

3. Material e Métodos

3 — MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Material

3.1.1- Pacientes

Os inóculos foram preparados a partir de lesões de três pacientes com HV e baciloscopia positiva, selecionados pelo corpo clínico do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, SP.

A classificação da forma clínica foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo Congresso Internacional de Madri, 1953. Os pacientes selecionados deram sua autorização para participar do estudo e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética Médica sob nº 29/97CEM.

Um dos pacientes identificado como **NT₁**(não tratado-1), masculino, branco, com 23 anos de idade era portador de HV ativa em progressão e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **NT₁**, antes do início do tratamento. O IB foi de 6+ e o índice morfológico (IM) 1%.

Um outro paciente identificado como **NT₂** (não tratado-2), masculino, branco, com 65 anos de idade era portador de HV ativa em progressão e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **NT₂**, antes do início do tratamento. O IB foi de 5+ e o IM 0,5%.

O terceiro paciente, identificado como **T** (tratado), masculino, branco, com 20 anos de idade era portador de HV em regressão, sob quimioterapia com Ofloxacim e Rifampicina, há cerca de 30 dias, e reação de Mitsuda negativa; dele foi preparado o inóculo **T**. O IB foi de 6+ e o IM 0,5%.

3.1.2- Animais

Foram utilizados 80 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos com aproximadamente dois meses e peso corpóreo entre 90 - 120 gramas. Durante o período de experimentação foram mantidos em temperatura ambiente, alojados em caixas plásticas apropriadas, recebendo ração comercial e água à vontade.

3.2- Métodos

3.2.1- Preparo dos Inóculos **NT₁** **NT₂** e **T**

Os inóculos **NT₁** e **NT₂** de dois pacientes não tratados e o inóculo **T** de um paciente em tratamento foram preparados a partir dos tecidos obtidos dos seus hansenomas, por biópsia com *punch* de 5,0 mm de diâmetro. Esse material foi processado segundo técnica proposta pela World Health Organization (WHO, 1987) com pequenas modificações, como segue, resumidamente: após retirada da epiderme, o tecido dérmico foi recortado com tesoura e homogeneizado em 1,0 ml de solução salina estéril a 0,85% (SSE) em triturador de tecido tipo Potter-Elverjhem e em seguida, foi filtrado em gaze de *nylon* obtendo-se a suspensão de bacilos. A seguir foi determinada a concentração bacilar e o material foi dividido em duas alíquotas, das quais uma foi utilizada para determinar a identificação do *M. leprae* e a outra, para inoculação dos animais dos grupos experimentais, o que ocorreu imediatamente após o preparo dos inóculos.

3.2.2- Determinação da Concentração Bacilar

Foi usada a metodologia proposta por Shepard (1960). Assim, em lâmina de vidro com três círculos de 1,0 cm de diâmetro foram espalhados 20 μ l da suspensão de bacilos em cada círculo; o material foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos e corado pela técnica de Ziehl- Neelsen. A seguir calculou-se a concentração dos *M. leprae* existentes na amostra, contando o número de bacilos em 20 campos microscópicos para cada círculo; para tanto examinou-se em zig-zag, toda a área de cada um dos círculos impressos na lâmina. O número total de bacilos dos três círculos foi somado dividido pela somatória dos campos microscópicos (60) e multiplicado pelo fator do microscópio 415754. O fator 415754 correspondeu à relação da área do círculo/área da abertura da objetiva.

3.2.3- Identificação do *Mycobacterium leprae*

Para identificação do *M. leprae* foram utilizadas técnicas de cultivo e de inoculação em coxim plantar de camundongos para afastar qualquer possibilidade de contaminação do inóculo com outras micobactérias. Esses procedimentos são utilizados rotineiramente para

identificação de *M. leprae*, cuja característica principal é o não crescimento *in vitro*, e a multiplicação limitada no coxim plantar após seis meses p.i.

