

UNIVERSIDADE FLUMINENSE CENTRO DE
CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Jo Yoshikuni Osugue

DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE *PAUCIBACILAR* PELA
TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Niterói -RJ
2000

Jo Yoshikuni Osugue

DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE *PAUCIBACILAR* PELA
TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal
Fluminense, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutor. Área de
concentração: Anatomia Patológica

Orientadora: Prof. Dr.a Ana Maria Nunes Mendonça — UFF

Co-Orientador: Prof. Assoc. Dr. Mario Hiroyuki Hirata — USP

Niterói -RJ
2000

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Osugue, Jo Yoshikuni

Diagnóstico de hanseníase paucibacilar pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) / Jo Yoshikuni Osugue - Niterói - 2000

(),2000

Tese (Doutorado em Patologia) — Universidade Federal Fluminense, 2000

Bibliografia: p.

1- Diagnóstico de hanseníase pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) 2- Hanseníase. 3- Diagnóstico histopatológico. 4- Mycobacterium leprae. 5- Extração de DNA. 6- Biopsia cutânea

CDD

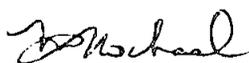
Jo Yoshikuni Osugue

DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE PAUCIBACILAR PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de concentração: Anatomia Patológica

Aprovado em 17/11/2000.

BANCA EXAMINADORA



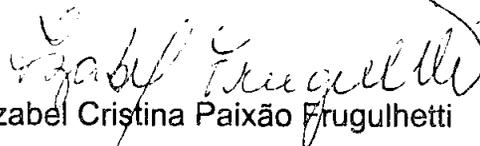
Prof^o. Dr. (a) Mayra Carrijo Rochoael



Prof^o. Dr. (a) Rosario Domingues Crespo Hirata



Prof^o. Dr. (a) Selma Margareth Bacellar de Souza Leão



Prof^o. Dr. (a) Izabel Cristina Paixão Frugulhetti



Prof^o. Dr. (a) Fernando Monteiro Aarestrup

Niterói— RJ
2000

Esta dissertação foi desenvolvida com o apoio de:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico —
CNPq.

Universidade Federal Fluminense — UFF

Universidade de São Paulo — USP - SP

Fundação Educacional Dom André Arcoverde. FAA — Valença — RJ

À Deus

À memória da minha mãe Kuniko.

Ao meu pai Yoshio.

Aos meus irmãos e tios.

À família Miyazato.

À minha esposa Saeko.

Aos meus filhos: André, Raphael e Gustavo.

AGRADECIMENTOS

A Professora Ana Maria Nunes Mendonça, pela orientação segura e incansável nas correções e sugestões de modo crítico. Quero expressar a minha profunda gratidão pela amizade e pelas horas dedicadas a mim e a este trabalho.

Ao Professor Mario Hiroyuki Hirata, co-orientador do trabalho, portador de um grande espírito humanístico, gentilmente colocou à disposição o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, permitindo o aprendizado e a execução da técnica da PCR.

A Professora Rosário Domingues Crespo Hirata, pela colaboração na execução das técnicas moleculares e que com espírito científico despreendido esteve presente nos momentos difíceis e de indecisão.

A Professora Miriam Dumas Hahn e à Professora Maria Eugênia Duarte, coordenadoras do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Presidente da Fundação Educacional D. André Arcoverde, Professor Dermeval Moura de Almeida Filho e ao Superintendente, Professor José Rogério Moura de Almeida Filho, pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Paschoal Martins Simões, diretor da Faculdade de Medicina de Valença e ao professor José Angel Mastache Astorgano, diretor do Hospital Escola 'Luiz Gioseffi Jannuzzi', pela oportunidade concedida em realizar este trabalho.

Ao Professor Cresus Vinicius Depes de Gouvêa, pela compreensão durante a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Constanti Ramos Garcia, responsável direto por este trabalho desde quando me disse: 'esta revista é para você', onde li um artigo sobre a PCR em micobacterioses.

Aos Professores e colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, pela convivência harmoniosa e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, pela atenção e colaboração na seleção do material utilizado neste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico que gentilmente me receberam, auxiliando e permitindo a utilização de suas dependências para realizar a PCR.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico: Andréia, Cecília, Cláudia, Dora, Fernanda, Hemerson, Heruih, Katlin, Luís Salazar, Márcia, Márcio, Marcos, Michelle, Neusa, Regina, Rosângela, Selma, Sílvio, Sung, Tatiana, Thais e Valéria, pela amizade e colaboração.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Escola "Luiz Gioseffi Jannuzzi" da Faculdade de Medicina de Valença: Cássia Lima Klinger e Luiz Fernando do Amaral, pelo incentivo. A Cláudia Cristina Cardoso e Marly Oliveira Cardoso da Fonseca, pela confecção das lâminas.

Ao Professor José Geraldo Rigotti de Faria, pela amizade, paciência e pela versão do resumo para o inglês.

A Professora Denise Augusto de Almeida, que apesar de enfrentar vários problemas nunca negou apoio e a colaboração sempre que solicitada.

Ao Professor Fernando Monteiro Aarestrup, ainda jovem mas com grande bagagem para a pesquisa, pela amizade e pelo incentivo.

Ao Professor Ataliba Macieira Bellizzi, que gentil e prontamente foi o responsável pela revisão ortográfica.

A Professora Tizuko Miyagui, pela convivência amiga, apoio constante e presença nas horas de dúvidas.

A Professora Vera Lúcia Lopes dos Reis, pelo espírito crítico, por acrescentar experiências e enriquecer o trabalho.

Aos amigos Alberto Wagner Delmondes Cabral, Shirley da Silva Oliveira e Regina di Sordi, do Laboratório de Biologia Molecular (Biomol), pela colaboração inestimável e incansável na realização deste trabalho.

Ao amigo de luta Maurício Ogueske, que acompanhou os meus primeiros passos no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico.

A Professora Suzanne Dasnoy Marinho, grande amiga por quem tenho grande admiração, foi uma das responsáveis pelo meu interesse em Anatomia Patológica e na minha formação profissional.

Ao Professor Bráulio Carlos Bezerra Filho, pela amizade, pelo convívio nos momentos inesquecíveis, com trocas contínuas de informações e críticas desde o início da minha vida profissional.

A Professora Rita Ifoue Kuribara da Silva, pela amizade e pelo exemplo profissional.

A bibliotecária Cidália Oliveira Carvalho de Mello e sua equipe, sempre dispostas a me atender com atenção.

A Adriana Ozaki e sua família, pela receptividade durante a minha permanência em São Paulo.

Ao amigo Silvério Teixeira dos Santos, pelo apoio técnico.

Ao amigo William Suzano, pelo companheirismo de longa data e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Manoel Barreto Neto "in memoriam", com saudades e a quem considero "mestre dos mestres".

Agradeço a todos, porventura não mencionados, que direta ou indiretamente, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	xii
Lista de gráficos.....	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de abreviaturas e siglas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1 - Introdução.....	1
2 - Revisão da literatura.....	2
2.1 - Considerações gerais sobre a hanseníase	2
2.2 - Diagnóstico clínico e histopatológico	8
2.3 - Métodos complementares de diagnóstico	13
2.4 - Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	17
3 - Objetivos	24
3.1 - Geral	24
3.2 - Específicos	24
4 - Material e métodos	25
4.1 - Material.....	25
4.2 - Métodos.....	26
4.2.1 - Preparo dos controles para emblocamento em parafina	26
4.2.2 - Preparo dos materiais e dos controles (CP e CN) para a PCR	27
4.2.3 -Quantificação dos ácidos nucléicos.....	29
4.2.4-Teste de inibidores dos controles	29
4.2.5 - PCR para amplificação do gênero <i>Mycobacterium</i>	30
4.2.6 - Teste de sensibilidade	31
4.2.7 - Teste de inibidores	34
4.2.8 - Análise Estatística	35
5 - Resultados	36
5.1 - Resultado do exame histopatológico em HE e Wade: perfil da amostra	37
5.2 - Resultado Global da PCR.....	41
5.3 - Resultado comparativo entre o método da PCR e Wade	42

5.4 - Documentação fotográfica dos produtos amplificados	51
5.5 - Resultado da sensibilidade da PCR	55
5.6 - Resultado do teste de inibidores	56
6 - Discussão	58
7 - Conclusões	68
8 - Referências bibliográficas	69
9 - Anexos	78
9. 1 - Materiais do SAP-UFF/Diagnóstico histopatológico em HE e Wade ..	79
9. 2 - Característica dos iniciadores " β -actina	84
9. 3 - Protocolo de Plikaytis, 1990	84
9. 4 - Protocolo de Richter, 1994 e 1995	85
9. 5 - Protocolo de Cook, 1994.....	86
9. 6 - Modificações dos protocolos	87
9. 7 - Análise comparativa entre os resultados de Wade e PCR	89
9. 8 - Materiais de consumo	92
9. 9 - Equipamentos	93
9.10 - Soluções de uso	93

LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Teste de inibidores dos controles	29
Tab. 2 - Primeira etapa da PCR para <i>Mycobacterium</i>	30
Tab. 3 - Segunda etapa da PCR para <i>Mycobacterium</i>	30
Tab. 4 - Digestão pela endonuclease de restrição Alu-1	31
Tab. 5 - Primeira etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR positiva	31
Tab. 6 - Segunda etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR positiva.....	32
Tab. 7 - Digestão pela endonuclease de restrição no teste de sensibilidade nas amostras com PCR positiva	32
Tab. 8 - Primeira etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras MB com PCR negativas	33
Tab. 9 Segunda etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras MB com PCR negativa	32
Tab. 10 - Digestão pela endonuclease de restrição no teste de sensibilidade nas amostras com PCR negativa.....	34
Tab. 11 - Teste de inibidores nas amostras com PCR positiva.....	34
Tab. 12 - Teste de inibidores das amostras MB com PCR negativa.....	35
Tab. 13 — Distribuição por sexo, faixa etária e cor.....	36
Tab. 14 - Resultado da sensibilidade das amostras com PCR positiva.	55
Tab. 15 - Resultado do teste de sensibilidade das amostras com PCR negativa	56
Tab. 16 - Resultado do teste de inibidores da PCR pela β -actina nas amostras com PCR positiva	56
Tab. 17-Resultado do teste de inibidores da PCR pela β -actin nos casos MB com PCR negativa	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência das formas clínico-histopatológicas da hanseníase	37
Gráfico 2 - Frequência dos casos de hanseníase PB e MB pela coloração de Wade.....	38
Gráfico 3 - Frequência das formas clínico-histopatológicas da hanseníase PB.....	39
Gráfico 4 - Frequência das formas clínico-histopatológicas da hanseníase MB...	40
Gráfico 5 - Resultado global da PCR nos casos de hanseníase.....	41
Gráfico 6 - Resultado da positividade entre o método da PCR e Wade	42
Gráfico 7 - Resultado da PCR na forma da hanseníase PB	43
Gráfico 8 - Resultado da PCR nas diversas formas da hanseníase PB	44
Gráfico 9 - Resultado comparativo entre a PCR e Wade na hanseníase PB	45
Gráfico 10 -Resultado da PCR na forma da hanseníase MB.....	46
Gráfico 11 -Resultado comparativo entre o método da PCR a Wade na forma da hanseníase MB.....	47
Gráfico 12 -Resultado da PCR nas diversas formas de MB	48
Gráfico 13 - Resultado da PCR nas formas da hanseníase PB e MB	49
Gráfico 14 - Resultado comparativo da PCR positiva e negativa nas diversas formas clínicas da hanseníase	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Resultado em gel de agarose a 1,5 % após separação eletroforética do produto da PCR pela "-actina amplificando fragmento de 304 pb 51
- Figura 2: Resultado em gel de agarose a 2 % após separação eletroforética obtendo fragmento de 310pb da primeira etapa da PCR..... 52
- Figura 3: Resultados em gel de agarose a 2 % após separação eletroforética do produto da segunda etapa da PCR amplificando fragmento de 133pb e após ação enzimática da Alu1, fragmento de 110pb53
- Figura 4: Resultado em gel de agarose a 2 % após separação eletroforética do produto da digestão enzimática com Alu1 no gene groEL específico para espécie *leprae* amplificando fragmento de 110pb 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

baar = bacilo álcool ácido resistente

"BD9" = tampão digestão "9"

BNF = formol tamponado 10%

CN = controle negativo

CP = controle positivo

CR = controle de reagentes

DNA = ácido desoxirribonuclêico

DNA-H = DNA genômico humano (extraído do sangue periférico)

dNTPs = deoxinucleotídeos trifosfatos

EN = eritema nodoso

EDTA = ácido etileno-diamino-tetra-acético

HCl = ácido clorídrico

HDD = hanseníase dimorfa dimorfa

HDT = hanseníase dimorfa tuberculóide

HE = hematoxilina-eosina

HI = hanseníase indeterminada

HT = hanseníase tuberculóide

HV = hanseníase virchowiana

IB = índice bacterioscópico kDa

= kilo dálton antígeno

MB = multibacilar

MH = hanseníase

MIX1 = mistura de reagentes 1

MIX2 = mistura de reagentes 2

MIX3 = mistura de reagentes 3

MIX4 = mistura de reagentes 4

MIX5 = mistura de reagentes 5

OMS = Organização Mundial da Saúde

PB = paucibacilar pb =

pares de base

PCR = reação em cadeia pela polimerase

PGA 1.5 = preparação de gel de agarose 1.5%

PGA 2 = preparação de gel de agarose 2%

PK = proteinase K

PTC1 = programação do termociclador 1

PTC2 = programação do termociclador 2

RNA = ácido ribonucleico

TA = temperatura ambiente

Taq = *Thermophilus aquaticus*

TBE = tris base, ácido bórico, EDTA

TC = tampão de corrida

TE = tris HCl, EDTA

UV = ultra-violeta

WHO= World Health Organization

RESUMO

O diagnóstico da hanseníase torna-se difícil sempre que os exames baciloscópico e histopatológico não mostram a presença do *Mycobacterium leprae*. Visando aprimorar o diagnóstico final, procurou-se encontrar na literatura alguns exames que viessem a contribuir para este objetivo. Dentre os métodos mais recentemente introduzidos para este fim, verificou-se que a técnica de biologia molecular da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido utilizada na detecção de vários microrganismos, destacando-se principalmente aqueles que ainda não são cultivados *in vitro* ou os que têm crescimento lento, como no caso do *Mycobacterium leprae*. Com o objetivo de padronizar este método da PCR e extração do DNA em material fixado em formol e incluído em parafina, foram utilizadas 128 amostras de lesões cutâneas de várias formas de hanseníase (73 paucibacilares e 55 multibacilares), procedentes do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense - RJ, todas obtidas de pacientes virgens de tratamento. Foram reexaminados todos os cortes histológicos corados pelos métodos HE e Wade e adotada a classificação de Ridley e Jopling, 1962. Foram utilizados, respectivamente, fragmentos de lesão de pele com hanseníase virchowiana e fragmentos de pele normal, respectivamente, como controles positivo e negativo da reação de PCR. O protocolo utilizado para a PCR foi o de Cook et al., 1994, modificado, que amplificou o gene *groEL*. Para verificar a presença de inibidores para a PCR, utilizou-se o iniciador β -actina com o DNA humano extraído de leucócitos do sangue periférico. Obteve-se resultado de 85% de positividade nas lesões paucibacilares e 78% nas multibacilares. Os resultados indicam, portanto, que a PCR é um exame complementar importante a ser introduzido na rotina do diagnóstico da hanseníase, principalmente na sua forma paucibacilar.

ABSTRACT

The diagnosis of leprosy is usually difficult when the bacteriological and histological studies fail to demonstrate the presence of the *Mycobacterium leprae*. A literature search was carried out in order to find methods that could refine the final diagnosis. Among the methods described, the genetic amplification technique with the polymerase chain reaction (PCR) has been used to identify a great variety of microorganisms, specially those that cannot be cultured "in vitro" or those which have slow-growth, such as *Mycobacterium leprae*. In order to standardize this PCR and DNA extraction method using formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, 128 samples of skin lesions from previously untreated patients with several forms of leprosy (73 paucibacillary and 55 multibacillary), from the files of the Anatomic Pathology Laboratory of the Hospital Universitário Antônio Pedro of the Universidade Federal Fluminense, were studied. All the slides with HE and Wade staining were examined again and Ridley and Jopling's (1962) classification was used. We used, respectively, fragments of lepromatous leprosy skin lesion and fragments of normal skin, as positive and negative controls for the PCR method. Modified Cook's (1994) PCR protocol was used with amplification of groEL gene. β -actin initiator with human DNA extracted from peripheral blood leucocytes was to check for the presence of PCR inhibitors. A satisfactory result with 85% positivity in paucibacillary lesions and 78% in multibacillary was obtained. Our data indicate that PCR is an important tool in the work-up of leprosy, mainly in its paucibacillary presentation.

1-INTRODUÇÃO

Observa-se na rotina do Laboratório de Anatomia Patológica, dificuldades no diagnóstico da hanseníase, principalmente naqueles materiais onde não são encontrados os bacilos álcool ácido resistentes (baar).

Em alguns casos o diagnóstico histopatológico é de compatibilidade e com isso, o diagnóstico final é feito pela correlação entre a clínica, o exame histopatológico, a baciloscopia e a reação imunológica do paciente.

A hanseníase é uma doença deformante e estigmatizante quando não tratada e por isso merece o diagnóstico correto e preciso, evitando-se assim que tratamentos inadequados resultem em consequências físicas, morais e sociais graves.

Três décadas de convivência com esta problemática, nos sensibilizou e fez com que buscássemos outros métodos que permitissem o diagnóstico mais preciso da doença. Este pensamento é também corroborado por um autor desconhecido que deixou escrito: "se quiseres diagnosticar uma doença sem o elemento comprobatório, erras e errarás sempre".

Ao consultar a bibliografia, encontrou-se pesquisas sobre a aplicação da reação em cadeia pela polimerase no diagnóstico das doenças provocadas por microorganismos. Nestes estudos, foram enfatizados a alta taxa de positividade proporcionada pelo uso desta reação, mesmo diante de uma quantidade mínima do agente.

A perspectiva da aplicabilidade desta técnica e a possibilidade de se utilizar este método em amostras em parafina, motivou este trabalho.

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Considerações gerais sobre a hanseníase

A hanseníase é uma doença secular, tendo recebido várias denominações: "morféia", "mal da pele", "mal do sangue", "doença lasarina". "lepra", cuja época exata do aparecimento não é bem conhecida. Os relatos mais antigos que existem sobre a doença datam de 1.100 a.C. na China, 4.266 a.C. no Egito e nos Livros Sagrados da Índia de 500 a 2.000 a.C. (Gay Prieto, 1971).

As antigas civilizações da China, do Egito e da Índia consideravam a doença como uma punição e os doentes eram obrigados a usar trajes especiais que permitissem o seu reconhecimento à longa distância e, também eram expulsos da sociedade. Estas atitudes bárbaras associadas às deformidades e mutilações que a doença provocava, geraram o preconceito e a discriminação que persiste até os dias de hoje.

No Brasil também o preconceito não foi diferente. O "Jornal do Comércio" do Rio de Janeiro, de 16 de novembro de 1840 anunciava a venda de um escravo com "morféia" por 100\$000, enquanto que um escravo sadio valia cerca de 1.880\$000 (Santos Filho, 1977).

Devido ao preconceito e a discriminação, o termo "lepra" e seus derivados caiu em desuso no Brasil, por força da lei nº 9.010 de 29/03/1995 e Rotberg, em 1977 propôs o termo "Mal de Hansen" (MH) , e "hanseníase" para substituição da estigmatizante lepra .

Os primeiros casos de hanseníase no Brasil datam do ano de 1600 na cidade do Rio de Janeiro possivelmente introduzidas pelos portugueses e africanos doentes (Fernando Terra, 1926). Uma vez chegada, a doença propagou-se de tal maneira que no século XVII já era endêmica em certos

estados como Minas Gerais, Espírito Santo, Maranhão e São Paulo.

Em 1920, no Brasil, criou-se o Departamento Nacional de Saúde Pública onde se priorizou a instalação de leprosários e a realização do censo dos pacientes (Yamashita et al., 1996). Nesta época, surgiu o tratamento com o óleo de Chaulmôgra, utilizada na China e na Índia. No Brasil o emprego do Chaulmôgra era polêmico, alguns autores eram favoráveis, outros consideravam pouco útil aos doentes. Rotberg e Bechelli, em 1946 expuseram as suas experiências com o Chaulmôgra como ineficiente. Observaram que havia pouca melhora em pequeno número de doentes, o remédio não atuava nos pacientes virchowianos e a recidiva ocorria em 70% dos casos após dois anos do tratamento. Aqueles que apresentaram melhora eram os tuberculóides em reação, diagnosticados como virchowianos.

Na década de 1940 Cochrane introduz a sulfonoterapia, no tratamento da hanseníase que modificou de modo substancial o quadro da doença em relação ao contágio, a profilaxia e a evolução da doença nos pacientes com a reação de lepromina negativa. Embora não constitua o medicamento ideal, as sulfonas permitiram mudar a situação da doença em relação à transmissão, melhorando as lesões das formas graves da doença e evitando que os pacientes com reação lepronima negativa evoluíssem para os formas virchowianas. No Brasil, Souza Lima, 1948 foi um dos pioneiros a empregar a sulfonoterapia.

Aproximadamente após um período de 20 anos da introdução da sulfonoterapia, observaram-se casos de resistência às sulfonas, possivelmente devido as baixas doses do medicamento, à irregularidade do tratamento ou às mutações do bacilo (Bechelli e Curban, 1988).

A partir de 1986, a Organização Mundial da Saúde - OMS (Brasil — MS, 1994) adota o esquema de poliquimioterapia, associando às sulfonas. outras drogas bactericidas e bacteriostáticas, utilizadas atualmente com administração de doses supervisionadas, para o controle da endemia (WHO, 1995).

O Brasil é considerado pela OMS o segundo país com maior número absoluto de casos, sendo responsável por 85% dos casos das Américas. A taxa de prevalência registrada em 1998 foi de 4,9/10.000 habitantes, variando de 0,53 / 10.000 habitantes no Rio Grande do Sul a 17,39 /10.000 habitantes na Amazônia. A proposta da OMS é alcançar uma taxa de prevalência de menos de 1 doente /

10.000 habitantes e assim eliminar a hanseníase como problema de Saúde Pública. (Brasil-M.S., 1999).

A hanseníase é uma doença infecciosa de curso crônico causada pelo *Mycobacterium leprae* descoberto pelo cientista norueguês Gerhard Henryk Armauer Hansen em 1873, razão pela qual é denominado de bacilo de Hansen e é considerada como a primeira bactéria patógena para o homem (Lombardi et al., 1990). Pertence a família *Mycobacteriaceae*, Ordem *Actinomycetales*, Classe *Schizomycetes*, Gênero *Mycobacterium* e espécie *leprae*. (Sampaio e Rivitti, 2000).

Os bacilos apresentam-se em forma de bastonetes, que se coram em vermelho pelos métodos de Ziehl-Neelsen-Faraco (1882) e Wade (variante do método de Faraco, 1938) e são bacilos álcool ácido resistentes (baar). Apresentam-se isolados ou aglomerados em forma de "globias" (dispostos paralelamente como cigarros em um maço) sendo o único bacilo a apresentar este tipo de disposição. A união entre eles é determinada por uma substância gelatinosa, não corável, denominada de gléia, estudada também por Neves, em 1977.

O *M. leprae* é um microorganismo intracelular obrigatório, que se aloja nos fagolisossomas das células do sistema mononuclear fagocitário, nas células de Schwann e nas células endoteliais. Mede de 1 a 81.1m de comprimento e 0,3µm de largura. A microscopia eletrônica verifica-se que a sua parede apresenta duas camadas, uma interna eletrodensa; a outra externa eletrotransparente e abaixo desta uma membrana plasmática. A camada eletrotransparente que corresponde a cápsula é constituída de dois lipídios: o dimicocerosato de ftiocerol e o outro glicolipídico fenólico (PGL1) que contém um grupamento trissacarídico específico do *M. leprae*. Entre os constituintes do citoplasma existe a enzima difenil oxidase, específica da espécie, e capaz de oxidar o isômero D da dihidroxifenilalanina, sendo a única micobactéria patogênica a apresentar a atividade dopa-oxidase. É através do PGL1 capsular, que se liga ao componente C3 do complemento, e facilita a fagocitose do bacilo pelas células do sistema mononuclear fagocitário através dos receptores CR1, CR3 e CR4 em suas superfícies celulares (Miller, 1998). Após a fagocitose pelas células macrofágicas, duas situações podem ocorrer: se o indivíduo for imunorresistente (fator de resistência natural específica), as células do sistema mononuclear fagocitário digerem os bacilos e

as células fagocitárias transformam-se em células epitelióides; se ao contrário, o paciente for do grupo não resistente, os bacilos causam lise celular parcial e multiplicam-se no interior das células fagocitárias, as quais tornam-se engurgitadas e espumosas. São as células de Virchow, descritas por Virchow, em 1858.

O estudo da relação entre o bacilo e a resposta imune do hospedeiro surge a partir de 1923 quando Mitsuda introduziu a intradermoreação que avalia a hipersensibilidade tardia específica nos pacientes. Baseada na intensidade desta reação, os pacientes foram classificados em imunopositivos e imunonegativos. O número de lesões e a forma da doença depende da resistência ou da imunidade específica do paciente; quanto maior a resistência, menor o número de lesões de forma circunscrita e assimétricas; enquanto que para uma menor resistência há inúmeras lesões disseminadas e simétricas (Rabello e Fraga, 1970).

A transmissão da hanseníase ocorre principalmente pelos doentes bacilíferos não tratados que eliminam os bacilos pelas vias aéreas superiores durante a convivência domiciliar. Quanto mais íntimo e prolongado for o contacto, maior será a possibilidade de contrair a infecção (Shepar, 1962; Schaffer, 1989). Outra forma de contágio pode ser pelos hansenomas ulcerados e o contacto com a pele erodada; contestada por uns e defendida por outros (Talhari e Neves, 1997).

Job et al., em 1994, observaram que alguns animais apresentavam vários espinhos incrustados nas orelhas, narinas, nas patas e sugeriram a possibilidade do contágio da hanseníase ocorrer por estas vias de inoculação. Inocularam espinhos de cactus infectados com *M. leprae* nas patas de camundongos que foram sacrificados e necropsiados após 15 a 17 meses. A análise histopatológica revelou células virchowianas disseminadas em vários órgãos. Diante destes achados, acredita-se que a transmissão possa ocorrer através da solução de continuidade da região plantar, num país onde muitas pessoas caminham descalças. Como o tempo de incubação da hanseníase é longo, os pacientes não associam pequenas lesões ocorridas nos pés com o aparecimento da doença.

As vias de eliminação dos bacilos, além das vias aéreas superiores e da pele erodada, são pela urina, fezes, suor, secreções vaginais e esperma. O bacilo de Hansen permanece viável no meio ambiente de 36 horas a 9 dias em

condições favoráveis de temperatura (em torno de 36,7°C) e com umidade média de 77,6%, tendo preferência pelas áreas mais frias do corpo. (Sampaio e Rivitti, 2000)

Quanto à influência de fatores ambientais na transmissão da doença, tem-se descrito que é uma endemia, só existente nos países tropicais, coincidindo com o subdesenvolvimento, cuja pobreza configura-se como fator de risco. Entretanto não se sabe da importância do estado nutricional, aglomeração domiciliar ou presença de outras doenças concomitantes no desencadeamento da hanseníase. Porém, é fundamental a interação entre os fatores intrínsecos do indivíduo (susceptibilidade genética) e os fatores ambientais. O mecanismo da resistência genética da população ainda é desconhecida e aproximadamente cerca de 90% da população não desenvolve a doença. O bacilo de Hansen apesar de alta infectabilidade possui baixa patogenicidade e virulência. (Rabello e Fraga, 1970).

