacteriology examination of the skin smears. Four PB patients with negative PCR skin smears were PCR positive in the periodontium and saliva, 1 positive in saliva and 2 in the periodontium. No sample of periodontium and saliva had positive bacteriological results. A prevalence of 58,3% of periodontal disease (DP) was observed.

**Conclusion:** there was no correlation between DP and the presence of *M. leprae*; bacteriological examination did not proved to be an efficient technique for analysis of saliva and periodontium; the skin smears PCR technique proved to be most efficient method for to diagnosis PB patients than bacteriological examination; PCR positivity for detection of *M. leprae* in PB patients can be increase by collecting slit skin smears, periodontium and saliva.

**Keywords:** *Mycobacterium leprae*, Skin Smears, PCR, Periodontium, Saliva, Bacteriological Examination.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Mycobacterium leprae</i> em esfregaço .....	9
<b>Figura 2</b>	Prevalência da hanseníase em 2006 na América Latina .....	10
<b>Figura 3</b>	Classificação da Hanseníase segundo Ridley; Jopling .....	13
<b>Figura 4</b>	Periodonto .....	17
<b>Figura 5</b>	Doença Periodontal .....	17
<b>Figura 6</b>	Fluxograma de Procedimentos .....	26
<b>Figura 7</b>	Sonda Periodontal Manual .....	28
<b>Figura 8</b>	Doença periodontal classificada segundo o índice WS .....	31
<b>Figura 9</b>	Coleta do raspado intradérmico .....	32
<b>Figura 10</b>	Fluxograma da coleta das amostras da saliva .....	33
<b>Figura 11</b>	Fluxograma da coleta de amostras do periodonto .....	34
<b>Figura 12</b>	Identificação dos microtubos de coleta .....	36
<b>Figura 13</b>	Fluxograma de Extração do DNA .....	38
<b>Figura 14</b>	Esquema de distribuição dos esfregaços na lâmina de microscopia .....	42
<b>Figura 15</b>	Técnica de coloração Kinyoun .....	43
<b>Figura 16</b>	Amostras de linfa de pacientes paucibacilares em gel de agarose .....	55

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Prevalência da Hanseníase no Brasil por região no ano de 2006 .....	11
<b>Quadro 2</b>	Formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Madri .....	12
<b>Quadro 3</b>	Índice Bacteriológico .....	14
<b>Quadro 4</b>	Índice Gengival .....	29
<b>Quadro 5</b>	Índice de Placa .....	30
<b>Quadro 6</b>	Reação PCR .....	39
<b>Quadro 7</b>	Programa de amplificação do PCR .....	40
<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos pacientes pelas categorias de doença periodontal baseada na classificação WS .....	47
<b>Tabela 2</b>	Relação das variáveis periodontais e a classificação periodontal .....	48
<b>Tabela 3</b>	Resultados da PCR em relação à Classificação Operacional da hanseníase .....	50
<b>Tabela 4</b>	Relação entre as PCRs do periodonto e saliva .....	52
<b>Tabela 5</b>	Relação da Hanseníase com a classificação periodontal .....	52
<b>Tabela 6</b>	Relação presença de <i>M. leprae</i> e a classificação periodontal .....	54
<b>Tabela 7</b>	Relação entre a classificação da hanseníase, a baciloscopia, a PCR e a biópsia .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>B</b>	Borderline
<b>BAAR</b>	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>D</b>	Dimorfo
<b>DATASUS</b>	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
<b>DD</b>	Dimorfo-dimorfo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Conjunto de Desoxirribonucleosídeos trifosfato
<b>DP</b>	Doença Periodontal
<b>DT</b>	Dimorfo-tuberculóide
<b>DV</b>	Dimorfo-virchowiano
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ENH</b>	Eritema nodoso da hanseníase
<b>FUAM</b>	Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta
<b>HCl</b>	Acido clorídrico
<b>I</b>	Indeterminada
<b>IB</b>	Índice bacilos cópico
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IG</b>	Índice Gengival
<b>IP</b>	Índice de Placa
<b>L</b>	Lepromatosa
<b><i>M.leprae</i></b>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<b>MB</b>	Multibacilares
<b>MH</b>	Mal de Hansen
<b>NI</b>	Nível de Inserção Clínica
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P</b>	Periodonto
<b>P0</b>	Saúde Gengival
<b>P1</b>	Periodontite Leve
<b>P2</b>	Periodontite Moderada
<b>P3</b>	Periodontite Avançada
<b>P4</b>	Periodontite Grave
<b>PB</b>	Paucibacilares
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase
<b>PGL</b>	Glicolipídeos Fenólicos
<b>PS</b>	Profundidade de Sondagem
<b>R</b>	Recessão Gengival
<b>S</b>	Saliva
<b>spp</b>	Espécie
<b>T</b>	Tuberculóide
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b><i>Taq</i></b>	<i>Termophilus aquaticus</i>

<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>V</b>	Virchowiana
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>WS</b>	Índice de Doença Periodontal

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>c</b>	Centímetro
<b>+</b>	Cruzes
<b>g</b>	Gramas
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>∞</b>	Infinito
<b>L</b>	Litro
<b>≥</b>	Maior e igual
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mmol</b>	Milimolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>'</b>	Minutos
<b>M</b>	Molar
<b>"</b>	Segundos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>%</b>	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Hanseníase</b> .....	8
<b>1.2 Hanseníase e fluídos corporais</b> .....	15
<b>1.3 A Doença Periodontal</b> .....	16
<b>1.4 Relação entre a doença periodontal e a Hanseníase</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	23
<b>2.2 Específicos</b> .....	23
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Modelo de Estudo</b> .....	24
<b>3.2 Universo de Estudo</b> .....	24
<b>3.3 Fluxograma de Procedimentos</b> .....	26
<b>3.4 Procedimentos</b> .....	26
3.4.1 Anamnese .....	27
3.4.2 Exame Periodontal .....	27
3.4.3 Coleta das Amostras .....	32
3.4.4 Procedimentos Moleculares – PCR .....	35
3.4.5 Procedimentos Bacteriológicos .....	41
<b>3.5 Análise Estatística</b> .....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>68</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hanseníase

A hanseníase ou Mal de Hansen (MH) é uma doença infecciosa que acomete principalmente a pele, nervos periféricos e mucosa, causada por uma bactéria denominada *Mycobacterium leprae* (*M. leprae* ou bacilo de Hansen) descrita em 1873 pelo médico norueguês Amauer Hansen (NEVILLE et al., 1998).

### 1.1.1 Agente Etiológico

O *M. leprae* taxonomicamente se encontra classificado no grupo das bactérias da seguinte forma: Classe – Schizomycetae; Ordem – Actinomycetales; Família – Mycobacteriaceae (bastonetes não formadores de cilos); Gênero – Mycobacterium (bastonetes álcool-ácido-resistentes). Possui a propriedade de retenção da fucsina básica mesmo na presença de soluções álcool-ácidas, e por esse motivo designa-se de bacilos álcool-ácido resistentes, que na prática clínica são transcritos como BAAR (DAVID, 1976).

É um parasita intracelular com predileção pela célula de Schwann dos nervos periféricos e pele sendo transmitido, principalmente, através das mucosas das vias aéreas superiores (HASTINGS, 1994). Representa um organismo gram-positivo, de metabolismo precário, pouca antigenicidade e baixa virulência (REICHART et al., 1985; STYLE, 1995).

Nos esfregaços são vistos isolados, em agrupamentos variados e em arranjos especiais denominados globias. Estas representam uma característica peculiar destas bactérias, sendo arredondadas, globóides e resultam de sólida união de numerosos bacilos por uma substância

chamada gléia, que torna difícil a sua dissociação (Figura 1). Até hoje ainda não se obteve um meio de cultura apropriado para o cultivo do *M. leprae* em laboratório (TALHARI et al., 2006).

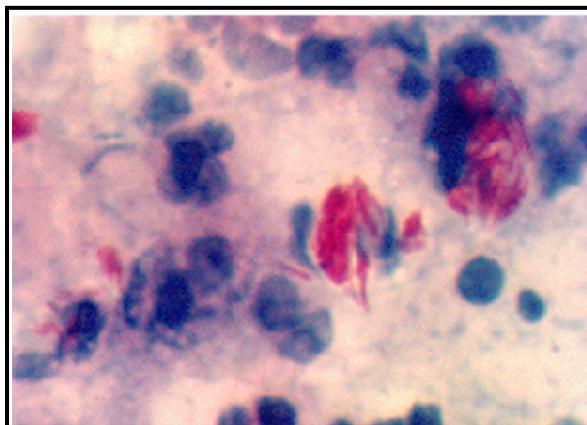


Figura 1 – *Mycobacterium leprae* em esfregaço  
Fonte: <http://www.fcf.usp.br>>Acesso em: 22 jan. 2009

A ultra-estrutura do *M. leprae* assemelha-se a de outras micobactérias, mas apresenta constituintes específicos, destacando-se a espessa camada lipídica (20 micra) formada principalmente pelos glicolípídeos fenólicos (PGL I, II e III), sendo que o PGL I é um antígeno espécie-específica (MACHADO, 2006).

A probabilidade da infecção é influenciada pela duração do convívio com o infectado, pela severidade da infecção a que se ficou exposto e pelo grau de resistência do organismo, sendo o período médio de incubação entre dois a cinco anos (LOMBARDI, 1990; NOGUEIRA, 1990).

### 1.1.2 Epidemiologia

De acordo com relatórios oficiais, a nível mundial a prevalência e o número de casos novos detectados de hanseníase têm diminuído ao longo dos anos, porém, a doença ainda continua com um alto índice em países como o Brasil, Angola, República Africana Central,

República Democrática de Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia (WHO, 2008).

A Figura 2 mostra os registros de prevalência da doença na América Latina no ano de 2006.

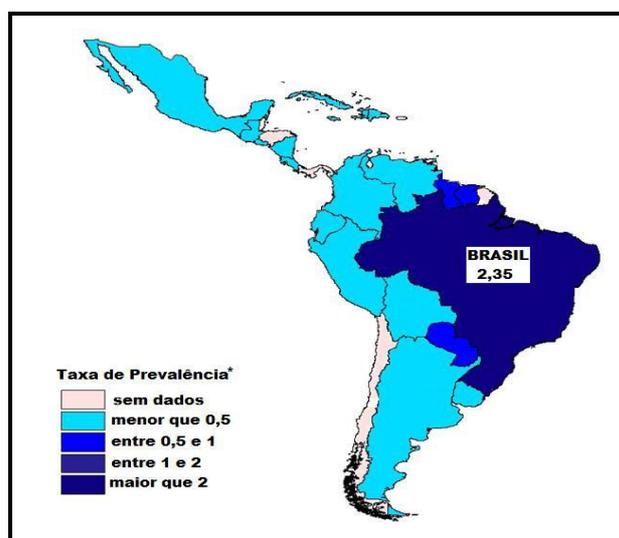


Figura 2 – Prevalência da Hanseníase em 2006 na América Latina

Fonte: WHO (2008)

\*casos/10.000habitantes

Segundo o Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2008), no Brasil apesar da acentuada redução na taxa de prevalência observada no período compreendido entre 1985 e 2006 de 19,00 para 2,35 doentes em cada 10.000 habitantes, a hanseníase ainda constitui um problema de saúde.

Embora o país registre um importante decréscimo nas taxas de prevalência de hanseníase, os níveis de magnitude da doença, segundo as regiões geográficas (Quadro 1), demonstram a necessidade de se dar continuidade à execução de atividades que impactem na transmissão da doença, de modo a atingir taxas inferiores a 1 caso/10.000 habitantes em cada município (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

## Quadro 1

### Prevalência da hanseníase no Brasil por região no ano de 2006

REGIÃO	PREVALÊNCIA*	PARÂMETRO
<b>Norte</b>	<b>5,88</b>	<b>Hiperendêmico</b>
Nordeste	3,09	Muito Alto
Sudeste	1,13	Médio
Sul	0,56	Médio
Centro-Oeste	6,69	Hiperendêmico
<b>BRASIL</b>	<b>2,35</b>	<b>Muito Alto</b>

\*casos/10.000habitantes

Fonte: DATASUS (2008).

No estado do Amazonas no ano de 2006, a partir das informações do DATASUS (2008), registrou-se uma taxa de prevalência 4,52 casos/10.000 (1.495 habitantes), sendo de 3,59 (606 habitantes no Município de Manaus).

#### 1.1.3 Classificação da Hanseníase

Segundo Languillon, J.; Carayon, A.(1986) existem quatro grandes critérios que definem a classificação da doença:

- Critério Clínico: aspectos das lesões cutâneas, variando em número, extensão, definição de margens e simetria de distribuição;
- Bacteriológico: presença ou ausência do *M. leprae*, e seus aspectos morfológicos, variando de numerosos, íntegros e agrupados, formando globias, a raros, fragmentados e ausentes;
- Imunológico: imunorreatividade à lepromina – reação de Mitsuda, que avalia a reação imunológica retardada (estado imunitário) frente à doença;
- Histológico: aspectos histopatológicos das lesões, variando de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário.

Na classificação de Madri, em 1953, as formas clínicas da hanseníase são feitas considerando-se aspectos bacteriológicos e resposta à intradermoreação de Mitsuda (BRASIL, 2002). Assim, os pacientes são classificados de acordo com o Quadro 2:

Quadro 2

Formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Madri

Formas Clínicas	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Dimorfa ou Borderline (D ou B)	Virchowiana (V)
Reação de Mitsuda*	positiva ou negativa	fortemente positiva	negativa a positiva fraca	negativa
Baciloscopia	Negativa	Negativa	positiva a raros bacilos	positiva

\*Considerando-se reação positiva  $\geq 5$  mm de diâmetro.

Fonte: adaptação de BRASIL (2002).