Para o cultivo foi utilizada uma alíquota de cada tipo do inóculo NT₁, NT₂ e T, semeada em meio Lowenstein Jensen a 30^o C e 37^o C; uma outra alíquota foi semeada em meio de Middlebrook 7H11 a 37^o C (David et al., 1994) efetuada em dois tempos, da seguinte forma: o primeiro tempo é de descontaminação parcial de bactérias; em tubo de ensaio de vidro, adicionaram-se 0,5 ml de hidróxido de sódio a 4% com vermelho fenol como indicador e 0,5 ml da amostra. Após vigorosa agitação incubou-se em estufa a 37^o C por 15 minutos. A seguir, a amostra foi centrifugada a 3000 r.p.m. por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi totalmente descontaminado gotejando-se ácido clorídrico a 4% até a viragem de cor para o amarelo e, em seguida foi neutralizado gotejando-se uma solução de sulfato de alumínio e potássio. a 0,4% com vermelho fenol como indicador, até a viragem da cor para o rosa; esse procedimento visou equilibrar o pH da amostra com o do meio de cultura. No segundo tempo, o material foi semeado no meio Middlebrook 7H11 a 37^o C e observado semanalmente por seis a oito semanas. O resultado dos cultivos após esse período foi negativo.

Para identificação da micobactéria através da inoculação em coxim plantar, foram usados cinco camundongos BALB/c inoculados com $1,0 \times 10^4$ *M. leprae*/0,03ml; após seis meses os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico e o tecido obtido do coxim plantar foi processado conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. A concentração de bacilos no grupo **NT₁** foi de $7,47 \times 10^4$ *M. leprae*/ ml e no grupo **T** foi de $6,45 \times 10^4$ *M. Ieprae*/ml.

3.2.4- Inoculação em Hamsters para Estudo Morfológico

Para a realização do estudo das lesões os hamsters foram divididos em três grupos experimentais denominados G1, G2, e G3 com 30, 30 e 12 animais respectivamente (Tabela 1).

Os animais dos grupos G1 e G2 foram inoculados no segmento distal da bolsa jugal com inóculos NT₁ e **T** respectivamente e os do grupo G3 foram inoculados no coxim plantar com o inóculo **NT1**. Para inoculação na bolsa jugal, os animais foram anestesiados com solução Tiopental sódico (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda), diluída a 20 mg/ml, na dose de 40mg/kg de peso corpóreo, por via intraperitoneal. A seguir, foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e, o acesso à porção distal foi obtido pela eversão da bolsa jugal direita,

com auxílio de uma pinça. Logo após a inoculação, a bolsa foi recolocada na posição inicial e, os animais foram devidamente identificados e assistidos até que se recuperassem da anestesia. Depois foram observados até o final dos períodos experimentais.

3.2.4.1 Grupo Experimental 1 (G1)

Trinta hamsters receberam inóculo **NT₁** com 0,1 ml da suspensão de $6,0 \times 10^8$ *M. leprae/ml* no tecido subepitelial do segmento distal da bolsa jugal direita. Lotes de cinco animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. Bolsas jugais de todos os hamsters foram processadas para microscopia óptica.

3.2.4.2 Grupo Experimental 2 (G2)

Trinta hamsters receberam inóculo **T** com 0,1 ml da suspensão de $6,0 \times 10^8$ *M. leprae/ml* no tecido subepitelial da porção distal da bolsa jugal direita. Lotes de cinco animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. As bolsas jugais de todos os hamsters foram processadas para microscopia óptica.

3.2.4.3 Grupo Experimental (G3)

Doze hamsters receberam inóculo **NT₁** com 0,1 ml da suspensão de $6,0 \times 10^8$ *M. leprae*/ml, no coxim plantar da pata posterior esquerda. Lotes de dois animais foram sacrificados às 20 e 48 horas e aos 7, 14, 21 e 28 dias p.i. O coxim plantar coletado foi processado para microscopia óptica.

