

### **III. Materiais e Métodos**

## **1. Pacientes**

No período de Outubro de 1996 a Outubro de 1997, estudamos pacientes HIV-positivos em seguimento na Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HCFMRP-USP). Durante a avaliação de suas condições mórbidas, estes foram submetidos à endoscopia digestiva alta, sendo então realizadas biópsias de esôfago. A indicação da endoscopia foi feita pelo médico assistente de cada paciente. As informações sobre os pacientes foram obtidas através de revisão dos prontuários médicos. Os pacientes infectados pelo HIV que realizavam acompanhamento em unidades básicas de saúde da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto e que foram encaminhados para realização de endoscopia durante este período, também foram incluídos neste estudo.

### ***Aspectos Éticos***

Realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, este estudo foi aprovado sem ressalvas pela comissão de ética deste hospital (processo nº 3864/98).

***Seleção dos Pacientes***

No período compreendido entre Outubro de 1996 e Outubro de 1997, foram realizadas endoscopias digestivas altas em pacientes portadores do HIV, que realizavam acompanhamento na UETDI-HCFMRP-USP, que é a unidade de referência terciária para os pacientes portadores do HIV de Ribeirão Preto e região (Direção Regional de Saúde - XVIII). Os exames foram realizados na sala de endoscopia digestiva alta da UETDI, que é vinculada ao serviço de endoscopia digestiva do HCFMRP-USP. Este serviço é responsável pela realização de todas as endoscopias digestivas altas em pacientes da UETDI.

Todos os pacientes referidos para realização de endoscopia foram avaliados quanto aos critérios de inclusão e exclusão (discriminados adiante). Os pacientes incluídos neste estudo foram referidos ao exame de endoscopia por seus respectivos médicos assistentes, devido a sintomas digestivos variados, sem nenhuma interferência dos participantes desta pesquisa na indicação da endoscopia. Os pacientes encaminhados pelas unidades básicas de saúde e que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão, também foram incluídos neste estudo.

***Critérios de Inclusão***

- 1- Idade acima de 18 anos, de ambos os sexos.
- 2- Indicação clínica para realização de endoscopia digestiva alta eletiva.
- 3- Diagnóstico de infecção pelo HIV\*.

\* Neste hospital, são rotineiramente utilizados dois exames para confirmação diagnóstica: a reação imunoenzimática (ELISA), realizado pelo kit Abbott HIV-1/HIV-2 3RD generation plus EIA (Abbott Lab., USA) e a aglutinação de partículas de gelatina, pelo kit Serodia<sup>®</sup>-HIV (Fujirebio Inc., Japan).

***Critérios de Exclusão***

- 1- Presença de contra-indicação para a realização de biópsias endoscópicas (coagulopatia qualitativa e/ ou quantitativa).
- 2- Gravidade acentuada da doença de base.

***Revisão de prontuários***

Procedemos a revisão de prontuários de todos pacientes incluídos no presente estudo. Nestes pesquisamos informações sobre sexo, idade, contagem de linfócitos T CD4+, quantificação de carga viral do HIV, sintomatologia que justificou o exame endoscópico, laudo do exame

endoscópico, laudo do exame histopatológico e evolução clínica após o tratamento instituído. Dos pacientes encaminhados de unidades básicas de saúde, pesquisamos apenas os laudos dos exames endoscópicos, junto ao Serviço de Endoscopia Digestiva do HCFMRP-USP, e dos exames histopatológicos, junto ao Serviço de Anatomia Patológica do HCFMRP-USP.

## **2. Exames laboratoriais**

A contagem de linfócitos T CD4+ foi realizada no Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, pelo método de citometria de fluxo. A quantificação da carga viral do HIV foi realizada no Laboratório de Carga Viral do HCFMRP-USP. Foi utilizado o método de Amplificação Baseada na Seqüência de Ácidos Nucléicos – *NASBA QR System*<sup>®</sup> (Organon Teknika), com sensibilidade para detecção de até 400 cópias por mililitro.

## **3. Endoscopia Digestiva Alta**

Os exames de endoscopia digestiva foram realizados com vídeo-endoscópios das marca Pentax<sup>®</sup>, modelos 2901 e 2940, e marca Olympus<sup>®</sup>, modelos GIF 120 e V, após jejum mínimo de 8 horas. Para preparação rotineira da endoscopia digestiva alta, antes do procedimento foram

administrados antifisético (40 gotas de dimeticona) por via oral e anestésico local (5 mg de lidocaína spray -10%) na orofaringe do paciente examinado. A endoscopia foi realizada com sedação consciente, administrando-se midazolam (média de 1mg) e meperidina (média de 50 mg) por via endovenosa, em doses variáveis e individualizadas de acordo com a necessidade do procedimento. Todas as endoscopias foram realizadas pelo médico endoscopista da UETDI ou sob sua supervisão. A descrição dos achados endoscópicos foi feita seguindo as orientações da Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (SOBED).