Até recentemente, acreditava-se que a doença era exclusiva na espécie humana, mas há relatos de achados dessas micobactérias nos musgos da Costa de Marfim e da Noruega, e em tatus e macacos naturalmente infectados (Sampaio e Rivitti, 2000).

Em 1960, Shepard relatou a multiplicação do *M.leprae* utilizando coxim da pata de camundongo. Posteriormente, Kirchheimer e Storrs (1971) publicaram os resultados da inoculação experimental do bacilo em tatu (*Dasypus novencinctus*), produzindo lesões semelhantes às do homem. No Brasil, até o momento não se tem relatos de animais selvagens infectados.

Classificação

Um dos pioneiros a estabelecer o conceito de polaridade da doença foi Rabello, em 1937. Fundamentado no número de bacilos, grau de resistência do hospedeiro e na estrutura histológica, classificou numa extremidade o pólo imunopositivo - hanseníase tuberculóide (HT), com tendência a fazer lesões localizadas, poucos bacilos e histologicamente, presença de células epitelióides no seio dos granulomas. Na outra extremidade, o pólo imunonegativo - hanseníase virchowiana (HV), com tendência à difusão das lesões distribuídas simetricamente, com abundância de bacilos e presença de histiócitos grandes e vacuolados (hansenócitos). Quebrando esta dualidade, o autor admitia a forma

instável - hanseníase indeterminada (HI), com tendência a evoluir para um dos pólos. Logo a seguir acrescentou ao esquema tripartida, a variante "dimorfa" (HD), descrita por Wade e Rodrigues em 1940, como forma interpolar. Esta classificação foi reconhecida no Congresso de Leprologia de Madri, em 1953 (Madri Congress, 1953). Portanto, segundo Rabello (1970), "a hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de curso crônico, determinada por um bacilo de baixo poder patogênico — o *Mycobacterium leprae*. São frequentes os estados de infecção subclínicas, e, igualmente freqüentes as formas benignas. É uma doença que afeta predominantemente pele e nervos, mas também pode comprometer os órgãos sistêmicos. As manifestações clínicas e anátomo-clínicas, dependem muito mais das reações desencadeadas pelo hospedeiro do que pela capacidade de penetração e multiplicação dos bacilos". (Rabello e Fraga, 1970)

Hoje, a classificação proposta por Ridley e Jopling (1962) é adotada mundialmente e se baseia no espectro imunológico do paciente em relação ao *M. leprae*. São definidos cinco grupos espectrais da doença, de acordo com a ordem decrescente da resposta imune. As formas polares de Rabello (1937) foram mantidas: HT no extremo imunopositivo e HV no extremo imunonegativo. Entre estas formas, o grupo central instável, imunologicamente variável: hanseníase dimorfa-tuberculóide (HOT); hanseníase dimorfa-dimorfa (HDD) e hanseníase dimorfa-virchowiana (HDV).

Ridley e Waters, em 1969 propuseram uma subdivisão da HV: casos definidos de HV desde o início da doença, que denominaram HV polar (HVp) e outros com evolução de HDD para HV e que denominaram de HV subpolar (HVs). Não incluídos no espectro, os autores consideram um grupo indeterminado (HI), como forma inicial ou lesão recente da doença, que ainda não se polarizou.

Para fins operacionais, visando o emprego da poliquimioterapia a OMS, (Brasil - MS, 1994) vem adotando uma classificação baseada na baciloscopia e no número de lesões. Segundo esse critério, a hanseníase é classificada em paucibacilar (PB) e em multibacilar (MB). No grupo PB encontram-se, os pacientes com baciloscopia negativa e com menos de cinco lesões cutâneas (HI, HT e a grande maioria de HOT). No grupo MB encontram-se aqueles pacientes que apresentam baciloscopia positiva ou mais de cinco lesões (alguns casos de HOT, HDD, HDV e HV).

No curso natural da doença e frequentemente durante a sua regressão, com o uso da poliquimioterapia surgem episódios inflamatórios agudos, de origem imunológica, denominados de reação hansênica. Estes episódios são classificados em reação tipo 1 (Jopling, 1959) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico, descrito, em 1912, por Murata.

2.2 - Diagnóstico clínico e histopatológico

Existe uma estreita relação entre as manifestações clínicas da hanseníase e as alterações histopatológicas encontradas nos tecidos, motivo pelo qual é interessante a análise em conjunto.

Os cortes histológicos já descrito por Portugal em 1947 devem ser submetidos a coloração pela hematoxilina-eosina (HE) — (Michalany, 1980) para o estudo morfológico das células e pela coloração específica para baar (Wade ou similar) (Michalany, 1980). A correlação anátomo/clínica/laboratorial e imunológica é importante e decisiva no diagnóstico da hanseníase quando não se encontram os bacilos no material examinado (Ridley e Jopling, 1966). Recentemente diversos trabalhos vêm propondo o uso de métodos da Biologia Molecular com a finalidade de investigar a presença do DNA do *M. leprae* em pacientes com ausência de bacilos no material examinado da linfa e da pele, mas com suspeita clínica de hanseníase. (Yoon, et al., 1993; Richter et al., 1994; Santos et al., 1997)

Hanseníase Indeterminada: nesta fase, a lesão cutânea pode permanecer durante meses ou anos: Caracteriza-se por mancha hipocrômica ou levemente eritematosa com bordas imprecisas. Geralmente lesão única e quando múltiplas são assimétricas. Surge em qualquer área do tegumento, tendo preferência para as áreas cobertas do corpo. O comprometimento neural é discreto, acometendo geralmente um filete nervoso, que pode provocar discreta hipoestesia na lesão cutânea.

O **exame histopatológico** da lesão mostra a presença do infiltrado linfocitário não específico.

Ridley, em 1988, descreve três fases evolutivas na HI.

- Fase 1: os cortes histológicos da pele permanecem praticamente normais

- Fase 2: presença do infiltrado constituído por linfócitos e macrófagos envolvendo feixes nervosos, músculo eretor do pêlo, glândulas sudoríparas e seus ductos. As vezes há exocitose. Nesta fase, há possibilidade do encontro de raros bacilos nas áreas com infiltração linfo-histiocitária.

- Fase 3: formação granulomatosa, próxima aos feixes nervosos, ductos das glândulas sudoríparas, músculo eretor do pêlo. Os granulomas ainda não são totalmente completos, contém poucas células epitelióides e células gigantes solitárias. O encontro do baar é pouco frequente.

Fleury, em 1983, descreve como quadro histopatológico altamente sugestivo de hanseníase a presença de:

- Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário contornando ou penetrando nos filetes nervosos.
- Infiltrado inflamatório contornando filetes nervosos e desarranjo das células de Schwann ou delaminação do perineuro.
- Encontro de bacilos nos filetes nervosos, nos histiócitos ou em outras estruturas cutâneas.

Hanseníase tuberculóide: os portadores da forma HT já apresentam comprometimento neuro-cutâneo. As lesões cutâneas se apresentam em placas eritematosas, circunscritas, numulares ou anulares, delimitadas, com leve atrofia central e ligeira descamação; outras vezes, são lesões papulosas, assimétricas, hipo ou anestésicas-é anidróticas. Esta forma apresenta uma variante nodular infantil, geralmente lesão única, localizada frequentemente na face, antebraço, região glútea ou coxa, por vezes apresentando regressão espontânea. Esta forma de hanseníase foi descrita por Souza Campos, em 1937, como hanseníase nodular infantil. Outra variante é a forma neurítica pura, sem lesão cutânea (Jopling e Mc Dougall, 1991).

O exame histopatológico mostra granuloma tipo tuberculóide com células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, circundada por células epitelióides e contornada por halo denso constituído de linfócitos, entremeadas por fibras reticulares. Os granulomas se localizam ao nível das glândulas sudoríparas, e/ou no trajeto dos filetes nervosos, provocam erosão da camada basal e destruição das fibras neurais. O bacilo raramente é identificado nas estruturas neurais, mas o

encontro de restos de filetes nervosos no interior do granuloma tuberculóide sugere fortemente o diagnóstico de hanseníase.

Hanseníase dimorfa - tuberculóide: os pacientes apresentam lesões em grandes placas, bem delimitadas, de bordas irregulares e papulosas; lesões múltiplas com tendência à simetria, de crescimento centrifugo e com regressão na área central. Surgem também lesões satélites com comprometimento de vários troncos nervosos.

O **exame histopatológico** mostra granulomas do tipo interpolar, o infiltrado de linfócitos fazendo parte do granuloma, com algumas células gigantes do tipo Langhans. A predominância do granuloma em polar ou subpolar vai depender da tendência espectral para HT ou HDD. O granuloma é formado por células epitelióides imaturas, alguns macrófagos ativados e ausência de células epitelióides maduras. Pode ou não ser encontrado o baar.

Hanseníase dimorfa - dimorfa: as lesões são em placas extensas, por vezes cobrindo grande área do tronco ou do membro. A parte central da lesão mostra pele normal com a borda infiltrada de limite interno bem definido e o limite externo impreciso. A cor é eritematosa ou ferruginosa, originando o aspecto "fovelar" ou em "queijo suíço". Coexistem lesões papulosas, infiltração difusa, e espessamento unilateral do lobo da orelha. Pode-se encontrar comprometimento de vários troncos nervosos periféricos, alguns dos quais muito acometidos.

No **exame histopatológico** observa-se presença de granulomas formados por células epitelióides imaturas ou de macrófagos ativados, poucos linfócitos, células epitelióides entre as laminações do perineuro, ausência de células gigantes do tipo Langhans e presença de edema. A presença do baar é frequente.

Hanseníase dimorfa — virchowiana: é a forma peri-virchowiana. As lesões são placas extensas de cor violáceo-ferruginosa com bordas externas infiltradas e limites internos não tão definidos como na forma HDD. É freqüente o comprometimento troncular nervoso e quando não adequadamente tratado leva a um grau elevado de incapacidade.

O **exame histopatológico** mostra o padrão morfológico muito próximo ao do observado na HV. Os granulomas são formados por macrófagos com citoplasma moderadamente frouxo. O perineuro se apresenta entumecido, de aspecto laminado, conhecido como "casca de cebola". Os bacilos estão presentes em grande número e formando pequenas globias.

Fleury, em 1983, descreve histologicamente a evolução da HDT para HDD:

- os granulomas tomam-se mais extensos frouxos e deixam de atingir a camada basal da epiderme.
- redução progressiva do número de linfócitos.
- redução do comprometimento dos filetes nervosos pelos granulomas, à medida que o quadro se aproxima da forma HV.
- a célula epitelióide vai perdendo a sua característica, o citoplasma vai se tomando mais frouxo e vesiculoso.
- aumento progressivo de bacilos. Pode-se encontrar também quadro histopatológico intermediário com predomínio de granulomas frouxos constituídos por macrófagos, ainda com algumas características das células epitelióides.

Hanseníase virchowiana: as lesões se caracterizam por manchas eritemato-ferruginosas com infiltração difusa, de aspecto brilhante e com limites mal definidos. Surgem também lesões pápulo-tuberosas e nodulares em todo o tegumento. Ocorre espessamento e infiltração das orelhas, infiltração difusa dos sulcos naturais da face e da fronte, madarose (alopécia na parte externa dos supercílios), dando o aspecto de "fascies leonina". As lesões são difusas, múltiplas e com distribuição bilateral e simétrica. O edema e a infiltração das mãos dão o aspecto úmido e brilhante conhecido como "mãos suculentas". As lesões surgem nas áreas mais frias do tegumento. Sem tratamento pode ocorrer o comprometimento da laringe e da faringe provocando a voz "rouca" e o comprometimento da mucosa nasal pode levar a perfuração do septo que configura o aspecto de "nariz de tapir". As lesões neurais consistem no espessamento dos nervos acompanhado de disfunção motora ou sensitiva. A HV é considerada uma doença sistêmica quando chega a comprometer órgãos internos como: câmara anterior do olho, linfonodos, fígado, testículos, rins e

ossos. A rinite crônica (coriza com obstrução nasal) e o edema bilateral das pernas no final do dia podem preceder as lesões cutâneas por muito tempo. Estas duas alterações geralmente passam despercebidas pelo doente e pelo médico. (Jopling e Mc Dougall, 1991).

A forma HV apresenta duas variantes:

- a primeira denominada de forma "difusa" descrita por Latapi e Zamora, em 1948, em que ocorre discreta infiltração generalizada do tegumento em contraste com a riqueza bacilar.

a outra variedade históide, individualizada por Wade, 1963, caracteriza-se por lesões tuberosas ou nodulares, delimitadas, brilhantes, com aspecto de quelóides ou dermatofibromas.

No **exame histopatológico** a epiderme é atrófica, geralmente retificada, separada pela faixa de Unna. O infiltrado celular ocupa toda a derme estendendo-se para o tecido subcutâneo, constituído predominantemente de macrófagos, com citoplasma espumoso, contendo lipídios (célula de Virchow) e grande quantidade de bacilos. Há poucos linfócitos e ausência de células de Langhans. Os filetes nervosos geralmente estão edemaciados e entumecidos. O perineuro se apresenta cheio de laminações em "casca de cebola" (Ridley, 1988).

Estados reacionais da hanseníase

Os estados reacionais são intercorrências comuns no curso da hanseníase, e se manifestam como síndromes inflamatórias agudas ou subagudas. Tem como fator básica a resposta imunológica do indivíduo, tanto em relação à atividade da doença, como sua regressão. Geralmente ocorre durante ou após o tratamento específico. Esta reação ocorre em 25% dos pacientes com HDT e HDD e em 40% nos HDV e HV (Azulay, 1999).

Jopling, em 1959, propôs a classificação em reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 cuja lesão mais frequente é o eritema nodoso hansênico, descrita pela primeira vez por Murata, 1912.

A reação tipo 1 caracteriza-se pela ativação das lesões pré-existentes, com eritema, edema, hiperestesia local e/ou aparecimento de lesões novas. Geralmente são acompanhadas do edema das extremidades e neurite. Esta reação decorre da hipersensibilidade tardia tipo IV (Gell e Coombs, 1975).

Quando esta reação for em consequência do aumento rápido da imunidade celular específica é reconhecida como reação ascendente ou reversa. Ao contrário, se houver baixa da imunidade celular é uma reação descendente. A reação tipo 1 ocorre em pacientes HDT, HDD e HDV. A reação tipo 2 envolve a reação de imunocomplexos circulantes e ocorre em pacientes HV e em alguns casos de HDV (Jopling e Mc Dougall, 1991). Esta reação geralmente é acompanhada de febre, mal estar, mialgias, edema e dores articulares. Na pele, surgem múltiplos nódulos inflamatórios de vários tamanhos e de distribuição simétrica em qualquer região do corpo as quais podem sofrer ulceração e necrose por obliteração da luz vascular, resultando o eritema nodoso necrotizante.

A neurite é sempre mais intensa e quando não tratada adequadamente leva a um maior grau de deformidade incapacitante, por isso a detecção precoce da reação e a instituição imediata da terapêutica é de fundamental importância para a prevenção das deformidades e das incapacidades principalmente para aquelas que são de caráter permanente.

Exame histopatológico: Reação tipo 1 - apresenta edema extracelular, redução da carga bacilar e aumento de linfócitos, células epitelióides e células gigantes. Na reação descendente, há o aumento do número de bacilos e a diminuição das células epitelióides, dos linfócitos e dos gigantócitos além do aumento de macrófagos de citoplasma vacuolados. Pode ocorrer degeneração das fibras elásticas e colágenas, focos de necrose nos granulomas e necrose fibrinóide no colágeno. Reação tipo 2 - presença de infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares, com aglomerado de macrófagos degenerados. aumento de eosinófilos, entumescimento endotelial com vasculite, edema e hemorragia. No eritema nodoso necrotizante observa-se vasculite, angeite obliterante e endoarterite.

2.3 - Métodos complementares de diagnóstico

Testes semiotécnicos no paciente, exames laboratoriais, estudo de imagens, além de outros exames complementares podem auxiliar na definição de um caso de hanseníase.

Pesquisa da sensibilidade cutânea

A pesquisa da sensibilidade tem como finalidade verificar a integridade das

terminações nervosas responsáveis pela sensibilidade cutânea. Esta sensibilidade é fundamental para a preservação e função protetora principalmente dos olhos, das mãos e dos pés.

Em geral por ordem de aparecimento, a primeira sensibilidade alterada é a térmica, seguida da sensibilidade dolorosa e da táctil, porém a sensibilidade normal não exclui o diagnóstico (Brasil — MS, 1994).

Prova da histamina - A prova da histamina foi introduzida por Pierini (1931), Rodrigues e Plantilha (1931). Baseia-se na observação da integridade dos ramúsculos nervosos periféricos. A resposta á ação da histamina provoca a dilatação dos capilares levando á formação do eritema reflexo, que configura a tríplice reação de Lewis, quando alterada a prova de histamina é incompleta.

Prova da pilocarpina - A prova da pilocarpina tem o mesmo principio da prova da histamina e identifica as áreas de anidrose, evento comum nas lesões hansênicas. Prefere-se esta prova nas pessoas melanodérmicas pela dificuldade de se verificar o eritema, produzido com a histamina (Brasil — MS, 1994).

Intradermoreação de Mitsuda

A intradermoreação de Mitsuda (1923) é uma reação de hipersensibilidade tardia e mede a resistência imunológica específica para o *M. leprae* ou a seus antígenos. Embora não seja um teste de diagnóstico ela tem valor prognóstico comprovado nos estudos realizados por Dharmendra (1942), Bechelli et al., (1945) e Rotberg (1986). Estes autores observaram que nos pacientes com a reação positiva desenvolveram as formas benignas, inclusive com algumas formas abortivas rias doenças e os que apresentaram reação negativa desenvolveram a forma mais grave.

Baciloscopia

A baciloscopia realizada em amostras obtidas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase tem como finalidade o diagnóstico e a classificação da doença, pela identificação do baar nos esfregaços de linfa, e/ou, material cutâneo. O esfregaço é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen ou similar (Michalany, 1980). O encontro de bacilos permite definir o índice baciloscópico (IB), proposto por Ridley e Jopling (1962), e que tem sido utilizado em trabalhos de investigação científica. Shepard e Mc Rae (1968) estimam que para obter o exame baciloscópico positivo, o material examinado deverá conter

aproximadamente 10^4 bacilos por mL.

Eletroneuromiografia e ultrassonografia

A eletroneuromiografia estuda a velocidade de condução elétrica no músculo e no nervo e tem a finalidade de verificar o comprometimento neural periférico na hanseníase. É útil para o acompanhamento terapêutico nos estados reacionais conforme citado no trabalho de Brasil Neto, (1992).

A ultrassonografia pode auxiliar na avaliação do calibre dos nervos, já que as alterações neurais na hanseníase manifestam-se pelo seu espessamento. Formaje, (1988); Taneja et al., (1992).

Sorologia com antígeno microbiano

Ainda visando o aprimoramento do diagnóstico da hanseníase, vários testes continuaram a ser introduzidos. Brennau e Barrow, (1980) descreveram um método sorológico utilizando antígeno micobacteriano, onde o antígeno PGL1 específico do *M. leprae* foi o mais estudado. Estes autores demonstraram a formação de anticorpos relacionados com o nível espectral da doença sendo os pacientes virchowianos os que apresentaram títulos maiores de IgM e menores de IgG.

Payne et. al, (1982), incorporaram o antígeno interior dos lipossomas e demonstraram pela técnica de imunodifusão em gel a presença de anticorpos específicos nos soros de pacientes virchowianos.

No Brasil, Saad et al., (1990) e Foss et al., (1993), realizaram o estudo Virchowianos.

Técnica de histoquímica e imunohistoquímica

Neves, em 1977, utilizou a coloração de Sudan III para identificar o depósito de lipídios nos cortes congelados de fragmentos de lesões de pele dos pacientes hansenianos. Esta técnica permite diferenciar as estruturas vesiculares das células de Virchow daquelas da degeneração hidrópica do citoplasma celular nos estados reacionais.

Outro recurso no diagnóstico da hanseníase é o emprego de técnicas de imunohistoquímica, utilizando anticorpos mono ou policlonais. Os primeiros pesquisadores a empregarem os anticorpos monoclonais contra o PGL1, foram Huerre et al., em 1989.

Em 1991, Goto e Izumi conseguiram identificar o antígeno PGL1 em quatro pacientes HDD de cinco casos estudados.

Wang et al. (1992), utilizando o anticorpo policlonal contra o PGL1, descreveram cinco padrões de achados imunohistoquímicos: solitário, granular, com distribuição irregular, vacuolar e amorfo. Esta técnica demonstrou a diferenciação entre as vesículas intracelulares decorrente de acúmulo de lipídios, daquelas decorrentes da degeneração hidrópica. No exame histopatológico, estas estruturas são semelhantes mas na imunohistoquímica a vesícula dos lipídios aparece com a margem acastanhada com conteúdo no seu interior, enquanto que na degeneração hidrópica permanece incolor e transparente.

Narayama et al. (1985) utilizaram os anticorpos ML04 para detectar o antígeno MY2 e ML06 para o antígeno MY1. Identificaram estes antígenos tanto nos pacientes PB como nos MB. Os pacientes MB com grande quantidade de bacilos, não apresentaram detecção nas áreas com intenso infiltrado inflamatório.

Fleury e Bacchi, em 1987, utilizaram a proteína S-100 no diagnóstico de hanseníase tuberculóide e indeterminada. Esta técnica permitiu fazer a distinção entre a morfologia quase intacta do nervo na forma indeterminada e fragmentos de nervos danificados na forma tuberculóide.

Mendonça, em 1987, empregou a técnica com a proteína S-100 nos materiais de biopsias fixadas em formol e emblocadas em parafina, de pacientes com várias formas da hanseníase. Demonstrou que esta técnica permite identificar pequenas, agressões neurais não demonstradas na coloração de hematoxilina-eosina. Demonstrou ainda que a proteína S-100 pode ser utilizada como marcador das células de Langhans.

Khanolkar et al., (1989) realizaram estudos com cinco anticorpos monoclonais: SL12 (65kDa), F47-9 (36kDa), SA1B11H (28kDa), SL5 (18kDa), ML06 (12kDa) com imunodeteção pela peroxidase. Observaram o caráter intracitoplasmático e granular nos doentes multibacilares. Os anticorpos monoclonais que produziram a reação mais intensa foram aqueles contra a proteína 65kDa e a lipoarabinomanana. Nos pacientes paucibacilares a imunodeteção foi fraca ou inexistente.

Takahashi et al., (1991), estudaram 42 doentes com hanseníase indeterminada pela técnica da imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais

anti-BCG e encontraram positividade em 67% dos casos, resultado superior àquele encontrado pela histopatologia e coloração para o baar, que foi de 45%. Neste caso a ligação foi cruzada e inespecífica. Observaram maior quantidade de antígenos próximos aos filetes nervosos, no citoplasma dos histiócitos perivasculares e ao redor dos músculos eretores dos pelos.

2.4 - Reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O desenvolvimento da técnica de amplificação dos ácidos nucléicos utilizando a PCR abriu grandes perspectivas para a detecção de vários agentes etiológicos. O método permitiu amplificar *in vitro* uma determinada região do DNA em milhões de vezes e em poucas horas, utilizando-se basicamente uma reação enzimática catalizada pela Taq DNA polimerase (enzima termoestável) cuja atividade depende de ions Mg⁺⁺. O resultado da amplificação pode ser visibilizado em gel de agarose. A especificidade da reação é determinada pela escolha adequada de "primers" ou iniciadores (segmentos de DNA), que são pequenos fragmentos sintetizados e que complementam a sequência do fragmento do DNA a ser amplificado (Saiki et al., 1985).

A PCR utilizando DNA polimerase termoestável foi introduzida por Mullis e Faloona, em 1987. No campo da biologia molecular, a PCR é uma ferramenta tão poderosa que tem sido utilizada de forma multidisciplinar para a pesquisa de bactérias patogénicas (*M. tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria meningitidis*, espécies, de *Shigella* e *E. coli*, *Helicobacter pylori* e outros); para a pesquisa de _viras (HIV I, Hepatite B, RNA da Hepatite C, Epstein-Barr, Rubéola, Herpesvirus varicellae e outros); para pesquisa de parasitos (*Trypanossoma cruzi*, *Leishmania sp*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii* e outros); para detecção de locus de resistência a antibióticos; no diagnóstico de doenças genéticas e aplicação em medicina forense (Hirata e Hirata, 1995).

Aperfeiçoando a técnica da PCR, Saiki et al., em 1988, elaboraram três etapas ou ciclos de amplificação: 1) desnaturação ou "melting", que consiste na separação da fita dupla de DNA em duas fitas simples numa temperatura elevada (90 a 95°C); 2) hibridização ou "annealing" que consiste na ligação entre o iniciador e o DNA alvo; 3) polimerização ou "extension" a DNA polimerase liga os nucleotídeos entre si, sintetizando as novas cadeias, as quais servem de moldes

para a produção sintética de novas fitas com os ciclos subseqüentes (reação em cadeia).

Hance et al., (1989) aplicaram a PCR como alternativa para identificação de doenças provocadas por várias micobactérias, especialmente naquelas que não são facilmente cultiváveis *in vitro*, ou as que tem crescimento lento. Com esta finalidade foram elaborados alguns tipos de iniciadores para detectar gênero e espécies de micobactérias como o gene *groEL* que codifica a proteína de choque térmico 65 kDa.

Shibata et al., (1988) testaram a extração do DNA de tecidos fixados em formol tamponado, emblocados em parafina e armazenados em temperatura ambiente durante 41 anos. Selecionaram 25 materiais para detectar o papiloma vírus humano (HPV) amplificando o gene *E* de HPV 16 e 18 e conseguiram sinais fortemente positivos. Os autores concluíram que o DNA de materiais fixados em formol e emblocados em parafina, armazenados durante muitos anos pode ser detectado mesmo que apresente algum sinal de degradação.

Hartskell et al., (1989) foram alguns dos primeiros a apresentar trabalhos de PCR com DNA polimerase termoestável para a detecção do *M. leprae* em material fresco para amplificar o gene *groEL*, utilizando "primers" S13 e S62 com base na sequência do gene 36 kDa e 65 kDa respectivamente, com bacilo purificado, isolado do baço de tatu e macado, experimentalmente infectados. Conseguiram amplificar o fragmento 530pb e verificaram a possibilidade de amplificar material contendo de 1 a 20 bacilos.

Clark-Curtis e Docherty, (1989) observaram a sequência repetitiva de pelo menos 19 vezes no cromossomo do *M. leprae*, enquanto que Woods e Cole, (1989) verificaram que uma das cópias da sequência localizada no gene *groEL* repetia-se cerca de 23 vezes no cromossomo, mesmo com a dificuldade de extração do DNA do bacilo, devido a difícil lisa celular.

Willians et al., (1990) utilizaram material de biópsia de pele a fresco de três pacientes com hanseníase e bacilos isolados e purificados extraídos de baço de tatu infectado para análise em PCR. Obtiveram boa especificidade no gene *groEL* codificado à proteína 18kDa com amplificação de produto com 360pb, sendo observado banda positiva em gel de agarose. Estas amostras continham menos que 10^4 bacilos. Obtiveram 100% de positividade em 5 materiais estudados.

Plikaytis et al., (1990), utilizaram material fresco de tatu infectado com *M. leprae* e três amostras de hanseníase virchowiana. Na primeira etapa da PCR obtiveram um produto de 578pb e na segunda etapa da PCR obtiveram um produto 347pb, correspondendo a porção do gene groEL de *M. leprae*, também denominada de gene 65 kDa. Para confirmar que o produto da segunda etapa de amplificação é realmente o fragmento do *M. leprae* (groEL) os autores digeriram com as enzimas de restrição PstI e RsaI e obtiveram os produtos: 254 e 93pb, e 193, 154pb, respectivamente. Estes fragmentos são previstos na sequência do do gene de *M. leprae*.

