

DOENTE E CONTROLES  
MÉTODOS

## DOENTES E CONTROLES

Foram selecionados 72 indivíduos da região de Ribeirão Preto-SP, sendo 53 doentes de hanseníase e 19 indivíduos aparentemente normais, divididos em três grupos, como se observa na Figura 1.

**Grupo I:** Doentes virchowianos - constituído de 30 pacientes.

**Grupo II:** Doentes tuberculóides - constituído de 23 pacientes.

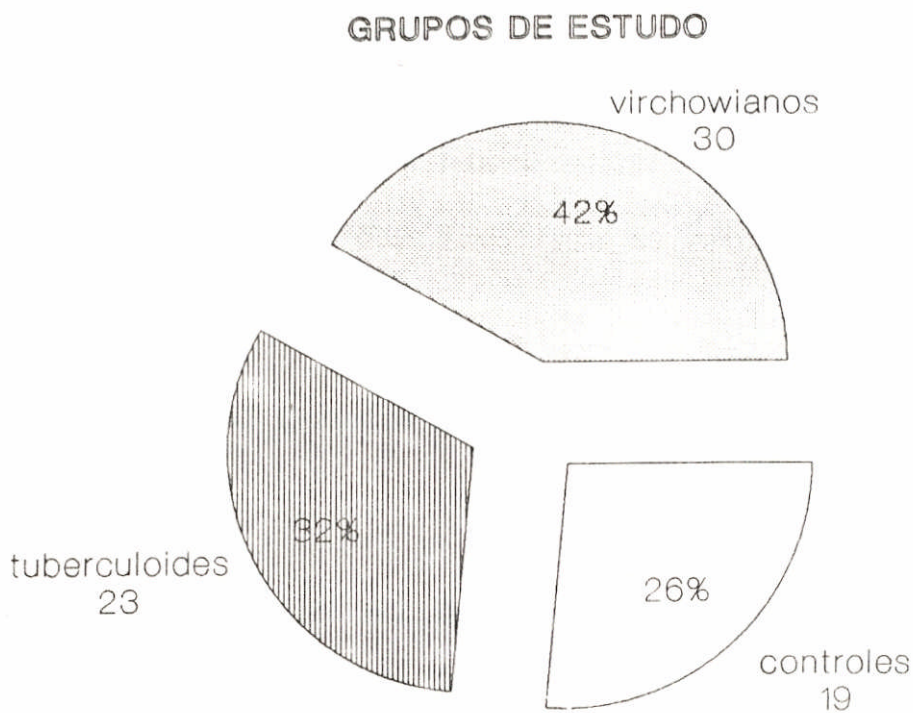
**Grupo III:** Controles - constituído de 19 indivíduos normais.

O diagnóstico dos casos de hanseníase foi baseado nos exames clínico, histológico, bacterioscópico (material de lesão da pele e muco nasal). Os doentes foram classificados segundo critérios adotados no VI Congresso Internacional de Leprologia, Madri, 1953, em virchowianos (V) e tuberculóides (T).

Os controles foram examinados com a finalidade de verificar se não apresentavam lesões sugestivas de hanseníase e submetidos à reação de Mitsuda com o mesmo antígeno utilizado em doentes.

### Grupo I: Doentes Virchowianos

Foram estudados 30 doentes de hanseníase virchowiana atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, com idade variando entre 21 a 60 anos (média 46,0 anos).



**FIGURA 1 - APRESENTAÇÃO DOS DOENTES E CONTROLES E FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS EM CADA GRUPO ESTUDADO.**

Na Tabela I observa-se que a maioria dos doentes (86%) estava sendo tratada com Dapsona (DDS), na dose de 100 mg/dia, por tempo variado; houve predominância de pacientes do sexo masculino (19 doentes - 63%). Foram positivos (1+ a 3+) os resultados dos exames baciloscópicos de lóbulo de orelha em 13 doentes (43%). Nos restantes foram negativos, tratando-se de doentes submetidos à terapêutica durante vários anos, até 1015 ou 20 anos. Nota-se também, que todos doentes tiveram reação de Mitsuda negativa e que doze (12) deles apresentavam reação dos tipos eritema nodoso em dez (10) doentes e eritema polimorfo em apenas dois doentes.

Deve ser destacado que apesar de 12 doentes apresentarem reação hansênica, por ocasião da coleta de sangue, nenhum deles estava sendo tratado com droga imunossupressora, como se nota na Tabela I.

## **Grupo II: Doentes Tuberculóides**

Foi constituído de 23 doentes de hanseníase tuberculóide atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com idade variando entre 18 a 60 anos (média 42,5 anos) (Tabela II).

Observa-se que foi semelhante a distribuição de sexo no grupo II (12 masculinos e 11 femininos) e, que todos doentes foram lepromino-reativos com respostas variando entre 1+ (12), 2+ (9) e 3+ (2). Foram sempre negativos os resultados da baciloscopia de material de lesões cutâneas; apenas dois

pacientes (nas 18 e 19) a baciloscopia de lóbulo de orelha foi positiva (1+). Nota-se, ainda, que por ocasião da coleta de sangue, oito (8) doentes apresentavam reação caracterizada por eritema e infiltração de lesões, neurite geralmente discreta e edema de extremidades, especialmente de pés e mãos; nenhum deles estava sendo tratado com drogas imunossupressoras.

Considerando a presença de doentes tuberculóides em reação, o Grupo II foi subdividido em: tuberculóides tórpidos (15 doentes) e tuberculóide em reação (8 doentes).