As biópsias endoscópicas foram realizadas com pinça regular (concha de 5mm) marca Endo-flex® *Instrument*. Nos pacientes que apresentavam lesões esofágicas, buscava-se colher amostras das lesões. Sempre que as dimensões das lesões permitiam buscava-se colher amostras da borda e do fundo da lesão. Realizou-se biópsia de mucosa esofágica sem alterações macroscópicas quando estas estavam ausentes.

As informações relacionadas ao exame endoscópico foram coletadas dos laudos de endoscopia, nos prontuários dos pacientes. No presente estudo, foram registradas apenas as alterações relacionadas ao esôfago.

#### **4. Amostras de biópsias**

Depois de coletadas, parte destas biópsias foi conservada em nitrogênio líquido (50 amostras) e parte enviada ao Serviço de Anatomia

Patológica do HCFMRP-USP, sendo armazenadas em um freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  (46 amostras), onde foram mantidas até o envio ao Laboratório de Virologia Molecular, para processamento.

## **5. Histologia**

Os fragmentos fixados imediatamente em formol a 10% foram encaminhados ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas, onde foram processados rotineiramente em blocos de parafina e corados pela hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram examinadas independentemente por patologistas deste serviço que desconheciam a existência de nosso estudo. Não foi realizada imunohistoquímica nas amostras deste estudo.

## **6. Extração do DNA**

A extração do DNA foi realizada utilizando-se de 2 técnicas distintas: a extração pelo TRIzol<sup>®</sup> (GIBCO<sup>®</sup> BRL, USA) e pelo protocolo de fenol-clorofórmio-etanol. Inicialmente as biópsias foram descongeladas à temperatura ambiente, em uma capela de fluxo laminar, e depois trituradas em pequenos pedaços, utilizando uma lâmina de bisturi estéril. Então, estes pedaços foram transferidos para um tubo tipo “eppendorf” estéril. Utilizamos

o método do TRIzol<sup>®</sup> de acordo com as instruções do fabricante. Este método é baseado no uso de tiocianato de guanidina para extração do DNA.<sup>38</sup> O outro método utilizado era baseado na lise celular em solução hipotônica, aliada à digestão da amostra com proteinase K. Nos tubos contendo as amostras maceradas foram adicionados 500µL de solução de lise (10mM TRIS-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0; 100mM NaCl; 1% SDS) e 1 µL de proteinase K (20 µg/mL) e incubados a 55°C por 2 horas. A purificação do DNA foi realizada através do uso de fenol equilibrado com tampão TE (10mM Tris-HCL, pH 8,0; 1mM EDTA), sendo adicionado 500µL ao tubo contendo as células lisadas. Foi então realizada mistura por agitação e separação por centrifugação a 130 g por 2 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi então removida para um tubo limpo, sendo adicionado 500µL de clorofórmio. Foi procedida agitação e separação de forma semelhante à etapa anterior, sendo novamente retirada a fase aquosa e removida para um tubo limpo. Na amostra resultante foi então adicionado 1000 µL de etanol absoluto, além de 50 µL de acetato de sódio 3M (pH 7,0-8,0). A mistura foi incubada à temperatura de -20°C por 1 hora ou durante a noite ("overnight"). Posteriormente, o material foi submetido à centrifugação a 130 g por 30 minutos, em temperatura de 4°C. O "pellet" resultante foi lavado com etanol 70% por duas vezes e então secado no "speed-vac" por cerca de 5 minutos. O "pellet" foi então ressuspensão em 200 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA), sendo incubado a 68°C por 20 minutos. A amostra extraída era então conservada em freezer a -20°C até a realização da PCR.



Depois de feita a extração pelos dois métodos descritos acima, o material foi submetido à reação em cadeia da polimerase para detecção do CMV (detalhes abaixo). Como obtivemos resultados semelhantes usando os dois métodos de extração, decidimos pela utilização, em todas as biópsias, do método baseado na lise celular em solução hipotônica, aliado a digestão da amostra com proteinase K, devido a sua relativa simplicidade e baixo custo.