A classificação de Ridley e Jopling (1962) adota subgrupos dentro do espectro, que obedece, critérios clínicos e bacteriológicos, e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos. Segundo esta classificação, a forma inicial da doença é a Indeterminada (I), a qual pode resolver espontaneamente ou evoluir para um espectro extremamente amplo de manifestações. Estas são reflexos de diferentes respostas imunocelulares ao *M. leprae*, pré-determinadas pela capacidade inata do hospedeiro em resistir ou não à infecção. Desse modo, pode permanecer limitada, no Pólo Tuberculóide (T), evoluir para formas disseminadas, o Pólo Virchowiano ou Lepromatosa (V ou L), ou tomar uma posição intermediária entre esses dois pólos, o Grupo Borderline ou Dimorfo (B ou D). Conforme a proximidade maior a um dos dois tipos polares, o Grupo Dimorfo subdivide-se em Dimorfo-Tuberculóide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD) ou Dimorfo-Virchowiano (DV) (Figura 3).



Figura 3 – Classificação da Hanseníase, adaptado de Ridley e Jopling (1962)

Baseada na pesquisa de bacilos nos raspados intradérmicos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1982 propôs uma classificação simplificada, considerando formas Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB) com implicações terapêuticas. Assim, os pacientes nas formas PB correspondiam a pacientes que apresentavam baciloscopia negativa e as formas MB à pacientes com baciloscopia positiva (BRASIL, 2002).

Nos últimos anos, a OMS tem estimulado os países endêmicos a classificarem os pacientes de acordo com o número de lesões cutâneas. Sendo considerados PB pacientes que apresentam de uma a cinco lesões e, MB pacientes com mais de cinco lesões. Este fato ocorreu pela dificuldade de execução da baciloscopia nos serviços de saúde e com base em trabalhos operacionais (BRASIL, 2002).

A hanseníase pode apresentar episódios reacionais caracterizados como processos inflamatórios que se intercalam no curso crônico da doença, devendo ser prontamente diagnosticados e tratados com a finalidade de evitar seqüelas. Podem surgir durante toda a evolução da doença, antes, durante e após o tratamento (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005). Os tipos de reação mais importantes são a reação reversa ou reação do tipo 1 e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (ENH). A reação do tipo 1 tende a surgir mais precocemente no tratamento, entre o 2º e o 6º meses, caracteristicamente na hanseníase dimorfa. Surgem lesões novas à distância freqüentemente acompanhadas de neurites, podendo ser a única

manifestação clínica. A reação do tipo 2 ou ENH ocorre nas formas virchowianas e dimorfas, em geral, após seis meses de tratamento, podendo também ser acompanhada de neurites (TALHARI et al., 2006).

#### 1.1.4 Diagnóstico da Hanseníase

A técnica laboratorial de diagnóstico da hanseníase é a baciloscopia, considerada padrão-ouro no diagnóstico da doença, pois é de fácil execução, pouco invasiva, de baixo custo e que não necessita de tecnologia avançada (ARAUJO, 2003). É realizada com o auxílio de um microscópio em objetiva de imersão, com aumento total de 100 x na objetiva e 10x ocular, onde se observa o *M. leprae* diretamente nos raspados intradérmicos das lesões hansênicas ou de outros locais de coleta selecionados (STRETCH, 1999; BRASIL, 2002). A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen ou pelo método de Kinyoun e apresenta-se o resultado sob a forma de índice baciloscópico (IB), numa escala que vai de 0 a 6+, dependendo do número de bacilos observados por campo à microscopia (ARAUJO, 2003) (Quadro 3).

Quadro 3

#### Índice Bacteriológico

IB	Bacilo/Campo
Negativo (0)	Nenhum bacilo em 100 campos examinados
Positivo (1+)	1 – 10 bacilos em 100 campos examinados
Positivo (2+)	11 – 100 bacilos em 100 campos examinados
Positivo (3+)	1 – 10 bacilos em média, por campo, em 50 campos examinados
Positivo (4+)	11 – 99 bacilos em média, por campo, em 25 campos examinados
Positivo (5+)	100 – 1000 bacilos em média, por campo, em 25 campos examinados
Positivo (6+)	Mais de 1000 bacilos em média, por campo, em 25 campos examinados

Fonte: adaptação TALHARI (2006)

A reação em cadeia da polimerase, conhecida pela sigla PCR (“Polimerase Chain Reaction”), é um método que vem revolucionando o diagnóstico da hanseníase uma vez que apresenta uma alta sensibilidade e especificidade para detecção de *M. leprae* (COLE et al., 2000). Também tem sido empregada para detecção de bactérias periodontopatogênicas por ser uma técnica rápida, relativamente simples e ideal para ser utilizada em situações que há um número limitado de patógenos presentes como na placa subgingival (CONRADS et al., 1996; MAYANAGI, 2004) e saliva (SANZ et al., 2004; UMEDA et al., 2004).

Segundo Santos et al.(1999), a PCR baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de DNA, que ladeado por dois iniciadores (*primers*), oligonucleotídeos curtos que se hibridizam com os filamentos opostos da seqüência-alvo e desencadeiam a síntese da seqüência de DNA-complementar pela enzima DNA-polimerase. Portanto, partes de um gene (em geral os *éxons*) do DNA podem ser ampliadas rapidamente pelo uso de iniciadores específicos conhecidos.

## **1.2 Hanseníase e fluídos corporais**

Segundo Brasil (2002) a hanseníase é transmitida por meio da via respiratória, por gotículas de saliva ou de secreção nasal. A transmissão da doença ocorre pelas vias aéreas superiores e foi confirmada pela infecção bem sucedida de ratos expostos ao ar carregado de bacilos. Ocorre também por contato direto com a pele através de feridas de doentes e através de secreções (semen, saliva, suor ou lagrima) dos doentes portadores de formas contagiantes (PINHEIRO, 2006).

No estudo da flora bucal, a saliva parece ser a amostra mais adequada visto que ela contém uma variedade de bactérias de diferentes sítios bucais (UMEDA et al., 2004). Além disso, a utilização da saliva possibilita uma padronização quantitativa da amostra, ou seja,

permite coletar o mesmo volume de amostra em diferentes pacientes. Representa também uma amostra de fácil obtenção, sem necessidade de técnicas invasivas durante sua coleta (TANAKA et al., 2002).

Nenhuma referência foi encontrada visando à detecção do *M. leprae* na saliva. Os trabalhos publicados sobre a saliva de pacientes com hanseníase foram de detecção de títulos de anticorpos e demonstraram existir anticorpos específicos contra o *M. leprae* (IgA) e aumento de níveis de anticorpos (IgM e IgG) que variava de acordo com a forma clínica da doença (ABE et al., 1984; NAGAO-DIAS et al., 2007).

### **1.3 A Doença periodontal**

#### 1.3.1 O Periodonto

O periodonto é o tecido de suporte dos dentes e compreende: a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar (Figura 4). A gengiva, dividida em gengiva livre e inserida, compõe o periodonto de proteção, e é constituída de tecido epitelial e conjuntivo. O osso alveolar, o cemento radicular e o ligamento periodontal compõem o periodonto de sustentação (LINDHE; KARRING, 1999).

A função principal do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo da maxila e mandíbula (periodonto de sustentação), bem como manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal (periodonto de proteção). Também é chamado de “aparelho de inserção” ou de “tecidos de suporte dos dentes e corresponde a uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que está sujeito a alterações morfológicas e funcionais (LINDHE; KARRING, 1999).

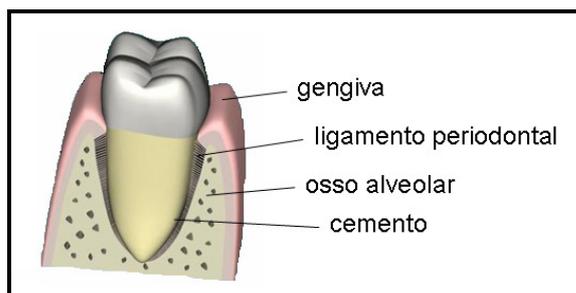


Figura 4 – Periodonto

Fonte: <http://odontologiaem3d.net/html/index2.htm>> acesso 17/03/2009

### 1.3.2 A patogênese da doença periodontal

Entende-se por doença periodontal ou periodontite (DP) um conjunto de condições inflamatórias, de caráter crônico e de origem bacteriana, que começa afetando o tecido gengival e pode levar à perda dos tecidos de suporte do elemento dental formando as bolsas periodontais (BELMONTE et al., 2007).

Clinicamente, a doença periodontal pode ser classificada em dois grupos: as gengivites, que são alterações nos tecidos moles sendo caracterizadas por mudança na cor e textura da gengiva com aumento na tendência ao sangramento à sondagem no sulco gengival/bolsa periodontal; e a periodontite, que, além disso, também causa alteração nos tecidos duros com perda progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar aumentando a profundidade clínica da bolsa e/ou retração tecidual (Figura 5) (LINDHE; KARRING, 1999).



Figura 5 – Doença periodontal

Fonte: [www.perioclean.com.br/periodontia/conseq.htm](http://www.perioclean.com.br/periodontia/conseq.htm)> acesso 17/03/2009

Existem vários fatores que podem influenciar o início, a taxa de progressão e as características clínicas da doença, assim como sua resposta ao tratamento. Estes fatores são a especificidade e a patogenicidade da flora microbiana envolvida, resposta imune-inflamatória do hospedeiro, fatores de risco ambientais e adquiridos, características do metabolismo dos tecidos conjuntivo e ósseo alveolar, bem como fatores de risco genéticos (LINDHE; KARRING, 1999).

Em relação à flora bacteriana, a gengivite é predominantemente constituída por bactérias gram-positivas, aeróbias, sacarolíticas e imóveis, e na periodontite predominam as gram-negativas, anaeróbias ou microaerófilas, proteolíticas e móveis (CHAZAN et al., 2004).

Estima-se que cerca de trezentas espécies bacterianas distintas podem ser isoladas do sulco periodontal (ZAMBON; HARASZTHY, 1995), mas apesar desta grande variedade e diversidade, somente algumas espécies têm sido encontradas repetidamente nos sítios periodontais alvos e, dentre estas podemos citar *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticula*, *Peptostreptococcus micros*, *Eikenella corrodens*, *Selenomonas spp.*, *Capnocytophaga spp.* (GERSDORF et al., 1993).

É indiscutível a participação de microorganismos na etiologia da doença periodontal sendo que um dos mais importantes avanços no campo da microbiologia associada à periodontite é o conceito de especificidade, o qual atribui a cada entidade clínica um grupo específico de patógenos (NEWMAN; NISENGAR, 1994). Assim, a determinação das espécies presentes é fundamental dentro da periodontia permitindo um diagnóstico e uma conduta terapêutica mais adequados (NIEMINEN et al., 1996).

Baseado nas evidências que implicam certas espécies microbianas como patógenos periodontais, vários ensaios laboratoriais têm sido desenvolvidos para detecção destas bactérias (ALBANDAR et al., 1997). Atualmente, alguns vírus como Herpes simplex,

Citomegalovírus e Epstein-Bar também têm sido descritos como possíveis causadores de doença periodontal (IMANISHI, 2005), porém, não foi encontrado nenhum relato sobre as micobactérias e sua atuação como agente etiológico da DP.

#### **1.4 Relação entre a doença periodontal e a Hanseníase**

As alterações que a Hanseníase pode apresentar na cavidade bucal foram descritas por Brasil et al. em 1973 relacionando-as com a forma da doença e seu tempo de evolução. Estudo realizado por este autor detectou lesões na mucosa bucal destes pacientes, relatando que estas só ocorrem em estados avançados da doença, inexistindo nas formas tuberculóide e indeterminada. A maioria dos autores menciona a mucosa nasal como principal local de contaminação e eliminação dos bacilos de Hansen. Com o advento da medicação específica iniciada na época sulfônica, tem sido admitido o desaparecimento precoce dessas manifestações na vigência da terapêutica. Os autores afirmaram que poucos pesquisadores davam ênfase às lesões de hanseníase na cavidade bucal, motivo pelo qual, no sentido profilático, pouco se fez no campo da Odontologia (BRASIL, 1973).

Segundo Aarestrup et al. (1995) a região bucomaxilofacial merece destaque quanto à prevalência e peculiaridades clínico biológicas durante a evolução das diferentes formas da Hanseníase.

A seqüência de alterações que ocorre na mucosa bucal é semelhante à encontrada na pele, sendo definida por estágios de invasão, proliferação e resolução. Alguns autores têm sugerido que as lesões bucais ocorrem em mais de 60% dos pacientes portadores da forma lepromatosa em atividade nos cinco primeiros anos de desenvolvimento desta doença (SCHEEPERS et al., 1993). O envolvimento da mucosa bucal nas outras formas raramente é observado. Sendo que, os pacientes com a forma intermediária que avançam para o pólo virchowiano podem vir

a apresentar (SAWYER et al., 1987; SCHEEPERS et al., 1993; NEVILLE et al., 1998; SCOLLARD et al., 1999).

De acordo com a literatura, as áreas mais envolvidas são palatos duro e mole, úvula, lábios, língua e gengiva (BECHELLI; BERTI, 1939; KUMAR et al., 1988; SHARMA, 1993). Sendo que, na região anterior da maxila pode ocorrer atrofia do processo alveolar, começando na região dos incisivos centrais, resultando em significativa erosão óssea, com perda de dentes nessa área (NEVILLE, 1998; SCOLLARD; SKINSNES, 1999).

Porto (1965) e Brasil et al. (1973) afirmaram que nenhuma lesão na mucosa oral é patognomônica da hanseníase sendo que, esta deve ser biopsiada e submetida ao exame histopatológico. A lesão somente pode ser considerada de etiologia hansênica se houver associação de bacilos álcoolácido-resistentes e reação inflamatória. E isso pode ocorrer em estágios menos avançados da doença não sendo exclusivo dos casos de longa duração.