Kallio et al., (1991) aplicaram a PCR para amplificação do DNA isolado de material parafinado e obtiveram melhor extração do DNA através da fervura. Heller et al., (1991) extraíram o DNA pela sonificação com bons resultados.

Volkenandt et al., (1991), analisaram os resultados falsos positivos que podem ocorrer pela contaminação de DNA exógeno, durante a microtomia, a preparação das reações pré ou pós PCR e os resultados falsos negativos devido a baixa qualidade do DNA, em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina. Os autores sugerem o uso de etanol como fixador e acreditam que a otimização da técnica possibilita a detecção de DNA na presença de pequena parte do genoma do microorganismo. Sugerem processar a PCR em áreas isoladas.

De Wit et al., (1991) demonstraram a correlação inversa entre a densidade do infiltrado celular, principalmente de linfócitos e o grau de positividade da PCR. Nos doentes com as formas PB, o infiltrado celular poderia secretar substâncias capazes de inibir a PCR. enquanto que a presença de bacilos potencialmente viáveis, presentes na forma MB, resulta numa amplificação positiva.

Ghossein et al., (1992) descreveram o método da PCR para detecção de micobactérias em tecidos emblocados em parafina e conseguiram detectar espécies de *M. tuberculosis*, *avium* e *saprófitas* utilizando PCR e enzimas de restrição.

Perosio e Frank, em 1992, elaboraram um método para aumentar a sensibilidade da técnica de PCR realizando-a em duas etapas "nested-PCR", que propicia a detecção e amplificação no gene groEL em amostras que contém de quatro a oito micobactérias, diferente da *M. leprae*.

Arnoldi et al., (1992), realizaram a amplificação enzimática do genoma DNA para a identificação da espécie específica do *M. leprae* em biópsias de pele congeladas obtendo fragmento de 990pb, no gene groEL.

Telenti et al., (1993) utilizaram como enzima de restrição *Bst*, *EII* e *Hae III* obtidos de iniciadores comuns a várias micobactérias, amplificando gene groEL que codifica o antígeno 65kDa.

Yoon et al., em 1993, utilizaram 102 casos de biópsias de peles congeladas e "imprint" do mesmo material para extração do DNA e amplificação pela PCR do gene 36 kDa, 18 kDa e 65 kDa. Utilizaram o protocolo de Plikaytis et al. (1990) com pequenas modificações, e usaram os dois iniciadores R, e R2 originalmente projetados por Woods e Cole (1989 e 1990). Obtiveram especificidade com 372pb do DNA de *M. leprae* numa sequência repetitiva de 28 vezes no cromossomo. Obtiveram resultados positivos em 85% dos casos PB e 86,5% nos MB de material cutâneo. No "imprint" a positividade foi de 60% em PB e 95% em MB.

Sung et al., (1993) realizaram PCR de material parafinado em cinco casos de MB e três de PB com 100% de positividade. Conseguiram amplificação no gene 18 kDa em material contendo um único bacilo.

Jamil et al., (1993) realizaram a PCR em materiais de lesão de pele, a fresco, obtidos de pacientes PB (9) e MB (8) obtiveram 100% de positividade naqueles com IB de 1 a 5 e 33.3% nos casos com IB menor que 1, amplificando o gene 18 kDa, 36 kDa e 65 kDa.

No Brasil, Santos et al., (1993) utilizaram a PCR em biópsias de pele fresca, sangue e linfa de pacientes com hanseníase. Obtiveram em 27 materiais 76% de positividade em pele fresca, 21 % de positividade na linfa e 53% de positividade no sangue. Os autores acreditam que o sangue possa conter inibidores (células mononucleares) que podem interferir na amplificação e sugerem realizar um pré-tratamento do material com NaOH. Relatam a possibilidade de conseguir a amplificação no gene groEL de 372pb na presença de 1/10 do genoma bacilar.

Pattyn et al., em 1993, realizaram a PCR de material do esfregaço nasal dos comunicantes de pacientes com hanseníase PB e MB e obtiveram

positividade de 1,9% e 7,9%, respectivamente. Os autores sugerem a importância da PCR nos trabalhos de controle epidemiológico da doença.

De Wit et al., (1993) realizaram análise de esfregaço nasal aplicando a PCR em pacientes com hanseníase não tratados, de controles endêmicos, não endêmicos e de contactos ocupacionais. Ao mesmo tempo realizaram o teste sorológico com anticorpo anti PGL1 do *M. leprae*. A amplificação ocorreu em 55% dos pacientes não tratados, em 19% dos contactos ocupacionais, 12% em controles endêmicos e em nenhum caso de controle não endêmico. Amplificaram fragmento 531pb do gene "encoding" que codifica o *M. leprae* e obtiveram sensibilidade de 120 fentograma de DNA bacilar, enquanto que o menor número de bacilos detectado pelo teste de ensaio imunoenzimático foi de 10^4 .

Jamil et al., (1994) aplicaram a PCR com o método colorimétrico para a detecção de *M. leprae* em fragmentos de pele congelados. Concluíram que: o método colorimétrico tem a mesma eficácia que o gel de agarose; que é necessária a PCR em sequência repetitiva nas formas PB; que a sensibilidade ocorre em um fragmento de DNA genômico purificado do bacilo e que a PCR é eficaz no controle terapêutico da doença. Obtiveram positividade em 100% nos materiais, de pacientes MB com IB ≥ 2 (70%); nos MB com IB = 1 e 69% em PB com IB = 0%.

Nishimura et al., (1994), realizaram a PCR em amostras parafinadas de 39 biópsias de pele obtidas de 30 pacientes, sendo 10 amostras de PB e 29 amostras de MB, para amplificar o gene groEL e fragmento de 372 pb.

Richter et al., (1994) desenvolveram um protocolo de PCR simples, baseado em três iniciadores capazes de detectar micobactérias de crescimento lento que possui a sequência 16S (rRNA). Este método amplifica o fragmento 479pb das micobactérias e após o emprego do segundo "primer antisense" (pL) amplifica o fragmento 204pb, específica do *M. leprae*. Utilizaram fígado fresco de tatu infectado.

Cook et al., (1994) desenvolveram um protocolo de PCR para detecção de diversas espécies de micobactérias pelo método de reamplificação da "nested-PCR". Os autores utilizaram 126 culturas puras de micobactérias utilizando iniciadores específicos para o gene groEL de 65 kDa. Os produtos da PCR foram tratados com três enzimas de restrição *HhaI*, *Mbol* e *BstUI*. Das 126 amostras,

103 positivaram e detectara Twenty-two points, plus triple-word-score, plus fifty points for using all my letters. Game's over. I'm outta here.m algumas espécies de micobactérias, mas nenhuma detectou o *M. leprae*. Submeteram o resultado da segunda PCR sob a ação da Alul (específica para *M. leprae*), e conseguiram positividade em um material fixado e embocado em parafina contendo a espécie *leprae*.

Van Beer et al., (1994) realizaram o estudo epidemiológico utilizando a PCR em esfregaço nasal, numa área endémica no sul da Indonésia, em 1.228 pacientes incluindo contato intradomiciliar e extradomiciliar. Utilizaram o protocolo de De Wit et al. (1993) e obtiveram amplificação no fragmento 531pb do gene PRA em 7,8%. Este estudo indica que os indivíduos podem ser infectados pelo bacilo sem apresentar sinais da doença. Comparou a PCR com os exames sorológicos obtendo os seguintes resultados: aglutinação de partículas de gelatina (MLPA) 32% de positividade, com método de ensaio imunoenzimático indireto (IgM-PGL) foi positivo em 30,8%, com antiarabinomanana (IgG-LAM) 11,6% e o exame menos sensível foi a sorologia com IgG-PGL com 6,7% de positividade.

Rafi et al, (1995) analisaram pela PCR 44 amostras de "imprint" de pele e escarro de pacientes submetidos a monoterapia e amplificaram fragmento 530pb no gene groEL que expressa 36kDa de *M. leprae*. Obtiveram 4,5% de positividade no escarro e 38,1% no material de "imprint" com maior positividade nos PB.

Wichitwechkarn et al., (1995) testaram a sensibilidade da PCR com quantidades conhecidas de DNA purificado de *M. leprae* e amplificaram fragmento de 531pb que codifica 36 kDa, visível com 3.125 fentogramas do DNA (equivalente a meio bacilo). O resultado foi mais positivo nos casos MB (87,1%) que em PB (36,4%). O exame microscópico de rotina apresentou IB = O nos 36,4% de PB, amplificado pela PCR. Um caso de MB não amplificado correspondia a forma virchowiana com IB = 5.

Misra et al., (1995) analisaram 67 amostras de "imprint" de pele, 45 fragmentos de pele fresca e 4 biópsias de pessoas sadias. Obtiveram os seguintes resultados: dos 67 "imprint", 46 foram da forma PB com 26% casos positivos e 21 da forma MB com 57% positivos. Em 45 fragmentos de pele, 24 da forma PB, somente 4% amplificaram e dos 21 casos de MB, 66,7% amplificaram.

Santos et al., (1995) ensaiaram um método diagnóstico de hanseníase com procedimentos não invasivos realizando a PCR em 33 amostras (26 MB e 7 PB) de secreção nasal com 63% de positividade e do bulbo de pêlos de diferentes áreas, com positividade de 72% nos MB e 28% nos PB. Observaram que o infiltrado inflamatório pode inibir a amplificação da PCR, coincidindo com as suposições de Yoon et al., (1993) e De Wit, (1991). A positividade na secreção nasal não significa necessariamente doença, principalmente numa região endêmica, este achado pode indicar transporte passivo do bacilo.

Corvalán, (1996) utilizou a PCR em amostra parafinada e sugeriu não amplificar fragmentos maiores que 600pb e recomendou utilizar amplificação em fragmentos até 200pb, devido a fragmentação do DNA no material parafinado.

Chemouilli et al., (1996) utilizaram a PCR em material de biópsias de nervos de 03 pacientes PB e 07 MB com neuropatia hansênica e verificaram que a extração do DNA de amostras contendo fibrose se torna difícil. A sensibilidade da técnica melhorou com o tratamento pela "proteínase K" em substituição à "colagenase/dispase", que possivelmente continha inibidores de "Taq DNA polymerase". Obtiveram resultados positivos em 100% dos pacientes MB e em 80% nos pacientes PB. Este trabalho mostra a importância da PCR para diferenciar a hanseníase de outras neuropatias inflamatórias.

Santos et al., em 1997, publicaram o estudo de um paciente que apresentava lesão hipocrômica no braço sem alteração da sensibilidade na lesão e parestesia da região ulnar sem lesões cutâneas. Os exames para o diagnóstico de hanseníase, incluindo-sorologia para detectar antígeno PGL1 de *M. leprae*, ultrassonografia do nervo e eletroneuromiografia foram inconclusivos. Aplicaram a PCR da secreção nasal, do sangue e bulbo piloso da lesão cutânea com intervalo de um mês. A 1ª PCR resultou positiva somente no material da secreção nasal. A 2ª PCR positivou amostras da secreção nasal e no sangue, concluindo o diagnóstico de hanseníase.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Geral

Padronizar a reação em cadeia pela polimerase no diagnóstico da hanseníase em material fixado em formol e emblocado em parafina, para uso de rotina do exame histopatológico.

3.2 – Específicos

3.2.1 - Padronizar a metodologia para obtenção do DNA de *Mycobacterium leprae* nas formas PB em material fixado em formol e parafinado utilizados na rotina do exame histopatológico.

3.2.2 - Padronizar a técnica de amplificação de DNA para diagnóstico de hanseníase pela PCR.

3.2.3 - Avaliar a sensibilidade da técnica da PCR comparando-a com os exames histopatológicos em HE e Wade, principalmente nos casos de hanseníase paucibaclar.

3.2.4 - Avaliar a possibilidade de utilização do método da PCR como ferramenta auxiliar de diagnóstico da hanseníase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

Foram utilizados 128 blocos contendo fragmentos de pele de 128 pacientes com diagnóstico de hanseníase, arquivados no Laboratório do Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal Fluminense - RJ, no período de 1993 a 1997. Os cortes histológicos foram previamente analisados pelas técnicas de coloração de HE e Wade (Michalany, 1940). (Anexo 9.1 - página 78). O material para o estudo foi composto de quatro grupos:

Grupo de estudo PB.

Dos 128 casos, 73 eram da forma PB classificados em 13 casos de HI, 18 de HT e 42 de HDT.

Grupo de estudo MB.

Entre os 128 casos estudados, 55 foram da forma MB, e classificados em 5 HDT, 2 HDD, 15 HDV e 33 HV.

Controle negativo (CN) e controle positivo (CP).

Esses controles foram obtidos de fragmento de pele de pacientes do Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Valença - RJ.

Como controle positivo, utilizou-se fragmento de pele de paciente com diagnóstico de HV. Como controles negativos utilizou-se pele normal, obtida de cirurgia plástica.

DNA genômico(DNA-H)

Como controle de possíveis inibidores foi utilizado o DNA genômico humano extraído de leucócitos de sangue periférico. Este material foi cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular (Biomol) - SP.

Em todas as reações, utilizou-se o controle de reagentes (CR), contendo todos os componentes exceto o DNA a ser amplificado.

4.2 - Métodos

O processamento do CP, CN e a microtomia dos materiais para a PCR foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Valença, RJ.

A extração do DNA, a PCR e a documentação fotográfica foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (SP).

Considerando-se que os materiais utilizados já estavam emblocados em parafina, foi necessário adequar a metodologia para a PCR. Inicialmente, procurou-se padronizar uma técnica de otimização capaz de fornecer resultados fidedignos, mesmo utilizando material com possibilidade de conter baixa qualidade e quantidade de DNA do *M. leprae*, contaminação de DNA exógeno ou mesmo presença de inibidores para a PCR. A otimização foi realizada desde a coleta das amostras para os controles.

As amostras foram preparadas em local isolado de outras atividades. Procurou-se manter a área a ser biopsiada e o local de sua realização isento de qualquer componente genético estranho como parasitas ou substâncias estranhas às amostras. O instrumental utilizado no ato da biópsia foi novo e estéril, quando impossível, o instrumental foi submerso em água oxigenada a 20 volumes, lavado com água Milli Q. e autoclavado. O material foi fixado, desidratado, diafanizado, submetido a banhos de parafina, separadamente entre si e as soluções não foram reaproveitadas.

4.2.1 - Preparo dos controles para emblocamento em parafina

O material foi preparado para emblocamento em parafina após centrifugação, semelhante ao que se faz como "cell block" (Takahashi, 1971), para precipitar o material no fundo do tubo de ensaio. Após solidificação fragmentou-se o tubo para liberar o material sem o contato manual, procurando assim, diminuir o tanto quanto possível a contaminação exógena.

- 1 - Utilizou-se 10 vezes mais o volume do líquido em relação ao volume do material nos procedimentos de fixação, desidratação, diafanização e no banho de parafina.
- 2 - Centrifugou-se a 3.000 rpm durante 1 minuto.
- 3 - Fixou-se o material em formol tamponado a 10% (BNF) durante 12 a 24 horas, em temperatura ambiente (TA).
- 4 - Desidratou-se com etanol em concentrações crescentes de 80%, 90% e 95% e mais duas vezes em etanol PA, durante 60 minutos em cada procedimento, em TA e desprezou-se o líquido por inversão.
- 5 - Diafanizou-se por três vezes em banhos de xilol PA durante 60 minutos em cada banho, em TA e desprezou-se o líquido por inversão.
- 6 - Impregnou-se o material em três banhos de parafina líquida a 57°C, durante 60 minutos cada banho. Solidificou-se no terceiro banho. Fragmentou-se o tubo para liberar o material emblocado.

4.2.2 - Preparo dos materiais e dos controles (CP e CN) para a PCR

A partir deste momento o protocolo de Cook et al. (1994), (Anexo 9.5 - Página 86), com várias modificações, começa a ser utilizado.

- 1 - Obteve-se cortes histológicos com 10 µm de espessura. Colocou-se cinco fragmentos em cada tubo de Eppendorf de 1,5mL.
- 2 - Desparafinou-se com 1,0 mL de xilol PA a 95°C, agitou-se leve e periodicamente durante 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 5 minutos e desprezou-se o solvente por inversão.
- 3 - Adicionou-se 1,0 mL de xilol PA a 57°C, agitou-se leve e periodicamente durante 10 minutos. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 5 minutos e desprezou-se o solvente por inversão. Repetiu-se, esta operação, uma vez.
- 4 - Removeu-se o solvente com 1,0 mL de álcool PA, agitou-se leve e periodicamente durante 5 minutos. Centrifugou-se durante 5 minutos. Desprezou-se o álcool por inversão. Repetiu-se por duas vezes.
- 5 - Evaporou-se o álcool residual deixando a tampa do tubo aberta protegida com gaze, em TA.

- 6 - Aplicou-se o choque térmico, aquecendo em banho de água a 98°C, durante 5 minutos e, logo a seguir, submergiu-se em nitrogênio líquido durante 1 minuto. Repetiu-se por mais uma vez.
- 7 - Procedeu-se a digestão do material com 20µL (400µg/mL) de PK e solução tampão com 480 µL de "BD9", na proporção de 1:24, incubou-se aquecendo em banho de água a 37°C durante 12 horas. Inativou-se a PK em banho de água a 98°C durante 10 minutos e submergiu-se imediatamente em nitrogênio líquido durante 1 minuto. Deixou-se o material repousando durante 20 minutos, em banho de gelo a 4°C.
- 8 - Extraí e purifiquei o DNA com 1,0 mL da mistura de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 25:24:1; agitei em vórtex durante 15 segundos. Centrifuguei a 12.000 rpm durante 15 minutos. Repetiu-se por mais uma vez.
- 9 - Adicionei 1.0 mL da solução de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1, agitei em vórtex durante 15 segundos. Centrifuguei a 12.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de Eppendorf.
- 10 - Adicionei 1.0 mL da solução contendo acetato de amônia a 8 M e isopropanol PA, ambos a -20°C e glicogênio 20 µL a 4°C na proporção de 24:75:1. Homogeneizei por inversão várias vezes. Incubei a 20°C durante 12 horas. Centrifuguei a 12.000 rpm durante 20 minutos, desprezei o líquido com pipeta, lavei com 1,0 mL de isopropanol a 70% e a -20°C. Repetiu-se a centrifugação e desprezei o líquido cuidadosamente com pipeta.
- 11 - O tubo permaneceu aberto em câmara asséptica protegido com papel até a evaporação total da solução.
- 12 - Ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de TE e incubou-se a 57°C durante 60 minutos.

4.2.3 - Quantificação dos ácidos nucleicos

Quantificou-se o DNA em espectrofotômetro medindo-se a absorvência da amostra a 260 e 280nm. Considerou-se a relação absortividade molar segundo Sanbrook et al., 1989 (1 DO = 50µml).

4.2.4 - Teste de inibidores dos controles.

Testou-se a presença de possíveis inibidores no DNA do CP e CN, pela amplificação da β -actina humana. A tabela 1 demonstra esquematicamente as etapas realizadas.

1 - Adicionou-se 5,0µL de DNA dos controles e 511L de DNA-H em 40µL de MIX1 (tampão PCR 1X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 200 mM de cada dNTPs; 2,0 U de Taq. DNA polimerase; 10 pM de β -actina 1; 10 pM de β -actina 2, e H_2O Milli Q. q.s.p. 50µL); 2 - Programou-se o termociclador PTC1 (1 ciclo de 4 minutos a 94°C; seguido de 40 ciclos: cada ciclo de 94°C, 1 minuto; 57°C, 1 minuto e 72°C, 1 minuto e um ciclo de 72°C durante 10 minutos e finalizar com esfriamento de 4°C); 3 - Utilizou-se PGA1,5 (dissolveu-se 1,5% de gel de agarose em TBE 1X, adicionou-se brometo de etídio a 0.3% mg/mL; solidificou-se em cuba de eletroforese em TA, submergiu-se em TBE 1X; utilizou-se 0,5µL de marcador de peso molecular de 100 pb; 2,0 µL de tampão de corrida; 8,0 µL do DNA. Ligou-se a fonte de eletroforese a 110V e 60mA, durante 40,0 minutos. Visualizou-se em UV e documentou-se em câmera Polaroid modelo DS34, com filme 667 de 3000 ASA).

Tabela 1: Teste de inibidores dos controles. Volume final = 50.0µL.

	MIX1	CP	CN	CR	DNA-H	H ₂ O
CP	40,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0
CN	40,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0

4.2.5 - PCR para amplificação do gênero *Mycobacterium*.

Os materiais foram submetidos a PCR em duas etapas.

Primeira etapa da PCR

Conforme demonstrado na tabela 2, adicionou-se 10 μL de DNA das amostras em 40 μL de MIX2 (tampão PCR 1X; 1,5 mM de MgCl_2 ; 200 mM de cada dNTPs; 2,5 U de Taq. DNA polimerase; 380 nM de cada iniciador T₁U; T₂U₂; T₁D) H₂O Milli Q. q.s.p. 50 μL e programou-se o termociclador PTC2 (40 ciclos a 94°C durante 1 minuto; 57°C durante 2 minutos; 72°C durante 2 minutos. Extensão final de 72°C durante 10 minutos e esfriamento a 4°C).

Tabela 2: Primeira etapa da PCR para *Mycobacterium*. Volume final 50.0 μL .

	MIX2	CP	CN	CR	Amostra n=128	H ₂ O
CP	40,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	40,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra n=128	40,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0

Segunda etapa da PCR – "Nested-PCR"

Conforme demonstrado na tabela 3, adicionou-se 5.0 μL do produto da primeira etapa da PCR em 45 μL de MIX3 (tampão PCR 1X; 1,5 mM de MgCl_2 ; 200 mM de cada dNTPs; 2,5 U de Taq. DNA polimerase; 380 nM de cada iniciador T2U; T2D) H₂O Milli Q. q.s.p. 50 μL . Programou-se o termociclador PTC2 conforme a primeira etapa.

Tabela 3: Segunda etapa da PCR para *Mycobacterium*. Volume final 50.0 μL .

	MIX3	CP	CN	CR	Amostra n=128	H ₂ O
CP	45,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	45,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
CR	45,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Amostra n=128	45,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0

Digestão pela endonuclease de restrição Alu1 para a espécie *leprae*.

Após a segunda etapa da PCR, as amostras foram submetidas a digestão pela Alu1, específica para espécie *leprae* demonstrado na Tabela 4. Adicionou-se 104 de MIX4 (enzima de restrição Alu1, 0,5 μL de tampão digestão) H₂O Milli Q. q.s.p. 10 μL e 10 μL do DNA do produto da segunda etapa da PCR. Incubou-se em banho de água a 37°C, durante quatro horas e preparou-se PGA-2 (2% de gel

de agarose dissolvido em TBE 1X, adicionou-se em brometo de etídio a 0,3% mg/mL; solidificou-se em cuba de eletroforese em TA, submergiu-se em TBE 1X; adicionou-se 0,5 µL de marcador de peso molecular de 100 pb; 2,0 µL de tampão de corrida; 8,0 µL do DNA. Ligou-se a fonte de eletroforese a 110V e 60mA, durante 40,0 minutos. Visualizou-se em UV e documentou-se em câmera Polaroid modelo DS34, com filme 667 de 3000 ASA).

Tabela 4: Digestão pela endonuclease de restrição Alu1 para *M. leprae*. Volume final 20 µL

	MIX4	CP	CN	CR	Amostra n=128	H ₂ O
CP	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra n=128	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0

4.2.6 - Teste de sensibilidade

Testou-se a sensibilidade do DNA dos controles e de 10 amostras com PCR positiva de PB, (1 a 4) e seis amostras de MB, (5 a 10) e em seis materiais MB com PCR negativa (1 a 6), escolhidas aleatoriamente, com diluições sucessivas de 1/10, 1/100 e 1/1000 com água Milli Q. estéril.

Primeira etapa da PCR

1 - adicionou-se 10µL de DNA em 40,0 µL de MIX2; 2 - programou-se o termociclador PTC2 conforme procedimento anterior. Tabela 5.

Tabela 5: Primeira etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR positiva. Amostra 1 a 4 PB e 5 a 10 MB. Volume final 50.0µL.

	MIX2	CP	CN	PCR +	CR	H ₂ O
CP	40,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	40,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 2	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 3	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 4	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 5	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 6	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 7	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 8	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 9	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 10	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0

Segunda etapa da PCR

1 - adicionou-se 5,0 μ L do produto da primeira etapa da PCR em 45,01.L de MIX3; 2 - programou-se o termociclador PTC2 conforme procedimento anterior.

Tabela 6: Segunda etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR positiva nas forma PB e MB. Amostras 1 a 4 PB e 5 a 10 MB. Volume final 50.0 μ L.

	MIX3	CP	CN	PCR +	CR	H ₂ O
CP	45,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	45,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
CR	45,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Amostra 1	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 2	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 3	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 4	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 5	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 6	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 7	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 8	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 9	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 10	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0

Digestão pela endonuclease de restrição Alu1

1 - adicionou-se 10,0 μ L do produto da segunda etapa da PCR em 10,0 μ L de MIX4; 2 - incubou-se a 37°C em banho de água durante quatro horas; 3 - Preparou-se PGA2, conforme procedimento anterior. Tabela 7

Tabela 7: Digestão pela endonuclease de restrição Alu1 nas amostras PCR positiva: amostras (1 a 4) PB (5 a 10) MB. Volume final 20,0 μ L

	MIX4	CP	CN	Amostra n=128	CR	H ₂ O
CP	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 2	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 3	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 4	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 5	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 6	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 7	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 8	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 9	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 10	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0

Teste dos controlos e das amostras com PCR negativa.

Testou-se a sensibilidade de seis amostras de MB com PCR negativa.

Primeira etapa da PCR

1 - adicionou-se 10,0 μL de DNA em 40,0 μL de MIX2; 2 - programou-se o termociclador PTC2, conforme procedimento anterior. Tabela 8.

Tabela 8: Primeira etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR negativa nas forma MB. Volume final 50.0 μL .

	MIX2	CP	CN	PCR -	CR	H ₂ O
CP	40,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	40,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 2	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 3	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 4	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 5	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 6	40,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0

Segunda etapa da PCR.

1 - adicionou-se 5,0 μL do produto da primeira etapa da PCR em 45,0 μL de MIX3; 2 - programou-se termociclador PTC2, conforme procedimento anterior.

Tabela 9.

Tabela 9: Segunda etapa da PCR no teste de sensibilidade nas amostras com PCR negativa em MB. Volume final 50.0 μL

	MIX3	CP	CN	PCR -	CR	H ₂ O
CP	45,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	45,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0
CR	45,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Amostra 1	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 2	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 3	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 4	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 5	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
Amostra 6	45,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0

Digestão pela endonuclease de restrição Alu1.

1 - adicionou-se 10 µL do produto da segunda etapa da PCR em 10,0 µL de MIX4; 2 - incubou-se em banho de água a 37°C, durante 4 horas; 3 - utilizou-se PGA2, conforme procedimento anterior. Tabela 10.

Tabela 10: Digestão pela endonuclease de restrição no teste de sensibilidade nas amostras com PCR negativa em MB. Volume final 20.0 µL

	MIX4	CP	CN	PCR -	CR	H ₂ O
CP	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CN	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
CR	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 2	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 3	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 4	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 5	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amostra 6	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0

4.2.7 - Teste de inibidores

Realizou-se o teste de inibidores de seis amostras com PCR positiva das formas PB (1 a 3) e de MB (4 a 6), escolhidas aleatoriamente. Tabela 11.

1 - adicionou-se 5,0 µL de DNA do bacilo e 5,0 µL de DNA-H em 40,0 µL de MIX1; 2- programou-se o termociclador PTC1; 3 - utilizou-se PGA 1.5 (Pág. 95). Tabela 11.

