

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

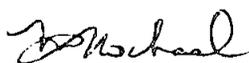
# Jo Yoshikuni Osugue

## 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



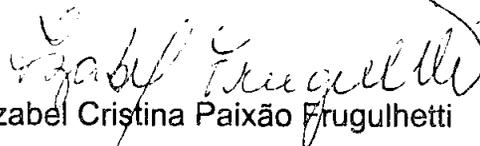
Prof<sup>o</sup>. Dr. (a) Mayra Carrijo Rochoael



Prof<sup>o</sup>. Dr. (a) Rosario Domingues Crespo Hirata



Prof<sup>o</sup>. Dr. (a) Selma Margareth Bacellar de Souza Leão



Prof<sup>o</sup>. Dr. (a) Izabel Cristina Paixão Frugulhetti



Prof<sup>o</sup>. 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
<b>1 - Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2 - Revisão da literatura.....</b>	<b>2</b>
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
<b>3 - Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 - Geral .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 - Específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>4 - Material e métodos .....</b>	<b>25</b>
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
<b>5 - Resultados .....</b>	<b>36</b>
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
<b>6 - Discussão</b> .....	<b>58</b>
<b>7 - Conclusões</b> .....	<b>68</b>
<b>8 - Referências bibliográficas</b> .....	<b>69</b>
<b>9 - Anexos</b> .....	<b>78</b>
9. 1 - Materiais do SAP-UFF/Diagnóstico histopatológico em HE e Wade ..	79
9. 2 - Característica dos iniciadores " $\beta$ -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 $\beta$ -actina nas amostras com PCR positiva .....	56
Tab. 17-Resultado do teste de inibidores da PCR pela $\beta$ -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 110pb .....53
- 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