*M. leprae* tem sido detectado em áreas da cavidade bucal sem lesões evidentes, em pacientes do pólo tuberculóide e dimorfo-tuberculóide, através de exames baciloscópios da mucosa clinicamente normal (HUBSCHER et al., 1979; SANTOS et al., 2000; FUCCI DA COSTA et al., 2003; ABREU et al., 2006; ABREU et al., 2007). Segundo Santos et al. (2007) o bacilo pode estar presente na mucosa bucal sem apresentar qualquer alteração morfológica clinicamente visível, o que sugere uma resistência ao surgimento de lesões neste local. Considera-se, portanto, que a invasão da mucosa oral é decorrência da bacilemia pela disseminação e multiplicação bacteriana (SONI, 1992; SHARMA, 1993).

Genvivite crônica e periodontite podem estar presentes nos pacientes portadores da hanseníase, sendo a gengiva usualmente afetada na área localizada na palatina dos incisivos superiores, geralmente associada às lesões do palato duro (REICHART, 1976; GIRDHAR, 1979).

Para o tipo virchowiano tem sido descrito predisposição à gengivite e periodontite com perda do osso alveolar e, conseqüentemente, perda dental, iniciada pela crista óssea interincisal da maxila. Nos estágios mais avançados, pode haver um achatamento antero-posterior da arcada superior, destruição da espinha nasal anterior, dos ossos próprios do nariz, da região do palato, com conseqüente perda dos dentes da área (MITAL, 1991).

A doença periodontal na Hanseníase, principalmente na forma virchowiana, é relativamente comum sendo o sangramento gengival ao menor toque, hipertrofia da papila gengival, perda de dentes e áreas de hipoestesia na mucosa do rebordo alveolar os achados mais freqüentes. Pode-se verificar uma relação direta entre o tempo de diagnóstico da hanseníase com o desenvolvimento de doença periodontal crônica inflamatória (AARESTRUP et al., 1995).

Ao contrário das manifestações cutâneas, que são descritas exaustivamente na literatura médica, são poucos os estudos publicados que tratam das manifestações orais na hanseníase, e faltam descrições detalhadas sobre esse assunto nos livros textos padrões. A maioria das referências é antiga, da época em que os pacientes evoluíam ao longo dos anos pela falta de um tratamento eficaz para a doença. Na literatura recente, em plena fase da multidrogaterapia, faltam dados sobre o comprometimento da mucosa oral pela hanseníase.

Apesar de a literatura relatar o envolvimento periodontal pela doença, os poucos registros são relativos apenas aos de níveis de inserção clínicos, índice gengival e índice de placa, não se encontrando trabalhos desenvolvidos na pesquisa do *M. leprae* nesta região. Considerando que os pacientes diagnosticados com Hanseníase geralmente são de classes sociais baixas e que essa população também apresenta uma deficiência na higiene bucal, a realização da pesquisa do *M. leprae* nessa região é um primeiro passo para verificar se há realmente uma relação positiva entre a DP e a Hanseníase.

Mediante a carência de publicações nesta área e visto que a hanseníase ainda hoje é considerada um problema de saúde pública, o presente trabalho será desenvolvido com o intuito de buscar novas informações sobre o assunto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Verificar por meio de parâmetros bacteriológico (baciloscopia) e molecular (PCR) a presença do *M. leprae* no exsudato do sulco gengival/ bolsa periodontal, saliva e raspados intradérmicos de pacientes virgens de tratamento nas diversas formas clínicas de hanseníase.

### **2.2 Específicos**

- 2.2.1 Verificar a prevalência de doença periodontal em pacientes com hanseníase;
- 2.2.2 Correlacionar os achados clínicos com os achados bacteriológicos e moleculares;
- 2.2.3 Verificar a especificidade da baciloscopia tendo como padrão a detecção do *M. leprae* na PCR.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 Modelo de Estudo**

Visando a proposição do trabalho optou-se por um estudo transversal do tipo detecção de casos para verificar a presença do *M. leprae* no exsudato do sulco gengival/ bolsa periodontal, saliva e raspados intradérmicos de pacientes virgens de tratamento nas diversas formas clínicas de hanseníase.

### **3.2 Universo de Estudo**

#### **3.2.1 A Instituição**

A pesquisa foi desenvolvida na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM) sediada no Município de Manaus, no Bairro da Cachoeirinha, por ser instituição referência no tratamento da hanseníase no Amazonas.

#### **3.2.2 Amostragem**

Adotamos a amostra por conveniência, ou seja, foram incluídos todos os pacientes encaminhados como casos suspeitos de hanseníase pelo setor de triagem ambulatorial da instituição no período de 16/05 a 19/06 e preencheram o critério de inclusão, gerando um total de 48 pacientes.

### 3.2.3 Critérios de Inclusão e/ou exclusão

Foram incluídos na pesquisa indivíduos de ambos os sexos, entre 18 e 65 anos, de demanda espontânea, com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de hanseníase e virgens de tratamento.

Foram excluídos da pesquisa pacientes de etnia indígena, mulheres grávidas, edentados totais e indivíduos que não tiveram o diagnóstico de hanseníase confirmado após o saliva e o raspado intradérmico e/ou biópsia.

### 3.2.4 Aspectos Éticos

Obedecendo ao exigido pela legislação brasileira (1996), este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (CEP – FUAM) e aprovado em reunião de 04/04/2008, tendo como registro 001/2008, FR-176358, CAAE-0001.0.266.115-08 (Anexo 1).

Indispensavelmente foi obtido o consentimento livre e esclarecido individual de todos os participantes antes da realização do exame (Apêndice A).

### 3.3 Fluxograma de Procedimentos

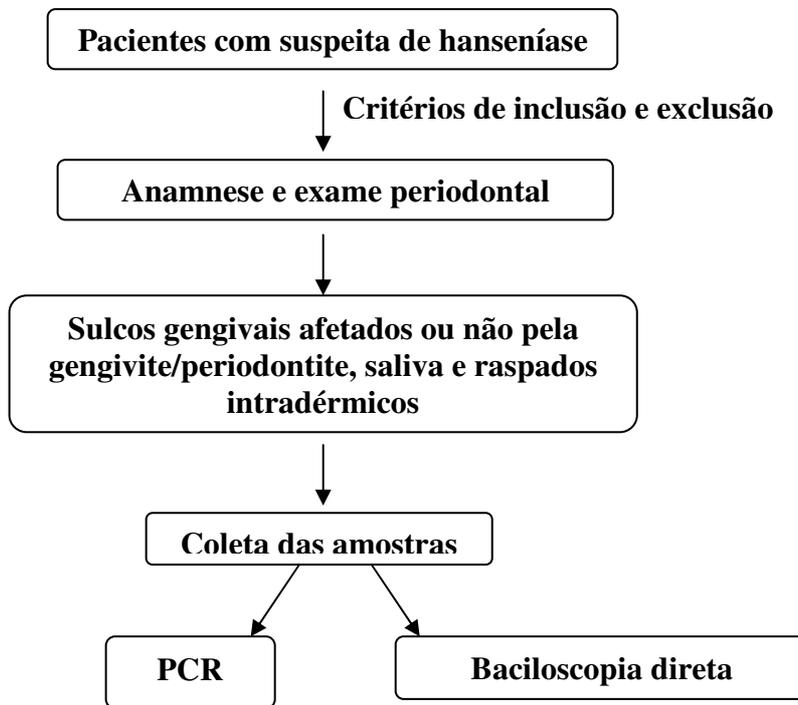


Figura 6 – Fluxograma de Procedimentos.

### 3.4 Procedimentos

A coleta dos raspados intradérmicos foi realizada na sala de baciloscopia do próprio ambulatório como ocorre na rotina na instituição. Posteriormente, os pacientes foram dirigidos ao consultório odontológico onde se realizou anamnese com ênfase em informações consideradas relevantes na avaliação da saúde periodontal. As coletas de saliva e do periodonto foram realizadas sendo por último realizado o exame periodontal. Essa ordem foi criteriosamente seguida a fim de evitar presença de sangue na coleta da saliva e do periodonto.

### 3.4.1 Anamnese

De cada paciente foram coletados dados demográficos referentes a nome, endereço, telefone, idade, data de nascimento, etnia, escolaridade, sexo e estado civil. Estes foram anotados em uma ficha padronizada para facilitar a análise de dados (Apêndice B). Um banco de dados foi elaborado para o cadastro dos pacientes, das informações coletadas, dos dados clínicos, periodontais e laboratoriais.

Os dados de relevância periodontal como tabagismo, uso de bebidas destiladas, uso atual de medicamentos, presença de doenças sistêmicas, sangramento gengival, respiração bucal, halitose, bruxismo e higiene dental foram colhidos através de um questionário de forma objetiva.

As informações clínicas relevantes como classificação da Hanseníase, números de lesões dermatológicas e tempo de evolução da doença foram colhidos a partir dos prontuários médicos.

### 3.4.2 Exame Periodontal

O exame periodontal foi realizado por um único profissional em todos os dentes presentes utilizando espelho bucal e sonda periodontal manual milimetrada modelo da Universidade Carolina do Norte (*Neumar*®, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 7). Todos os parâmetros foram obtidos em uma única sessão e anotados na ficha clínica.



Figura 7 – Sonda Periodontal Manual, modelo da Universidade Carolina do Norte (Neumar®, São Paulo, SP, Brasil). Aumento de 2X.

Os parâmetros clínicos avaliados foram a profundidade de sondagem, o nível de inserção clínica e recessão gengival, o índice gengival, o índice de sangramento gengival e o índice de placa.

#### 3.4.2.1 Profundidade de Sondagem (PS)

A profundidade de bolsa correspondeu à distância da margem gengival ao ponto mais apical do fundo do sulco/bolsa, medida com a sonda periodontal. A sondagem foi realizada com leve pressão, o mais paralelo possível ao eixo longitudinal do dente e em seis sítios de cada elemento, sendo três na face vestibular (distovestibular, médio-vestibular, mesiovestibular) e três na face lingual (distolingual, médio-lingual e mesiolingual).

#### 3.4.2.2 Nível de Inserção Clínica (NI) e Recessão Gengival (R)

O nível de inserção foi avaliado através da sondagem e considerado como a distância do ponto mais apical do fundo do sulco/bolsa à junção cimento-esmalte.

A recessão gengival correspondeu à distância da margem gengival até a junção cimento-esmalte.

### 3.4.2.3 Índice Gengival (IG)

O IG foi determinado utilizando os critérios de Løe (1967) que estabelece escores de 0 a 3 baseado no sangramento após a sondagem e sinais clínicos visíveis de inflamação como mudança de cor, edema, brilho, etc. (Quadro 4)

Quadro 4  
Índice Gengival

IG	Crítérios
Grau 0	Gengiva clinicamente saudável
Grau 1	Inflamação leve: ligeira alteração de cor, pouco edema, sem sangramento à sondagem
Grau 2	Inflamação moderada: edemaciada, brilhante, avermelhada ou azulada, e com sangramento à sondagem
Grau 3	Inflamação severa: rubro intenso, edema marcante, ulcerações da margem e tendência ao sangramento espontâneo

### 3.4.2.4 Índice de Placa (IP)

O índice utilizado foi o proposto por Silness e Løe (1964), no qual se efetua o isolamento relativo utilizando uma pinça clínica e rolos de algodão e seca-se a área com jatos suaves de ar. Com o auxílio de cotonetes, uma solução evidenciadora de placa (verde malaquita a 0,6% e álcool 70%) foi aplicada nas coroas dentais de todos os elementos. A seguir, o paciente enxáguou a boca duas vezes seguida e as faces dos dentes coradas foram anotadas na ficha clínica. Foram avaliadas as superfícies proximais (mesiais e distais) e as livres (vestibulares e linguais). Os escores foram somados e divididos por quatro, obtendo-se o índice de placa por dente. Ao somar os índices dos dentes e dividir pelo número de dentes examinados, o índice de placa para o paciente foi obtido de acordo com os seguintes critérios (Quadro 5):

## Quadro 5

### Índice de Placa

IP	Critérios
Grau 0	Ausência de placa na região gengival
Grau 1	Ausência de placa clinicamente visível, porém detectada com a sonda exploradora
Grau 2	Presença de placa, sendo o acúmulo moderado
Grau 3	Presença de placa abundante

A doença periodontal (DP) foi classificada em níveis segundo o índice WS (Sallum et al., 2001), de acordo com o grau de acometimento, sendo o mesmo adaptado para este estudo, da seguinte forma (Figura 8):

- Saúde Gengival (P0) – presença de sangramento gengival em apenas 25% dos sítios sondados;
- Periodontite leve (P1) - presença de pelo menos quatro dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica de até 3mm;
- Periodontite moderada (P2) - presença de pelo menos quatro dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica de 4 a 6mm;
- Periodontite avançada (P3) - presença de pelo menos três dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica de 7 a 9mm;
- Periodontite grave (P4) - presença de pelo menos três dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica maior que 10mm.

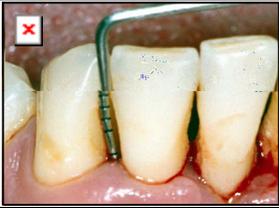
Saúde Gengival (P0)	
Periodontite leve (P1)	
Periodontite moderada (P2)	
Periodontite avançada (P3)	
Periodontite grave (P4)	

Figura 8 – Doença periodontal classificada segundo o índice WS

Para a avaliação da associação entre as condições periodontais e as outras variáveis deste estudo, e utilizando o critério de López (2002) que instituiu 3mm de perda de inserção como medida mínima para considerar doença, definiu-se “grupo A” composto pelos pacientes com diagnósticos P2, P3 e P4, e “grupo B”, aquele composto pelos pacientes com diagnóstico P0 e P1.