Tabela 11: Teste de inibidores nas amostras com PCR positiva. Amostras (1 a 3) PB e (4 a 6) MR Volume final: 50,0 µL

	MIX1	CP	CN	CR	Amostras	DNA-H	H ₂ O
CP	40,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
CN	40,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 2	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 3	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 4	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 5	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 6	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0

Da mesma forma, realizou-se o teste de inibidores em seis amostras de MB com PCR negativa (1 a 6), escolhidas aleatoriamente.

1 - adicionou-se 5,0 µL de DNA e 5,0 µL de DNA-H em 40,0 µL de MIX1; 2- programou-se o termociclador PTC1; 3 - utilizou-se PGA 1,5, conforme procedimentos anteriores. Tabela 4.

Tabela 12: Teste de inibidores das amostras MB com PCR negativa. Volume final: 50,0 μ L.

	MIX1	CP	CN	CR	Amostras	DNA-H	H ₂ O
CP	40,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
CN	40,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	0,0
CR	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Amostra 1	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 2	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 3	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 4	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 5	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0
Amostra 6	40,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0

4.2.8 - Análise estatística

Utilizou-se o método do χ^2 para a avaliação da frequência de casos com resultado de PCR positivo e negativo, considerado significativo ao nível de $P < 0,05$.

5 – RESULTADOS

Do total de 128 amostras estudadas, obtidos de 128 pacientes, 66 casos (51,56%) foram do sexo masculino e 62 casos (48,48%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 03 anos a 88 anos, com maior incidência na faixa etária de 20 a 29 anos no sexo masculino, que apresentou 18 casos (27,28%). No sexo feminino a faixa etária de maior frequência foi entre 40 a 49 anos com 19 casos (43,93%). Tanto no sexo masculino como no feminino houve um discreto predomínio em pacientes de cor branca com 29 casos masculinos (43,93%) e 22 casos femininos (35,48%).

Tabela 13: Distribuição por sexo, faixa etária e cor.

Idade/Cor	Sexo Masculino					Sexo Feminino					Sub. T. Masc./Fem.
	Br	Pd	Pt	N. Inf	Sub.T	Br	Pd	Pt	N. Inf	Sub. T.	
0 – 09	02	00	01	00	03	01	00	00	00	01	04
10 – 19	01	01	05	00	07	03	02	02	01	08	15
20 – 29	07	03	07	01	18	02	03	00	00	05	23
30 – 39	04	03	02	00	09	01	01	04	00	06	15
40 – 49	08	01	01	02	12	06	05	05	03	19	31
50 – 59	03	03	01	00	07	02	03	00	00	05	12
60 – 69	03	01	01	00	05	01	03	01	00	05	10
70 – 79	01	00	00	00	01	04	01	00	01	06	07
80 – 89	00	00	01	00	01	01	01	00	00	02	03
N. Inf.	00	01	00	02	03	01	01	00	03	05	08
	29	13	19	05	66	22	20	12	08	62	128

Br - branca / Pd - Parda / Pt - Preta / N. Inf. - Não Informado / Sub.T - Sub. Total

5.1 – Resultado do exame histopatológico em HE e Wade: perfil amostra.

Os 128 materiais obtidos de 128 pacientes portadores de hanseníase foram analisados pelo exame histopatológico, utilizando-se a classificação de Ridley e Jopling, 1962.

A forma clínico-histopatológica mais freqüente foi a HDT com 47 casos (36,72%), seguidas de HV com 33(25,78%), HT com 18 (14,06), HDV com 15 (11,72%), HI com 13(10,15%) e a forma menos freqüente foi HDD com dois casos (1,56%) (Gráfico 1).

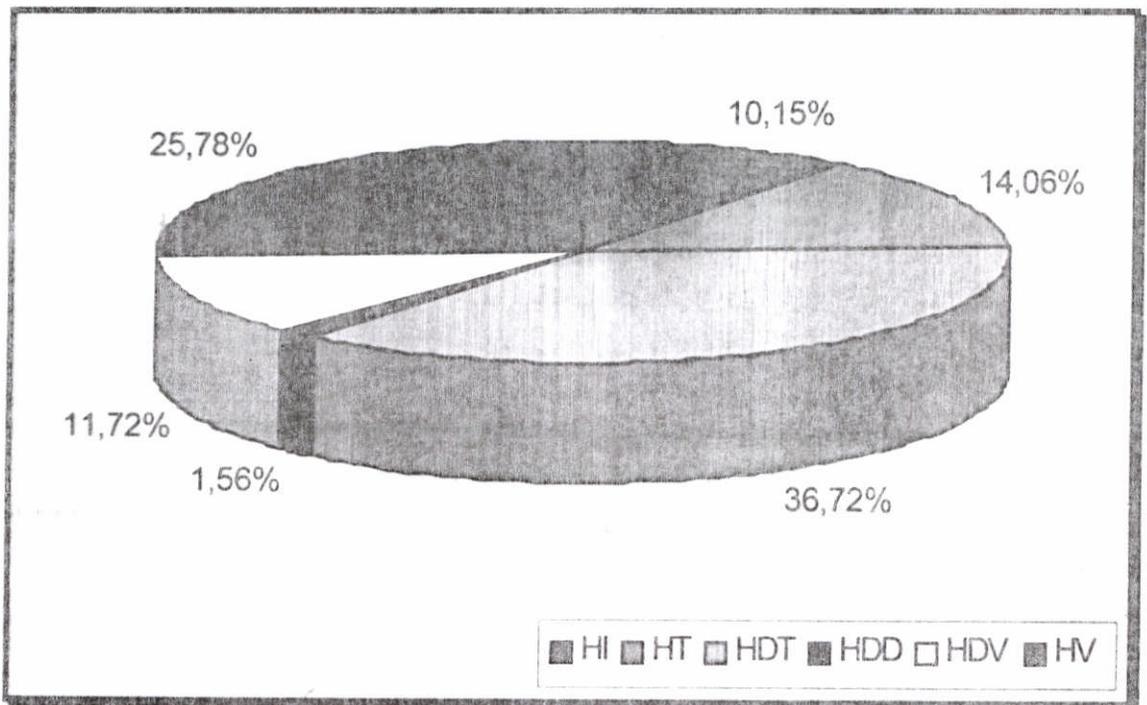


Gráfico 1: Frequência das formas clínico-histopatológicas da hanseníase, representada em porcentagem de casos.

Os 128 materiais foram analisados pela coloração de Wade para a identificação do baar e apresentou o seguinte resultado: 55 casos (43,00%) foram positivos para baar e constituem o grupo MB. E 73 casos (57,00%) foram negativos e constituem o grupo PB (Gráfico 2).

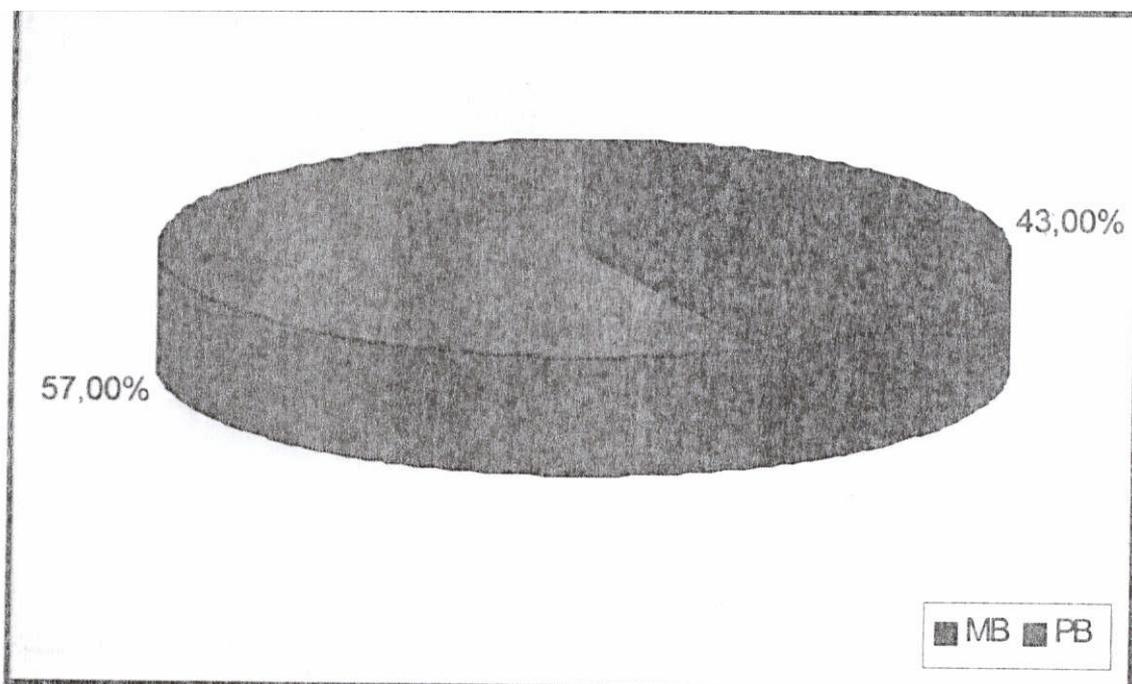


Gráfico 2 : Frequência dos casos de hanseníase PB e MB pela coloração de Wade, do total de casos estudados, representada em porcentagem.

Os 73 casos com baar negativo (PB) foram classificados histopatologicamente em 13 casos (17,80%) com a forma HI, 18 casos (24,60%) de HT e 42 casos (57,60%) HDT (Gráfico 3).

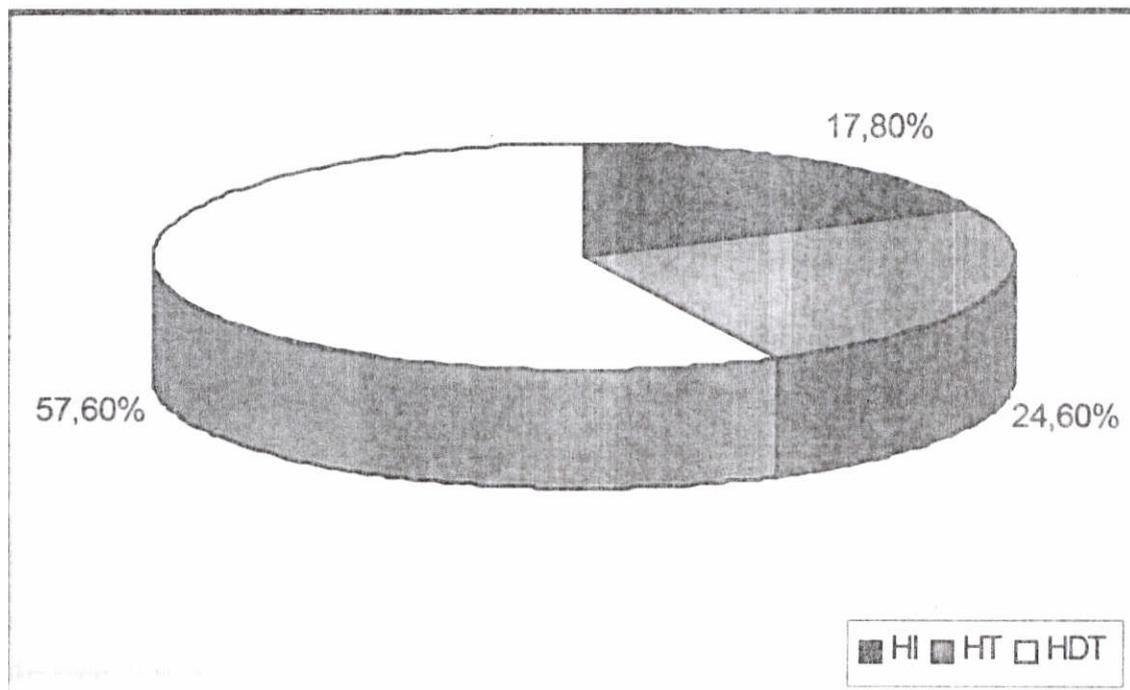


Gráfico 3: Frequência das formas clínico-histopatológicas de hanseníase PB, representada em porcentagem.

Os 55 casos com baar positivo (MB) foram classificados clínico-histopatologicamente em 5 casos (9,10%) de HUT, 2 casos (3,60%) de HDD, 15 casos (27,30%) de HDV e 33 casos (60,00%) de F-IV (Gráfico 4).

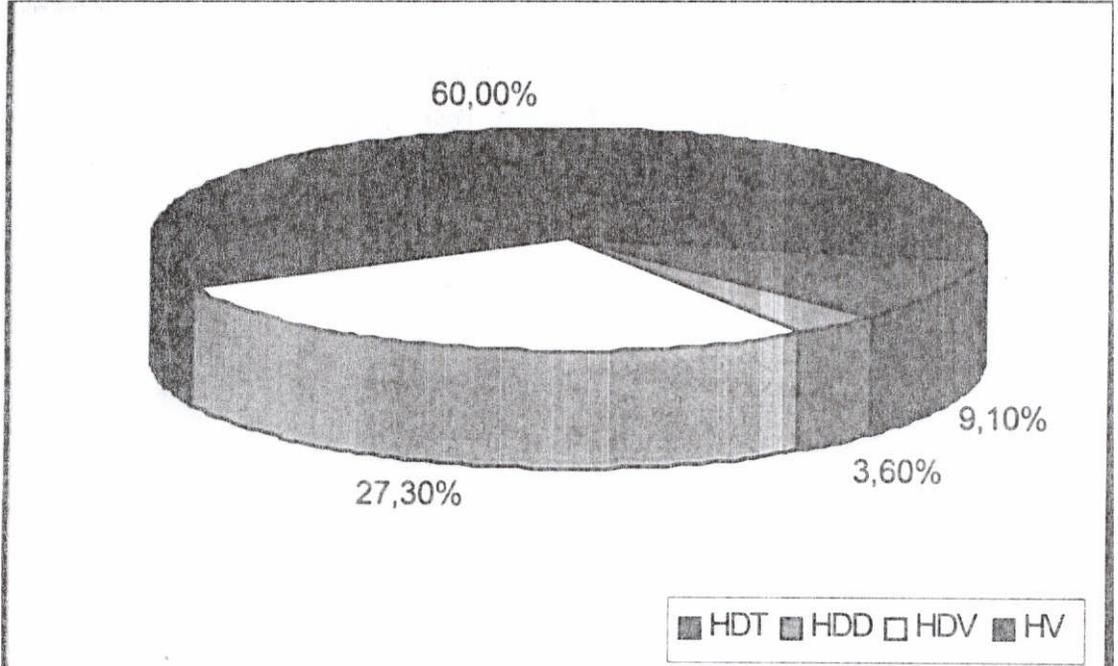


Gráfico 4: Frequência das formas clínico-histopatológicas de hanseníase MB, representada em porcentagem.

5.2 - Resultado global da PCR

Dos 128 casos submetidos à técnica da PCR, ocorreu amplificação em 105 casos (82,00%), são os casos de PCR positiva (PCR +), 23 casos (18,00%) não amplificaram, são os casos com a PCR negativa (PCR -) (Gráfico 5).

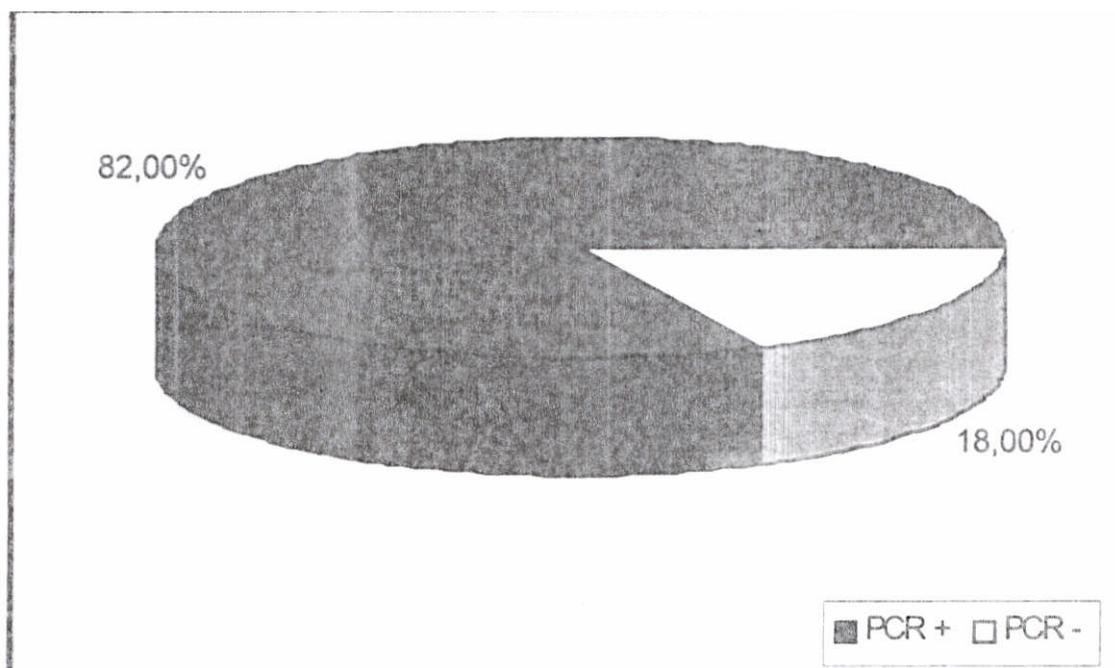


Gráfico 5: Resultado da PCR nas 128 amostras de hanseníase, representado em porcentagem.

5.3 - Resultado comparativo entre o método da PCR, e de Wade.

Das 128 amostras de pele fixadas em formol e emblocadas em parafina, o exame histopatológico corado pelo método de Wade apresentou positividade em 55 casos (43,00%) e pela técnica da PCR a positividade ocorreu em 105 casos (82,00%).

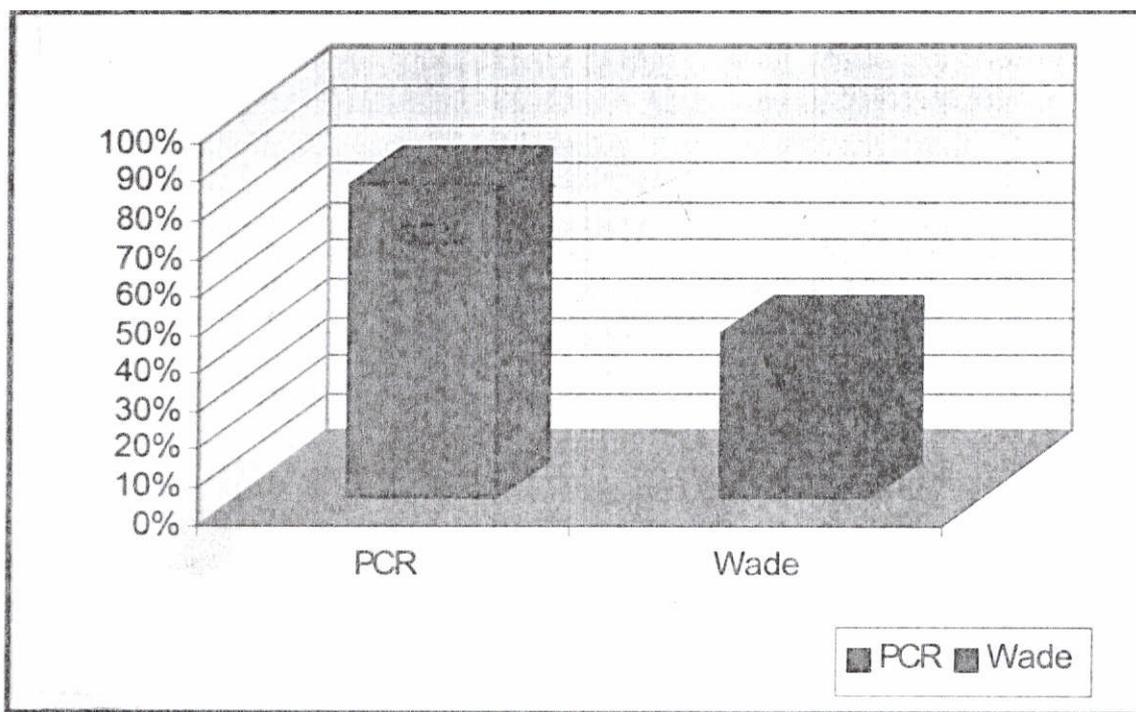


Gráfico 6: Resultado da positividade entre o método da PCR e Wade.

A PCR apresentou positividade diferente entre os dois grupos de hanseníase. Na forma PB, a PCR foi positiva em 62 casos (35,00%) e não amplificou em 11 casos (15,00%) (Gráfico 7).

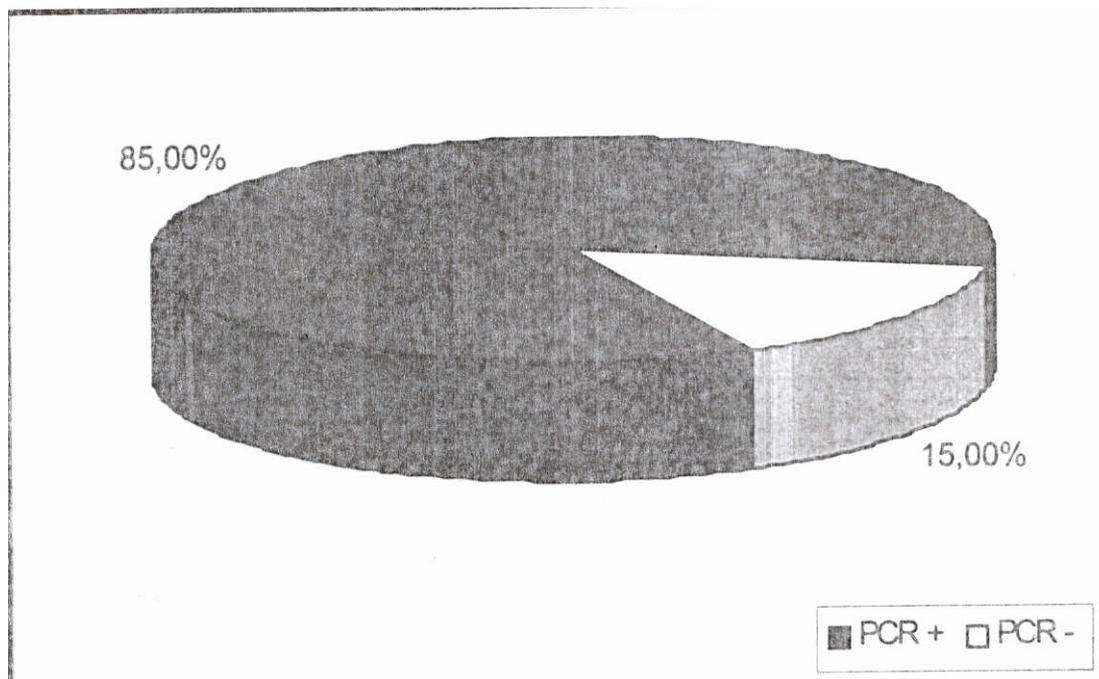


Gráfico 7: Resultado da PCR na forma da hanseníase PB, representado em porcentagem.

No grupo PB, a positividade da PCR ocorreu em 11 casos (15,06%) na forma HI, em 16 casos (21,90%) na forma HT e em 35 Casos (48,00%) na forma HDT (Gráfico 8).

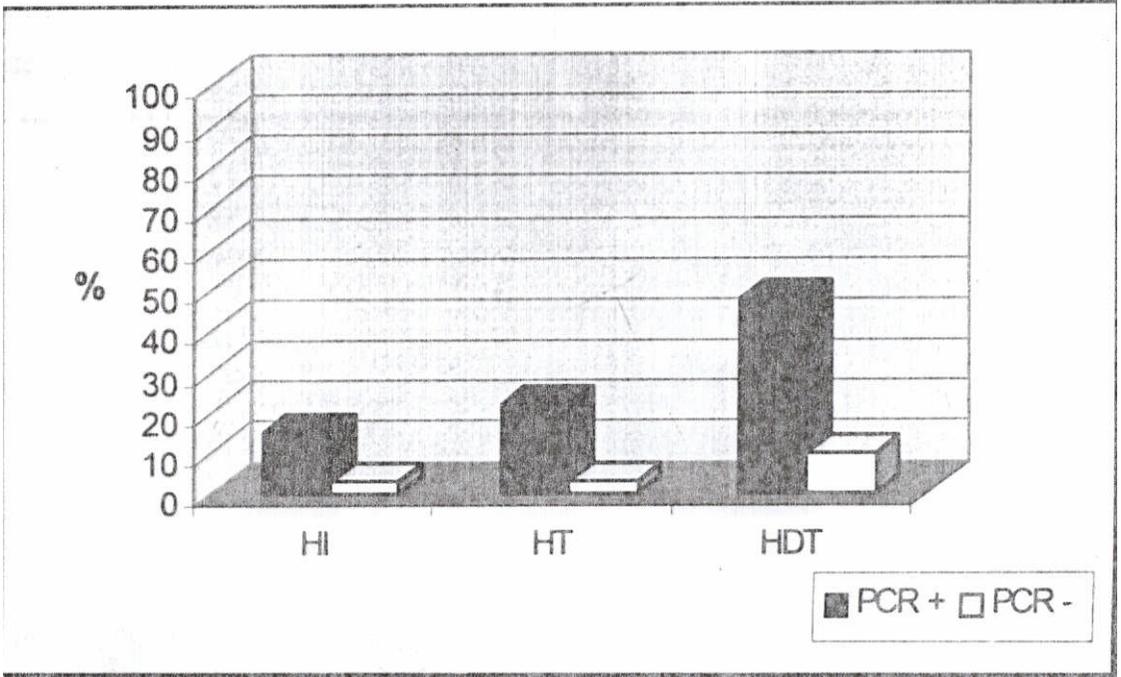


Gráfico 8: Resultado da PCR nas diversas formas da hanseníase PB, representado em porcentagem:

HI = 15,06%

HT = 21,90%

HDT = 48,00%

Resultado comparativo entre o exame histopatológico pela coloração de Wade e a técnica da PCR, nos casos da hanseníase PB.

O exame histopatológico pelo Wade não demonstrou presença de bacilos em nenhum caso (0,00%), e, pela técnica da PCR a positividade ocorreu em 62 casos (85,00%).

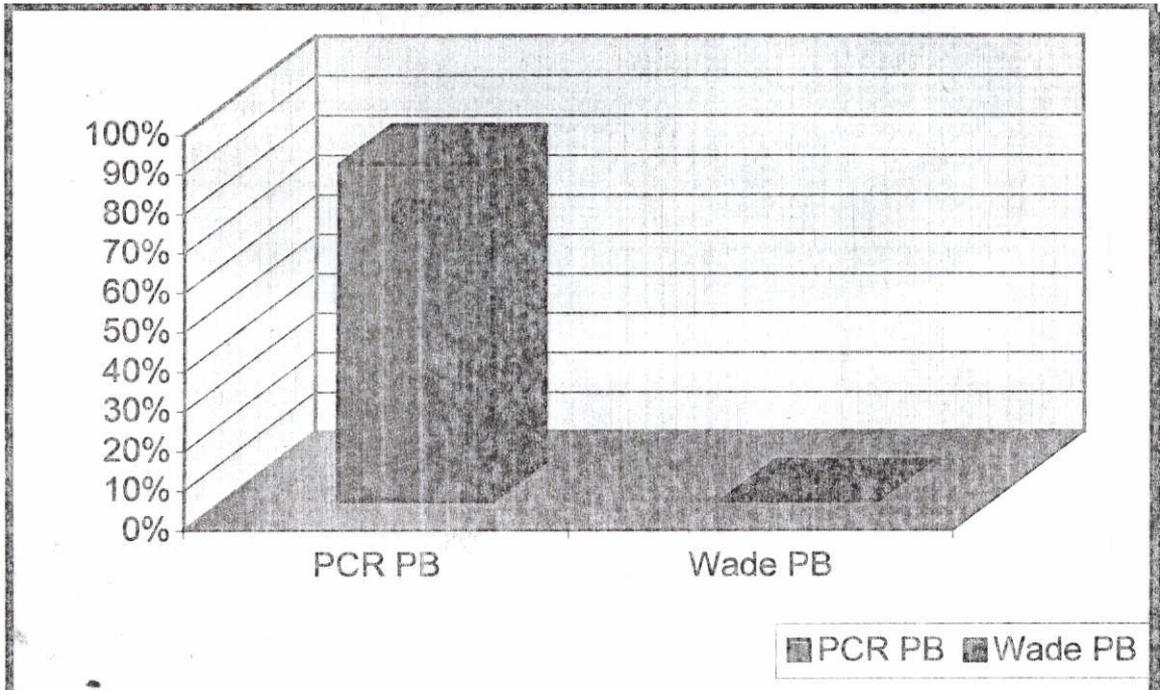


Gráfico 9: Resultado comparativo entre a PCR e Wade na hanseníase PB.