TABELA I - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DOENTES VIRCHOWIANOS.

No. ORDEM	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE (ANOS)	CLASSIFICAÇÃO		REAÇÃO HANSENICA	REAÇÃO LEPROMICA	BACILOSCOPIA		TRATAMENTO			
				CLINICA	HISTOLOGICA			L0	MV	DRUGA	DOSEmg/d	DURACAO	REGULARIDADE
1	ADK	M	48	V	V	-	-	NEGATIVA	2+	DDS	100	6A	R
2	DCS	M	56	V	V	-	-	NEGATIVA	-	DDS	100	6A	R
3	MASS	F	27	V	V	-	-	NEGATIVA	1+	DDS	100	2A	R
4	MSCS	M	24	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	5A	R
5	AM	M	59	V	V	-	-	NEGATIVA	1+	DDS	100	1A	R
6	AHL	M	52	V	V	-	-	NEGATIVA	2+	DDS	100	17M	R
7	MUS	M	54	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	15M	R
8	VB	M	57	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	10A	R
9	JEL	F	43	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	1A	R
10	RRF	M	56	V	V	-	-	NEGATIVA	2+	-	-	-	-
11	AM	M	50	V	V	-	-	NEGATIVA	1+	DDS	100	2A	R
12	TA	F	52	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	10A	R
13	SSH	M	43	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	2A	R
14	PLF	M	24	V	V	-	-	NEGATIVA	3+	-	-	-	-
15	JLR	M	44	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	5A	R
16	LVR	F	56	V	V	-	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	12A	R
17	LCR	M	48	V	V	-	-	NEGATIVA	1+	-	-	-	-
18	RRS	F	50	V	V	-	-	NEGATIVA	1+	DDS	100	10M	R
19	AS	M	55	Vr	Vr	-	-	NEGATIVA	1+	DDS	100	18M	R
20	CAS	M	21	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	2+	DDS	100	200	R
21	ART	F	31	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	1+	DDS	100	6M	R
22	PV	M	55	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	5A	P
23	CNO	F	31	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	15A	R
24	BSA	M	58	Vr	Vr	EP	EP	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	6A	P
25	MP	F	58	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	8A	F
26	EASY	F	22	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	2+	DDS	100	1M	R
27	FCF	M	52	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	20A	R
28	JBB	M	38	Vr	Vr	EP	EP	NEGATIVA	2+	-	-	-	-
29	ACC	M	60	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	5A	R
30	MDP	F	51	Vr	Vr	EN	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	DDS	100	2A	R

V = Virchowiano Vr = Virchowiano Reacional EN = Eritema Nodoso EP = Eritema Polimorfo L0 = Lóbulo de Orelha MN = Muco Nasal  
R = Regularidade A = Anos M = Meses D = Dias DDS = Dapsone - = Não Tratado

TABELA II - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DOENTES TUBERCULÓIDES.

No. ORDEN	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE (ANOS)	CLASSIFICAÇÃO		REAÇÃO LEPROINICA	BACILOSCÓPIA		TRATAMENTO			
				CLÍNICA	HISTOLÓGICA		LESÃO CUTÂNEA	LO	DROGA	DOSE	DURAÇÃO	REGULARIDADE
1	JLT	M	31	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	10M	R
2	CAS	M	18	T	T	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
3	JMO	M	48	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
4	ADBF	F	33	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	1M	R
5	MDSO	F	31	T	T	3+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
6	ETS	M	52	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	8M	R
7	CLCS	F	47	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	15D	R
8	IR	F	31	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	4M	R
9	JAS	M	55	T	T	3+	NEGATIVAS		DDS	100	1M	R
10	AAS	M	52	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	4A	R
11	MJP	F	46	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	8M	R
12	BCO	F	58	T	T	2+	NEGATIVAS		-	-	-	-
13	CCL	F	52	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	2A	R
14	MGE	F	35	T	T	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
15	VHP	F	57	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	3M	R
16	VDS	M	59	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
17	DA	M	60	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	11M	R
18	AA	M	33	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS	1+	DDS	100	1M	R
19	APG	F	28	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS	1+	DDS	100	2M	R
20	JMS	M	30	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	3M	R
21	MPPA	F	20	Tr	Tr	2+	NEGATIVAS		DDS	100	15D	R
22	AJS	M	58	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
23	PCS	M	23	Tr	Tr	2+	NEGATIVAS		-	-	-	-

T = Hanseniase Tuberculóide  
 DDS = Dapsona

Tr = Hanseniase Tuberculóide em Reação  
 LO = Lóbulo de Orelha

R = Regularidade  
 - = Não Tratado

## Grupo In: Controles

Nos controles foram estudados 19 indivíduos aparentemente normais, com idade variando entre 20 a 50 anos (média 28,2 anos), de ambos os sexos (12 masculinos e 7 femininos), a maioria deles estudantes do curso de graduação em medicina (FMRP-USP); que foram subdivididos segundo a resposta à reação de Mitsuda em: lepromino-positivos (11 Indivíduos) e lepromino-negativos (8 indivíduos).

TABELA III - DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE.