### 3.4.3 Coleta das amostras

#### 3.4.3.1 Coleta dos raspados intradérmicos

Os raspados intradérmicos foram coletados segundo rotina do serviço da instituição. O técnico responsável pela coleta realizou a anti-sepsia do local com álcool 70% e utilizou os dedos, indicador e polegar para fazer a isquemia da região a ser coletada. Posteriormente, foi realizado corte superficial com lâmina de bisturi descartável para extração do material. A coleta foi realizada em quatro regiões diferentes, conforme padronização da OMS, sendo distendida em uma mesma lâmina de microscopia em quatro esfregaços. A obtenção de material utilizado para a PCR foi realizada com uma pipeta (ponteiros com filtros descartáveis) diretamente da amostra contida na lâmina de bisturi (aproximadamente 10µl no total) sendo introduzida em um microtubo contendo 400 µl de soro fisiológico (Figura 9).

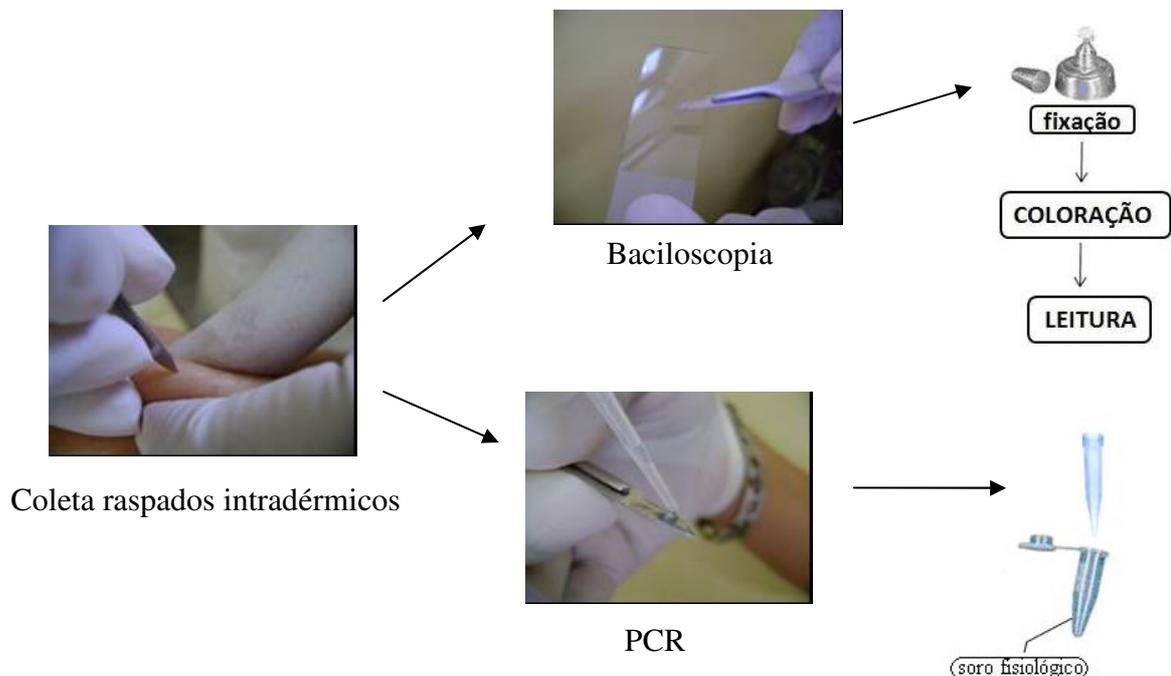


Figura 9 – Coleta do esfregaço cutâneo

### 3.4.3.2 Coleta da saliva

Para coleta da saliva os voluntários mastigaram um pedaço de aproximadamente 1 cm de um tubo de látex, número 203 (Auriflex, São Roque, SP), previamente esterilizado, para estimular a produção da mesma. A saliva produzida durante os primeiros 30 segundos foi deglutida, sendo subseqüentemente coletada por 5 minutos em recipientes plásticos descartáveis de 50ml. Com o auxílio de uma pipeta, 400 µl da saliva era coletada do copo e assepticamente transferida para um microtubo de 1,5 ml vazio. Uma gota da saliva era dispersa, com a própria pipeta, sobre a lâmina de microscopia para a realização da baciloscopia direta (Figura 10).

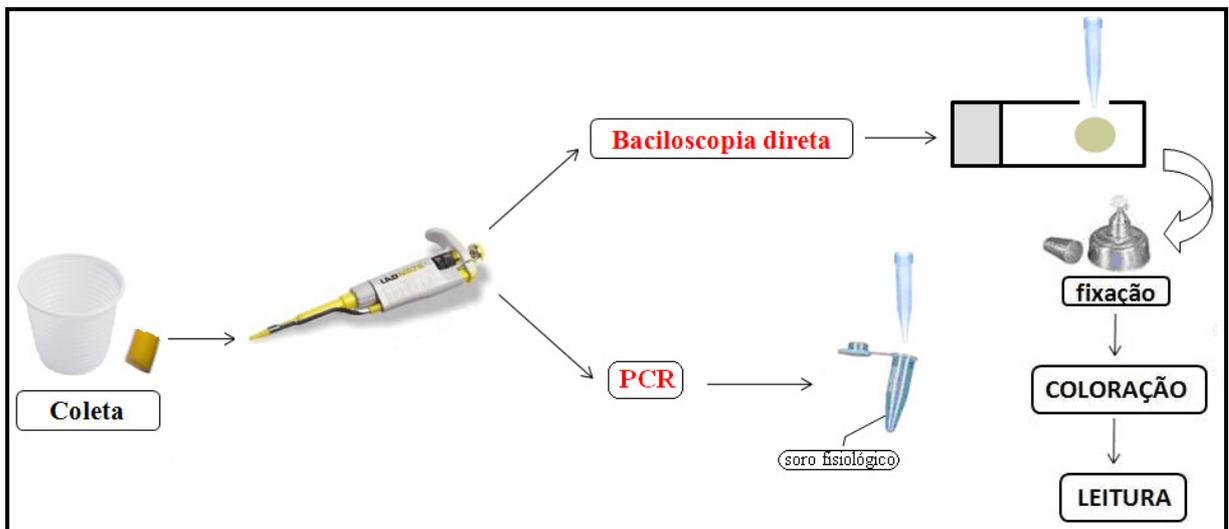


Figura 10 – Fluxograma da coleta das amostras da saliva

### 3.4.3.3 Coleta do periodonto

A obtenção das amostras foi realizada nos sulcos gengivais de todos os dentes presentes independente do comprometimento clínico de gengivite ou periodontite. Coletou-se exsudatos dos sulcos gengivais/ bolsas periodontais localizados na vestibular e lingual dos elementos

presentes utilizando curetas periodontais do tipo Gracey Mine-Five 5/6 (HU-FRIEDY). Foram realizadas duas coletas seqüenciadas para cada amostra sendo que a primeira era depositada em uma lâmina de microscopia para a realização da baciloscopia direta e, a segunda era inserida em um microtubo de 1,5 ml contendo 400 µl de soro fisiológico para PCR (Figura 11).

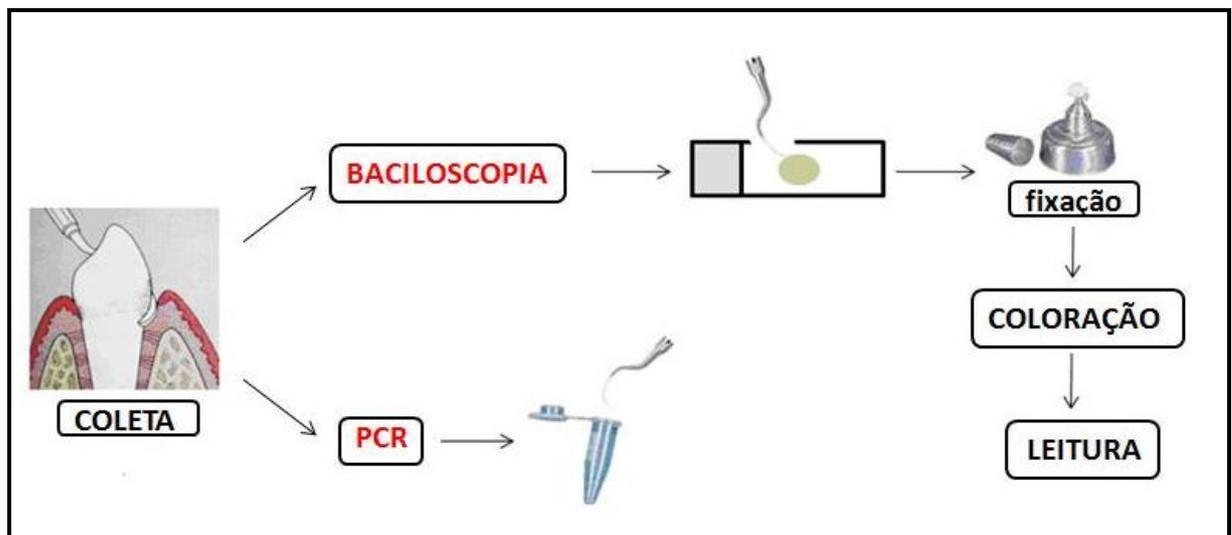


Figura 11 – Fluxograma da coleta de amostras do periodonto

#### 3.4.3.4 Conservação do material coletado

Após a realização das coletas os microtubos que continham as amostras foram acondicionados a -20°C até o momento da extração do DNA.

#### 3.4.3.5 Descontaminação e esterilização do material de coleta

A fim de evitar presença de DNA nas curetas periodontais utilizadas durante a coleta para a PCR, as mesmas eram primeiramente lavadas, esterilizadas em autoclave, deixadas no hipoclorito de sódio a 5% por 1 minuto e posteriormente deixadas na luz ultravioleta por 15

minutos. Foram realizados quatro PCRs de controle ao longo do período de coleta. A cada 15 pacientes, a ponta ativa das curetas, após passar por todas as etapas anteriormente citadas, eram mergulhadas em tubo de 1 ml contendo PCR mix e iniciadores para Beta-actina. O microtubo era levado ao termociclador e posteriormente a leitura realizada em gel de agarose a 1,5%.

Os copos descartáveis utilizados na coleta da saliva também tiveram o controle realizado pela PCR para o lote de copo utilizado. Três copos selecionados aleatoriamente foram lavados com soro fisiológico, realizadas as extrações do DNA e feita as PCRs.

O tubo de látex utilizado na coleta da saliva foi esterelizado, cortado, deixado no hipoclorito de sódio a 5% por 1 minuto, lavados em água mill-Q e deixados na luz ultravioleta por 15 minutos. O controle foi realizado juntamente com os copos descartáveis.

### 3.4.4 Procedimento molecular – PCR

#### 3.4.4.1 Identificação dos microtubos de coleta

Os microtubos com 400µl de soro contendo as amostras foram identificados através de um número para cada paciente. Para um único paciente eram utilizados três microtubos com o mesmo número seguido da letra correspondente ao local da coleta. Para a coleta dos raspados intradérmicos o número era seguido de R, da saliva S e do periodonto P (Figura 12).

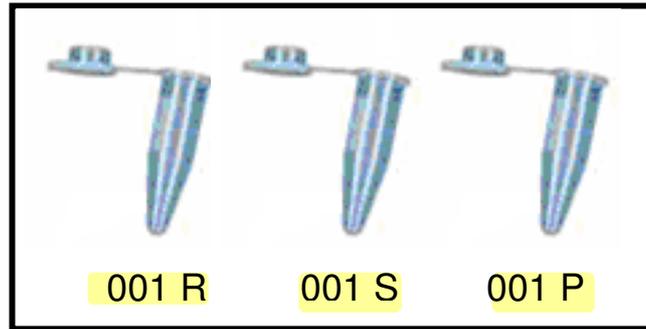


Figura 12 – Identificação dos microtubos de coleta

#### 3.4.4.2 Extração do DNA

Metade da amostra coletada, ou seja, 200 $\mu$ l era transferido para outro tubo de 1,5ml e congelado para eventuais necessidades. Os 200 $\mu$ l restante eram digeridos com proteinase K como descrito por Stefani et al. (2003) com modificações. Eram incubadas por 48 horas a 60°C com 7,5 $\mu$ l de proteinase K (300 $\mu$ g/ml) em 42,5 $\mu$ l de tampão de amostra contendo 100 mmol/l de Tris-HCl (pH 7.4), 150 de mmol/l NaCl e 10 mmol/l de EDTA (pH 8.0)

A extração do DNA seguiu o método de fenol-clorofórmio com o seguinte protocolo (Figura 13):

- a) Três microtubos de 1,5 ml eram identificados com as mesmas especificações que o microtubo contendo a coleta em 400  $\mu$ l de soro fisiológico e denominados A, B e C respectivamente;
- b) No microtubo A era inserido 200  $\mu$ l da amostra e o restante retornava para o freezer;
- c) A amostra do microtubo A era então digerida com 7,5  $\mu$ l de proteinase K (300  $\mu$ g/ml) em 42,5  $\mu$ l de tampão de reação (100 m $\mu$ l/l de Tris-HCl (pH 7,4); 150 m $\mu$ l/l de NaCl e 10 mmol/l EDTA (pH8,0) ) por 48 horas a 60° C;

- d) Posteriormente, 200 µl de fenol-clorofórmio (Invitrogen - 800205) foram adicionados, agitado manualmente por 10 segundos e centrifugado por 15 minutos a 13.000g a 4°C;
- e) O sobrenadante foi transferido para o microtubo B sendo o microtubo A contendo a fase fenólica (inferior) descartado em descartex;
- f) No tubo B contendo o sobrenadante era adicionado 200 µl de clorofórmio PA (Nuclear - 07101555), agitado por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos a 13.000g a 4°C;
- g) O sobrenadante era transferido para o microtubo C sendo o microtubo B a descartado com a fase inferior (clorofórmio), sendo um volume de aproximadamente 200 µl recuperado;
- h) 500 µl de isopropanol P.A. (Vetec - 014047) foi adicionado ao sobrenadante e incubado por 1 hora na temperatura de -20°C para precipitação do DNA;
- i) Após a incubação, o microtubo era centrifugado por 15 minutos a 13.000g a 4°C e o sobrenadante era cuidadosamente removido;
- j) 500 µl de etanol 70% (Nuclear - 311620) gelado era inserido e centrifugado por 5 minutos a 13.000g a 4°C e retirando o sobrenadante. Essa etapa era repetida mais uma vez para efetivar a remoção das impurezas restantes;
- k) Os microtubos eram deixados abertos na cabine de segurança biológica sob po fluxo de ar durante 5 minutos;
- l) 200 µl de destilada livre de nucleases (lote 486/2002) era utilizado para ressuspender o precipitado que era estocado em ar refrigerado a -20° C.