Nos 55 casos de MP, a PCR amplificou 43 casos (78,00%) e não amplificou 12 casos (22,00%) (Gráfico 10).

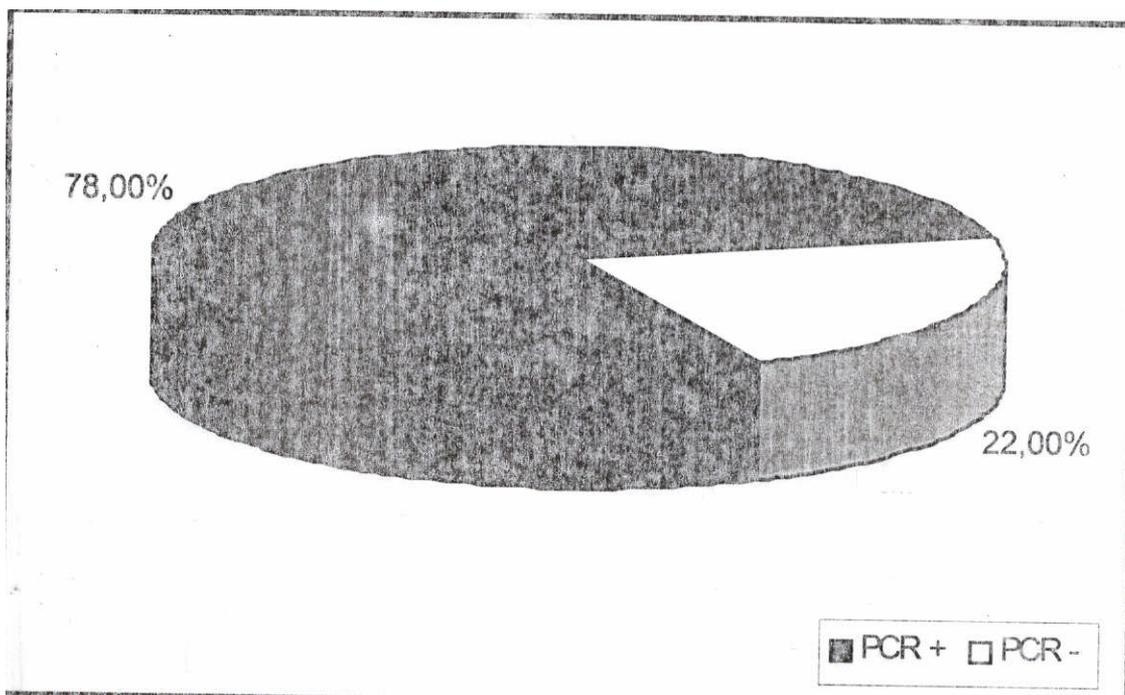


Gráfico 10: Resultado da PCR na forma da hanseníase MB, representado em porcentagem.

Resultado comparativo entre o exame histopatológico pela coloração de Wade e a técnica da PCR, nos casos da hanseníase MB.

A coloração de Wade demonstrou presença de bacilos em 55 casos (100,00%) e a técnica da PCR foi positiva em 43 casos (78,00%).

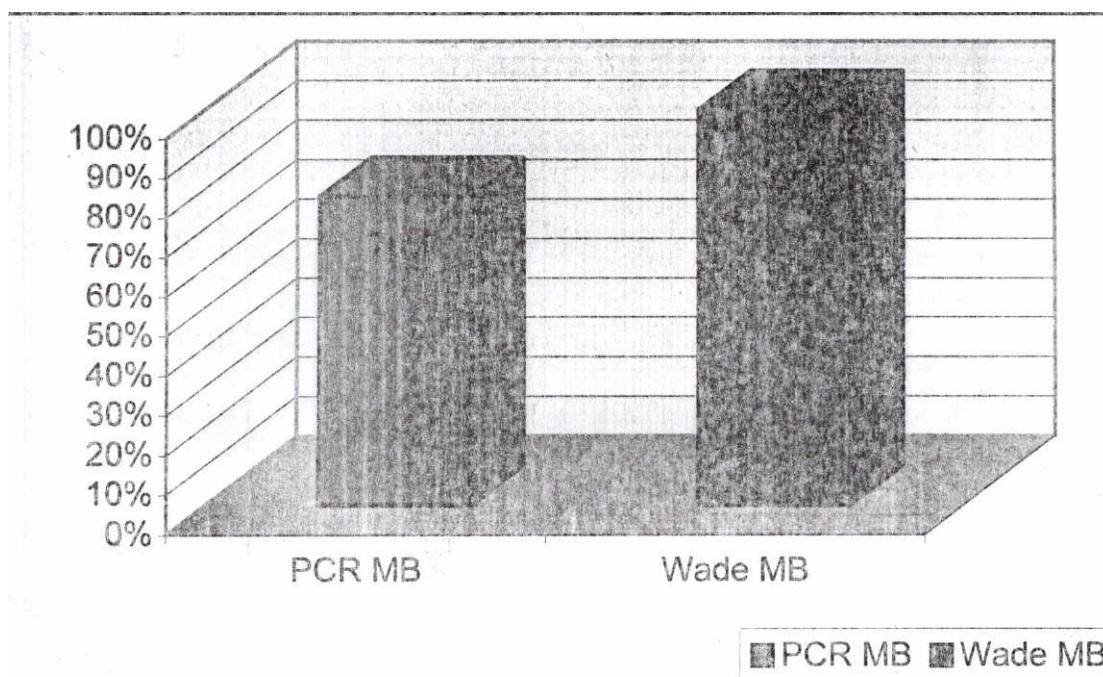


Gráfico 11: Resultado comparativo entre o método da PCR e Wade na hanseníase MB.

A positividade da PCR em diferentes grupos de MB foi em quatro casos (7,20%) de HDT, dois casos (3,60%) de HDD, 11 casos (20,00%) de HDV e 22 casos (47,20%) em HV (Gráfico 12).

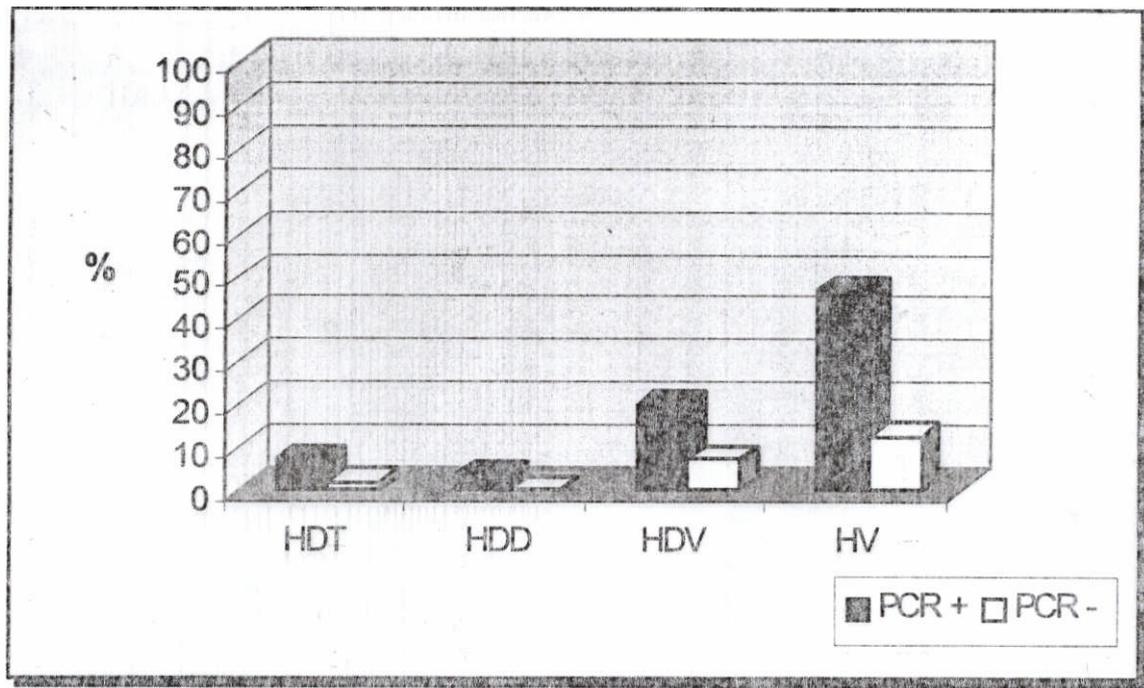


Gráfico 12: Resultado da PCR nas diversas formas da hanseníase MB, erro percentagem:

HUT = 7,20%

HDD = 3,60%

HDV = 20,00%

HV = 47,20%

Não foi observada a diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparada a porcentagem de positividade da PCR nas amostras de lesões paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) (Gráfico 13).

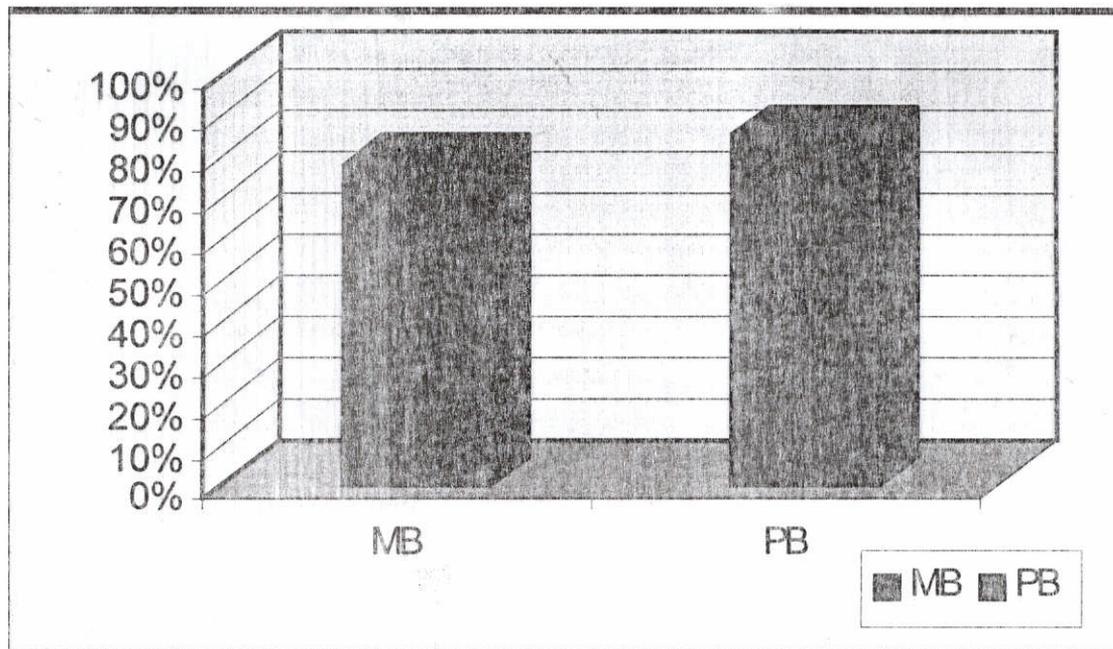


Gráfico 13: Resultado da PCR nas formas da hanseníase PB e MB.

Comparação do resultado, em porcentagem, de PCR positiva e negativa nas diversas formas clínico-histopatológicas da hanseníase PB e MB (Gráfico 14).

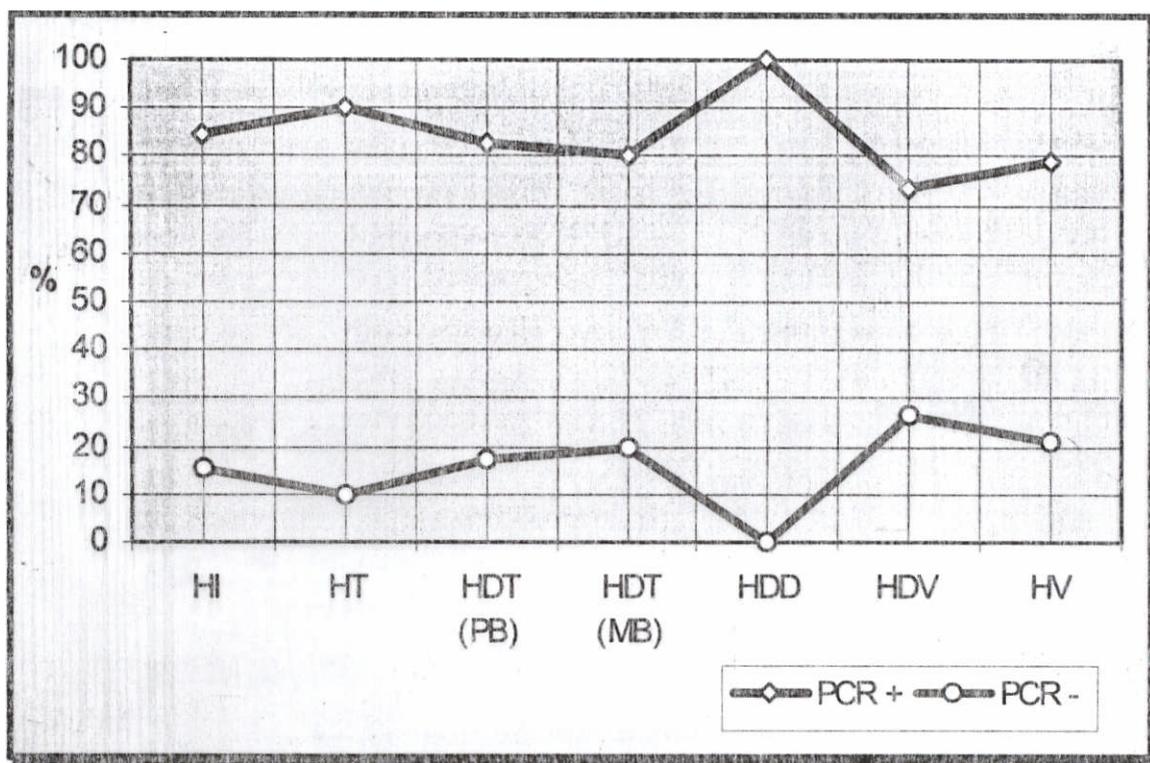


Gráfico 14: Resultado comparativo de PCR + e PCR - nas diversas formas clínicas da hanseníase, em porcentagem de ocorrência:

HI (13 casos) = 84,62%: PCR +; 15,38%: PCR -

HT (18 casos) = 88,89%; PCR +; 11,11%: PCR -

HDT (42 casos PB) = 83,34%: PCR +; 16,66%: PCR -

HDT (05 casos MB) = 80,00%; PCR +; 20,00%: PCR -

HDD (02 casos) = 100,00%: PCR +

HDV (15 casos) = 73,33%: PCR +; 26,67%: PCR -

HV (33 casos) = 78,80%: PCR +; 21,20%: PCR -

5.4 - Documentação fotográfica dos produtos amplificados

Resultado do teste de inibidores na reação da PCR nas amostras de tecido fixado, pela β -actina que amplificou fragmento de 304pb (Figura 1).

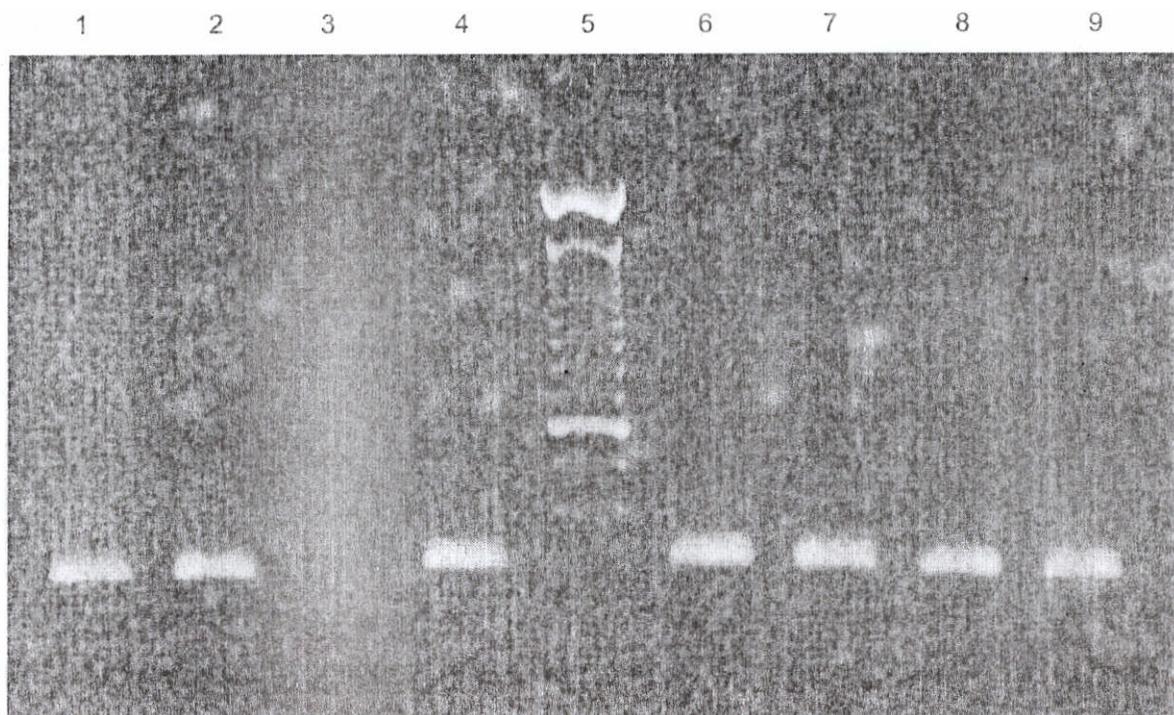


Figura 1: Fotografia do gel de agarose a 1,5% após separação eletroforética dos produtos da PCR pela β -actina. Linhas 1, 2, 4, 6, 7, 8 e 9: gene β -actina positiva; Linha-a: β -actina negativa; Linha 1: OP; Linha 2: ON; Linha 3: CR (somente reagentes); Linha 4: PB com POP, positiva; Linhas 6 e 7: MB com PCR positiva. Linha 8: -MB com PCR negativa; Linha 9: PB com POR negativa; Linha 5; marcador de tamanho molecular (100pb).

Resultado dos produtos da primeira etapa da FOR utilizando os iniciadores T₁U₂ e T₁D amplificaram o DNA do gênero *Mycobacterium* com fragmentos de 310pb nas amostras de tecidos fixados (Figura 2).

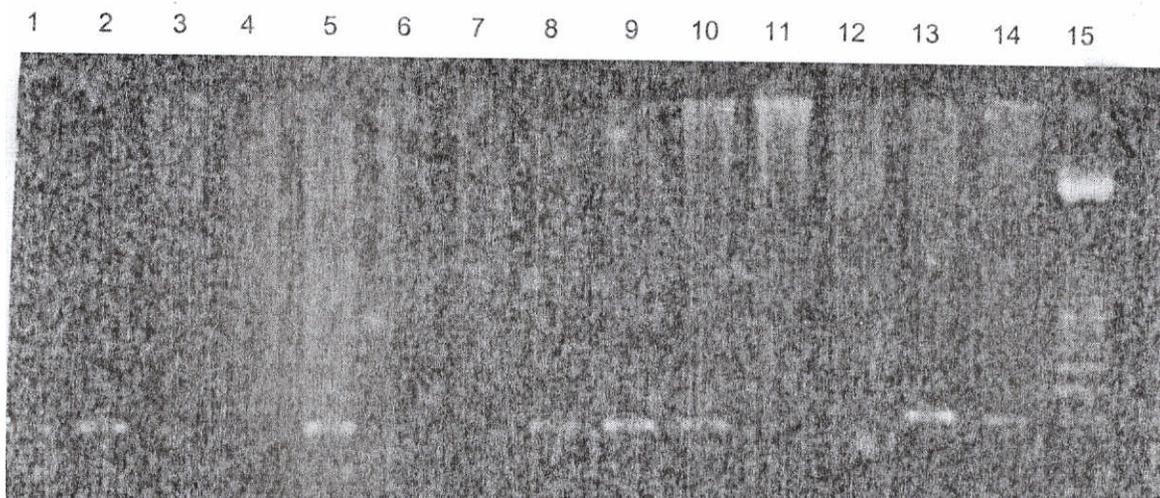


Figura 2 Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da POR. Linhas 2, 5; 10 e 13: MB com PCR positiva; Linhas 7 e 11: MB com PCR negativa; Linhas 1, 9 e 14: PB com POR positiva; Linhas 3 e 12: PB com PCR negativa; Linha 4: ON; Linha 8: OP; Linha 6: CR; Linha 15: marcador de tamanho molecular (100pb).

Produtos da segunda etapa da PCR, com fragmento de 133pb, submetidos a ação enzimática com enzima de restrição Alu1 para a caracterização da espécie *M. leprae* resultando em fragmentos de 1100 das amostras de tecidos fixados (Figura 3).

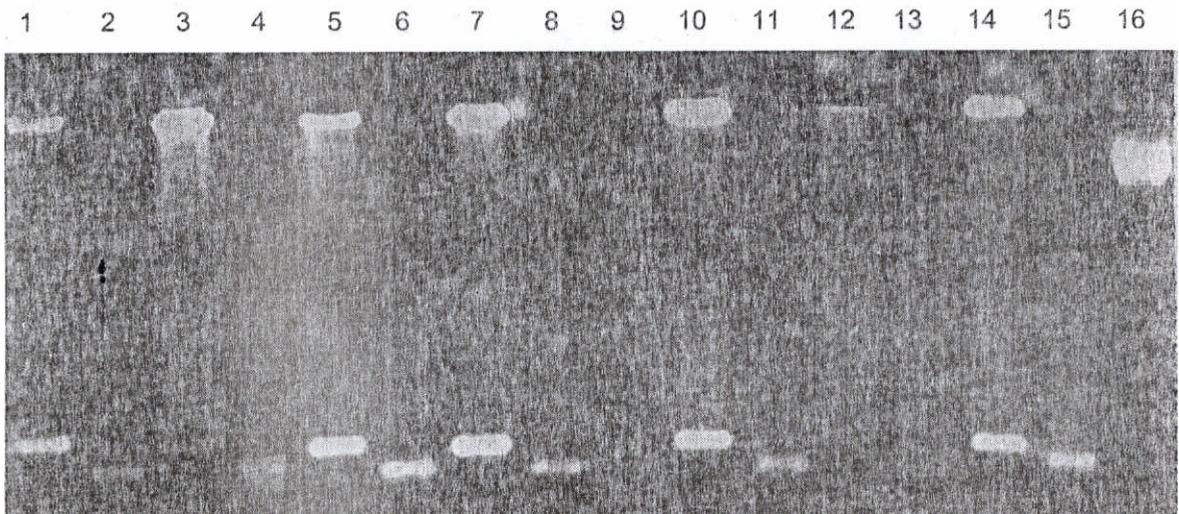


Figura 3: Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da POR e da digestão enzimática pela Alu-1. Linhas 1, 3, 5, 7, 10 e 14: segunda etapa da POR amplificou 133pb; Linhas 2, 4, 6, 8, 11 e 15: digestão pela enzima de restrição Alu1 do produto da segunda etapa da POR dos materiais das linhas 1, 3, 5, 7, 10 e 14, respectivamente, e resultou fragmento de 110pb; Linha 5: CP produto da segunda etapa da POR ; Linha 6: CP - digestão pela enzima de restrição Linha 9: CR não ocorreu amplificação; Linhas 12 e 13: ON não ocorreu a amplificação; Linha 16: marcador de tamanho molecular (100pb).

O resultado da ação enzimática com AluI sobre os produtos da segunda etapa da PM, amplificaram o DNA específico para a espécie *M. leprae* com fragmentos de 110 pb no gene groEL (Figura 4).

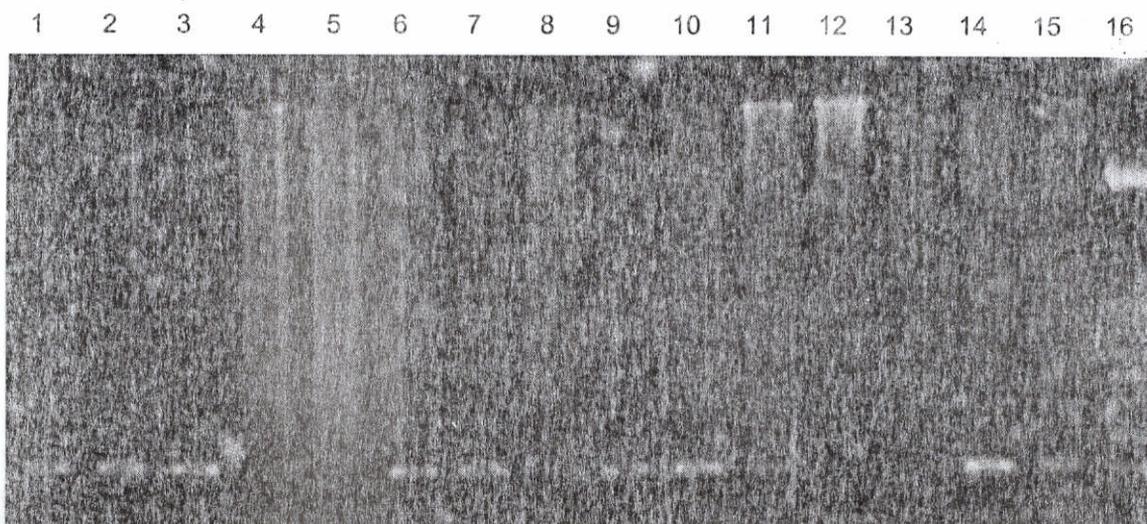


Figura 4: Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da digestão enzimática com Alu-1 dos produtos da PCR, no gene groEL. Linhas 6, 7, 10 e 14: PB com PCR positiva (fragmentos de 110pb); Unha 8: PB com PCR negativa; Linhas 1, 2, 9, 11 e 15: MB com PCR positiva; Linhas 12 e 13: MB com PCR negativa; Linhas 4: ON; Linha 5: OR; Linha 3: CP; Linha 16: Marcador de tamanho molecular (100pb).

5.5 - Resultado da sensibilidade da PCR

O DNA extraído do CP amplificou em todas as diluições (1/10, 1/100 e 1/1000). Os CN e CR, não amplificaram. As dez amostras PCR positiva amplificaram na diluição de 1/10. As amostras de PB (1 a 4) amplificaram até a diluição de 1/100. As amostras de MB (5 a 10) amplificaram até a diluição de 1/10. (Tab. 13).

Tabela 14: Resultado da sensibilidade nas amostras com PCR positiva: PB (1 a 4) e MB (5 a 10).

	NORMAL	DILUIÇÕES		
		1/10	1/100	1/1000
CP	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
CN	0,0	0,0	0,0	0,0
CR	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 1	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 2	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 3	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 4	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 5	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 6	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 7	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 8	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 9	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 10	Positiva	Positiva	0,0	0,0

Seis amostras da hanseníase MB com PCR negativa foram submetidas ao teste de sensibilidade na diluição de 1/10, 1/100 e 1/1000.