No. ORDEM	SEXO	IDADE (ANOS)	REAÇÃO		CONTATO PRÉVIO		FÓCO
			LEPROMÍNICA		TIPO	DURAÇÃO	
1	M	26	1+		0	5A	II
2	M	22	1+		0	1A	H
3	M	24	2+		0	1A	H
4	M	23	1+		0	1A	H
5	M	25	2+		0	1A	H
6	F	21	2+		0	1A	H
7	M	22	1+		0	1A	H
8	F	36	3+		F	>10A	HV
9	M	50	2+		0	>10A	H
10	F	27	1+		0	2A	H
11	F	47	1+		0	>10A	H
12	F	20	NEGATIVA		F	3A	HV
13	M	27	NEGATIVA		0	5A	H
14	F	28	NEGATIVA		0	3A	H
15	F	40	NEGATIVA		F	>10A	HV
16	M	24	NEGATIVA		0	1A	H
17	M	23	NEGATIVA		0	1A	II
18	M	23	NEGATIVA		0	1A	II
19	M	28	NEGATIVA		0	1A	H

0 = Operacional  
 F = Familiar  
 HV = Virchowiano  
 H = Hanseníase



## **MÉTODOS**

### **1. Coleta de Dados**

Dados clínicos e laboratoriais referentes aos doentes foram anotados em fichas especiais que incluíam, também, informações sobre o, tipo de tratamento, dose, duração e regularidade do mesmo (Anexo I). Considerou-se tratamento regular quando os doentes compareciam à maioria das consultas de seguimento (75%); porém, como a ingestão de droga se faz no domicílio, não se tem certeza da regularidade de tratamento.

Por ocasião da coleta de sangue todos os pacientes e controles foram examinados, fez-se a reação de Mitsuda e, nos doentes, a pesquisa de bacilos em esfregaços de material de lesão de pele e muco nasal.

## 2. Exame Bacterioscópico

Os esfregaços foram corados pela técnica de Ziehl Neelsen. O grau de positividade foi determinado de acordo com a recomendação da Segunda Conferência Panamericana de Lepra (1974):

- **Negativo:** nenhum bacilo encontrado em 100 campos;
- **Positivo 1+:** um ou menos que um bacilo em cada campo;
- **Positivo 2+:** bacilos encontrados em todos os campos;
- **Positivo 3+:** muitos bacilos encontrados em todos os campos.

## 3. Reação de Mitsuda

Reação de Mitsuda é a resposta observada 4 semanas após injeção intradérmica de 0,1 ml de uma suspensão estéril de bacilos de Hansen, mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas. O teste foi feito em todos doentes e nos controles por ocasião da coleta de sangue. A suspensão de bacilos foi preparada de acordo com a técnica de Mitsuda (1953), contendo  $60 \times 10^6$  bacilos por ml. Fez-se a leitura 28-30 dias após, seguindo o critério recomendado no VII Congresso Internacional de Leprologia (Tóquio, 1958) com modificações propostas por Hanks et al. (1970):

- **Negativo** - : ausência de reação
- **Duvidoso** : infiltração com diâmetro inferior a 3mm

- **Positivo +** : pápula com diâmetro entre 3 e 5 mm
- **Positivo ++** : induração com diâmetro maior que 5 e menor ou igual a 10 mm.
- **Positivo +++**: induração com diâmetro superior a 10 mm ou ulcerada.

#### **4. Extração de Proteína-C-Reativa (PCR) de Soro Humano**

Todo processo de extração e purificação de PCR do soro humano foi desenvolvido sob orientação do Prof. E. Brandt de Oliveira, no Departamento de Bioquímica da FMRP-USP.

Amostras de soro PCR positivas foram coletadas e armazenadas a -20°C, completando um volume de 2.200 ml. Após descongelamento à temperatura ambiente fizeram-se:

. Duas precipitações com sulfato de amônio (nas concentrações de 333 g/l e 176 g/litro de soro), resultando um volume de 180 ml (sedimento da segunda precipitação).

. Diluiu-se o sedimento com água deionizada e acrescentou-se EDTA (etilenodiaminotetracetato dissódico) numa concentração final de 5 mM. Centrifugou-se a 1200 rpm durante 10 minutos.

. Aplicou-se o sobrenadante em coluna de SephadexG-25 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada com salina (cloreto de sódio 0,9%), para filtrar o

sulfato de amônio. Coletou-se as frações em tubos numerados.

. Determinaram-se as frações que continham a proteína pelo teste com coomassie (0,25%), no qual estas amostras coram-se em azul com Intensidade proporcional à concentração protéica.

. As frações de sulfato de amônio foram determinadas pelo aspecto leitoso adquirido após adição de hidróxido de bário.

. Após filtração em Sephadex G-25 foram obtidos três tipos de frações:

- *Nº 1-14 volume inicial ("void volum")*

- *Nº 15-31 frações protéicas (coomassie +)*

- *Nº 27-50 frações sulfato de amônio (aspecto leitoso)*

- As frações de nº 16 a 26 foram agrupadas e em seguida foi acrescentado cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 5 mM. Esta solução foi adicionada 6. coluna de Sepharose-4-bis-epoxi fosforil-etanolamina (resina de afinidade), equilibrada com tampão contendo 2,0 mM de TBS ("Tris buffer saline") e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,5.

- Coletaram-se amostras coomassie positivas (proteína-C reativa), que foram as frações de rigs 6, 7 e 8, constituindo a solução de PCR. A concentração de PCR foi determinada em capilar com soro anti PCR humana.

. A solução de PCR foi cristalizada duas vezes com solução de sulfato de amônio saturada obtendo-se uma concentração de 8,2 mg de PCR/ml, a qual foi determinada pelo método de Biureto. Os cristais de PCR foram mantidos em estufa a 37°C.

## **5. Quantificação de Proteínas-C-Reativa de Doentes e Controles**

Através do método nefelométrico determinou-se a concentração de proteína C-reativa (PCR) no soro dos grupos estudados, utilizando-se o aparelho ICS Analyser II (Immunochemistry Systems - Beckman).

