

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 quanto 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 purificou-se o DNA com 1,0 mL da mistura de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 25:24:1; agitou-se em vórtex durante 15 segundos. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 15 minutos. Repetiu-se por mais uma vez.
- 9 - Adicionou-se 1.0 mL da solução de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1, agitou-se em vórtex durante 15 segundos. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de Eppendorf.
- 10 - Adicionou-se 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. Homogeinizou-se por inversão várias vezes. Incubou-se a 20°C durante 12 horas. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 20 minutos, desprezou-se o líquido com pipeta, lavou-se com 1,0 mL de isopropanol a 70% e a -20°C. Repetiu-se a centrifugação e desprezou-se 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 MgCl₂; 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 MgCl₂; 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 50.0µL.

	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. 10µL 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 $P < 0,05$.