O CP amplificou em todas as diluições. O CN e CR não amplificaram em nenhuma diluição.

Duas amostras inicialmente negativas (amostra 1 e 2) positivaram na diluição de 1/10 e 1/100, indicando presença de inibidores. As demais amostras permaneceram negativas (Tab. 15).

Tabela 15: Resultado do teste de sensibilidade das amostras MB com PCR negativa.

	NORMAL	DILUIÇÕES		
		1/10	1/100	1/1000
CP	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
CN	0,0	0,0	0,0	0,0
CR	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 1	0,0	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 2	0,0	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 3	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 4	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 5	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 6	0,0	0,0	0,0	0,0

5.6 - Resultado do teste de inibidores

O resultado do teste de inibidores, pela β -actina, no CP, CN e nas amostras com PCR positiva, amplificaram fragmentos de 304pb, indicando ausência de inibidores. O CR, não ocorreu amplificação (Tab.16).

Tabela 16: Resultado do teste de inibidores da PCR pela β -actina nas amostras com PCR positiva. Amostras (1 a 3) PB e (4 a 6) MB.

	RESULTADOS
CP	Positiva para β -actina
CN	Positiva para β -actina
CR	0,0
Amostra 1	Positiva para β -actina
Amostra 2	Positiva para β -actina
Amostra 3	Positiva para β -actina
Amostra 4	Positiva para β -actina
Amostra 5	Positiva para β -actina
Amostra 6	Positiva para β -actina

O resultado do teste de inibidores, pela β -actina, das amostras da hanseníase MB com PCR negativa revelou provável presença de inibidores nas amostras 5 e 6. (Tab. 17)

Tabela 17: Resultado do teste de inibidores da PCR pela β -actina nos casos MB com PCR negativa.

	RESULTADOS
CP	Positiva para β -actina
CN	Positiva para β -actina
CR	0,0
Amostra 1	Positiva para β -actina
Amostra 2	Positiva para β -actina
Amostra 3	Positiva para β -actina
Amostra 4	Positiva para β -actina
Amostra 5	0,0
Amostra 6	0,0

6-DISCUSSÃO

É interessante observar que ao longo do tempo, o diagnóstico da hanseníase permanece como um verdadeiro desafio tanto no diagnóstico clínico, laboratorial e mesmo ao nível da pesquisa básica e aplicada. Embora sua existência seja milenar, muito se tem a fazer no que se refere ao aprimoramento dos diagnósticos clínico e laboratorial.

Ao mesmo tempo em que a tecnologia avança, busca-se métodos diagnósticos mais sensíveis, precoces e específicos desta doença para a instituição da terapêutica adequada.

Neste aspecto, o conhecimento dos ácidos nucléicos e o avanço no estudo da biologia molecular têm contribuído significativamente para o entendimento da etiologia das doenças e desta, em especial. O desenvolvimento dos sintetizadores automáticos de iniciadores levaram a evolução tecnológica usando sondas específicas que, atualmente, estão disponíveis nos bancos genéticos (Yoon et al., 1993; Santos et al., 1993; Hirata e Hirata, 1995). Estes métodos laboratoriais são possíveis de serem utilizados em amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina.

Assim, a PCR caminha a passos largos e tem permitido aos pesquisadores identificar a etiologia das doenças com grande sensibilidade e em menor espaço de tempo. No entanto, a aplicação do método em material parafinado tem sido pouco utilizado por requerer procedimentos mais complexos.

A primeira oportunidade de realizar este trabalho surgiu ao conhecer o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Este laboratório é o pioneiro neste setor e já desenvolveu vários trabalhos com a PCR em tecidos, secreções, líquidos orgânicos na pesquisa de vários

agentes infecciosos (vírus, bactérias, parasitas), na detecção de locos de resistência a antibióticos, no diagnóstico de doenças genéticas para identificação de indivíduos e em medicina forense. Até então eles não tinham tido a oportunidade de realizar um trabalho com *M. leprae*. Estudar a hanseníase em material parafinado era meta também a ser alcançada por eles. Este fato contribuiu para o intercâmbio e definiu os objetivos visando a padronização de um sistema com PCR capaz de diagnosticar fidedignamente a hanseníase no Material parafinado.

Em função deste objetivo futuro havia no laboratório quatro iniciadores de L1 a L4 (Plikaytis et al., 1990) para amplificar um segmento do DNA de *Mycobacterium leprae*, no gene *groEL*.

No Brasil há poucos trabalhos sobre PCR em hanseníase, eles estão relacionados aos exames de sangue, linfa, secreção nasal e bulbo piloso (Santos et al., 1993, 1995 e 1997). Na literatura mundial são poucos os trabalhos referentes a aplicação da PCR em tecido parafinado, como por exemplo: (Sung et al., 1993; Nishimura et al., 1994; Cook et al., 1994), e por isto, este trabalho se propôs a estudar o assunto.

Um dos passos iniciais ao se trabalhar com a PCR é reconhecer que o material biológico, sofre várias manipulações, desde a obtenção da amostra, a passagem por várias soluções, até a amplificação do produto desejado, e este processo aumenta a chance tanto da contaminação quanto da degradação do DNA do material. Isto foi motivo de preocupação durante a execução dos experimentos e também para os pesquisadores que utilizaram esta técnica. Kallio et al. em 1991, detectaram agentes inibidores até no sumo de palitos de madeira e nas pipetas de polietileno após duas a três semanas de exposição aos raios ultravioleta, que normalmente, são responsáveis pela eliminação dos inibidores e de DNA exógeno. 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., 1991.

De acordo com os objetivos propostos, procurou-se aplicar a técnica da PCR no diagnóstico da hanseníase utilizando fragmentos de pele fixadas em formol e emblocadas em parafina.

O material para este estudo compreende dois grupos: um multibacilar e outro paucibacilar.

Esta classificação grupal tem como base a análise dos cortes histológicos pela coloração de Wade. Quando, no material, esta coloração mostra a presença de bacilos e globias (MB), a definição do diagnóstico não causa problemas. Já quando é negativa (PB), várias situações precisam ser analisadas. É fundamental lembrar que um exame negativo não exclui o diagnóstico da hanseníase. O material tecnicamente bem preparado deve ser analisado criteriosamente (com aumento de 1.000 X). Os referenciais para uma técnica histopatológica perfeita são as cores das ceratinas, dos grânulos de queratohialinas das glândulas sudoríparas écrinas e das hemácias.

O trabalho foi iniciado utilizando-se o protocolo de Plikaytis et al., (1990) para amplificar o gene *groEL* de *M. leprae* (Anexo 9:3 - Página 84) com os 4 iniciadores sugeridos por este autor e que o laboratório já os possuía. Apesar de várias modificações não se obteve o resultado desejado. Este protocolo não foi eficiente provavelmente por ele ser elaborado para trabalhar com material a fresco, pois neste, o DNA não sofre ação dos fixadores.

O segundo protocolo utilizado foi o de Richter et al., (1994 e 1995) com amplificação do RNA 16S. Este protocolo estabelece dois objetivos: um direcionado para o material a fresco e o outro para o material parafinado. O protocolo de Richter para material parafinado utiliza dois iniciadores sense (P1 e P5) para a amplificação do fragmento 479pb e um outro iniciador anti-sense (PL) específica para *M. leprae* (Anexo 9.4 — Página 85). O resultado não foi o esperado.

Utilizou-se os iniciadores do protocolo de Richter para material a fresco (DNA de fígado de tatu infectado pelo *M. leprae*) associado à técnica do protocolo para material parafinado, do mesmo autor, para o gênero *Micobactérium*. O resultado, ainda assim, não foi satisfatório, provavelmente devido a dois fatores: sequência do primer que flanqueiou a região do DNA mais suscetível à degradação do DNA extraído do material parafinado; ou da incompatibilidade dos iniciadores em relação ao DNA degradado.

Continuando a busca de um protocolo eficaz tentou-se então, um terceiro protocolo, o de Cook et al., (1994) que amplificou 65 kDa, descrito no Anexo 9.5

(página 86). Com este, e tendo introduzido trinta e duas modificações, conforme descrito no Anexo 9.6 (página 87), conseguiu-se finalmente um padrão de amplificação confiável para os fins objetivados. Destas modificações, 16 foram definitivamente incorporadas à técnica e contribuíram para o êxito do trabalho. As modificações foram:

- 1 - Desparafinar a quente utilizando xilol em temperatura em torno de 97°C e 57°C, para desnaturar a cápsula e facilitar a digestão pela PK da membrana cérea do *M. leprae*.
- 2 - Retirar o solvente com três lavagens de etanol, para diminuir o tanto quanto possível o resíduo de solventes e facilitar a ação da PK.
- 3 - Aplicar o choque térmico antes da digestão objetivando a desnaturação da cápsula do *M. leprae* e facilitar a ação da PK.
- 4 - Utilizar o "BD9" como solução tampão digestão que se mostrou mais eficiente na ação da PK (Oguske, 1998).
- 5 - Aumentar o volume do tampão digestão de 804 para 4804 que aumenta a área de contacto da ação entre a PK e a cápsula bacilar, evitando saturação.
- 6 - Aumentar a concentração da PK de 1 mg/mL para 20 mg/mL com finalidade de aumentar o poder de digestão da cápsula bacilar sem destruição do DNA.
- 7 - Aumentar o processo de extração e purificação do DNA de uma para três séries, mostrou resultados mais eficientes em material que apresentavam dificuldades de extração do DNA.
- 8 - Utilizar 0,4 mg de glicogênio, como carreador, melhorou a precipitação do DNA.
- 9 - Substituir o etanol por isopropanol: que se mostrou melhor precipitador de DNA (Shimizu e Burs, 1995).
- 10 - Substituir o acetato de sódio por acetato de amônia: com a mesma finalidade de saturar o meio e facilitar a precipitação do DNA (Shimizu e Burs, 1995).
- 11 - Substituir a água Milli Q. pelo TE que preservou melhor o DNA.

- 12 - Incubar o DNA em banho de água antes da reação de amplificação. O aquecimento a 57°C durante 60 minutos facilitou a separação entre as moléculas de DNA aumentando a sensibilidade da PCR.
- 13 - Amplificar o DNA logo após a sua extração evitando o seu armazenamento para evitar a perda da qualidade e quantidade do DNA do material parafinado.
- 14 - Aumentar a concentração da Taq. DNA polimerase de 2,0U para 2,5U para aumentar a atividade enzimática.
- 15 - Aumentar o número de ciclos de amplificação no programa do termociclador de 35 para 40 ciclos, para aumentar a sensibilidade.
- 16 - Aumentar o tempo de permanência nas etapas da PCR de 1 minuto para 2 minutos nas fases de desnaturação, anelamento e extensão. Na extensão final acrescentar mais 5 minutos. Com este procedimento aumentou a sensibilidade.

Com a introdução destas modificações conseguiu-se alcançar resultados mais satisfatórios. Destas, acredita-se que duas delas desempenharam um papel importante. A primeira é a desparafinização a quente. A segunda, o choque térmico antes da digestão pela PK. Além de fazer uma boa desparafinização, é provável que o xilol aquecido interferiu na desnaturação do componente da parede do bacilo. O choque térmico antes da digestão, promoveu melhor degradação da cápsula do *M. leprae*.

Além destes cuidados é importante reconhecer que o material parafinado para ser utilizado na PCR deverá atender a várias especificações concernentes a pureza da amostra, pois vários são os fatores que levam a um resultado pouco confiável e qualquer resíduo de DNA contaminante poderá prejudicar o exame. Este fato já citado por Sucupira em 1994 e este autor recomenda realizar a PCR em três compartimentos isoladamente.

Considerando que o material em estudo foi preparado para o exame histopatológico de rotina, a otimização passou a ser realizada partir da microtomia, citados na otimização para corrigir possíveis fatores prejudiciais.

Apesar de fazer parte no material, 33 materiais com Wade positivo, incluiu-se o controle positivo (CP) especificamente preparada para a PCR, pois os casos positivos não foram otimizados desde o início do processo, e certamente poderiam apresentar degradação do DNA ou contaminação exógena do manipulador ou de outras micobactérias.

O CP apresentou amplificação até a diluição de 1/1000. Enquanto que Plikaytis et al., 1990 amplificou até com 0,2 picograma; Nishimura et al. em 1994 amplificou 100% em 39 amostras, Shimizu e Burns, em 1995 obtiveram baixa sensibilidade no material parafinado. Os autores utilizaram pó de vidro ou de sílica para purificar previamente o material fixado com a finalidade de diminuir a ação dos inibidores presentes e dos fixadores, sobre a degradação do DNA. Aumentaram o número de ciclos e o tempo de exposição em cada temperatura.

Como controle negativo (CN) utilizou-se fragmento de pele normal obtido de pessoa sadia, e para controle de reagentes (CR), usou-se a mistura de reagentes isento de DNA de micobactérias, cujo resultado foi negativo.

A PCR foi realizada em duas etapas o que possibilitou obter reação mais sensível e específica conforme descritos por alguns autores: Plikaytis et al., 1990; Perosio e Frank, 1992; Cook et al., 1994, conseguindo-se aumentar a sensibilidade em mais de 100 vezes.

Desta forma, a primeira etapa da PCR amplificou já em algumas amostras, uma região que flanqueia 310 bp do gene *groEL*, uma proteína de 65 kDa do DNA do *M. leprae*. A segunda etapa da PCR "nested PCR" reamplificou um segmento interno, de 133pb do DNA. A identificação da espécie *leprae* foi obtida através da digestão do produto da segunda etapa da PCR com a endonuclease de restrição-Alu1 que possibilitou identificar especificamente o *M. leprae* resultando num fragmento de 110pb. Os resultados obtidos encontram-se no Anexo 9.7 - página 89.

Vários autores amplificaram fragmentos com diferentes pares de base para detecção do *M. leprae*, como: Arnoldi et al. em 1992 amplificaram 990pb, Rafi et al. em 1995, Wichitwechkarn et al. em 1995 amplificaram fragmento de 530pb; Plikaytis et al. em 1990, Yoon et al. em 1993, Santos et al. em 1993, Misra et al. (1995) utilizaram iniciadores baseados na sequência dos genes LSR/15 kDa e obtiveram resultados mais positivos na forma da hanseníase MB, com melhor sensibilidade no material de "imprint" de pele. O nível de detecção foi de 10 a 100

bacilos, e conseguiram amplificar fragmento de 320pb, utilizando PCR em duas etapas com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade. Greer et al., (1995) relacionaram a idade do bloco ao tamanho do fragmento a ser amplificado. Blocos com até 16 anos amplifica fragmento de 268pb com 90% de positividade e blocos de 20 anos, 45% de positividade. Blocos com até 5 anos amplifica fragmento de 536pb com 60% de positividade, já, não apresenta positividade em 989pb. Corvalán em 1996 recomenda amplificar fragmento menor que 200pb para evitar resultados falsos negativos.

Apesar de não fazer parte dos objetivos deste trabalho, não se pode deixar de comentar os resultados obtidos em relação ao sexo, a idade e a incidência das formas clínicas que são semelhantes àqueles relatados na literatura. Houve um discreto predomínio nos homens, coincidindo com os dados relatados por diversos autores como: Fleury, 1983; Bechelli et al., 1988; Sampaio et al., 2000. Acredita-se que este grupo seja mais exposto ou de menor resistência imunológica. Os homens são comprometidos mais prematuramente do que as mulheres. Portanto, a hanseníase acomete tanto os homens quanto as mulheres, sem predileção de raça e em plena idade produtiva. (Yamanouchi et al., 1993).

A forma clínico-histopatológica da doença mais freqüente encontrada foi a forma HDT com 36.72%, seguida da HV com 25.78%, HT com 14.06%, HDV com 11.72%, HI com 10.16% e a forma menos freqüente, HDD com 1.56%. (Anexo 9.1 - página 78)

O aumento da frequência da forma HDT se deve à classificação de Ridley e Jopling (1962) que permitiu melhor definição dos quadros intermediários interpolares fazendo com que pequenas variações na configuração do granuloma, deixe de ser a forma polar HT, passando a ser classificada como HDT.

Analisando os resultados do gráfico 2 (página 38) verifica-se que o método histopatológico pela coloração de Wade confirmou 55 casos (43%) positivos (MB), e 73 casos (57%) negativos (PB). Sem dúvida o método utilizado, considerado como de escolha para esta finalidade, é pouco eficiente neste caso. Isto pode ser confirmado quando os casos paucibacilares foram submetidos à pesquisa do gene *groEL*, presente nas micobactérias, cuja área de restrição pela enzima Alu 1 caracteriza a espécie *M. leprae*. Verificou-se que dos 73 casos PB (Wade

negativo), 62 (85%) foram positivos pela PCR, enquanto 11 casos (15%) foram negativos. (Gráfico 7 - página 43).

Por outro lado nos casos do exame histopatológico Wade positivo, os MB, a técnica da PCR não foi expressiva. A expectativa era de 100% de positividade e o resultado mostrou-se positivo em 78% (Gráfico 10 - página 46). Este resultado, no entanto, expressa um importante dado científico; a não amplificação pode significar basicamente as seguintes suposições: 1) presença de inibidores (Heller et al., 1991; Nishimura et al., 1994; Shimizu e Burns, 1995; Misra et al., 1995; Pereira, 1997); 2) degradação do DNA extraído (Perose e Frank, 1992); 3) deficiência da extração do DNA (Shimizu e Burns, 1995); 4) presença de outra espécie que não da *M. leprae* ou a sua mutação na área pesquisada (De Wit et al, 1992).

Avaliando a 1ª hipótese, estudou-se em dois dos 6 casos MB negativos a presença de inibidores por diluição seriada do DNA obtido (Heller et al., 1991; Nishimura et al., 1994; Pereira, 1997) e verificou-se que houve resultado positivo após diluições de 1/10 e 1/100 (Tab. 16 e 17 - página 56 e 57, respectivamente), sugerindo claramente a presença de inibidores. No entanto, devido a pequena amostragem este resultado na o é totalmente conclusivo. Wichitwechkarn et al., (1995) observaram que o excesso de DNA inibiu a reação da PCR, num caso de hanseníase MB com IB > 5. Quanto as outras hipóteses, sugere-se aqui que sejam realizados mais estudos para avaliar estas dúvidas.

Comparando os estudos descritos na literatura, o resultado de 85% da,PCR positiva nos PB é animador mesmo em material parafinado. Yoon et al., (1993) estudando 102 casos; Jamil et al., (1993) estudando 17 casos; Wichitwechkarn et al., (1995), 53 casos utilizaram material a fresco e alcançaram positividade de 73,3%; 33,3% e 36,4% respectivamente. Em contrapartida nas formas MB, estes mesmos autores conseguiram positividade maiores que os 78% alcançado neste trabalho. Coincidindo com o nosso resultado Rafi et al., (1995), obtiveram melhor resultado na forma PB em 22 casos de "imprint" de pele, com positividade de 38,1% e 4,5% na forma MB. Possivelmente pela preservação da qualidade do DNA presente, mesmo em bacilos não viáveis.

Numa análise global, incluindo os PB e MB, a positividade da PCR foi de 82% (Gráfico 5 - página 41), resultado este, próximo ao alcançado por Santos et al., 1993 com positividade de 76% em material a fresco.

O estudo realizado por Nishimura et al., 1994 apresentou 100% de positividade em material parafinado tanto de pacientes PB como MB. Nos 20% dos casos com PCR negativa os autores repetiram a PCR na diluição de 1/2, 1/4 e 1/6 conseguindo amplificação em todos os materiais. As diferenças básicas entre as duas metodologias aplicadas foram: 1) neste trabalho o tempo de extração do DNA foi de 12 horas a 37°C, os autores realizaram em 72 horas a 40°C com adição de pK a cada 24 horas; 2) inativação enzimática com choque térmico a 100°C durante 10 minutos seguido de congelamento em nitrogênio líquido durante 1 minuto, eles utilizaram EDTA e aquecimento a 99°C, durante 10 minutos; 3) a purificação do DNA com :fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, e clorofórmio/álcool isoamílico não foi realizada por eles, que utilizaram pó de vidro ou de sílica para diminuir os efeitos de inibidores. Para os autores é possível que nas micobactérias que apresentam paredes celulares espessas a digestão enzimática deverá ser mais prolongada com finalidade de melhor extração do DNA e evitar resultados falsos negativos.

Na impossibilidade de se avaliar a sensibilidade da reação em todas as amostras, escolheu-se aleatoriamente dez amostras com PCR positiva e seis amostras com PCR negativa, utilizando método de diluições sequenciais simples.

As dez amostras com PCR positiva, foram submetidas à diluições de 1/10, 1/100 e 1/1000 e amplificaram até a diluição de 1/100 (Tab. 14 e 15 — páginas: 55, 56 respectivamente). Isto pode sugerir que para amostras parafinadas é possível amplificar o DNA até 100 vezes (Perose e Frank, 1992).

Das seis amostras negativas, duas amplificaram após a diluição de 1/10 demonstrando que aumentou a sensibilidade da reação nesta diluição (Tab. 15 - página 56), provavelmente provocada pela diluição dos inibidores presentes ou devido a alta concentração de DNA presente no material (Misra et al., 1995; Wichitwechkarn et al., 1995). As quatro amostras continuaram não amplificando, são os casos de MB que poderiam apresentar DNA degradado ou outros fatores que contribuíram para este resultado negativo. Se do universo de 23 casos com

PCR negativa todos fossem submetidos a diluições sucessivas é provável que o Índice de positividade aumentaria.

O material foi também submetido ao teste de inibidores com a finalidade de verificar causas de possíveis inibição da PCR. Desse modo, um exame negativo nem sempre indica ausência do DNA do *M. leprae*. Pode indicar a presença de inibidores da PCR, fato que ocorreu com as amostras 5 e 6, que não amplificaram o gene da β -actina. (Tabela 17 - página 57)

Portanto, nos casos MB, o exame pelo Wade é mais prático, mais fácil, e fidedigno, de menor custo e com 100% de positividade. A maior indicação para se usar a PCR é na hanseníase PB, e neste, acredita-se que a técnica tem um bom desempenho. Alcançar 85% de positividade no grupo PB pode ser considerado um êxito, porém pode ser aperfeiçoado na tentativa de eliminar todos os fatores que contribuíram com os 16% de negatividade neste estudo.

E evidente que um único protocolo não será apropriado para todas as situações, a cada aplicação será necessário o desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas e otimização.

A eficácia na extração do DNA do *M. leprae* e a eliminação de qualquer substância que venha inibir a reação, assim como, a escolha da sequência do DNA alvo e dos iniciadores são passos importantes para se obter os resultados desejados.

Este autor procurou normatizar os procedimentos que possibilitassem a utilização do material biológico parafinado para estudo simultâneo da histopatologia e das técnicas moleculares principalmente visando esclarecer os casos de PB.

Aprimorar o protocolo, melhorar a otimização, diminuir o tanto quanto possível os fatores contaminantes e inibidores são importantes como meta futura.

7 – CONCLUSÕES

- 1 Desparafinização a quente e o choque térmico antes da digestão pela PK são dois passos essenciais dentre as 16 modificações realizadas na metodologia para a obtenção do DNA do *Mycobacterium leprae*.
- 2 - A PCR, em duas etapas em material parafinado, aumenta a sensibilidade de amplificação do *Mycobacterium leprae*.
- 3 - A detecção do DNA do *M. leprae* foi positiva em 85% dos casos de hanseníase paucibacilares.
- 4 - A detecção do DNA do *M. leprae* foi positiva em 78% dos casos de hanseníase multibacilares.
- 5- A PCR realizada em 128 casos apresentou 82% de positividade enquanto que o Wade foi positivo em 43%.
- 6 - A PCR é uma técnica útil, sensível, específica, eficaz, e relativamente rápida para ser introduzida na rotina do diagnóstico laboratorial da hanseníase.
- 7 - A técnica da PCR, por se tratar de um método simples, não sofisticado, pode ser utilizado em laboratório de pequeno porte.

1-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001 - ARNOLDI, J., SCHLÜTER, C.; DUCHROW, M. et al. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. **Laboratory investigation**. v. 66, n. 5, p. 618-623, 1992.
- 002 - AZULAY, R. D. Sumário sobre o tratamento da hanseníase. Atualização. **Rio Dermatológico**, 1999. 5 pp.
- 003 - BECHELLI, L. M., CURBAN, G. V. Infecções bacilares da pele. in: **Compêndio de Dermatologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 664 pp.
- 004 - ____, ROTBERG, A., KEIL, H. Resultado da lepromina reação em países não endêmicos da lepra (Nota prévia). **Rev Brasil Leprol**. n. 32, p. 2124, 1945.
- 005 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FNS. CNDS. **Guia de Controle da Hanseníase**. 2. ed. Brasília, 1994. 156 pp.
- 006 - BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SPS. DGPE. ATDS. **Guia para implantar / implementar as atividades de controle da hanseníase nos pianos estaduais e municipais de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 1999. 28 pp
- 007 - BRASIL NETO, J.P. - Electrophysiologic studies in leprosy. **Arq Neuropsiquiatr**. n. 50, p. 313-318, 1992.
- 008 - BRENNAU, P.J., BARROW, W.W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. n. 48, p. 382-387, 1980.
- 009 - CHEMOUILLI, P.; WOODS, S.; SAID, G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesion by the polimerase chain reaction. **Int J Lepr** v. 64, n. 1, p. 1-5, Mar, 1996.
- 010 - CLARK-CURTIS, J.E., DOCHERTY, M.A. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. **J. Infect Dis**. n. 159, p. 7-15, 1989.

- 011 - COCHRANE, R.J. (1940). Quimioterapia. In: JOPLING, W. H., NIC: DOUGALL, A. C. **Manual de Hanseníase**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991, 110 pp.
- 012 - COOK, S.M., BARTOS, R.E.; PIERSON, C.L. et al. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. **Diagn Mol Pathol**. v. 3, n. 1, p. 53-58, 1994.
- 013 - CORVALAN, A. Reação de polimerase em cadeia. **O patologista**. n. 47, p. 47-48, Nov. 1996.
- 014 - De WIT, M.Y.L., DOUGLAS, J.T., Mc FADDEN, J. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **J Clin Microbiol**. n. 3, v. 31, p. 502-506, 1993.
- 015 - DE WIT, M.Y.L., FABER, W. R., KRIEG, S.R. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **J Clin Microbiol**. n. 29, p. 906-910, 1991.
- 016 - DHARMEDRA, M. D. Studies of the lepromin test. A bacillus antigen standardised by weight. **Leprosy in India**. n. 14, p. 122-129, 1942.
- 017 - FLEURY, R.N. *Hanseníase*. In: SILVA, I.M. **Dermatopatologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1983. p. 89-100.
- 018 - ____, BACCHI, C.E. S-100 protein and immunoperoxidase technique as an aid in the histopathologic diagnosis of leprosy. **Int J Lepr**. n. 55, p. 338-414., 1987.
- 019 - FORMAGE, B.D. - Peripheral nerves of the extremities. Imaging with ultrasound. **Radiology**. n. 167, p. 179-182, 1988.
- 020 - FOSS, N.T., CALLERA, F., ALBERTO, F. L. Anti - PGL1 levels in leprosy patient and their contacts. **Braz J Med Biol Res**. n. 26, p. 43-51, 1993.
- 021 - GAY PRIETO, J. **Dermatologia**. 7. ed. Barcelona: Científico Médica, 1971. p. 335-388.
- 022 - GELL, P. G. H., COOMBS, R. R., LACHMANN, P. J. Clinical aspects of immunology. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.
- 023 - GHOSSEIN, R. A.; SALOMON, R. N.; ABSON, A. R. Rapid detection and species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. **Diagnostic Molecular Pathology**. n. 1, v. 3, p. 185-191, 1992.
- 024 - GOTO, M., IZUMI, S. Light and electron-microscopic immunohistochemistry using anti-PGL1 antibody specific for *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. n. 59, v. 1, p. 195, 1991.