O princípio do método baseia-se na comparação da leitura da amostra desconhecida, tratada previamente com anti-PCR humano, com a leitura do padrão de PCR~anti PCR de concentração conhecida.

Os resultados são apresentados em mgPCR/dl de soro.

## **6. Dosagem do Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$ TNF no Soro de Doentes e Controles**

Utilizou-se o "Kit" de análise imunorradiométrico para o fator de necrose tumoral -  $\alpha$ TNF (Medgenix diagnostics - código 30-17520 PO Box 42

- Belgium).

O teste é ensaio imunoradiométrico baseado na reação imunológica, entre o  $\alpha$ TNF existente no soro (antígeno) e o anti- $\alpha$ TNF (anticorpo) com o qual o tubo da análise é revestido.

Tubos plásticos revestidos com anti  $\alpha$ TNF, ligado na parte inferior e interna do tubo, são utilizados para a dosagem da concentração de  $\alpha$ TNF do soro. A reação imunológica é revelada pela adição de anti  $\alpha$ TNF- $I^{125}$ (anticorpo marcado com iodo radioativo- $P^{125}$ ), que é detectada pela medida de radioatividade em contador gama.

### ***Procedimento:***

Para cada ensaio faz-se uma curva padrão em amostras de  $\alpha$ TNF de concentrações conhecidas (0, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 pg/ml).

. Nos tubos revestidos e numerados, em duplicatas, são colocadas as amostras padrão e desconhecida (200 p/ cada). A determinação da contagem total é feita em tubo não revestido contendo apenas o anti  $\alpha$ TNF- $I^{125}$ .

. Adiciona-se a todos os tubos anti  $\alpha$ TNF- $I^{125}$  (50  $\mu$ l Agita-se delicadamente.

. Incuba-se na temperatura ambiente, no período de 16 a 20 horas.

. Aspira-se, cuidadosamente todo o líquido do tubo

- . *Lavam-se os tubos 2x com solução de Tween 20 na concentração de 20%.*
- . *Aspira-se, novamente, todo o líquido do tubo. Para maior reprodutibilidade o tubo deve estar sem uma gota de líquido.*
- . *Contam-se os tubos em contador gama durante 60 segundos cada.*
- . *Prepara-se a curva padrão colocando-se a relação entre leitura obtida do cintilador gama (cpm) das amostras ("bound" - padrão) e a contagem total (I125 livre).*

$$R = \frac{\text{cpm(padrão)}}{\text{cpm total}} \times 100$$

*No gráfico projetou-se os valores de R na ordenada e as concentrações de  $\alpha$ TNF na abcissa.*

- . *Após, determina-se a concentração de  $\alpha$ TNF no soro interpondo-se os valores do coeficiente R na curva padrão.*

Fez-se então, a curva padrão de  $\alpha$ TNF (Figura 2).

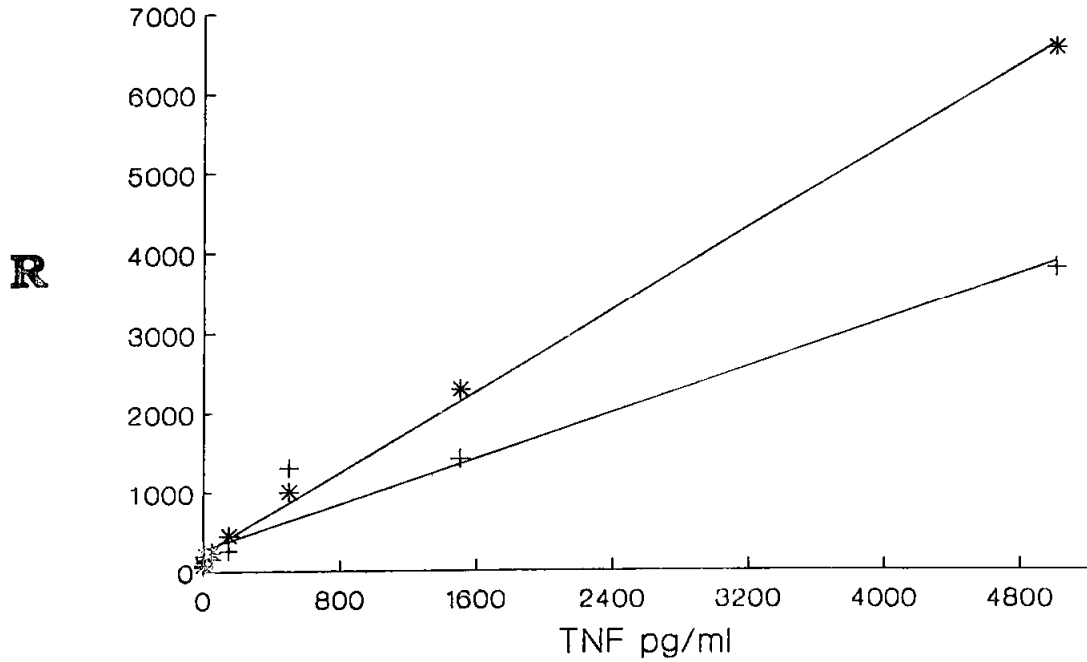


FIGURA 2 - CURVA PADRÃO - TNF IRMA.