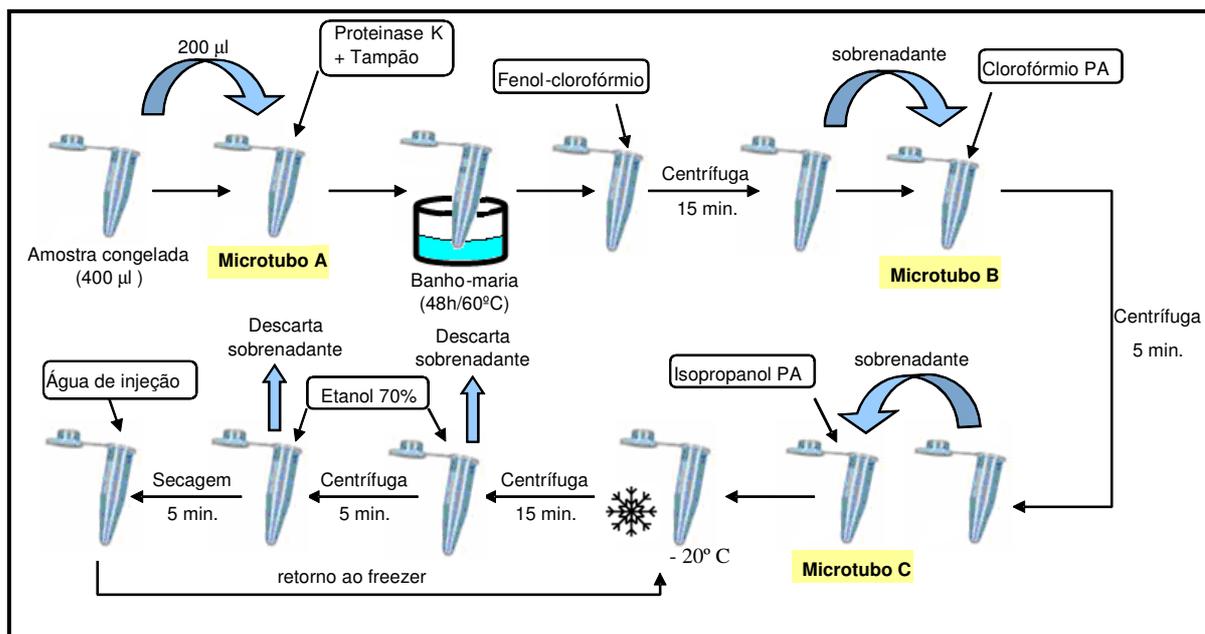


Figura 13 – Fluxograma de Extração do DNA

#### 3.4.4.3 Reação de PCR

Os microtubos de 0,2 ml eram numerados de acordo com cada amostra a ser amplificada sendo inserido (Quadro 6):

- 2 µl de primer mix de Beta-actina [5 µM] (Invitrogen – 5055452/851G09) que amplificam a região entre as posições 342-361 (senso, 5`-TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG-3`) e 736-754 (antisenso, 5`-CAT CTC TTG CTC GAA GTC C-3`) do gene constitutivo humano, produzindo um amplicon de 413 pb (LIN et al., 1999);

- 2 µl de primer mix do 85 A-C [5 µM] (Invitrogen – 5037916) que amplificam a região intergênica do *M. leprae* entre as posições entre os genes *fbpA* e *fbpC* (senso, 5`-ATA CTG TTC ACG CAG CAT CG-3` e antisenso, 5`- GTT GAA GGC ATC AAG CAG GT-3`), gerando uma banda de 250 pb (RINKE et al., 1993);

- 23 µl de Platinum PCR Supermix (Invitrogen - 11306-161) que contém Anti-Taq DNA Polymerase, magnésio, dNTPs e Taq DNA polymerase;

- 3 µl de amostra extraída (microtubo C).

#### Quadro 6

##### Reação PCR

ITEM	QUANTIDADE (µl)
Primes Beta-actina [5 µM]	2
Primers de 85 A-C [5 µM]	2
Platinum PCR Supermix	23
Amostra	3
Volume reação final	30

Os primers e o PCR mix eram adicionados em uma cabine de segurança biológica enquanto que as amostras eram posteriormente inseridas em outra cabine para não haver contaminação.

#### 3.4.4.4 Controles positivo e negativo

Para cada grupo de reações de PCR realizadas um controle branco (non-template) e um positivo eram feitos. O controle branco continha apenas os primers e PCR mix e o controle positivo foi feito com uma amostra de linfa extraída de um paciente multibacilar que teve seu resultado positivo para *M. leprae* em PCR.

#### 3.4.4.5 Amplificação por PCR

O programa de amplificação para o 85 A-C utilizado foi baseado no trabalho de Martinez et al. (2006) com algumas modificações e associado ao programa da beta-actina (Quadro 7):

## Quadro 7

### Programa de amplificação do PCR

Amplificação			
Etapas	Repetições	Temperatura	Tempo
Incubação Inicial	1X	94°C	3'
Ciclo 1	10 X	94°C	30''
		60°C	45''
		72°C	30''
Ciclo 2	35 X	94°C	30''
		56°C	45''
		72°C	30''
Extensão final	1 X	72°C	7'
Incubação Final	∞	4°C	∞

#### 3.4.4.6 Eletroforese em gel de agarose

A leitura dos resultados foi realizada de acordo com a presença ou ausência de amplicons visualizadas em forma de bandas em gel de agarose a 1,5% no tamanho referente as bandas de Beta-actina e do *M. leprae* comparadas a um padrão de peso molecular de 100pb.

O gel de agarose era preparado para uma cuba de eletroforese da marca *Loccus* (LCH 7 X 8) onde 0,76g de agarose (Invitrogen - 15510-019) era pesado em uma balança (*Mettler Toledo* AB 204) e colocada em um erlenmeyer contendo 50 ml de TAE 1X (GIBCO - 24710-030). A mistura era aquecida em microondas por 32 segundos, resfriado em água corrente e 5 µl de Syber Safe (Invitrogen - 503089) era acrescido com uma pipeta. Posteriormente, vertia-se no suporte do gel onde os pentes com espessura de 1 mm encontravam-se posicionados, esperava-se a geleificação em temperatura ambiente e os pentes eram removidos. O suporte

era posicionado na cuba de eletroforese e adicionado 230 ml do tampão TAE 1X até cobrir o gel.

A aplicação no gel de agarose foi feita em uma cuba de eletroforese e a quantidade de poços variava conforme a quantidade de amplicons a serem aplicados. Foi feita da seguinte forma:

- a) Cortava-se um pedaço de parafilm e colocavam-se, com o auxílio de pipeta, alíquotas de 3  $\mu$ l de tampão de amostra contendo xileno 2,5% (Usb – 23513), glicerol (Invitrogen - 15514-011) e TAE 1X, correspondentes ao número de amplicons a serem aplicados mais dois padrões de peso molecular para cada pente;
- b) 8  $\mu$ l de amplicon era adicionado para cada alíquota do tampão e 1  $\mu$ l do padrão de peso molecular era utilizado em uma das alíquotas;
- c) A mistura era transferida com a pipeta para cada um dos poços do gel de agarose assim como o padrão de 100 pb (Invitrogen - 15628-019).

A visualização das bandas era feita em transluminador de luz azul da *Invitrogen* (Safe Imager<sup>TM</sup>). Quando as bandas ficavam muito claras, o gel era corado em solução de 50 ml de TAE 1X e 5  $\mu$ l de syber safe por 10 minutos em agitador orbital em 100rpm.

### 3.4.5 Procedimentos bacteriológicos

#### 3.4.5.1 Baciloscopia

A baciloscopia foi realizada conforme estipulado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), onde:

- a) As lâminas de coleta foram limpas e desengorduradas com álcool 70% e identificadas com o número de registro do paciente na extremidade esmerilhada.

- b) O exsudato coletado do periodonto foi depositado na superfície de uma lâmina de microscopia previamente identificada com o auxílio da própria cureta em movimentos circulares, até a obtenção de uma película fina e uniforme. A saliva foi depositada com a própria ponteira utilizada na coleta (Figura 14).

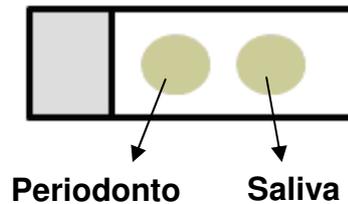


Figura 14 – Esquema de distribuição dos esfregaços na lâmina de microscopia

- c) A lâmina contendo os esfregaços foi deixada em temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos para secagem e posteriormente passada em chama de lamparina por três vezes para a fixação da amostra coletada.
- d) Um porta-lâminas foi utilizado para o transporte ao laboratório de baciloscopia da FUAM onde foi realizada a coloração e a leitura baciloscópica.

#### 3.4.5.2 Coloração e leitura baciloscópica

O método de coloração Kinyoun foi realizado conforme recomendado por David et al. (1989), por seu corante ser mais concentrado e não necessitar de aquecimento, aumentando a segurança da técnica e diminuindo o tempo laboratorial.

A técnica abrange três etapas:

- a) Coloração: as lâminas foram colocadas em suporte adequado e em suas superfícies foi adicionada fucsina fenicada, previamente filtrada, e deixadas em repouso por 5 minutos. Após

esse período, o excesso de fucsina foi eliminado e as lâminas foram cuidadosamente lavadas com jato de água de baixa pressão. Assim, os bacilos ficam corados em vermelho.

c) Descoramento: recolocadas no suporte adequado, em suas superfícies foi adicionado solução álcool-ácida com tempo de permanência de 3 minutos. A solução álcool-ácida foi vertida sob um jato de água de baixa pressão e lavagens rápidas com nova solução álcool-ácida, caso permanecesse resíduos de fucsina sobre o esfregaço;

d) Coloração de fundo: para os bacilos tornarem-se mais visíveis no microscópio óptico, é necessário realizar uma coloração de todos os outros componentes que fazem parte do esfregaço. Assim, foi adicionada solução de azul de metileno por 3 minutos. Após esse período, o excesso de azul de metileno foi eliminado e as lâminas lavadas, cuidadosamente, com jato d'água de baixa pressão. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente até secagens completa e posteriormente submetidas à leitura microscópica (Figura 15).

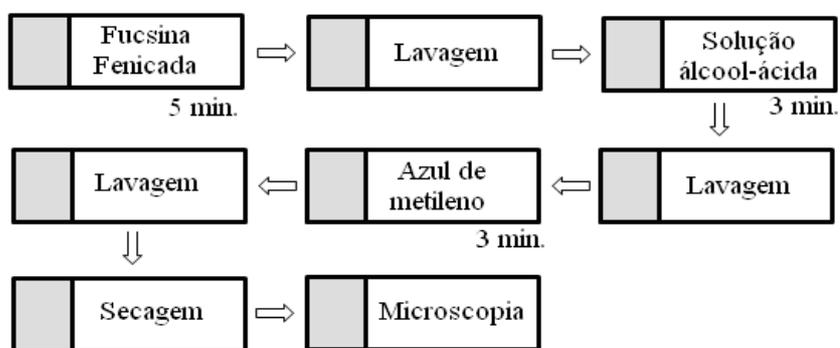


Figura 15 – Técnica de coloração Kinyoun

A leitura foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão, com aumento de 1.000 x. Na interpretação dos resultados das amostras foi utilizada o índice bacteriológico (IB), que varia de 0 a 6+ dependendo do número de bacilos visualizados em cada campo microscópico examinado (Quadro 3).

### **3.5 Análise Estatística**

Os dados foram analisados empregando análise bidimensional das variáveis qualitativas. Adotou-se tabelas de contingência de duas e três entradas, testes de hipóteses para a verificar as proporções estimadas, mais precisamente, o Teste Exato de Fisher, para a analisar as associações entre pares das variáveis de interesse.

As variáveis foram categorizadas e posteriormente submetidas a uma análise computacional (MINITAB versão 14, R versão 2.7.2), “Cross Tabulation” e comandos específicos do software R.

A interpretação das comparações de categorias com a variável de interesse foi empregado as de chances de ocorrência, levando em consideração a categoria com o sucesso e fracasso da variável de interesse. Para a interpretação da positividade de uma variável em relação à outra, foi utilizada a probabilidade global de acerto, baseado nas probabilidades condicionais.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, 57 casos suspeitos de hanseníase foram encaminhados para a coleta do raspado intradérmico. Sendo que dois foram prontamente excluídos por possuírem idade inferior a 18 anos e um por ser edentado total, restando 54 pacientes.

Realizou-se um estudo duplo-cego, ou seja, as análises laboratoriais de PCR e baciloscopia foram realizadas sem o conhecimento prévio dos resultados dos exames laboratoriais de rotina da instituição. Após os resultados laboratoriais dos raspados intradérmicos e/ou biópsia, mais seis pacientes foram excluídos da pesquisa por possuírem outros diagnósticos restando, portanto, 48 casos para a análise estatística. Destes pacientes excluídos, três foram encaminhados para o neurologista, um para o reumatologista, um teve diagnóstico de Policondrite Recidivante e outro de Farmacodermia.