- 025 - GREER, C. E., WHEELER, C. M., MANOS, M. M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: sample preparation and the effects of fixation. In: DIEFFENBACH, C. W. et al. **PCR Primer - a laboratory manual**. Califórnia: CSHL Press, 1995. p. 99-110.
- 026 - HANCE, A. J., GRANDCHAMP, B., LEVY, V. et al. Detection and identification of mycobacteriol by amplification of mycobacterial DNA. **Molecular Microbiology**. n. 3, p. 843-849, 1989.
- 027 - HANSEN, A. (1873). In: BECHELLI, L. M., ROTBERG, A., **Compêndio de Leprol . gia. 2. ed.**, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1956.
- 028 - HARTSKEEL, R. A., DE WIT, M. Y. L., KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J General Microbiol.** n. 135, p. 2357-2364, 1989.
- 029 - HELLER, M. J., BURGAT, L. J., TENEYCK, C. J. et al. An efficient method for the extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by sonication. **Biotechniques**. v. 11, n. 3, p. 372-377, 1991.
- 030 - HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C. Aplicação da biologia molecular no diagnóstico clinico. **LAES & HAES. ano XVI**, n. 96, p. 98-108, ago/set 1995.
- 031 - HUERRE, M., DESFORGES, S., BOBIN, P. Demonstration of PGL1 antigens in skin biopsies in indeterminate leprosy patients: comparison with serological anti PGL1 levels. **Acta Leprol.** n. 7 (Suppl.) p. 125-127, 1989.
- 032 - JAMIL, S., KEEN, J. T., LUCAS, S. B. et al. Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. **The Lancet.** n. 34, p. 264-268, Jul. 1993.
- 033 - __ __, **WILSON**, S. M., HACKET, M. et al. A colorimetric PCR method for the detection of *M. leprae* in skin biopsies from leprosy patients. **Int J Lepr. v. 62**, n. 4, p. 512-520, 1994.
- 034 - JOB, C. K., CHEHL, S. K., HASTINGS, R. C. Transmission of leprosy in nude mice through thorn pricks. **Int J Lepr.** v. 62, p. 315-318, 1994.
- 035 - JOPLING, W. H. Reactional leprosy of leprosy in reaction. **Lepr Review.** n. 30, p. 194-196, 1959.
- 036 - JOPLING, W. H. , MC DOUGALL, A. C. **Manual de Hanseníase. 4. ed.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.
- 037 - KALLIO, P., SYRJANEN, S., TERVAHAUTA, A. et al. A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded sample for PCR. **Journal of Virological Methods.** n. 35, p. 39-47, 1991.

- 038 - KHANOLKAR, S. R., MACKENZIE, C. D., LUCAS, S. B. et al. Identification of *Mycobacterium leprae* antigens in tissues of leprosy patients using monoclonal antibodies. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** n. 57, p. 652-658, 1989.
- 039 - KIRCHCHEIMER, W. F., STORRS, E. E. Attempt to establish the armadillo (*Dasypus novencitus*) as a model for the study of leprosy. **Int J Lepr.** n. 3, p. 396-702, 1971.
- 040 - LATAPI, F., ZAMORRA, A. C. The "spotted" leprosy of Lucio (la lepra 'manchada' de Ludo): an introduction to its clinical and histological study. **Int J Lepr.** n. 16, p. 421-430, 1948.
- 041 - LEVER, W. F., LEVER, G. S. **Histopat logia da pele.** 7^a. ed. São Paulo: Manole, 1991. 475 pp, v. 1.
- 042 - LOMBARDI, C., FERREIRA, J., MOTA, C. P. et al. História natural da hanseníase. Epidemiologia e controle. São Paulo: **Imprensa Oficial do Estado**, 1990. p. 13-20.
- 043 - MADRI CONGRESS. Technical resolutions on classification. **Int J Lepr.** n. 21, p. 504-516, 1953.
- 044 - MENDONÇA, A. M. N. **Identificação imunohistoquímica da proteína S100 nas diversas formas de hanseníase.** Niterói, 1987. 154 pp. Tese (Doutorado em Patologia) Universidade de São Paulo.
- 045 - MICHALANY, **G. Técnica histológica em Anatomia Patológica.** São Paulo: EPU, 1980. 277pp.
- 046 - MILLER, R. A. Hanseníase (Lepra). In: HARRISON. *Medicine Interna.* 14^a. ed. 1998. 1085 pp.
- 047 - MISRA, N., RAMESH, V., MISRA, R. E. et al. Clinical utility of LSR/A 15 gene for *Mycobacterium leprae* detection in leprosy tissues using the polymerase chain reaction. **Int J Lepr.** v. 63, n. 1, p. 35-41, 1995.
- 048 - MITSUDA, K. Les lepreux maculo-nerveuse, d'une part, les tubereux d'autre part, comportent differentement a la suite d'une inoculation d'émulsion de tuberculo lépreux. **Anais da III Conferência Intern de Lepra.** Estrasburg. p. 219-222, 1923.
- 049 - MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA "in vitro" via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** n. 155, p. 335-350, 1987.
- 050 - MURATA, M. Erythema nodosum leprosum. **Jap J Derrnatol Urol.** n. 12, p. 1013, 1912.

- 051 - NARAYAMA, R. B., RAMU, G., SHINHA, S. et al. Demonstration of *Mycobacterium leprae* specific antigens in leprosy using monoclonal antibodies. *Indian J Lepr.* n. 57, p. 258-264, 1985.
- 052 - NEVES, R. G. A coloração de lipídios pelo Sudão III. Importância na classificação histopatológica da hanseníase. **Hansen hit.** n. 2, p. 132-152, 1977.
- 053 - NISHIMURA, M., KWON, K. S., SHIBUTA, K. et al. An improved method for DNA diagnosis of leprosy using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. **Modern Pathology.** V. 7, n. 2, p. 253-256, 1994.
- 054 - OGUSKO, M.M. **Utilização da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico laboratorial da tuberculose cutânea**, 1998. Dissertação apresentada ao ICB-USP, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.
- 055 - PATTYN, S. R., URSI, D., IEVEN, M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **Int J Lepr.** v. 61, n. 3, p. 389-393, Sep. 1993.
- 056 - PAYNE, S. N., DRAPER, P., REES, R. J. W. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** n. 50, p. 220-221, 1982.
- 057 - PEREIRA, C. A. D. **Caracterização molecular de parvovirus canino pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)** 1997. Tese (Mestre em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.
- 058 - PEROSIO, P. M., FRANK, T. S. Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of biopsy specimens by the polymerase chain reaction. **Clin Microbiology and Infectious Disease.** v. 100, n. 6, p. 643-647, 1992.
- 059 - PIERINI, I. E., Reacciones cutaneas de la histamina en dermatosis diversas. **Semana Med.** n. 38, v. 1, p. 159-170. 1931.
- 060 - PLIKAYTIS, B. B., GELBERG, R. H., SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **J Clin Microbiol.** v. 28, n. 9, p. 1913-1917, Sep. 1990.
- 061 - PORTUGAL, H. Contribution to the study of the classification of leprosy: aspects of lesions antigenic response and presence of microorganism in histologic structure. **Int J Lepr.** n. 15, p. 162-168, 1947.
- 062 - RABELLO, F. E. A clinico-epidemiological classification of the forms of leprosy. **Int J Lepr.** n. 5, p. 343-356, 1937.

- 063 - RABELLO, F. E., FRAGA, S. **Atlas de Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. 304 pp.
- 064 - RAFI, A., DONOGNUE, H. D., STANFORD, J. L. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. **Int J Lepr.** v. 63, n. 1, p. 42-47, 1995.
- 065 - RICHTER, E., DUCKROW, M., SHLÜTER, C. Detection of *Mycobacterium leprae* by there primer PCR. **Immunobiol.** v. 191, p. 351-353, 1994.
- 066 - _ _ _ , SCHLÜTER, C., DUCKROW, M. et al. An improved method for the species specific assessment of mycobacteria in routinely formalin fixed and paraffin-embedded tissues. **J Pathol.** n. 175, p. 85-92, 1995.
- 067 - RIDLEY, D. S., JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. **Lepr Rev.** v. 33, p. 119-128, 1962.
- 068 - _ _ _ , _ _ _ . Classification of leprosy according to immunity. **Int J Lepr.** n. 34, p. 255-273, 1966.
- 069 - _ _ _ , WALTERS, M. F. R. Significance of variations within the lepromatous group. **Leprosy Review.** n. 40, p. 143-152, 1969.
- 070 - _ _ _ **Pathogenesis of leprosy and related diseases**. Cambridge: Butterworth, 1988. 250 pp.
- 071 --RODRIGUES, J., PLANTILHA, F. C. The histamine test as an aid in the diagnosis of early leprosy. **Philip J Sc.** n. 46, p. 123, 1931
- 072 - ROTBERG, A., BECHELLI, L. M. A terapêutica chaulmoogra, de acôrdo com o estudo de 2.201 casos de lepra. II **Conferência Paramericana de Lepra**, RJ. n. 2, p. 363-374, 1946.
- 073 - ROTBERG, A. The "Hansen-nergic fringe". **Acta Leprol.** n. 4, p. 347-354, 1986.
- 074 - ROTBERG, A. (1977) Hanseníase. In: MICHALANY, J. **Anatomia Patológica Geral**. São Paulo: Artes Médicas, 1995, 317 pp.
- 075 - SAAD, M. H. F., MEDEIROS, M. A., GALLO, M. E. N. IgM immunoglobulins reacting with the phenolic glycolipid-1 antigen from *Mycobacterium leprae* in sera of leprosy patients and their contacts. fViem **frost Oswaldo Cruz.** n. 85, p. 191-194, 1990.
- 076 - SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification of 13-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.** v. 230, p. 1350-1354, 1985.

- 077 - __ __ __, GELFAND, D., STOFFEL, S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 239, p. 487-491, 1988.
- 078 - SANBROOK, J. **Molecular Cloning: a laboratorial manual**. 2. ed. v. 3: Cold Spring Harbor, 1989.
- 079 - SAMPAIO, S. A. P., RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2ª. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 1155 pp.
- 080 - SANTOS FILHO, L. História **Geral da Medicina Brasileira**. São Paulo: HUCITEC, USP, 1977, 436 pp.
- 081 - SANTOS, A. R., MIRANDA, A. B., SARNO, E. N. et al. Use of PCRmediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnoses of leprosy. **J Med Microbiol**. v. 39, p. 298-304, 1993.
- 082 - __ __ __, GOES FILHO, J. T., NERY, J. A. C. et al. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. RJ. v. 11, p. 113-120, 1995.
- 083 - __ __ __, NERY, J. A. C., DUPPRE, N. C. et al. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol**. v. 46, p. 170-172, 1997.
- 084 - SCHAFFER, I. An the spread of leprosy bacilli from the upper parts of the .respiratory tract. **Arch Dermatol Siphylol**. n. 44, p. 159-179, 1989.
- 085 - SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. **J Exp Med**. p. 112-445, 1960.
- 086 - __ __ __. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. **Int J Lepr**. n. 30, p. 10, 1962.
- 087 - __ __ __, MC RAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int J Lepr**. n. 36, p. 78-82, 1968.
- 088 - SHIBATA, D., MARTIN, W. J., ARNHEIM, N. Analysis of DNA sequences in forty-year old paraffin-embedded thin-tissue sections: bridge between molecular biology and classical histology. **Cancer Research**. n. 48, p. 4564-4566, Aug. 1988.
- 089 - SHIMIZU, H., BURS, J. C. Extraction of nucleic acids: sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: INNIS, M. et al. **PCR strategies**. California: Academic Press, 1995. p. 32-39.
- 090 - SOUZA CAMPOS, N. Aspects cliniques de la lepre tuberculoide chez l'enfant. **Rev Bras Lepr**. n. 5, p. 99-113, 1937.

- 091 - SOUZA LIMA, L., CERQUEIRA, G. C., MAURANO, F. et al. Resultados atuais da sulfonoterapia no Sanatório Padre Bento. **Rev Bras Lepr.** n. 16, p. 75, 1948.
- 092 - SUCUPIRA, M. A. A. **Prevalência do DNA do HBV em amostras de doadores de sangue com AgHBs negativo e anti H positivo.** São Paulo, 1994. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo.
- 093 - SUNG, K. J., KIM, S. B., CHOI, J. H. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from multibacillary and paucibacillary leprosy patients by polymerase chain reaction. **Int J Dermatol.** v. 32, n. 10, p. 710-713, Oct. 1993.
- 094 - TAKAHASHI, M. **Color atlas of cancer cytology: cell block method.** Tokyo: Igaku Shoin, 1971. 353 pp.
- 095 - TAKAHASHI, M. D., ANDRADE JR., H. F., WAKAMATSU, A. et al. Indeterminate leprosy: histopathologic and histochemical predictive parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** n. 59, p. 12-19, 1991.
- 096 - TALHARI, S., NEVES, R. G. **Hanseníase.** 3. ed. Manaus: Tropical, 1997. 167 pp.
- 097 - TANEJA, K., SETHI, A., SHIV, V. K. et al. Diagnosis of nerve abscess in leprosy by sonography. **Indian J Lepr.** n. 64, p. 105-107, 1992.
- 098 - TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M. et al. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol.** v. 31, n. 2, p. 175-178, Feb. 1993.
- 099 - TERRA, F. Esboço histórico da lepra no Brasil. **An bras Dermatol.** n. 2, p. 3-5, 1926.
- 100 - VAN BEER, S.M., IZUMI, S., MADJID, B. et al. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. **Int. J. Lepr.** v. 62, n. 1, p. 1-7, Mar, 1994.
- 101 - VIRCHOW, R. (1858). Hanseníase. In: MICHALANY, J. **Anatomia Patológica Geral.** São Paulo: Artes Médicas, 1995. 317 pp.
- 102 - VOLKENANDT, M., BURMER, G. C., SCHADENDORF, D. et al. The polymerase chain reaction. Method and application in dermatopathology. **An J Dermatopathol.** v. 15, n. 2, p. 118-126, 1991.
- 103 - WADE, H. W., RODRIGUES, J. M. Borderline tuberculoid leprosy. **Int J Lepr.** n. 8, p. 307-332, 1940.

- 104 - _ _ _ . The histoid variety of lepromatous leprosy. **Int J Lepr.** n. 2, p. 129-142, 1963.
- 105 - WANG, T., IZUMI, S., BUTT, K. I. et al. Demonstration of PGL1 & LAM-B antigens in paraffin sections of leprosy skin lesions. **Int. J. Leprosy.** n. 61, p. 165-174, 1992.
- 106 - WHO/LEP/95-1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Um guia para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública.** Goiania: CEGRAF, 1995, 61 pp.
- 107 - WICHITWECHKARN, J., KARNJAN, S., SHUNTAWUTTISEETEE, S. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. **J Clin Illicr biol.** v. 33, n. 1, p. 45-49, 1995.
- 108 - WILLIAMS, D. L., GILLIS, T. P., BOOTH, R. J. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Inf Dis.** p. 193-200, Jul, 1990.
- 109 - WOODS, S. A., COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application for PCR. **FEMS Microbiology Letters.** v. 65, p. 305-310, 1989.
- 110 - _ _ , _ _ _ . A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Molecular Microbiology.** v. 10, p. 1745-1751, 1990
- 111.- YAMANOUCHI, A. A., CARON, C. R., SHIWAZU, D. T. et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **An brasil Dermatol.** n. 68, v. 6, p. 394-404, 1993.
- 112 - YAMASHITA, J. T., MAED, S. M., JABUR, R. et al. Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. **An bras Dermatol.** n. 71, v. 4, p. 343-349, 1996.
- 113 - YOON, K., CHO, S. N., LEE, M. K. et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae* specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **J Clin Microbiol.** v. 31, n. 4, p. 895-899. Apr, 1993.

9-ANEXOS

Anexo 9.1

Os cortes histológicos das amostras foram examinadas pela técnica de coloração em hematoxilina-losina (HE) para o estudo morfológico dos tecidos. Os núcleos das células, as fibras colágenas, elásticas e neurofibrilas em vermelho.

Para a coloração da *M. leprae* empregou-se a coloração de Wade, que é o método de coloração para bacilos álcool ácido resistentes. Os bacilos coram-se em vermelho vivo. O núcleo e o citoplasma em azul celeste.

As tabelas a seguir mostram as amostras em estudo.

Anexo 9.1: Materiais do SAP-UFF

Nº	Registro	Nome	Idade	Sexo	Cor.	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Histopatológico	Wade
01	B93/2794	J.P.S.	24	F	Pd	MiHV, MHDV - Eritema polimorfo	HDV	+
02	B93/2830	V.L.	-	F	-	MHI	HI	-
03	B93/2970	G.C.M.	61	F	Pd	Eritema nodoso hansênico	HDV em reação	+
04	B93/2992	M.J.V.T.	47	F	Pd	MVH - LES - fotossensibilidade	MHV	+
05	B93/3066	D.L.P.	28	F	Br	MH - líquem	HI	-
06	B93/3141	F.A.S.	-	F	Br	MHV	HV	+
07	B93/3203	J.R.R.S.	26	M	Pd	MHT	HT	-
08	B93/3260	S.G.A.	62	M	Br	MHD	HT	-
09	B93/3362	D.G.S.	44	M	Br	Eritema polimorfo	HV em reação	+
10	B93/3358	J.G.M.	16	M	Pt	MHV históide	HV em reação tipo II	+
11	B93/3359	E.R.M.	61	M	Br	MHDD - MHDV	HDV	+
12	B93/3441	E.F.	32	M	Pd	MHDT	HDT	-
13	B93/3735	M.P.	60	F	Pd	MHV	HV	+
14	B93/3770	I.M.S.	37	M	Pt	MHDV	HDV	+
15	B93/3781	G.F.M.	42	M	Br	Paracoccidiodomicose, xantoma	HV	+
16	B93/3869	M.A.S.	48	F	Pd	MHDT	HDT	+
17	B93/4238	M.T.S.	17	M	Pt	MHV	HV	+
18	B93/4100	P.F.M.	29	M	Pd	Eritema polimorfo	HV	+
19	B93/4172	M.L.R.	31	M	Br	MHT	HDT	-
20	B93/4377	R.A.C.	36	F	Pt	MHV	HV	+
21	B93/4402	A.M.C.	08	M	Pt	MHI	HI	-
22	B93/4423	A.L.O.	43	M	Br	MHT	HDT em reação	-
23	B93/4458	F.A.C.	08	F	Br	MHT	HI	-
24	B93/4499	H.I.	65	M	Pt	MHDT	HDT	-
25	B93/4522	A.O.C.	27	M	Br	MHDT	HDT	+
26	B93/4678	M.M.S.C.	31	F	Pd	MHT	HT	-
27	B93/4622	P.A.S.	28	M	Br	MHV	HV	+
28	B93/4804	A.M.R.B.	42	F	Pt	MHV - MHDV	HV	+
29	B93/4884	A.R.S.	52	F	Br	MHD	HDT	-
30	B94/048	A.G.L.	42	F	-	Granuloma anular - líquem plano - MHT	HDT	-
31	B94/183	L.M.A.M.	19	F	Br	MHDD - MHDT	HDT	-
32	B94/457	L.E.C.C.	44	M	Br	MHI	HI	-

Anexo 9.1: Materiais do SAP-UFF

Nº	Registro	Nome	Idade	Sexo	Cor.	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Histopatológico	Wade
33	B94/1078	E.P.	54	M	Br	MHT	HDT em reação	-
34	B94/1082	S.C.O.	34	F	Pt	MHDV - MHDD	HI	-
35	B94/1304	H.G.L.S.	10	M	Br	MH - Eritema nodoso	HI	-
36	B94/1312	W.E.	50	M	Br	MHDV - MHV	HDV	+
37	B94/1659	M.P.R.	50	F	Pd	MHDT - MHI	HDT	-
38	B94/2403	S.S.S.	30	M	Pd	MHDV	HDV em reação	+
39	B94/2426	G.M.F.	32	F	Pt	MHV	HDV	+
40	B94/2591	G.B.	-	M	Pd	MHV	HDT	-
41	B94/2641	E.S.	44	F	Br	MHT	HDT	-
42	B94/2691	R.M.B.	48	F	-	MHV - com fenômeno de Lúcio	HV em reação	+
43	B94/2719	R.S.S.	15	M	Pt	MH	HDT	-
44	B94/2970	N.L.F.	24	M	Pd	MHT - MHDT	HDT	-
45	B94/3234	V.U.A.M.	54	M	Pd	MH	HI	-
46	B94/3422	J.J.C.	87	F	Br	MHT - MHV	HT	-
47	B94/3698	I.L.V.	42	F	Br	MHD	HDT	-
48	B94/3991	A.F.B.	41	F	Pt	MHV	HV	+
49	B94/1379	J.G.M.	61	F	Br	MHD - sarcoidose	HDT	-
50	B94/4622	Z.S.S.	38	F	Pt	MHDT	HDT	-
51	B94/4874	M.P.S.	88	F	Pd	MHDV	HV em reação	+
52	B94/4983	L.M.M.	24	F	Br	MH	HV	+
53	B94/5023	F.H.G.A.	22	M	Br	MHV	HV	+
54	B94/5459	A.P.C.	37	M	Br	MHI	HV em reação	+
55	B94/058	Z.O.S.	41	F	-	MHDD	HDV	+
56	B95/392	J.O.S.	17	F	Br	MHV	HV	+
57	B95/434	C.M.F.	40	F	Pd	MHI	HDT	-
58	B95/721	M.G.S.	18	F	Pd	MHD	HDT em reação	-
59	B95/961	M.C.S.	50	M	Pd	MHV - Lues - Mucose fungóide	HV em reação	+
60	B95/963	J.U.	25	M	Pt	MHDT	MHV em reação	+
61	B95/1028	H.L.O.	37	M	Br	MHDT	HT	-
62	B95/1313	G.V.S.	68	F	Pd	MH	HDT	-
63	B95/1489	J.D.O.	69	M	Pd	MHDD - MHDV	HDV	+

Anexo 9.1: Materiais do SAP-UFF

Nº	Registro	Nome	Idade	Sexo	Cor	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Histopatológico	Wade
64	B95/1621	C.M.P.	43	F	Pt *	MHDV - MHDD	HDV	+
65	B95/1740	A.F.O.	48	M	Br	MHDD - MHV	HV	+
66	B95/1771	C.S.	65	F	Pt	MHDT	HT	-
67	B95/1900	J.V.S.	63	M	Pd	MHDD - MHDT	HDT	-
68	B95/1933	E.N.G.P.R.	52	F	Br	MHI - MHT - MHDT	HT	-
69	B95/2159	C.V.R.	71	F	Pd	MH	HI	-
70	B95/2244	W.D.V.F.	22	M	Br	MH	HDV	+
71	B95/2265	D.F.A.	46	M	Pd	MH	HT	-
72	B95/5211	D.S.S.	13	F	Pt	MHT - MHDT	HT	-
73	B95/2302	E.C.T.	30	M	Br	Hipoestesia	HDT	-
74	B95/2308	M.L.	25	M	Br	MHDV	HDV	+
75	B95/2322	A.C.P.C.	36	M	Pt	MHT	HDT	-
76	B95/2451	J.A.	43	M	-	MH	HT	-
77	B95/2452	I.R.F.	46	F	Br	MHT - MHDT	HI	-
78	B95/2718	H.L.	47	M	-	MH	HDD	-
79	B95/2726	M.D.V.	21	M	Pt	MHT	HDT	-
80	B95/2895	D.C.M.	03	M	Br	MH	HT	-
81	B95/2955	C.S.S.	14	M	Pd	MHDT	HT	-
82	B95/5901	E.C.	-	F	-	MHV	HV	+
83	B96/205	M.S.M.L.	75	F	Br	MHDT ou MHT	HT	-
84	B96/313	V.P.	88	M	Pt	Eritema nodoso hansênico	HV em reação	+
85	B96/642	R.M.N.L.	43	F	Br	MH	HDT	-
86	B96/684	A.S.K.	23	M	-	MHV	HV	+
87	B96/509	A.R.S.	73	M	Br	MHV - MHDT	HT	-
88	B96/1073	C.V.S.	-	M	-	MHDT	HDT	-
89	B96/1340	M.D.S.	57	M	Br	MHD - MHDV	HI	-
90	B96/3855	B.H.T.	70	F	-	MHT	HDT	-
91	B96/1539	Z.A.F.P.	75	F	Br	MHDT - MHT	HDT	+
92	B96/2267	L.R.	-	M	-	MHD	HDV	+
93	B96/2336	A.C.A.	14	F	-	MHT	HT	-
94	B96/2546	P.A.S.	-	F	-	MHDT	HV	+
95	B96/2577	J.G.A.	57	F	Pd	MHT, sarcoidose, granuloma anular	HDT	+

Anexo 9.1: Materiais do SAP-UJFF

Nº	Registro	Nome	Idade	Sexo	Cor .	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Histopatológico	Wade
96	B96/2698	G.S.	35	M	Pd	MHV	HV	+
97	B96/2956	J.T.L.	48	M	Br	MHI	HI	-
98	B96/3384	A.C.E.	40	M	Pt	MHDT - MHT	HDV	+
99	B96/3474	J.A.L.	28	M	Pt	MHT	HDT	-
100	B96/3519	J.T.S.	40	F	Pt	MHV	HDT	-
101	B96/3520	E.C.S.	10	F	Pd	MHI	HDT	-
102	B96/3607	J.S.O.	43	M	Br	MHD - MHDT	HDT	-
103	B96/3693	I.R.S.	44	F	Pt	MHT	HDT	-
104	B96/4208	G.D.B.	26	F	Pd	MHV	HV	+
105	B96/3997	C.A.	38	F	Br	MHD - MHI	HDT	-
106	B96/4000	L.S.	24	M	Pt	MHT - MHDT	HDT	-
107	B96/4049	L.S.S.	40	F	Br	MHDD - MHDV	HDT	-
108	B96/4370	N.A.S.	60	M	Br	MHD	HDD	+
109	B96/4487	J.L.L.	45	F	Pd	MHT	HDT	-
110	B96/4665	R.B.S.	72	F	Br	MHT	HT	-
111	B96/4701	M.C.S.	53	F	Pd	LE - vasculite, MH-DV	HV em reação	+
112	B96/5105	A.S.E.	18	F	Br	MHV	HV	+
113	B96/5482	J.V.M.P.	23	M	Pt	MHV	HV	+
114	B96/5533	A.C.W.	05	M	Br	MHI	HT	-
115	B96/5623	R.R.S.	21	M	Br	MHDV - MHDD	HDV	+
116	B96/5625	M.C.S.C.	26	M	Br	MHT	HT	-
117	B96/4310	J.P.F.F.	50	M	Pt	MHDT - MHT	HDT	-
118	B97/427	M.A.T.	70	F	Br	MHDD - MHDV - MHDT	HDT	+
119	B97/1701	C.J.S.	28	M	Pt	MH	HV	+
120	B97/1703	L.C.N.	16	M	Pt	MHDT - MHT	HDT em reação	-
121	B97/1733	N.J.S.	44	M	Br	MH	HV	+
122	B97/2186	U.G.U.O.	26	M	Pd	MHDT - MHT - lupus	HDT	-
123	B97/2502	J.C.B.	-	F	Pd	MH	HDT	-
124	B97/3119	A.M.B.	18	M	Pt	MH	HDT	-
125	B97/3452	P.O.S.	12	F	Pt	MHI	HI	-
126	B97/3480	M.P.S.S.	40	F	Br	MH	HDT	-
127	B97/2908	R.J.D.A.	40	F	Pd	MH	HDT em reação	-
128	B97/3682	J.B.R.	22	F	Pd	MHV	HV	+

Anexo 9.1: Diagnóstico histopatológico / Wade

Histopatológico	Nº. Casos	Wade + (MB)	Wade - (PB)
HI	13	0	(100%) 13
HT	18	0	(100%) 18
HDT	47	12% (05)	88% (42)
HDD	02	100% (02)	0
HDV	15	100% (15)	0
HV	33	100% (33)	0
TOTAL	128	43% (55)	57% (73)

Anexo 9.2 - Características dos iniciadores β -actina

Os iniciadores β -actina 1 e 2 têm as seguintes características β -act1 apresenta seqüência de 5' AGC — GGG — AAA — TCG — TGC — GTG 3'; tamanho de 18pb; com descrição de A=4(22,2%); C=3 (16,7%); G=8 (44,4%); T=3 (16,7%). A p-act 2 apresenta seqüência de 5' CAG — GGT — ACA — TOG — TGG — GTG 3'; tamanho de 18pb; com descrição de A=3 (16,7%); C=3 (16,7%); G=8 (44,4%); T=4 (22,2%).