## 7. Teste de Linfoproliferação "In Vitro" Pelos Mitógenos Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina-A (CON-A)

### 7.1. Princípio do método

Basicamente o método consiste na manutenção de células



mononucleares, em sistema controlado de cultura "in vitro", no qual são mantidas as condições fisiológicas do ambiente físico-químico (temperatura, pH, pressão osmótica, tensão de oxigênio e de dióxido de carbono na interface gás-líquido), de necessidades nutritivas, substâncias reguladoras e condições de esterilidade, permitindo que haja interação celular, proliferação e preservação de funções celulares especializadas.

Linfócitos cultivados "in vitro" podem ser estimulados por mitógenos ou antígenos e a resposta resultante pode ser utilizada para quantificar a imunocompetência celular. Pela interação entre linfócitos sensibilizados e antígenos específicos são gerados mediadores solúveis (fatores: blastogênicos, quimiotáticos, de ativação celular, de inibição da migração celular, de reatividade cutânea e outros). A resposta imunocelular é refletida pela habilidade destes fatores em promover a transformação blástica "in vitro".

A quantificação da proliferação de linfócitos pode ser realizada através de métodos morfológicos ou, mais precisamente, através da análise da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA). A incorporação de timidina exógena marcada de baixa atividade específica (<sup>3</sup>H-timidina), para prevenir o dano celular radioativo ao DNA de células em cultura durante período fixo, é medida por contador de cintilação. A quantidade de timidina utilizada deve ser suficiente para manter a incorporação através de todo período de "pulso". Este período é usualmente de 9 a 24 horas, para evitar os efeitos de síntese assincrônica de DNA linfocitário. A magnitude da resposta das células a um estímulo particular varia com as condições da cultura, densidade celular e concentração do agente ativador, assim como o momento e duração do pico

da resposta depende do estímulo utilizado e sua concentração (Ford & Hunt, 1973).

## **7.2. Teste de linfoproliferação "in vitro"**

Foi desenvolvido em câmara de fluxo laminar, submetida previamente (durante 15 a 30 minutos) à irradiação com luz ultra-violeta (280 nm), para que fosse minimizada a possibilidade de multiplicação bacteriana nas superfícies da câmara.

O método foi executado em linfócitos do sangue periférico separados através do gradiente de separação Ficoll-Hypaque (metrizoato sódico).

Quando o sangue com anticoagulante é colocado sobre a mistura Ficoll-Hypaque e centrifugado, os elementos celulares dividem-se em duas frações principais: granulócitos e eritrócitos sedimentados no fundo do tubo, células mononucleares (85% linfócitos e 15% monócitos) e parte das plaquetas que permanecem na interface entre o gradiente e o soro, podendo ser então removidas (Boyum, 1968). Entretanto, se o sangue é previamente diluído o rendimento de células mononucleares aumenta (Ford & Hunt, 1973).

Após a separação, os linfócitos são submetidos a processo de lavagem para eliminação de resíduos do Ficoll-Hypaque, e ressuspensos em meio de cultura, ficando em condições de serem cultivados "In vitro".

### 7.2.1. Técnica

- . Colhe-se em condições de esterilidade, 7,0 ml de sangue venoso, utilizando tubo de coleta à vácuo heparinizado e siliconizado (Vacuntainer, B.D.).
  
- . Dilui-se o sangue total com igual volume de meio de cultura estéril (RPMI 1640) a 37°C e homogeneiza-se suavemente com pipeta de Pasteur.
  
- . Coloca-se o sangue diluído, lenta e cuidadosamente, sobre 7,0 ml de FicollHypaque. Centrifuga-se a 400 g (1400 rpm) durante 30 minutos, na temperatura ambiente.
  
- . Após centrifugação verifica-se a formação de camadas distintas: superior, contendo plasma e plaquetas; interface, contendo células mononucleares (90% linfócitos), média gradiente Ficoll-Hypaque e Inferior, contendo granulócitos e hemácias.
  
- . Com pipeta de Pasteur aspira-se, cuidadosamente, a camada de linfócitos transferindo-a para um tubo cônico estéril (esta fase é crítica, pois o volume de linfócitos é pequeno e pode ocorrer contaminação, não desejada, com as camadas superior ou média).
  
- . Ressuspendem-se as células com solução salina isotônica. Centrifuga-se a 200 g (1000 rpm) durante 10 minutos, despreza-se o sobrenadante, repetindo-se o processo por duas vezes.

. Ressuspendem-se as células com 1,0 ml de meio de cultura e procede-se a contagem desta suspensão utilizando diluidor automático (Celm, modelo DA 500) e contador automático (Celm, modelo CC 510).

. Avalia-se a viabilidade dos linfócitos com azul de Trypan a 2% (Trypan Blue 2%). O método baseia-se na capacidade de células vivas repelirem o corante (Fig. 3) (Ford & Hunt. 1973).

. Dilui-se a suspensão de células com meio de cultura enriquecido com soro AB humano (na concentração de 15%), inativado pelo calor, para obter concentração de  $2,5 \times 10^6$  linfócitos/ml.

. Prepara-se a placa de cultura (marca - Corning), colocando-se em cada poço 0,1 ml de meio de cultura e os estimulantes, em concentração determinadas em experimentos tipo dose-resposta, que serão descritos posteriormente.

