

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 stock" 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	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.).