Anexo 9.3 - Protocolo de Plikaytis, 1990

Utilizou-se os iniciadores agrupados: dois iniciadores externos, que direcionam a amplificação de uma porção do genoma alvo; dois outros iniciadores internos, que direcionam a amplificação da seqüência contida dentro do produto definido e produzido pelos iniciadores externos. Este procedimento aumentou a especificidade e a sensibilidade do DNA.

Características dos iniciadores para a primeira etapa da PCR.

O iniciador "L1" tem um tamanho de 18 pb; com descrição de A=3(16,34%); C=6 (33,33%); G=5 (27,77%); T=4 (22,22%); e seqüência de 5' GTG GCT CAG ATC CET ACC 3' em concentração de 1,0 μ M.

O iniciador "L2" tem um tamanho de 22 pb com descrição de A=2 (9,09%); C=8(36,36%); G=8 (36,36%); T=4 (18,18%) e seqüência de 5' ATG — CCA — CCG — GTC — GGG — TCG — CTCG 3' em concentração de 1,0 μ M.

Características dos iniciadores para a segunda etapa da PCR (PCR — Nested).

O iniciador "L3" tem um tamanho de 19 pb com descrição de A=2 (10,52%); C=8 (42,10%); G=5 (26,31%); T=4 (21,05%) e seqüência de CAT — CAG — GCT — GCT — CCG — GCTC em concentração de 1,0 μ M.

O iniciador "L4" tem um tamanho de 23 pb com descrição de A=1 (4,34%); C=8 (34,78%); G=10 (43,47%); T=4 (17,39%) e seqüência de GTC — GGG — TCG — CTC — GCC — GGA — GTC GC' em concentração de 1,0 μ M.

As concentrações dos reagentes foram: 20 μ M de cada NTPs, 10 μ M de cada iniciador, 2.5U de Taq. DNA polimerase, 10 mM de TrisHidroclorídrico pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂ e 0,01% de gelatina.

Utilizou-se 10.0µL dos DNAs para a primeira etapa da PCR e 5 µL do produto da primeira etapa para a segunda etapa da PCR.

Programou-se o termociclador em: 94°C durante 75 segundos; 68°C durante 3 minutos em 35 ciclos.

Adicionou-se os reagentes e programou-se o termociclador para a primeira e a segunda PCR.

O resultado da primeira amplificação foi um fragmento com 578pb e na segunda amplificação um fragmento com 347pb.

Anexo 9.4 - Protocolo. de Richter, 1994 e 1995

Cortou-se de dois a três fragmentos de tecido parafinado com 20µm de espessura e depositou-se dentro de um tubo de 1.5 mL. Desparafinou-se com 1.0 mL de xilol, agitou-se suavemente durante 5 minutos. Centrifugou-se a 10.000 rpm durante 5 minutos. Repetiu-se a operação. Removeu-se o xilol residual com 1.0 mL de etanol absoluto duas vezes durante 5 minutos. Centrifugou-se a 10.000 rpm durante 5 minutos. Secou-se a vácuo e incubou-se a 37°C durante meia hora. Digeriu-se o material com tampão digestão (50 mM Tris HCl, pH 7.4), proteinase K (1 µg / mL) e 1% de dimetil sulfóxido (SDS) para eliminar quaisquer atividades de DNA's. Incubou-se com 300µL de solução de proteinase K durante 2 horas a 37°C. Msturou-se num vortéx a cada 30 minutos. Aplicou-se o choque térmico (banho maria a 100°C durante 1 minuto e congelamento repentino durante 1 minuto em nitrogênio líquido), repetiu-se quatro vezes.

A amplificação do DNA específico da espécie do "*M. leprae*" foi baseada no trabalho de Richter et al., 1994. Utilizou-se três iniciadores em cada PCR: dois sense (P1 e P5) amplificaram fragmentos com 479pb e o terceiro "antisense" (PL) amplificou-se fragmento com 204pb no gene RNA 16S ribossômico e específico para *M. leprae*.

Características do primeiro iniciador (P1): fragmento de 20pb, com descrição A=4 (20%); C=4 (20%); G=6 (30%); T=6 (30%); e a seqüência de 5' AGA — GTT — TGA — TCC — TGG — CTC — AG 3' na concentração de 1,0 mM.

O segundo iniciador "P5" com fragmento de 20 pb; com descrição de A=7 (35%); C=7 (35%); G=4 (20%); T=2 (10%); com seqüência de 5' ACC — GTC — AAT — CCG — AGA — GAA — CC 3' na concentração de 1,0 mM.

O terceiro iniciador "PL" com 20 pb; com descrição de A=7 (35%); C=6 (30%); G=4 (20%); T=3 (15%); e seqüência de 5' CAC - AAG - ACA - TGC - GCC - TTG - AA 3' na concentração de 0,1 mM.

A concentração dos reagentes utilizados foram: volume final 100 μ L; tricine 30 mM com pH 8.4; MgCl₂ 2mM; beta-mercaptoetanol 5 mM; gelatina 0,01%; tesit 0,1%; 200 mM de cada dNTPs; 1 mM dos iniciadores 1 e 5; 0,1 mM do iniciador M. leprae específico e 2,5 U Taq. DNA polimerase.

Quantidade do DNA utilizado no P1 foi de 1.0 mM e em P5 foi 0.1 mM do iniciador específico para M. leprae.

Programou-se o termociclador: desnaturação a 94°C durante 2 minutos, hibridização a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 3 minutos, no total de 35 ciclos, e uma extensão final a 72°C durante 15 minutos.

Utilizou-se também o protocolo de Richter et al., 1995, para extração do DNA de material fixado em formol e emblocado em parafina.

Anexo 9.5 - Protocolo de Cook, 1994

Desparafinou-se as secções de tecidos com 4 p.m de espessura em 100 μ L de xilol. Adicionou-se 100 μ L de etanol a 95%, e procedeu-se a evaporação a vácuo por 30 minutos. Ressuspendeu-se o material em 100 μ L de 50 mM Tris pH 8.3 com (10 μ l) 200 μ g/mL de PK, e incubou-se a 37°C e agitou-se suavemente durante toda a noite. Aplicou-se o choque térmico (gelo sêco durante 1 minuto e 8 minutos em água fervente). Colocou-se em gelo por 5 minutos. Amplificou-se 01.1.L de cada amostra utilizando o protocolo de Perosio & Frank, 1993.

Utilizou-se os iniciadores para amplificar uma porção do gene antígeno 65 kDa da micobactéria que codifica uma proteína "heat shock" com epítomos específicos do gênero.

Procedeu-se a digestão pela enzima de restrição Alu1 do produto da segunda etapa da PCR para espécie específica de M. leprae.

Utilizou-se dois iniciadores sense (T₁U₁ e T₁U₂) e um iniciador antisense (T₁D), na primeira etapa da PCR.

Utilizou-se 5 μ L do produto da primeira etapa da PCR, usando-se os iniciadores (T₂U e T₂D) na segunda etapa da PCR.

Características dos iniciadores da primeira etapa da PCR

O primeiro iniciador "T₁U₁" (sense), tem um tamanho de 20 pb; com descrição de A=7 (35%); C=2 (10%); G=9 (45%); T=2 (10%); e seqüência = AAG-GAG — ATC — GAG — CTG — GAG — GA na concentração de 2,5 ng/μL (aprox. 380nM).

O segundo iniciador "T1U2" (sense), tem um tamanho de 19 pb; com descrição de A=2 (10,52%); C=3 (15,78%); G=10 (52,63%); e seqüência = AGG — CGT — TGG — TTC — GCG — AGGG; na concentração de 2,5 ng/μL (aprox. 380nM).

O terceiro iniciador "T1D" (anti sense) tem um tamanho de 19 pb; com descrição de A=2 (10,52%); C=7 (36,84%); G=5 (26,37%); T=5 (26,37%); e seqüência = TGA — TGA — CGC — CCT — CGT — TGC C; na concentração de 2,5 ng/μL (aprox. 380nM). Programou-se o termociclador em: desnaturação inicial de um ciclo de 94°C durante 4 minutos; desnaturação a 94°C durante 1 minuto; hibridização a 57°C durante 2 minutos e extensão de 72°C durante 2 minutos, no total de 40 ciclos; e uma extensão final de 72° durante 7 minutos.

Características dos iniciadores da segunda etapa da PCR

O iniciador "T2U" tem tamanho de 18 pb; com descrição de A=4 (22,22%); C=6 (33,33%); G=5 (27,77%); e seqüência de GTC — TCA — AAC — GCG — GCA — TCG; na concentração de 2,5 ng/μL (aprox. 380nM). Amplificou-se um fragmento de 310pb.

O iniciador "T2D", tem tamanho de 18 pb; com descrição de A=3 (16,66%); C=6 (33,33%); G=5 (27,77%); T=4 (22,22%) e seqüência de CTC — ACC — GAT — "GGA — CTG — GTC; na concentração de 2,5 ng/μL (aprox.380nM). Amplificou-se um fragmento de 133pb na segunda PCR.

Digestão pela endonuclease de restrição

Area de restrição: 5' — AG↓ CT-3' e 3' — TC↑ GA-5'.

Resultou um fragmento de 110pb.

Anexo 9.6 - Modificações dos protocolos

Após várias tentativas para amplificar o DNA do *M. leprae*, a partir dos protocolos utilizados não obtivemos os resultados esperados. Na tentativa de se obter a amplificação desejada, foram realizadas as seguintes modificações:

1 - desparafinou-se a quente a 95°C e a 57°C; 2 - retirou-se o solvente por três vezes; 3 - aplicou-se o choque térmico, antes da digestão; 4 - utilizou-se o "BD9"; 5 - aumentou-se o volume do tampão digestão de 80µL para 480µL; 6 - aumentou-se a concentração da PK de 10µL para 20µL; 7 - aumentou-se o processo de extração e purificação do DNA; 8 - utilizou-se 0,4mg de glicogênio como carrreador para DNA; 9 - substituiu-se o etanol por isopropanol; 10 - substituiu-se o acetato de sódio pelo acetato de amônia; 11 - redissolveu-se o DNA em TE; 12 - incubou-se o DNA em banho-maria; 13 - amplificou-se o DNA logo após a extração evitando o seu armazenamento; 14 - aumentou-se a concentração do Taq. DNA polimerase de 2.04 para 2.5µL; 15 - alterou-se o ciclo do termociclador conforme PTC2; 16 - alterou-se a temperatura do termociclador conforme PTC2; 17 - utilizou-se reagentes de fabricação idônea; 18 - utilizou-se um conjunto de pipetas automáticas para cada reagente e em cada setor; 19 - extraiu-se o DNA por sonicação com disruptor de células; 20 - auxiliou-se a extração de DNA com microtritador; 21 - extraiu-se o DNA utilizando Chelex 100; 22 - desparafinou, fragmentou e iniciou-se a digestão sob lâmina histológica; 23 - trocou-se a centrífuga de TA para centrífuga refrigerada a 4°C; 24 - diluiu-se o DNA em 1/10, 1/100 e 1/1000; 25 - ressintetizou-se os iniciadores pelo mesmo fabricante; 26 - trocou-se de Taq (*Thermus aquaticus*) para Ampli Taq Gold; 27 - empregou-se o "hot-star"; 28 - alterou-se a concentração dos diversos reagentes (Anexo 9.15 - página 94); 29 - alterou-se a programação do termociclador PTC2; 30 - os tampões de corridas para eletroforese TBE foram substituídos para TAE; 31 - alterou-se o número de ciclo do termociclador de 35 para 40 ciclos; 32 - alterou-se as composições dos tampões de digestão.

Anexo 9.7: Análise comparativa entre os resultado de Wade e PCR

Nº. CASO	REGISTRO SAP	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	WADE	PCR
01	B93/2794	HDV	+	310-133-110
02	B93/2830	HI	-	0-133-110
03	B93/2970	HDV em reação	+	0-133-110
04	B93/2992	HV	+	0-133-110
05	B93/3066	HI	-	0-133-110
06	B93/3141	HV	+	0-0-0
07	B93/3203	HT	-	0-133-110
08	B93/3260	HT	-	0-133-110
09	B93/3326	HV em reação	+	0-133-110
10	B93/3358	HV em reação	+	0-0-0
11	B93/3359	HDV	+	0-0-0
12	B93/3441	HDT	-	0-133-110
13	B93/3735	HV	+	0-133-110
14	B93/3770	HDV	+	0-133-110
15	B93/3781	HV	+	0-0-0
16	B93/3869	HDT	+	0-133-110
17	B93/4238	HV	+	0-133-110
18	B93/4100	HV	+	0-0-0
19	B93/4172	HDT	-	0-133-110
20	B93/4377	HV	+	0-133-110
21	B93/4402	HI	-	0-133-110
22	B93/4423	HDT em reação	-	0-133-110
23	B93/4458	HI	-	0-0-0
24	B93/4499	HDT	-	0-0-0
25	B93/4522	HDT	+	0-0-0
26	B93/4678	HT	-	0-0-0
27	B93/4622	HV	+	0-133-110
28	B93/4804	HV	+	0-133-110
29	B93/4884	HDT	-	0-133-110
30	B94/048	HDT	-	0-133-110
31	B94/183	HDT	-	0-133-110
32	B94/457	HI	-	0-133-110
33	B94/1078	HDT em reação	-	0-133-110
34	B94/1082	HI	-	0-0-0
35	B94/1304	HI	-	0-133-110
36	B94/1312	HDV	+	0-0-0
37	B94/1659	HDT	-	0-133-110
38	B93/2403	HDV em reação	+	0-133-110
39	B94/2426	HDV	+	0-133-110
40	B94/2591	HDT	-	0-0-0
41	B94/2641	HDT	-	0-0-0
42	B94/2691	HV em reação	+	310-133-110
43	B94/2719	HDT	-	0-133-110
44	B94/2970	HDT	-	0-133-110
45	B94/3234	HI	-	0-133-110
46	B94/3422	HT	-	0-133-110
47	B94/3698	HDT	-	0-133-110
48	B94/3991	HV	+	0-133-110
49	B94/1379	HDT	-	0-0-0
50	B94/4622	HDT	-	0-133-110
51	B94/4874	HV em reação	+	0-0-0
52	B94/4983	HV	+	0-0-0
53	B94/5023	HV em reação	+	0-0-0
54	B94/5459	HV em reação	+	0-133-110

Anexo 9.7: Análise comparativa entre os resultados de Wade e PCR

Nº. CASO	REGISTRO SAP	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	WADE	PCR
55	B95/058	HDV	+	310-133-110
56	B95/392	HV	+	310-133-110
57	B95/434	HDT	-	310-133-110
58	B95/721	HDT em reação	-	0-0-0
59	B95/961	HV em reação	+	310-133-110
60	B95/963	HV em reação	+	310-133-110
61	B95/1028	HT	-	0-0-0
62	B95/1313	HDT	-	310-133-110
63	B95/1489	HDV	+	310-133-110
64	B95/1621	HDV	+	0-133-110
65	B95/1740	HV	+	310-133-110
66	B95/1771	HT	-	0-133-110
67	B95/1900	HDT	-	0-133-110
68	B95/1933	HT	-	0-133-110
69	B95/2159	HI	-	0-133-110
70	B95/2244	HDV	+	0-133-110
71	B95/2265	HT	-	0-133-110
72	B95/5211	HT	-	0-133-110
73	B95/2302	HDT	-	0-133-110
74	B95/2308	HDV	+	0-0-0
75	B95/2322	HDT	-	0-133-110
76	B95/2451	HT	-	0-133-110
77	B95/2452	HI	-	0-133-110
78	B95/2718	HDD	+	0-133-110
79	B95/2726	HDT	-	0-133-110
80	B95/2895	HT	-	0-133-110
81	B95/2955	HT	-	0-133-110
82	B95/5901	HV	+	0-133-110
83	B96/205	HT	-	310-133-110
84	B96/313	HV em reação	+	310-133-110
85	B96/642	HDT	-	310-133-110
86	B96/684	HV	+	310-133-110
87	B96/509	HT	-	310-133-110
88	B96/1073	HDT	-	310-133-110
89	B96/1340	HI	-	310-133-110
90	B96/3855	HDT	-	0-133-110
91	B96/1539	HDT	+	0-133-110
92	B96/2267	HDV	+	310-133-110
93	B96/2336	HT	-	310-133-110
94	B96/2546	HV	+	0-133-110
95	B96/2577	HDT	+	0-133-110
96	B96/2698	HV	+	310-133-110
97	B96/2956	HI	-	310-133-110
98	B96/3384	HDV	+	0-133-110
99	B96/3474	HDT	-	310-133-110
100	B96/3519	HDT	-	0-133-110
101	B96/3520	HDT	-	0-0-0
102	B96/3607	HDT	-	310-133-110
103	B96/3693	HDT	-	310-133-110
104	B96/4208	HV	+	0-133-110
105	B96/3997	HDT	-	0-133-110
106	B96/4000	HDT	-	310-133-110
107	B96/4049	HDT	-	0-0-0

Anexo 9.7: Análise comparativa entre os resultados de Wade e PCR

Nº. CASO	REGISTRO SAP	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	WADE	PCR
108	B96/4370	HDD	+	0-133-110
109	B96/4487	HDT	-	310-133-110
110	B96/4665	HT	-	0-133-110
111	B96/4701	HV em reação	+	310-133-110
112	B96/5105	HV	+	310-133-110
113	B96/5482	HV	+	0-133-110
114	B96/5533	HT	-	0-133-110
115	B96/5623	HDV	+	0-0-0
116	B96/5625	HT	-	310-133-110
117	B96/4310	HDT	-	0-133-110
118	B97/427	HDT	+	310-133-110
119	B97/1701	HV	+	310-133-110
120	B97/1703	HDT em reação	-	0-133-110
121	B97/1733	HV	+	0-133-110
122	B97/2186	HDT	-	310-133-110
123	B97/2502	HDT	-	310-133-110
124	B97/3119	HDT	-	310-133-110
125	B97/3452	HI	-	310-133-110
126	B97/3480	HDT	-	310-133-110
127	B97/2908	HDT em reação	-	310-133-110
128	B9/3682	HV	+	310-133-110

Anexo 9.8 - Material de consumo

Material	Procedência e Referência	Concentração de Uso
Acetato de amônio, 8M, pH 5.2	Merck, S.A., RJ – Brasil	1/100 do volume
Agarose ultra pure	Life Technologies U.S.A.	2% e 1,5%
Água oxigenada 160 volumes	Merck, S.A., RJ – Brasil	20 volumes
Albumina	Sigma Chemical CO., U.S.A.	0,01%
Ampli Taq gold	Perkin Elmes	1,5 U
Beta mercaptoetanol	Merck, S.A., RJ – Brasil	5mM
Brometo de etídio	Bio Rad, U.S.A.	1/1000
Chelex 100	Biotech	
Deoxinucleotídeos trifosfato	Pharmacia Biotech - Sweden	200 μ M de cada
DNA marcador	Pharmacia Biotech - Sweden	
EDTA	Merck, S.A., RJ – Brasil	0,5 M
Enzima de restrição (Alu-1)	Life Technologies U.S.A.	5 U
Etanol absoluto	Merck, S.A., RJ – Brasil	
Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico	Life Technologies U.S.A.	1000 mL por tubo
Filme 667 ASA 3000 polaroid	Polaroid – 3000 Asa	
Formol 40 volumes	Herzoch	10%
Fosfato bissódico	Merck, S.A., RJ – Brasil	
Fosfato monossódico	Merck, S.A., RJ – Brasil	
Gelatina	Gíbico BR	0,01%
Glicogênio	Gíbico BR	10 μ L/100 μ L
HCl	Herzoch	
Iniciadores β -actina 1 e 2	Bio Synthesis U.S.A.	
Iniciadores L1 a L4	Life Technologies U.S.A.	1.0 μ M
Iniciadores P1, P5 e PL	Life Technologies U.S.A.	
Iniciadores T ₁ U ₁ , T ₁ U ₂ , T ₁ D ₁ , T ₂ D, T ₂ U	Life Technologies U.S.A.	2.5 ng/ μ L \cong 380nM
MgCl ₂ – 50mM	Life Technologies U.S.A.	1,5 mM por reação
Microtubos polipropileno para PCR 0,2 mL	Bio Raid, U.S.A.	
Microtubos polipropileno para PCR 0,5 mL	Bio Raid, U.S.A.	
Microtubos polipropileno para PCR 1,0 mL	Bio Raid, U.S.A.	
Microtubos polipropileno para PCR 1,5 mL	Bio Raid, U.S.A.	
Navalha descartável histológica modelo 818	Leica Instruments GmbH – Nussloch, Germany	
Nitrogênio líquido	White Martins	
Parafina histológica	Herzoch	
Ponteiras para pipetadores	Bio Raid, U.S.A.	
Proteinase K	Life Technologies U.S.A.	20 mg/mL
Tampão amostra 6x	Life Technologies U.S.A.	2.0 μ L
Tampão para Alu1	Life Technologies U.S.A.	2.0 μ L
Tampão PCR	Pharmacia Biotech - Sweden 10X	1X
Taq DNA polimerase	Pharmacia Biotech - Sweden	2.0 U
Thesite (0.1%)	Life Technologies U.S.A.	1.0 μ L
Tricine	Life Technologies U.S.A.	3.0 μ L
Tris base	Life Technologies U.S.A.	1 M
Triton x-100	Sigma Chemical CO., U.S.A.	
Twen 20	Sigma Chemical CO., U.S.A.	
Xilol PA	Merck, S.A., RJ – Brasil	

Anexo 9.9 - Equipamentos

EQUIPAMENTOS	MARCA / FABRICANTE
Agitador/aquecedor magnético	Fanem, SP., Brasil
Autoclave de esterilização	Fanem, SP., Brasil
Banho-maria	Fanem, SP., Brasil
Banho-maria c/ aquecedor e agitador	Permutation-Curitiba
Câmara asséptica	Permutation-Curitiba
Câmara polaroid DS34	Polaroid, U.S.A.
Centrífuga até 12.000 rpm	Celme – SP
Centrífuga Spin	Celme – SP
Cuba de eletroforese	Gibico – BR
Espectrofotômetro	Beckmann 640
Estufa de secagem	Fanem, SP., Brasil
Fluxo laminar	Veco, Campinas - Brasil
Fonte para eletroforese EPS	Pharmacia Biotech – Sweden
Forno microondas	Sharp – Brasil
Microcentrífuga	Celme – SP
Micrótomo rotativo	American Optica 820 U.S.A.
Pipetas automáticas	Pipetman P10, P20, P50, P100, P200 e P1000
Sonicador	Branson
Termociclador	Techne PHC-3, Perkin-Elmer 2400; U.S.A.; PTC 100 M.J. Research Inc. U.S.A.
Transluminador UV	Pharmacia Biotech
Vórtex	Fanem, SP., Brasil

Anexo 9.10 - Soluções de uso:

- "BD9" (100 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1% Twen 20; 1% Triton X-100).
 - brometo de etidio (50 ng; 100mL de H₂O) solução de uso 0,5 µg/mL).
- CR - para todas as reações processadas utilizou-se um tubo de reagentes contendo todos os componentes e água Milli Q. exceto o DNA a ser amplificado.
- cloreto de magnésio (1 M de MgCl₂, 1.000 mL de H₂O q.s.p., concentração 50 mM).
 - formol tamponado (fosfato monossódico 4,0 g; fosfato bisódico 4,5 g, formol 100 mL H₂O - 900mL) - usar 10 vezes o volume do material. - MgCl₂ - 50 mM.
- MIX1 (tampão PCR 1x; 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de cada dNTPs; 2,0 U de Taq. DNA polimerase; 10 pM de p-actina 1; 10 pM de p-actina 2).
- MIX2 (tampão PCR 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de cada dNTPs; 2,5 U de Taq. DNA polimerase; 380 nM de cada iniciador T₁ U; T₂U₂; T1D).

- MIX3 (tampão PCR 1X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 200 mM de cada dNTPs; 2,5 U de Taq. DNA polimerase; 380 nM de cada iniciador T₂U; T₂D).
- MIX4 (enzima de restrição Alu1, 0,5 μ L de tampão digestão).
- MIX5 (acetato de amônia a 8M; isopropanol PA; glicogênio 20 mg/mL, na proporção de 24:75:1).
- padrão marcador (50 μ L de padrão marcador DNA, 95,0 μ L de H₂O Milli Q. estéril, 20 μ L Loading Buffer 6x). Usar 5,0 μ L.
- PGA1.5 (dissolveu-se 1,5% de gel de agarose em TBE 1X, adicionou-se brometo de etídio a 0,3% mg/mL; solidificou-se em cuba de eletroforese em TA, submergiu-se em TBE 1X; utilizou-se 0,54 de marcador de peso molecular de 100 pb; 2,0 μ L de tampão de corrida; 8,0 μ L do DNA. Ligou-se a fonte de eletroforese a 110V e 60mA, durante 40,0 minutos. Visualizou-se em UV e documentou-se em câmera Polaroid modelo DS34, com filme 667 de 3000 ASA).
- PGA2 (2% de gel de agarose dissolvido em TBE 1X, adicionou-se em brometo de etidio a 0,3% mg/mL; solidificou-se em cuba de eletroforese em TA, submergiu-se em TBE 1X; adicionou-se 0,54 de marcador de peso molecular de 100 pb; 2,0 μ L de tampão de corrida; 8,0 μ L do DNA. Ligou-se a fonte de eletroforese a 110V e 60mA, durante 40,0 minutos. Visualizou-se em UV e documentou-se em câmera Polaroid modelo DS34, com filme 667 de 3000 ASA).
- PK - 204 de PK (solução padrão 400 μ g/mL).
- PTC1 (1 ciclo de 4 minutos a 94°C; seguido de 40 ciclos: cada ciclo de 94°C, 1 minuto; 57°C, 1 minuto e 72°C, 1 minuto e um ciclo de 72°C durante 10 minutos e finalizar com esfriamento de 4°C).
- PTC2 (40 ciclos a 94°C durante 1 minuto; 57°C durante 2 minutos; 72°C durante 2 minutos). Extensão final de 72°C durante 10 minutos e esfriamento a 4°C).
- TAE 50x (Tris 242g, ácido acético glacial 57,1mL, EDTA a 0,5M pH 8,0, 1000 mL de H₂O q.s.p).
- tampão amostra 6x (azul de bromofenol 0,25% - 25mg; xileno cyanol FF 0,25% - 25 mg; glicerol 30% - 3mL; 10mL de H₂O q.s.p).

- tampão de corrida (10mM Tris HCl pH 7.4; 0,1 mM EDTA; 1mM 2 mercapto etanol; 500 µg/mL BSA; 50mM KCl e 50% U/U glicerol).
- tampão POR 10x (100mM de Tris HCl pH 9,0; 15mM - MgCl₂; 500 mM KCl). Usar 1X.
- TBE 10x (108 g Tris base, 55g ácido bórico, 40 mL; 0,5 M EDTA pH 8,0, 1000mL de H₂O q.s.p.).
- TE (1,0 mM de Tris HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA, 1000mL de H₂O q.s.p.).