**FIGURA 3- TESTE DE VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS: LINFÓCITOS VIÁVEL, NÃO CORADO PELO "AZUL DE TRYPAN ( - >). E CÉLULAS INVIÁVEIS CORADAS PELO REAGENTE (--->).**

Adiciona-se a cada poço, Id preparado, 0,1 ml da suspensão de células ( $2,5 \times 10^5$  linfócitos por poço), preparando-se culturas triplicatas de 0,2 ml cada segundo o protocolo:

- a) Controle: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos
  
- b) PHA: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA
  
- c) PHA/PCR: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA + PCR
  
- d) ConA: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + ConA
  
- e) ConA/PCR: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + ConA + PCR
  
- f) PCR: contendo  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PCR

. As placas foram fechadas e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , em ambiente úmido e com  $\text{CO}_2$  A. concentração aproximada de 5% durante 3 dias.

Esta condição particular foi conseguida, através de "incubadora" de acrílico confeccionada na oficina de precisão da FMRP, contendo vias de entrada e saída de mistura de ar e  $\text{CO}_2$  e recipiente com água destilada para manutenção da umidade.

. Dezesesseis horas antes do término do período de incubação das células adiciona-se 0,5 microcuries de 3H-timidina.

- . Completado o tempo de cultura procede-se à coleta das células utilizando-se coletor automático "Automated Cell Harvester" (este aparelho aspira as células e lava os poços seqüencialmente com salina, TCA 5% e metanol absoluto, recolhendo os linfócitos em papel de filtro (Fiber-Glass).
- . Cada poço coletado tem uma área correspondente no papel de filtro ,que é então recortado e colocado em frasco para cintilação líquida ,no qual se adiciona líquido de cintilação e conta-se a radioatividade com auxílio de espectômetro de cintilação líquida Beckman LS150,durante 10 minutos por frasco .

### *7.2.2. Reagentes*

#### **. Meio de cultura**

Utilizou-se RPMI com glutamina sem bicarbonato de sódio, liofilizado (Lote 10077 - Flow Laboratories USA), contendo soro humano AB inativado, na concentração de 15%, penicilina 150 UI/ml, estreptomicina 80 µg/ml, bicarbonato de sódio 2,0 g/litro e tampão biológico HEPES - 20 mM/I (INLAB - PM: 238,31 - lote 812940).

#### **. Mistura Ficoll-Hypaque**

Hypaque de sódio 50%..... 100 ml  
 Ficoll solução a 9% ..... 345 ml

Água deionizada ..... 47,5 ml

- Hypaque - Wintrop Products (New York - USA)

- Ficoll - PM: 40 x 104 - Sigma Chemical Company - USA

A solução foi mantida à temperatura ambiente em frasco escuro, e esterilizada no momento em que foi utilizada.

Densidade final da mistura 1075 mg/ml.

- **Azul de Tripán**

Trypan Blue - Direct Blue 15 - Sigma Chemical Company. Lote: 015F00601.

- **3H - Timidina**

Thymidine methyl - 3H PM: 242,2 - Concentração: 0,036 mg/ml. Atividade específica: 6,7 Curies/mM - solução aquosa estéril. New England Nuclear - Radiochemical Specifications.

- **PPO 2,5 - Diphenyloxazole - PM anidro: 221,3.**

- **POPOP 2,2' p-phenylen bis (5-phenyloxazol) - PM: 364,41.**

- **Tolueno: Merk**

### 7.2.3. *Mitógenos*

- Fitohemaglutinina: (1%) PHA: Bacto (Difco Laboratories) Lote: 3110-56.
- Concanavalina A: ConA: Sigma Chemical Company. Lote: C-2010.

### 7.2.4. *Proteína C-Reativa (PCR)*

Os cristais de PCR em sulfato de amônio foram suspensos em meio de cultura estéril (sem soro humano) e aplicados em coluna de G-25 (0,9 cm de diâmetro por 5,0 cm de altura) e filtrados, para a obtenção de PCR pura, imediatamente antes do uso da solução nas culturas de linfócitos.

Durante a filtração colhem-se amostras de 0,3ml cada num total de 10 amostras. Determinam-se as amostras que contem PCR através do coomassie.

As amostras coomassie positivas são agrupadas e diluídas para serem usadas no teste de linfoproliferação(Fig. 4).



**FIGURA 4 - FILTRAÇÃO EM GEL 0-28 E APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTENDO PROTEÍNA-C-REATIVA. CORADAS EM AZUL (NÚMEROS 6, 7 E 8).**

#### *7.2.5. Placas de culturas*

Foram utilizadas placas de acrílico, estéreis com 96 poços cada, de fundo plano e com tampa (marca Corning, Lot. n° 25860 - New York - USA).

#### *7.2.6. Esterilização dos reagentes*

Todos os reagentes foram esterilizados pela passagem através de

filtros estéreis (GA-3 Metricell 0,2 m/, diâmetros 25 e 50mm), para utilização Imediata.

#### *7.2.7. Antígeno de Mitsuda - Mitsudina*

Suspensão contendo  $60 \times 10^6$  bacilos/ml - frascos de 2,0 ml, mantidos a temperatura de 4°C. Lot.: 10/89. Microbase (fornecido pelo Hospital Lauro de Souza Lima-SP).

### **8. Experimento Dose-Resposta Para Determinação da Concentração de Proteína-C-Reativa (PCR) a Ser Utilizada nas Culturas**

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de determinar a concentração mínima de PCR que não fosse inibitória ou estimulante da biastogênese de linfócitos, ou seja, os resultados da linfoproliferação na presença de PCR deveriam ser semelhantes aos das culturas controles.

Assim, desenvolveu-se o teste em 35 indivíduos sendo: 13 doentes de hanseníase virchowiana, 13 doentes de hanseníase tuberculóide e 9 indivíduos controles normais, cujos resultados se encontram nas Tabelas IV, V. VI e Figura 5.