Dos 48 pacientes examinados que tiveram o diagnóstico conclusivo para hanseníase, 32 eram do sexo masculino (66,7%) enquanto que 16 (33,3%) pertenciam ao sexo feminino. Os resultados indicaram predominância de manifestação no sexo masculino em relação ao feminino, numa proporção semelhante aos resultados obtidos por Fonseca et al. (1983) que constataram, no estado do Maranhão, uma proporção de 70% dos casos. Já Carvalho et al. (1995) encontraram um discreto predomínio do sexo masculino de 50,5% no estado de Minas Gerais, semelhante ao encontrado no estado de São Paulo que foi de 52% (SÃO PAULO, 1992).

A idade dos indivíduos variou entre 18 e 65 anos, sendo que a idade média foi de 39,12 anos. Houve predomínio de pacientes na faixa etária entre 18-30 anos, sendo de 15 casos, seguido dos pacientes maiores que 50 anos com 12 casos, de 41-50 com 11 casos e de

31-40 com 10 casos. No Rio de Janeiro Serruya (1981) realizou um estudo epidemiológico onde predominou a faixa etária de 20-29 anos, semelhante aos resultados aqui encontrados. Carvalho et al. (1995) observou que a média da idade dos pacientes estava em torno dos 40 anos, portanto a pacientes mais velhos que os verificados neste trabalho.

Quanto à procedência, Quanto à procedência, houveram pacientes de dois estados brasileiros, 42 (87,5%) oriundos do Amazonas, sendo 23 (47,93%) de Manaus e 19 (39,57%) do interior do Estado. Seis oriundos do Pará, sendo 1 (2,08%) de Belém e 5 (10,42%) do interior do Estado.

Quanto ao estado civil, 29 (60,42%) eram casados, 17 (35,42%) solteiros e 2 (4,17%) viúvos. Com relação à raça, 13 (27,08%) eram branca, 1 (2,08%) mulata, 1 (2,08%) negra e 33 (68,75%) parda. Quando questionado o grau de escolaridade, 2 (4,17%) disseram ser analfabetos, 29 (60,42%) possuíam até o ensino fundamental, 16 (33,33%) ensino médio e 1 (2,08%) ensino superior.

Em relação ao etilismo, dos 48 pacientes entrevistados, apenas 5 (10,4%) indivíduos relataram consumir ou ter consumido álcool. Em relação ao tabaco, 28 (58,33%) não fumavam, 7 (14,58%) fumavam e 13 (27,08%) pararam de fumar.

Quando questionados quanto à escovação dental, 11 (22,92%) declararam escovar uma vez ao dia, 15 (31,25%) duas vezes ao dia, 17 (35,42%) três vezes e 5 (10,42%) paciente quatro vezes ao dia. Apenas um paciente já havia feito tratamento periodontal, porém fazia quatro anos que o mesmo tinha sido realizado não interferindo nos nossos resultados.

Para a avaliação periodontal, optou-se pelo registro de todos os dentes porque segundo Ronderos et al. (2001), o uso de registros de apenas alguns dentes (sistema de marcação parcial) para avaliar o estado periodontal pode ser uma limitação dos estudos epidemiológicos e deve ser avaliado com cautela. Os exames de boca toda fornecem melhores meios para avaliar de forma precisa a prevalência e a severidade da doença periodontal em uma

população (LINDHE; KARRING, 1999). Baseando neste princípio optou-se por examinar a boca toda, uma vez que os exames parciais podem subestimar a extensão dos danos causados pela doença periodontal ao periodonto. Os únicos inconvenientes do estudo mais detalhado são o grau de dificuldade para sua realização e a dificuldade de comparação com estudos de metodologia menos meticulosa, ou seja, que analisam apenas alguns dentes ou sítios da cavidade bucal.

Dos 48 pacientes atendidos 20 (41,67%) foram classificadas como P0 e P1 (Grupo B) e as demais 28 tiveram a classificação de P2 a P4 (Grupo A), o que corresponde a uma prevalência global de DP de moderada a grave de 58,33% nessa população (Tabela 1).

Tabela 1

Distribuição dos pacientes pelas categorias de doença periodontal baseada na classificação WS

<b>Categoria</b>	<b>Quantidade</b>	<b>%</b>	<b>Classificação</b>
0	18	37,5	B (41,67%)
1	2	4,17	
2	11	22,92	A (58,33%)
3	9	18,75	
4	8	16,67	
<b>Total</b>	48	100	

Estudos têm relatado a presença de doença periodontal em 60% dos pacientes com hanseníase (REICHART, 1976; MÖLLER-CHRISTENSEN et al., 1952). Estes resultados se aproximam muito dos encontrados no presente trabalho.

Quando as variáveis idade, sexo, raça e escolaridade foram relacionadas à doença periodontal (DP), apenas a idade e a escolaridade foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

Embora a literatura descreva uma relação direta entre o consumo de tabaco/álcool e a presença da DP, esta relação não foi estatisticamente significativa neste trabalho.

As variáveis pesquisadas referentes à higiene bucal (quantidade de escovações diárias, halitose, presença de sangramento durante a escovação, uso de fio dental e uso de enxaguatórios bucais) quando relacionadas à presença de DP, apenas o sangramento, o hálito, o uso de fio dental e o número de escovações diárias mostraram-se estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). O fato de o paciente ranger os dentes a noite ou ser respirador bucal não mostrou qualquer relevância estatística. Podemos visualizar na tabela 2 todas as variáveis periodontais relacionadas com a classificação periodontal.

Tabela 2

Relação das variáveis periodontais e a classificação periodontal

Variável	Categoria	Classificação Periodontal				Total	p*
		Grupo A	%	Grupo B	%		
Idade do Indivíduo	Até 24 anos	3	6	12	25	15	0,002
	De 25 à 38 anos	8	17	2	4	10	
	De 39 à 47 anos	7	15	4	8	11	
	De 50 à 78 anos	10	21	2	4	12	
Sexo	Feminino	8	17	8	17	16	0,537
	Masculino	20	42	12	25	32	
Raça	Branca	6	13	7	15	13	0,431
	Parda	20	42	13	27	33	
	Negra	2	4	0	0	2	
Escolaridade	Fundamental	18	38	11	23	29	0,0314
	Médio	8	17	8	17	16	
	Analfabeto	2	4	0	0	2	
	Superior	0	0	1	2	1	
Consumo de Tabaco	Não	16	33	12	25	28	0,999
	Sim	8	17	5	10	13	
	Parou	4	8	3	6	7	
Consumo de Bebida Alcoólica	Não	25	52	18	38	43	0,440
	Sim	3	6	1	2	4	
	Parou	0	0	1	2	1	
Uso de Drogas	Não	27	56	20	42	47	0,999
	Sim	1	2	0	0	1	
Uso de medicamentos atual	Não	22	46	17	35	39	0,716
	Sim	6	13	3	6	9	
Possui alguma doença sistêmica	Não	21	44	15	31	36	0,999
	Sim	7	15	5	10	12	
Presença de Sangramento Gengival	Não	0	0	11	23	11	< 0,001
	Sim	19	39	2	4	21	

	Às vezes	9	21	7	15	16	
Presença de mau hálito	Não	10	21	18	38	28	< 0,001
	Sim	18	38	2	4	20	
Respirador bucal	Não	18	38	13	27	31	0,673
	Sim	10	21	7	15	17	
Quantidade Escovação Diária	Uma vez	8	17	3	6	11	0,008
	Duas vezes	12	25	3	6	15	
	Três vezes	8	17	9	19	17	
	Quatro vezes	0	0	5	10	5	
Uso do fio dental	Não	19	40	12	25	31	0,021
	Sim	2	4	8	17	10	
	Às vezes	5	10	2	4	7	
Faz uso de colutórios	Não	26	54	15	31	41	0,112
	Sim	0	0	0	0	0	
	Às vezes	2	4	5	10	7	
Range os dentes à noite	Não	16	33	15	31	31	0,474
	Sim	9	19	4	8	13	
	Às vezes	3	6	1	2	4	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

Do ponto de vista da estatística e utilizando um valor de probabilidade de significância de 5%, verificou-se uma relação direta entre o sangramento gengival à sondagem e presença de placa dental com a classificação da doença do periodonto ( $p < 0,001$ ).

Com relação ao PCR, todos os 15 pacientes multibacilares apresentaram PCR positivo nos raspados intradérmicos, porém, destes, apenas dois apresentaram positividade também no periodonto e outros dois também na saliva. Dos 33 pacientes paucibacilares, 16 (48,5%) apresentaram positividade nos raspados intradérmicos, sendo que destes, 10 apresentaram positividade apenas nos raspados, 2 apresentaram também na saliva, 2 apresentaram também no periodonto e 2 apresentaram na saliva e no periodonto (Tabela 3).

Tabela 3

Resultados da PCR em relação à Classificação Operacional da hanseníase

Variável	Categoria	Classificação Hanseníase		Total	p (*)
		MB	PB		
PCR dos raspados intradérmicos	Negativa	0	17	17	< 0,001
	Positiva	15	16	31	
PCR da Saliva	Negativa	13	25	38	0,472
	Positiva	2	8	10	
PCR do Periodonto	Negativa	13	23	36	0,292
	Positiva	2	10	12	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

Um dado interessante encontrado é que a positividade da PCR para *M. leprae* nas amostras do periodonto e da saliva foi bem maior nos pacientes paucibacilares do que nos multibacilares fato este não esclarecido.

O resultado de positividade dos pacientes paucibacilares para *M. leprae* nos raspados intradérmicos pela técnica da PCR parece baixo, porém, é muito alta quando relacionados com a baciloscopia que é sempre negativa para estes pacientes. Na literatura, pode-se verificar dados muitos parecidos com os aqui encontrados sendo justificados pela pequena quantidade de DNA do *M. leprae* nos pacientes paucibacilares que acaba sendo inibido pela presença de grande quantidade de DNA humano nas amostras (MARTINEZ et al., 2006). Outra justificativa seria a dificuldade de extração de DNA do *M. leprae*, principalmente em função da dificuldade em romper a parede bacteriana. Por essa razão obtivemos melhores resultados quando aumentamos o tempo de digestão com a proteínase K para 48 horas, ao invés das 16 horas (*overnight*) inicialmente testadas (dados não mostrados). A confiabilidade da PCR com finalidade diagnóstica está diretamente relacionada com amostras contendo DNA quantitativa e qualitativamente preservadas e de bacilos potencialmente viáveis conforme sugere De Wit et al. (1993).

É interessante observar que embora a hanseníase tenha uma existência milenar, permanece um verdadeiro desafio a obtenção de um diagnóstico clínico e laboratorial. Ao mesmo tempo em que a tecnologia avança, buscam-se métodos diagnósticos mais sensíveis, precoces e específicos para a instituição da terapêutica adequada. Neste aspecto, as técnicas da Biologia Molecular têm contribuído significativamente permitindo aos pesquisada identificação da etiologia das doenças com grande sensibilidade e em menor espaço de tempo. No entanto, os custos laboratoriais e os equipamentos necessários para a realização das reações ainda são visto como um grande empecilho para consolidar este método como padrão de diagnóstico. No presente trabalho, o preço de cada reação de PCR foi de R\$ 5,30 mostrando que é um método de custo acessível quando relacionado com a exatidão e o tempo do resultado, principalmente em se tratando dos pacientes paucibacilares.

Outro fato importante é também tivemos 4 pacientes paucibacilares que foram negativos nos raspados intradérmicos porém positivos no periodonto e na saliva, 1 paciente positivo apenas na saliva e 2 positivos apenas no periodonto. Este fato é interessante porque a positividade da PCR para o diagnóstico do *M. leprae* nos pacientes paucibacilares pode ser aumentada coletando os raspados, periodonto e saliva e inserindo numa mesma reação. Neste caso o número de positividade de diagnóstico pela técnica da PCR aumentaria de 16 (48,5%) pacientes para 23 (69,7%).

Também foi verificada uma relação direta entre a positividade da saliva e do periodonto para as reações de PCR. Seis pacientes apresentaram ambos os PCRs de periodonto e saliva positivos. Todas as amostras negativas para o PCR de *M. leprae*, apresentaram resultados positivos para beta-actina confirmando a efetividade na extração do DNA (Tabela 4).

Tabela 4

Relação entre as PCR's do periodonto e saliva

PCR periodonto	Total Geral		PCR saliva				p*
			Negativa		Positiva		
	n	%	n	%	n	%	
NEGATIVA	36	75	32	66,7	4	8,3	0,009235
POSITIVA	12	25	6	12,5	6	12,5	
Total	48	100	38	79,2	10	20,8	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

Quando correlacionados os dados clínicos da hanseníase com a doença periodontal, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabela 5).

Tabela 5

Relação da Hanseníase com a classificação periodontal

Hanseníase	Categoria	Classificação Periodontal		Total	p*
		Grupo A	Grupo B		
Classificação Ridley e Jopling	Indeterminada	4	4	8	0,391
	Tuberculóide	7	3	10	
	Dimorfo	10	11	21	
	Virchowiana	7	2	9	
Classificação Operacional	PB	20	13	33	0,755
	MB	8	7	15	
Tempo de evolução	2 - 6 meses	9	5	14	0,581
	7 - 24 meses	12	9	21	
	25 - 36 meses	2	4	6	
	> 36 meses	5	2	7	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

Na literatura, desde 1970, existem relatos mostrando uma relação direta entre a doença periodontal e a hanseníase (MIRANDA, 1970). Brasil et al. em 1973 afirmou que as alterações que a Hanseníase pode apresentar na cavidade bucal tem relação direta com a forma da doença e seu tempo de evolução, sendo que este fato não foi comprovado no

presente estudo. Também não foi verificada nenhuma relação estatisticamente significativa entre o número de lesões dermatológicas clinicamente visíveis e a doença periodontal

Scollard e Skinsnes (1999) diagnosticaram perda óssea periodontal e gengivite nestes pacientes, porém não encontraram uma explicação clara para este fato. Segundo Brand (1959) essas modificações podem ser decorrentes de mudanças reativas do osso, efeitos da inflamação crônica, infiltrado inflamatório de neutrófilos e a redução da temperatura local. Poder-se-ia depreender que as dificuldades decorrentes da deformidade de mão em garra teriam algum reflexo na higiene bucal adequada e, daí, influenciar uma possível maior prevalência de doença periodontal, mas esta correlação não pôde ser verificada já que não houve nenhum caso deste no presente trabalho.