3.2.5- Teste de Recuperação Bacilar

3.2.5.1 Grupo Experimental 4 (G4) e Camundongos

Oito hamsters receberam inóculo **NT₂ com 0,1** ml da suspensão de $3,4 \times 10^9$ *M. leprae*/ml no tecido subepitelial do segmento distal da bolsa jugal direita. Lotes de dois animais foram sacrificados aos 7,14,21 e 28 dias p.i e as lesões de inoculação das bolsas jugais foram processadas como em 3.2.1 e 3.2.2 para a obtenção da suspensão de bacilos.

Essas suspensões foram utilizadas para reinoculação no coxim plantar de cinco camundongos BALB/c na dose $1,0 \times 10^4$ *M. leprae*/0,03 ml por lote de hamster.

Esses camundongos foram todos sacrificados seis meses p.i e as lesões dos tecidos dos coxins plantares inoculados foram processados também como em 3.2.1 e 3.2.2 para testes de recuperação bacilar.

Tabela 1 - Distribuição dos animais inoculados com *M. leprae* segundo o grupo experimental, via de inoculação, tipo do inóculo, número de animais /lote e destino dos fragmentos teciduais.

Grupos	Via	Inóculo	N.º/Lote	M.O	TRb
G1 (n=30)	BJ	NT ₁	5	5	-
G2 (n=30)	BJ	T	5	5	-
G3 (n=12)	CP	NT ₁	2	2	-
G4 (n=8)	BJ	NT ₂	2	-	8

BJ= bolsa jugal

CP= coxim plantar

n.º/lote= número de animais sacrificados/ lote

MO= número de animais destinados à microscopia óptica/lote

TRb= teste de recuperação bacilar

3.3- Sacrifício e Coleta de Materiais

Os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram sacrificados por inalação com éter etílico comercial, em jarra de anaerobiose, através de plano anestésico profundo levando à depressão do sistema nervoso central.

Constatada a morte do animal, a bolsa jugal foi evertida e a lesão de inoculação do segmento distal coletada e fixada em formalina a 10%, exceto o grupo G4 já descrito em 3.2.5.

A pata posterior esquerda dos animais (G3), foi seccionada ao nível das articulações, separando-se o tecido do coxim plantar *que* foi fixado em formalina a 10%.

3.4- Análise Microscópica

Secções histológicas com espessura aproximada de 4 μ m, foram coradas pela HE e Faraco-Fite (1938). As lâminas analisadas foram documentadas no fotomicroscópio Olympus Vanox AHB53 .

3.4.1- Determinação do Índice Baciloscópico

A análise histológica incluiu a determinação do IB, que representou a média estimativa da população bacteriana da amostra. Nesse estudo, a avaliação foi realizada de acordo com a escala logarítmica proposta por Ridley & Nilson (1967). O número de bacilos presentes foi determinado conforme quadro abaixo.

Quadro 1: Escala para Avaliação do Índice Baciloscópico.

IB= 0 (não há bacilos em 100 campos examinados)
IB= 1+ (1-10 bacilos em cada 100 campos examinados)
IB= 2+ (1-10 bacilos em cada 10 campos examinados)
IB= 3+ (1-10 bacilos em cada campo examinado)
IB= 4+ (10-100 bacilos em cada campo examinado)
IB= 5+ (100-1000 bacilos em cada campo examinado)
IB= 6+ (mais, de 1000 bacilos em cada campo examinado)

3.4.2- Determinação do Índice Morfológico

A análise histológica também incluiu a determinação do IM, conforme metodologia descrita por Leiker & McDougall (1987). O IM representou o percentual de bacilos intensa e uniformemente corados e morfológicamente íntegros em relação ao total de bacilos examinados, presentes nos cortes histológicos. Aqueles íntegros foram denominados de sólidos e considerados viáveis. Os demais bacilos, que evidenciaram falhas na coloração, representadas por zonas transversais descoradas mesmo apresentando a maior parte do seu organismo bem corada, foram denominados fragmentados e considerados não viáveis. Os bacilos fragmentados que evidenciavam muitas zonas transversais descoradas foram denominados granuloso e, também considerados não viáveis.