Após a separação dos linfócitos, seguindo a técnica anteriormente descrita (7.2.1) foram preparadas culturas triplicatas (0,2 ml cada) seguindo

o protocolo:

- Culturas controles:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos
- Culturas PCR<sub>1</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PCR 5,0 µg/ml
- Culturas PCR<sub>2</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PCR 10,0 µg/ml
- Culturas PCR<sub>3</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PCR 20,0 µg/ml

Utilizou-se a PCR preparada segundo Item 7.2.4.

A quantificação da resposta celular foi feita utilizando-se o quociente médio entre a contagem da emissão de radiação por minuto (cpm - medido em contador de cintilação) na presença e na ausência de PCR, o que representa a proporção de incorporação de timidina ou proliferação celular, definindo o índice de estimulação (IE).

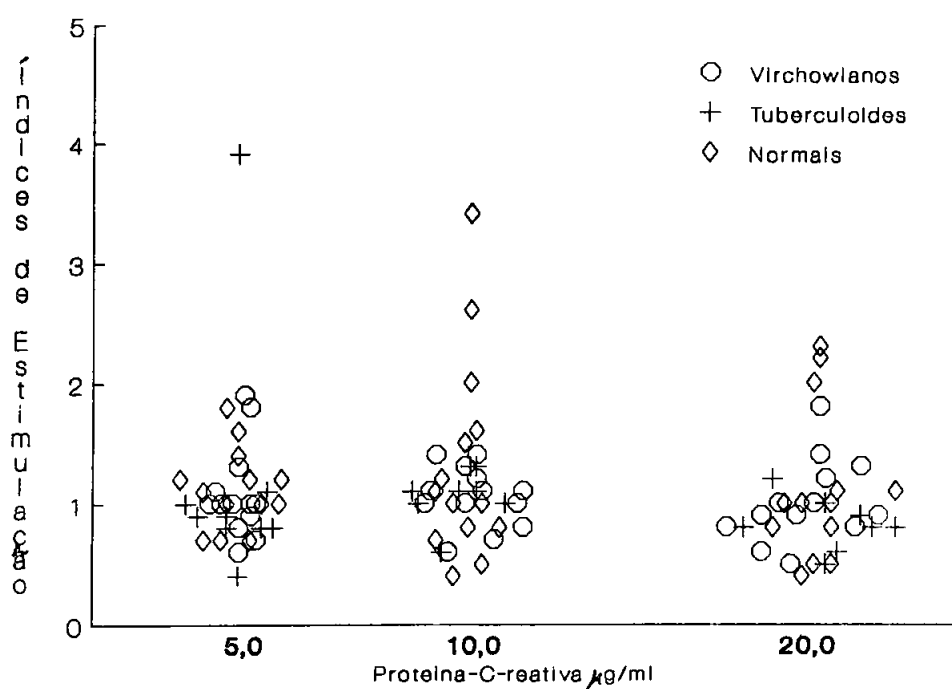
$$I E = \frac{\text{cpm na presença de PCR}}{\text{cpm na ausência de PCR}}$$

Os resultados em cpm e os respectivos índices de estimulação encontram-se nas Tabelas IV, V e VI e Figura 5.

A análise dos resultados mostra que as concentrações de PCR utilizadas não foram inibitórias nem estimulantes do teste de proliferação de linfócitos, em doentes virchowianos, tuberculóides e controle normais. A análise de variância de Friedman aplicada aos dados demonstrou não haver

diferenças significantes entre as três concentrações de PCRna linfoproliferação de virchowianos ( $\chi^2 r = 0,50$ ,  $p > 0,70$  n.s./ $\chi^2 r$ ;  $0,05 = 5,99$ ), tuberculóides ( $\chi^2 r = 3,85$ ,  $p > 0,10$  n.s.) e controles ( $\chi^2 r = 5,17$ ,  $p > 0,05$  n.s.).

Diante destes achados optou-se pela concentração de 5,0  $\mu\text{g}$  de PCR, por ser a menor dose.



**FIGURA 5 - RESULTADOS DA LINFOPROLIFERAÇÃO ESTIMULADA PELA PROTEÍNA-C-REATIVA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, EM DOENTES DE HANSENÍASE E INDIVÍDUOS NORMAIS.**

TABELA IV - CONTAGENS POR MINUTO(CPM) E ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE DOENTES DE HANSENÍASE VIRCHOWIANA, EA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR).

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
ORDEM	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	2094	1,6	3339	2,6	3049	2,3
2	1858	1,2	2322	1,5	3094	2,0
3	4927	1,8	5443	2,0	6020	2,2
4	1257	1,4	1078	1,2	988	1,1
5	1210	1,0	1196	1,0	1227	1,1
6	1720	0,7	1573	0,5	1316	0,5
7	234	1,2	161	0,8	159	0,8
8	1536	0,7	1616	0,7	1074	0,5
9	1850	0,7	847	0,4	890	0,4
10	229	1,0	184	0,8	196	0,8
11	140	1,0	249	1,6	156	1,0
12	196	1,1	205	1,1	196	1,0
13	212	1,2	199	1,0	199	1,0