Um fato interessante é que ambas as doenças têm suas apresentações clínicas relacionadas com padrões imunológicos distintos, variando a resposta imune mediada por células à presença dos agentes etiológicos. Porém, não há descrito na literatura que o *M. leprae* pode atuar na etiologia da doença periodontal, embora, sua presença no sulco gengival tenha sido detectada neste trabalho mostrando que essa relação pode ser verdadeira. Neste caso, talvez o início da poliquimioterapia para hanseníase seja suficiente para regressão da doença periodontal.

Estatisticamente não foi verificada uma relação direta entre a doença periodontal e a presença do *M. leprae* no exsudato do sulco gengival ou na saliva. Dos 12 pacientes que obtiveram PCR positivos para o *M. leprae* no periodonto, 5 estavam incluídos no grupo B de doença periodontal enquanto que o restante foi incluído no grupo A. Entre os 10 pacientes que apresentaram PCR positivo para a saliva, 4 pertenciam ao grupo B e os outros 6 ao grupo A (Tabela 6).

Tabela 6

Relação da presença do *M. leprae* e a classificação periodontal

<i>M. leprae</i>	Categoria	Classificação Periodontal		Total	p*
		Grupo A	Grupo B		
PCR dos raspados intradérmicos	Negativa	9	8	17	0,760
	Positiva	19	12	31	
PCR da Saliva	Negativa	22	16	38	0,999
	Positiva	6	4	10	
PCR do Periodonto	Negativa	21	15	36	0,999
	Positiva	7	5	12	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

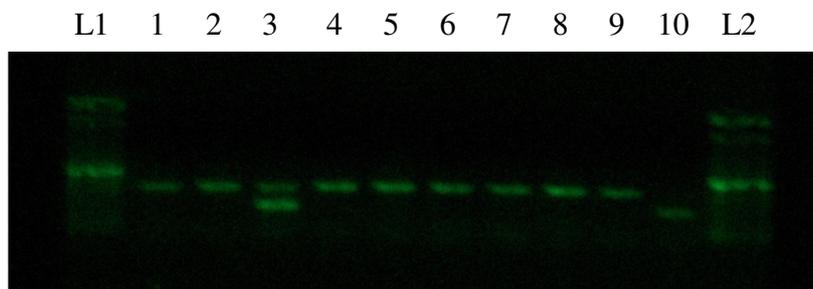
Embora não tenhamos conseguido relacionar a DP com a presença do *M. leprae*, novos estudos devem ser realizados para verificar essa associação.

Em relação a técnica da PCR utilizada, no laboratório de Biologia Molecular da FUAM havia dois tipos de iniciadores de controle humano: beta-actina (amplicon com 413pb) e GAPDH (amplicon com 226pb). Optou-se pela utilização do beta-actina como controle das reações por este apresentar amplicons de 413pb que é bem distinto do amplicon de 250pb formado pelo 85 A-C.

Durante o preparo das reações de PCR, também testou-se acrescentar glicerol e DMSO para verificar se ocorria melhora na visualização dos amplicons porém, essa melhora não foi observada, optando-se, portanto, a não utilização dos mesmos nas reações.

Antes de iniciar a coleta das amostras clínicas, foram desenvolvidos vários protocolos para que em uma única reação de PCR obtivesse a amplificação da região intergênica 85 A-C e do gene da beta-actina humano. Esse fato diminuiria as quantidades de reações que seriam realizadas, o tempo laboratorial e os custos. Para isso, foi utilizada uma amostra de esfregaço cutâneo de um paciente com diagnóstico clínico e laboratorial de 6+ da forma multibacilar da doença. Adaptou-se o tempo e número de ciclos da termociclagem do beta-actina com o do 85

A-C de modo que pudesse visualizar os dois amplicons num mesmo poço formando duas bandas bem distintas e separadas em seus respectivos tamanhos (Figura 16).



L1, L2- ladder 100pb; 1,2,4,5,6,7,8 - Beta-actina; 3- Beta-actina e *M. leprae*; 10- controle positivo

Figura 16 – Amostras de linfa de pacientes paucibacilares em gel de agarose.

Com modificações no protocolo originalmente descrito por Martinez et al. (2006), incluindo 10 ciclos de PCR com temperatura de hibridização mais estrigente (60°C) seguido de 35 ciclos a 55°C, conseguimos incluir na mesma PCR a detecção de um controle endógeno (beta-actina). Isto aumentou a confiabilidade do teste por minimizar a possibilidade de resultados falso-negativos devidos a inibição da PCR.

Testaram-se três protocolos de extração de DNA: com fenol-clorofórmio, com Isotiocianato de guanidina + fenol-clorofórmio (GTC) e com proteinase K. A proteinase K mostrou um melhor resultado e foi testada para os tempos 12 horas, 24 horas e 48 horas. Assim, verificou-se que o maior tempo foi mais eficiente na obtenção de uma maior positividade nos resultados da PCR.

Com relação à baciloscopia e o PCR dos raspados intradérmicos, pode-se verificar que o PCR é um método muito mais eficaz no diagnóstico das formas paucibacilares, porém, não é necessário para o diagnóstico das formas multibacilares já que todas tiveram o seu resultado conclusivo na baciloscopia (Tabela 7).

Tabela 7

Relação entre a classificação da hanseníase, a baciloscopia, a PCR e a biópsia

Variável	Categoria	Classificação Hanseníase		Total	p (*)
		MB	PB		
PCR dos raspados intradérmicos	Negativa	0	17	17	< 0,001
	Positiva	15	16	31	
Baciloscopia	Negativa	0	33	33	< 0,001
	Positiva	15	0	15	
Biópsia	Não	15	20	35	< 0,001
	Sim	0	13	13	

(\*) probabilidade de significância para o teste exato de Fisher

O encaminhamento para a realização da biópsia é feita para o fechamento do diagnóstico, porém, este também pode ser conclusivo apenas clinicamente. Por isso, apenas 13 dos 33 pacientes paucibacilares que tiveram a baciloscopia negativa foram encaminhados para realização da mesma. O interessante é verificar que a conclusão do diagnóstico de quatro dos 13 encaminhados para a biópsia poderia ter sido realizada pela PCR sem ter que esperar de 30 a 40 dias para a obtenção do resultado.

Todas as amostras colhidas do periodonto e da saliva para realização do esfregaço tiveram o resultado negativo, não sendo visualizado nenhum bacilo por campo examinado. Moreira et al. (2006) realizaram um trabalho de pesquisa do *M. leprae* em raspados da conjuntiva ocular pelo método da baciloscopia e verificaram uma sensibilidade de 65,4% e especificidade de 96,2% por através desse método. Essa técnica, porém, não se mostrou efetiva para pesquisa de bacilos de hansen em periodonto e saliva.

## 5. CONCLUSÕES

- 5.1** A doença periodontal nos pacientes com hanseníase teve uma prevalência de moderada a grave, porém, não foi estabelecida uma relação direta entre o grau de envolvimento periodontal e a forma da hanseníase ou seu tempo de evolução;
- 5.2** Não foi verificada uma relação direta entre a doença periodontal e a presença do *M. leprae* no exsudato do sulco gengival ou na saliva;
- 5.3** A PCR dos raspados intradérmicos é um método muito mais eficaz no diagnóstico das formas paucibacilares, porém, não é necessário para o diagnóstico das formas multibacilares já que todas tiveram o seu resultado conclusivo na baciloscopia;
- 5.4** A positividade da PCR para *M. leprae* nas amostras do periodonto e da saliva foi bem maior nos paciente paucibacilares do que nos multibacilares;
- 5.5** Verificou-se pacientes paucibacilares que tiveram PCR negativos nos raspados intradérmicos, porém, positivos no periodonto e na saliva, assim, pode-se aumentar o índice de positividade da PCR coletando linfa, periodonto e saliva;
- 5.6** A baciloscopia não mostrou ser uma técnica eficiente para análise da saliva e do periodonto.
- 5.7** As modificações propostas na extração de DNA com o aumento do tempo de incubação com proteinase K e na PCR com a introdução de um controle endógeno, em um formato multiplex, minimizou a possibilidade de resultados falso negativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; AQUINO, M.A.; CASTRO, J.M. Doença periodontal em hansenianos. *Rev. Period.*, v.4, p.191-3, 1995.

ABE, M.; YOSHINO, Y.; MINAGAWA, F.; MIYAJI, I.; SAMPOONACHOT, P.; OZAWA, T.; SAKAMOTO, Y.; SAITO, T.; SAIKAWA, K. Salivary immunoglobulins and antibody activities in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v.3, p.343-50, 1984.

ABREU, M.A.M. et al. A mucosa oral na hanseníase: um estudo clínico e histopatológico. *Rev. Bras. Otorrinol.*, v. 72, n.3, p.31-6, 2006.

ABREU, M.A.M. et al. The oral mucosa in paucibacillary leprosy: a clinical and histopathological study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. oral Radiol. Endod.*, v.103, p.48-52, 2007.

ALBANDAR, J.M. et al. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.*, v.68, n.10, p.973-81, 1997.

ARAUJO, M.G. Hanseníase no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.3, p.373-82, 2003.

BECHELLI, L.M.; BERTI, A. Lesões lepróticas da mucosa bucal: estudo clínico. *Rev. Bras. Leprol.*, v.7, p.187-199, 1939.

BELMONTE, P.C.R. et al. Características da doença periodontal em hanseníase. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v.4, n.44, 2007.

BRAND, P.W. Temperature variation and leprosy deformity. *Int. J. Lepr.*, v. 27, p.1-7, 1959.

BRASIL, J.; OPROMOLLA, D.V.A.; SOUZA-FREITAS, J.A.S.; ROSSI, J.E.S. Estudo histológico e baciloscópico de lesões lepróticas da mucosa bucal. *Estomat. & Cult.*, v.7, n.2, p.113-9, 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. *Guia de Controle da Hanseníase*. 2ª ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2002.

CARVALHO, N.L.R.; ARAUJO, M.G.; GUEDES, A.C.M. et al. Reação hansênica tipo 1 na hanseníase borderline tuberculóide, durante a poliquimioterapia: época de aparecimento e nervos acometidos. *An Bras Dermatol*, v.70, n. 3, p.205-208, 1995.

CHAZAN, F.; AQUINO, M.A.; MARIANI, C.N. Doença periodontal e prematuridade. *Femina*, v.32, n.3, p.219-22, 2004.

COLE, S.T.; HONORE, N.; EIGLEMEIER, K. Preliminary analysis of the genome sequence of *Mycobacterium leprae*. *Lepr. Rev.*, v.71(Suppl.), p.162-7, 2000.

CONRADS, G. et al. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individual. *J. Periodonto.l*, v.67, n.10, p.994-1003, 1996.

DAVID, H.L., LÉVY-FRÉBAULT, V., THOREL, M.F. Méthodes de Laboratoire pour Micobactériologie Clinique. Comissão des Laboratoires de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur. Paris: Institut Pasteur, 1989.

DAVID, H.L. *Bacteriology of the Mycobacterioses*. Department of Health, Education, and Welfare (CDC). Atlanta, Georgia, USA. p.166, 1976.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS. *Informações de Saúde: Epidemiológicas e Morbidade*. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> Acesso em: 22 jan. 2008.

De WIT, M.Y.L., DOUGLAS, J.T., Mc FADDEN, J. et al. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium Ieprae in nasal swab specimens. *J Clin. Microbiol*, n. 3, v. 31, p. 502-6, 1993.

FONSECA, P.H.M.; CUTRIM Jr., R.J.C.; CARNEIRO,S.F.M. Hanseníase no Estado do Maranhão (análise de 5.274 casos). *Arq Bras Med*, v.57, n.4, p.175-7, 1983.

FUCCI DA COSTA, A.P.; DA COSTA NERY, J.A.; WAN-DEL-REY DE OLIVEIRA, M.L.; CUZZI, T., RAMOS-E-SILVA M. Oral lesions in leprosy. *Indian J. Dermatol. Venereol. Lepr.*, v.69, p.381-5, 2003.

GERSDORF, H. et al. Identification of *Bacteroides forsythus* in sungingival plaque from patients with advanced periodontitis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n.4, p. 941-6, 1993.

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

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Tratado de Medicina Interna*. 22. ed. São Paulo: Ed. Elsevier, 2005.

HASTINGS, R.C. *Leprosy*. 2. ed. Singapore: Churchill Livingstone, 1994.

HUBSCHER, S.; GIRDHAR, B.K.; DESIKAN, K.V. Discharge of Mycobacterium leprae from the mouth in lepromatous leprosy patients. *Lepr. Ver.*, v.50, p. 45-50, 1979.

IMANISH, S.A.W. *A investigação do Citomegalovírus e do Epstein Barr vírus na doença periodontal humana*. Belo Horizonte: UFMG, 2005. Dissertação (Mestrado em Periodontia), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

KUMAR, B.; YANDE, R.; KAUR, I. Involvement of palate and cheek in leprosy. *Indian J. Leprosy.*, v.60, p.280-4, 1988.

LANGUILLON, J. ; CARAYON, A. Lésions cutanées. In: LANGUILLON, J. ; CARAYON, A. *Précis de léprologie*. 2o ed. p.62-101. Paris: Masson, 1986.

LIN, H.; HUBER, R.; SCHLESSINGER, D.; MORIN, P. J. Frequent Silencing of the *GPC3* Gene in Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, n.59, p.807–10, 1999.

LINDHE, J.; KARRING, T. Anatomia do Periodonto. In: LINDHE, Jan. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

LÖE, H. The gingival index, the plaque index and retention index systems. *J. Periodont.*, v. 38, supplement, n.6, p.610-6, 1967.

