

## 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  $\beta$ -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.