TABELA V - CONTAGENS POR MINUTO (CPM) E ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO(IE)DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE DOENTES DE HANSENÍASE TUBERCULÓIDE, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
ORDEM	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	3832	1,9	1974	1,0	1941	1,0
2	2275	1,0	2716	1,2	4074	1,8
3	1752	1,1	2018	1,3	1497	0,9
4	1246	0,6	1144	0,6	935	0,5
5	159	1,0	172	1,0	141	0,8
6	282	1,8	162	1,0	144	0,9
7	170	0,9	221	1,1	242	1,2
8	137	1,0	154	1,0	132	0,9
9	179	1,0	149	0,8	146	0,8
10	242	0,8	226	0,7	205	0,6
11	166	0,7	275	1,1	265	1,0
12	207	1,0	292	1,4	266	1,3
13	300	1,3	312	1,4	315	1,4

TABELA VI - CONTAGENS POR MINUTO(CPM) E INDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE INDIVÍDUOS NORMAIS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	4086	3,9	3490	3,4	2505	2,4
2	2190	0,9	3155	1,3	2150	0,9
3	3598	1,1	4123	1,3	2636	0,8
4	2705	0,8	3476	1,0	2024	0,6
5	985	0,4	1617	0,6	2069	0,8
6	1712	1,0	1935	1,1	1984	1,2
7	1508	0,8	2244	1,1	1046	0,5
8	140	0,8	189	1,1	136	0,8
9	239	0,9	276	1,0	276	1,0

## **9. Experimento Dose-Resposta para Determinação da Concentração de Fitohemaglutinina (PHA) e ConcanavalinaA a Ser Utilizada nas Culturas**

Foi realizado o experimento com doses variadas dos mitógenos fitohemaglutinina e concanavalina-A com o objetivo de verificar a dose ideal estimulatória da biastogênese. Colheu-se o sangue de dois indivíduos normais, como descrito anteriormente.

Após a separação dos linfócitos, seguindo toda metodologia descrita no item 7.2.1., foram preparadas culturas triplicatas (0,2 ml cada) seguindo o protocolo:

A - Culturas Controles:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos

B - Culturas PHA<sub>1</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA 2,0 µg/ml

C - Culturas PHA<sub>2</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA 5,0 µg/ml

D - Culturas PHA<sub>3</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA 10,0 µg/ml

E - Culturas PHA<sub>4</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PHA 20,0 µg/ml

F - Culturas PHA<sub>5</sub>:  $2,5 \times 10^5$  linfócitos + PI IA 100,0 µg/ml



G - Culturas ConA<sub>1</sub> 2,5x10<sup>5</sup> linfócitos + ConA 1,0 µg/ml

H - Culturas ConA<sub>2</sub> 2,5x10<sup>5</sup> linfócitos + ConA 2,0 µg/ml

I - Culturas ConA<sub>3</sub> 2,5x10<sup>5</sup> linfócitos + ConA 5,0 µg/ml

J - Culturas ConA<sub>4</sub> 2,5x10<sup>5</sup> linfócitos + ConA 10,0 µg/ml

L - Culturas ConA<sub>5</sub> 2,5x10<sup>5</sup> linfócitos + ConA 25,0 µg/ml

O experimento foi desenvolvido em placas para cultura de células (Corning) que foram fechadas e incubadas a 37°C, em ambiente úmido e com CO<sub>2</sub> à concentração aproximada de 5%, durante 3 dias.

Dezesseis horas antes do término do período de incubação das células adicionou-se 3H timidina.

Os resultados foram avaliados pela contagem de radioatividade em espectômetro de cintilação líquida.

Os resultados em cpm e os respectivos índices de estimulação encontram-se na Tabela VII.

TABELA VII - RESULTADOS EM CPM E RESPECTIVOS ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE INDIVÍDUOS NORMAIS, ESTIMULADA PELOS MITÓGENOS FITOHEMAGLUTININA E CONCANAVALINA-A.

Culturas	DOADOR *1		DOADOR 2	
	cpm	IE	cpm	IE
Controle	190,5		235,6	
PHA 2,0 µg/ml	2247,8	11,8	978,8	4,2
PHA 5,0 µg/ml	3366,3	17,7	1785,6	7,6
PHA 10,0 µg/ml	4598,1	24,1	1472,2	6,2
PHA 20,0 µg/ml	5218,3	27,4	1733,5	7,4*
PHA 100,0 µg/ml	2831,8	14,9	1067,1	4,5
ConA 1,0 µg/ml	486,4	2,6	328,5	1,4
ConA 2,0 µg/ml	1173,7	6,2	463,3	2,0
ConA 5,0 µg/ml	2060,8	10,8	780,4	3,3
ConA 10,0 µg/ml	3566,5	18,7	1420,0	6,0*
ConA 25,0 µg/ml	3565,1	16,7	960,3	4,1

Observando os resultados nota-se que nas condições do experimento os mitógenos PHA e ConA apresentam maior atividade linfoproliferativa nas

concentrações de 20,0 µg/ml e 10,0 µg/ml, respectivamente.

Deste modo, utilizaram-se as concentrações de PHA-20 µg/ml e ConA 10,0 µg/ml, no desenvolvimento do projeto.

## **10. Análise Estatística**

Para analisar os resultados do experimento dose-resposta utilizou-se o Teste de Friedman.

Os resultados da biastogênese de linfócitos, dos três grupos estudados, sob os mitógenos PHA e ConA, na presença ou ausência de PCR, foram avaliados pelo método de Wilcoxon.

Na avaliação dos níveis de PCR no soro e da resposta biastogênica de doentes com reação e sem reação hansênica utilizou-se o método de Mann Whitney.

Estudou-se a correlação entre resultados da linfoproliferação e concentrações de PCR, e das concentrações séricas de TNF e PCR, pelo do coeficiente de correlação(r) de Spearman.