LOMBARDI C. Hanseníase epidemiologia e controle. Convênio IMESP/SAESP. São Paulo, 1990.

LÓPEZ, N.; SMITH, P.; GUTIERREZ, J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J. Dental Res.*, v.1, n.81, p.58-63, 2002.

MACHADO, P.R.L. Imunologia. In: TALHARI, Sinésio; NEVES, René Garrido; PENNA, Gerson Oliveira; OLIVEIRA, Maria Leide Van-Del-Rey. *Hanseníase*. 4.ed. Manaus: Tropical, 2006.

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 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. *J.C.M.*, v.44, n.9, p.3154–9, 2006.

MAYANAGI G., et al. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 19, n.6, p.379-85, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Organização Mundial de Saúde – *Situação Atual da doença*. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>> Acesso em: 22 jan. 2008.

MIRANDA, R.P.G. Efeitos da lepra na cavidade oral. *Publ. Cent. Est. Lepr.*, v.10, p.24-7, 1970.

MITAL, B.N. The national leprosy eradication programme in India. Rapp. Trimest Statisc. *Sanit. Nond.*, v.44, p.23-29, 1991.

MÖLLER-CHRISTENSEN V.; BAKKE, S.N.; MELSOM, R.S. Changes in the anterior nasal spine of the alveolar process of the maxillary bone in leprosy. Int. *J. Lepr.*, v.20, p.335-40, 1952.

MOREIRA, A.S.; RIBEIRO, C.S.; BASTOS, R.R.; SILVA, J.V.; SANTOS, P.M. Baciloscopia da conjuntiva no diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de hanseníase. *Arq. Bras. Oftalmol.* v.69, n.6, p.865-9, 2006

NAGAO-DIAS, A.T.; ALMEIDA, T.L.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, R.C.; LIMA, A.L.; BRASIL, M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.2, n.11, p.215-9, 2007.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M. Infecções bacterianas – Lepra. In: NEVILLE, B.W. *Patologia oral & maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

NEWMAN, M.G.; NISENGARD, R.J. Diagnostic microbiology and immunology. In: NISENGARD, R.J., NEWMAN, M.G. *Oral microbiology and immunology*. 2 ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1994.

NIEMINEN, A. et al. Value of some laboratory and clinical measurements in the treatment plan for advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* v.23, n.6, p.572-81, 1996.

NOGUEIRA W. Hanseníase: Importante agravamento para a saúde pública no mundo, no Brasil e no Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo: 1990.

PINHEIRO, M.M.O. *A hanseníase em registro ativo no município de Passos, MG-Brasil*. São Paulo: UNIFRAN, 2006. Dissertação (Mestrado em em Promoção da Saúde), Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu, Universidade de Franca, 2006.

PORTO, M. *Lesões orais na lepra: estudo clínico*. Araraquara: USP, 1965. Tese, Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade de São Paulo, 1965.

REICHART, P.; ANANATASAN, T.; REZNIK, G. Gingiva and periodontium in lepromatous leprosy. Clinical radiological, and microscopical study. *J. Periodontol.*, v.47, p.455-60, 1976.

REICHART, P.A.; METAH, D.; ALTHOFF, J. Ultrastructural aspects of oral and facial lepromatous lesions. *Int J Oral Surg.* v.14, p.55-60, 1985.

RIDLEY, D.S; JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev.*, v.33, n.2, p.119-28, 1962.

RINKE 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.

RONDEROS, M.; PIHLTROM, B.L.; HODGES, J.S. Periodontal disease among indigenous people in the Amazon rain forest. *J. Clin. Periodont.*, v.28, n.11, p.995-1003, 2001.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. *Hanseníase: normas e instruções*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac, 64 p., 1992.

SALLUM, W; ALVES, F,A; HIPÓLITO, O.; LOPES, M.A; SALLUM, E.A. W.S. FOPUNICAMP: um novo método de diagnóstico periodontal. *Period. Ver.*, v.4, p.50-6, 2001.

SANTOS, G. G.; MARCUCCI, G.; JÚNIOR, J.G.; MARGARIDO, L.C.; LOPES, L.H.C. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia da polimerase. *An. Bras. Dermatol.*, v.82, n.3, p.245-9, 2007.

SANTOS, G.G.; MARCUCCI, G.; JÚNIOR, J.G.; MARCHESE, L.M.. Aspectos estomatológicos das lesões específicas e não-específicas em pacientes portadores da moléstia de Hansen. *Pesq. Odontol. Bras.*, v.14, n.3, p.268-272, 2000.

SANTOS, A.R.; DEGRAVE, W.M.; SUFFYS, P.N. Use of polymerase chain reaction (PCR) in leprosy reseach. *Indian J. lepr.*, v.71, p.101-10, 1999.

SANZ, M. et al. Methods of detection of Actinobacillus actomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with especial emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, n.12, p.1034-47, 2004.

SAWYER, D.R.; ALAGUMBA, L.N.; LEHNERT, J.F. Facial and oral manifestations of leprosy: an evaluation of the one hundred and four cases. *J. Oral Med.*, v.42, n.3, p. 143-9, 1987.

SCHEEPERS, A.; LEMMER, J.; LOWNIE, J.F. Oral manifestations of leprosy. *Lepr. Rev.*, v.64, p. 37-43, 1993.

SCOLLARD, D.M.; SKINSNES, O.K. Oropharyngeal leprosy in art, history, and medicine. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. oral Radiol. Endod.*, v.87, p.463-70, 1999.

SERRUYA, J. Hanseníase no Município do Rio de Janeiro. *An. Bras. Dermatol.*, v.56, n.4, p.251-4, 1981.

SHARMA, V.K.; KAUR, S.; RADOTRA, B.D. Tongue involvement in lepromatous leprosy. *Int. J. Dermatol.* v.32, p. 27-29, 1993.

SILNESS, J.; LOE, L.H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont Scand*, v. 22, p.121-35, 1964

SONI, N.K. Leprosy of the tongue. *Indian J Lepr*, v.64, n.3, p.325-30, 1992.

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. Dis.*, v. 188, p.1024-31, 2003.

STRETCH, R. Presentation and treatment of Hansen's disease. *N. Times*, v.95, n.29, p.46-7, 1999.

STYLE, A. Early Diagnosis and treatment of leprosy in the United States. *Am. Fam. Physic.*, v.52, n.1, p.172-8, 1995.

TANAKA, S. et al. Frequency of reactivity for Porphyromonas gingivales and Prevotella spp. In supra- and subgingival plaques, and periodontal clinical parameters according to subject age. *J. Period.*, v.73, n.8, p.877-85, 2002.

TALHARI, S.; NEVES, R.G.; PENNA, G.O.; OLIVEIRA, M.L.V. *Hanseníase*. 4.ed. Manaus: Tropical, 2006.

UMEDA, M. et al. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodont Res*, v.39, n.6, p.398-404, 2004.

WHO. World Health Organization – *Leprosy: Global Situation*. Disponível em: <<http://www.who.int/lep>>. Acesso em: 22 jan. 2008.

ZAMBON, J.J.; HARASZTHY, V.I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology*, v.7, n.1, p.69-82, 1995.

## **APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da Pesquisa: **PESQUISA DE *Mycobacterium Leprae* NO PERIODONTO E SALIVA DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

#### **I. A justificativa e objetivos da pesquisa**

Este é um estudo que estamos fazendo na Fundação Alfredo da Mata, com o objetivo de saber se as pessoas com hanseníase, que vêm consultar aqui na Fundação, têm também problemas na gengiva. Os problemas na pele serão vistos pelos médicos, e os problemas na gengiva serão visto pelo dentista.

Participando deste estudo você não receberá nenhum benefício em dinheiro, mas estará contribuindo para que seja feito um estudo sobre a saúde da gengiva das pessoas que procuram tratamento aqui na Fundação. Além disso, você receberá orientações da dentista que poderão ajudar a você ter um sorriso e uma boca com mais saúde.

#### **II. Os procedimentos a serem utilizados:**

No consultório examinaremos a sua gengiva e, se você permitir, faremos a coleta de material. Tudo será feito com material descartável e esterilizado, não gastando muito o do seu tempo ou oferecendo nenhum risco.

#### **III. Os desconfortos ou riscos esperados:**

O exame é rápido e muito fácil de ser feito, e não causam dor ou incomodam. Os exames não atrapalham em nada sua boca e sua vida.

#### **Os benefícios que se pode obter:**

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

#### **V. Os procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:**

Caso você não deseje participar da pesquisa, continuará recebendo os tratamentos necessários nesta instituição sem nenhum problema.

#### **VI. 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.

#### **VII. 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 permanecerão na pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo.

#### **VIII. 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.

#### **IX. 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.

**X. Garantia que 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: Lígia Fernandes Abdalla**

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – Formulário de Anamnese e Exame Clínico.

### 1. IDENTIFICAÇÃO

Prontuário: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Idade: ( ) anos completos Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) 1-F; 2-M

Estado civil: ( ) 1- Solteiro; 2- Casado; 3- Divorciado; 4- Viúvo; 5- Outros

Raça/Etnia: ( ) 1- Branca; 2- Negra; 3- Mulata; 4- Oriental; 5- Parda; 6- Outras

Escolaridade Completa: ( ) 1- Analfabeta; 2- Fundamental; 3- Médio; 4- Superior; 5- Pós-graduada

### 2. DADOS PESSOAIS E MÉDICOS

a) Fuma? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- Parei

Que tipo? \_\_\_\_\_

b) Quantos cigarros fuma por dia? ( ) Há quanto tempo? ( ) anos

c) Tem hábito de ingerir bebida alcoólica? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- Parei

Qual? \_\_\_\_\_

d) Quantas doses por semana? ( )

e) Faz uso de qualquer outra droga? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- Parei

Que tipo? \_\_\_\_\_

f) Faz uso de medicamentos? ( ) 1- Sim; 2- Não

Qual? \_\_\_\_\_

g) Tem alguma doença sistêmica? ( ) 1- Sim; 2- Não

Qual? \_\_\_\_\_

### 3. DADOS PERIODONTAIS

a) Sua gengiva sangra? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

b) Tem mau hálito? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

c) Respira pela boca? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

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

e) Usa fio dental? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

f) Faz uso de bochechos? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

g) Aperta ou range os dentes? ( ) 1- Sim; 2- Não; 3- às vezes

h) Já fez tratamento gengival? ( ) 1- Sim; 2- Não

### 4. DADOS COLETADOS NOS PRONTUÁRIOS

Tipo de Hanseníase: ( ) 1- T; 2- D; 3- DT; 4- DD; 5- DV; 6- V

Classificação Operacional: ( ) 1- PB; 2- MB

Número de lesões: ( )

Tempo de evolução da doença: ( ) anos



## ANEXO A – Parecer Comitê de Ética

### PARECER CONSUBSTANCIADO N.º 06/2008

Registro no CEP: 001/2008 FR – 176358 CAAE – 0001.0.266.115-08

#### I. IDENTIFICAÇÃO

**Título de Projeto:** “Pesquisa de Micobactérias no periodonto de pacientes com Hanseníase”

**Pesquisador responsável:** Lígia Braga Fernandes de Oliveira.

**Instituição a ser realizar a pesquisa:** Fundação “Alfredo da Matta”.

**GRUPO:** III

**Data de apresentação ao CEP:** 25.02.2008

**Data da Reunião:** 04 /04/2008

#### II. OBJETIVOS

##### Geral:

- Verificar através de parâmetros bacteriológicos (baciloscopia e isolamento) e moleculares (PCR) a presença do *M. leprae* e de outras micobactérias no exsudato do sulco gengival, bolsa periodontal de pacientes virgens de tratamento nas diversas formas clínicas da hanseníase.

##### Específicos:

- Observar se o diagnóstico da doença pode ser obtido através da coleta de material do exsudato do sulco gengival / bolsa periodontal;
- Conhecer a frequência do envolvimento periodontal em pacientes com hanseníase;
- Verificar a especificidade da baciloscopia sendo como padrão a análise da PCR;
- Identificar as espécies do micobactéria isoladas no cultivo.

#### III. SUMÁRIO

A hanseníase é uma doença infecciosa que acomete pele, nervos periféricos, mucosas e cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*. Em diversos trabalhos na literatura relatam o envolvimento periodontal pela doença, principalmente com desenvolvimento da gengivite periodontal com perda do osso alveolar.

- **Pesquisa:** Trata-se de um estudo transversal descritivo do tipo de detecção do caso para verificar a presença de *M. leprae* e de outras micobactérias no periodonto.
- **Participantes:** população de 75 pacientes com hanseníase que concordarem em participar do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- **Inclusão e/ou Exclusão:** \* **Inclusão** – ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 65 anos, demanda espontânea, com diagnóstico clínico laboratorial de hanseníase e virgem de tratamento.

\***Exclusão** – mulheres grávidas, endentados totais e indivíduos que por algum motivo desistirem de participar do estudo.

#### III. COMENTÁRIOS DO RELATOR REFERENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES.

- Projeto de relevância e objeto de dissertação de Mestrado, que proporcionará maiores informações sobre o envolvimento periodontal em pacientes com hanseníase. 

**Estrutura do protocolo:** Adequado.

**Retorno de benefícios para o sujeito e / ou comunidade:** Adequado

**Informação adequada quanto ao financiamento:** Adequado. O projeto integra o Programa RH da Amazônia da FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas).

**Lista de centros (para estudos multicêntricos):** não se aplica

**Cronograma de execução:** Adequado

**Recursos humanos envolvidos e orçamento:** Adequado

**Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido:** Adequado.

O presente projeto atende às Normas que regula a Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

**V. PARECER DO CEP:**

**Aprovado.**

O pesquisador deverá enviar o relatório semestral e final para o Departamento de Ensino e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta e ao CEP.

Manaus, 10 de abril de 2008

  
**ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ**  
Coordenadora do CEP - FUAM