
Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram selecionadas dos arquivos da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Lauro de Souza Lima, pertencente à Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, lâminas de histologia e blocos de parafina de biópsias cutâneas de 10 indivíduos diagnosticados clinicamente como Dimorfo Tuberculóide Reacional antes do início do tratamento específico (DTR), e 10 indivíduos diagnosticados clinicamente como dimorfos com reação tipo 1 na vigência de poliquimioterapia para multibacilares (D-RR). Os critérios de escolha utilizados foram o diagnóstico clínico, confirmado pelo exame histopatológico, e a qualidade e volume do tecido incluído em parafina, para possibilitar a realização de grande número de cortes histológicos e com boa qualidade para a confecção de lâminas para imunoistoquímica.

Os critérios diagnósticos, tanto quanto à classificação histopatológica quanto à condição reacional, foram os expostos por Ridley (1987)⁷.

3.2. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais, com suas diluições, utilizados neste estudo foram: anti-CD8 (Dako/M7103 — 1:25), anti-CD20 (Dako/M0755-1:100), anti-CD79 (Dako/M7050— 1:50), anti-CD68 (Dako/M0814 - 1:1000), anti-CD57 (Lab.Vision/MS.136P — 1:100), anti-IL-10 (R&D Systems/MAB285 - 1200) e anti-LAM (Lab. AMC/F30.5 — 1:500).

3.3. Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais e suas diluições foram: anti-CD3 (Dako/A0452 — 1:75), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc./sc-651 — 1:500) e anti-BCG (Dako/B0124 — 1:2000).

3.4. Estudos imunoistoquímicos

As células mononucleares (linfócitos T, linfócitos B, plasmócitos, células NK e macrófagos), antígenos micobacterianos, a enzima óxido nítrico sintase e a interleucina 10, no infiltrado inflamatório, foram identificadas por método imunoistoquímico empregando-se a marcação pela imunoperoxidase por meio do Sistema Dako EnVision⁺ (K4001 e K4003) Os cortes seriados foram colhidos em lâminas de vidro silanizadas (Dako, S3003, Glostrup-Denmark) e submetidos a processos de desparafinização e hidratação. Em seguida, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 30 min, para bloqueio da peroxidase endógena e posteriormente, aquecidas a 95°C, por 10 min, em tampão citrato a 10mM pH 6,0 para recuperação antigênica dos marcadores CD3, CDB, CD20, CD79 e iNOS. Após resfriamento, as lâminas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários. A seguir, foram incubadas por 30 min com o Sistema Dako EnVision⁺, posteriormente, com DAB (3'3' tetra-hidroclorato de diaminobenzidina) (Sigma) e contra-coradas em hematoxilina de Harris.

A imunomarcação para IL-10 seguiu o método ABC com o Kit Vectastain Elite (Vector Lab./6102), porém fez-se a recuperação antigênica com tripsina a 0,25% em PBS e o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação do soro AB humano.

Os linfócitos T CD4⁺ foram identificados empregando-se o Sistema de Dupla-Coloração Dako EnVision (K1395), com os marcadores CD3 e

CD8. O anticorpo primário antilinfócito T supressor/citotóxico (CD8) foi incubado com polímero marcado com peroxidase e revelado com DAB. Em seguida, após o emprego da solução bloqueadora, o anticorpo primário antilinfócito T (CD3) foi incubado com polímero marcado com fosfatase e incubado com *Fast Red*. Os linfócitos T CD8+ ficaram corados de marrom, enquanto os linfócitos T CD3+ coraram-se de vermelho caracterizando, desse modo, linfócitos T CD4+ todos aqueles que apresentaram coloração vermelha.

Como controle positivo para marcação da população celular, foi utilizado material histológico proveniente de amigdalectomia e, como controle positivo para os anticorpos anti-LAM, anti-BCG e anti-IL-10, foram utilizados blocos de biópsias de pele incluídos em parafina oriundos de pacientes com diagnóstico de hanseníase virchoviana. Ambas foram incubadas com os anticorpos primários. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se os anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS.

3.5. Avaliação dos cortes histológicos submetidos a Imunoistoquímica

O número de linfócitos T CD4+, TCD8+, células NK e células com expressão de IL-10 positivas foi obtido contando-se 15 campos de 0,0625mm² (aproximadamente 1mm²), sendo 5 campos na derme papilar, 5 na derme reticular média e 5 na profunda, sorteados no aumento de 400x. Esta contagem foi realizada mediante consenso entre três observadores.

A avaliação da população dos linfócitos B CD20+ e CD79+ foi realizada por 3 observadores, em escala semiquantitativa de 0 a 4+, sendo: 0 = ausente; 1+ = mínimo; 2+ = discreto; 3+ = moderado; 4+ = intenso.

A população de células iNOS positivas foi avaliada por 3 observadores independentes, de forma semiquantitativa, de 0 a 3+, sendo:

0 = ausente; 1+ = 1 a 10% de células imunomarcadas; 2+ = 11 a 20% de marcadas; 3+ = mais de 20% das células marcadas.

Os antígenos micobacterianos, assim como os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), foram verificados em todo o corte histológico com os anticorpos anti-BCG, anti-LAM e com a técnica de Faraco-Fite, utilizando-se a escala de 0 a 6+, de acordo com Ridley (1987). A representação morfológica dos antígenos micobacterianos mostrou fragmentos antigênicos bem individualizados, permitindo contagem igual àquela utilizada para quantificar os bacilos em cortes corados pela técnica do Faraco-Fite.

3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos de cada grupo estudado foram submetidos à análise estatística por meio do método não paramétrico Kruskal-Wallis. Para comparação entre os grupos das variáveis quantitativas foi aplicado o teste "t" de Student. Para correlação entre variáveis semiquantitativas entre os dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para análise da correlação entre variáveis semiquantitativas e quantitativas num mesmo grupo, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Para as variáveis que foram significativas, foram aplicados o teste de comparação múltipla, teste de Dunn, e o teste de Wilcoxon para duas amostras independentes. Para a comparação entre as áreas da derme superficial, média e profunda usou-se o teste de Friedman, levando em conta a dependência entre as áreas. Para as variáveis apresentaram diferença significativa, foi aplicado o teste de Dunn. Para análise de correlação entre todos os marcadores utilizou-se o Teste de Pearson. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA, U.S.O. (1997), e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$)