## **7. Reação em Cadeia da Polimerase**

O DNA extraído foi utilizado para realização de PCR para os seguintes microorganismos: CMV, vírus herpes, HPV, HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Treponema pallidum* e *Haemophilus ducreyi*, usando-se os *primers* específicos para cada um deles [Tabela 1 e 2].

As condições de realização da PCR, para os diferentes agentes obedeceram a alguns procedimentos básicos. Em um tubo tipo eppendorf foram adicionados 5µL de DNA, numa reação com volume final de 50µL, contendo 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase, 200µM de cada desoxinucleotídeo, 1X do tampão da *Taq* DNA polimerase e 20pM de cada

Tabela 1: Relação com os microorganismos pesquisados, os primers específicos, suas respectivas seqüências e referências originais (parte 1).

| Agente                 | Primer    | Seqüência                               | Referência                       |
|------------------------|-----------|---|----------------------------------|
| <b>CMV</b>             | MIE-4     | 5' CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C 3' | Demmler JD <i>et al.</i> ,       |
|                        | MIE-5     | 5' CAG CAC CAT CCT CCT CCT CTG G 3'     | Demmler JD <i>et al.</i> ,       |
| <b>Herpes</b>          | GPHV-RUs  | 5' TCC TGG CTG CTN TTT CCC TC 3'        | Baron JM <i>et al.</i> , 1996    |
|                        | GPHV-RUC  | 5' TGG CCG ANT CCT TCN TGC AGG A 3'     | Baron JM <i>et al.</i> , 1996    |
| <b>HPV</b>             | MY-9      | 5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3'        | Manos MM <i>et al.</i> , 1989    |
|                        | MY-11     | 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3'        | Manos MM <i>et al.</i> , 1989    |
| <b>HIV (externo)</b>   | HIV V3s   | 5' CAA TGT ACA CAT GGA ATT 3'           | Kashima S, 1996                  |
|                        | HIV V3c   | 5' ATT ACA GTA GAA AAA TTC CC 3'        | Kashima S, 1996                  |
| <b>HIV (Interno)</b>   | HIV 2KSIs | 5' GCA GTC TAG CAG AAG AAG A 3'         | Kashima S, 1996                  |
|                        | HIV 2KS1c | 5' TGG GTC CCC TCC TGA GGA T 3'         | Kashima S, 1996                  |
| <b>M. tuberculosis</b> | TB1       | 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3'        | Eisenach KD <i>et al.</i> , 1990 |
|                        | TB2       | 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 5'        | Eisenach KD <i>et al.</i> , 1990 |

Tabela 2: Relação com os microorganismos pesquisados, os primers específicos, suas respectivas seqüências e referências originais (parte 2).

| Agente                   | Primer   | Seqüência                           | Referências                      |
|--------------------------|----------|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>M. avium</i>          | MAVs     | 5' CCT CAA GAC GCA TGT CTT CT 3'    | Chen ZH <i>et al.</i> , 1996     |
|                          | MAVc     | 5' ACA GCT CCC TCC CAA AAG GG 3'    | Chen ZH <i>et al.</i> , 1996     |
| <i>M. intracellulare</i> | MINs     | 5' CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA 3'    | Chen ZH <i>et al.</i> , 1996     |
|                          | MINc     | 5' GCA CAG CTC CCT CCC AAG GG 3'    | Chen ZH <i>et al.</i> , 1996     |
| <i>T. pallidum</i> (ext) | RPTP47-1 | 5' GAC AAT GCT CAC TGA GGA TAG T 3' | Burstain JM <i>et al.</i> , 1991 |
|                          | RPTP47-2 | 5' ACG CAC AGA ACC GAA TTC CTT G 3' | Burstain JM <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>T. pallidum</i> (int) | RPTP47-3 | 5' TTG TGG TAG ACA CGG TGG GTA C 3' | Burstain JM <i>et al.</i> , 1991 |
|                          | RPTP47-4 | 5' TGA TCG CTG ACA AGC TTA GGC T 3' | Burstain JM <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>H. ducreyi</i>        | RPHDPØ   | 5' AGA GTT TGA TC(AC) TGG 3'        | Chui L <i>et al.</i> , 1993      |
|                          | RPHDP3   | 5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT 3'    | Chui L <i>et al.</i> , 1993      |

*primer* específico para cada agente. Foram adicionadas 2 gotas de óleo mineral para evitar a evaporação.

A reação foi realizada em todas as amostras com controle positivo. Utilizamos um termociclador Perkin Elmer 2400 com as seguintes etapas: uma etapa de aquecimento inicial das amostras para desnaturação das fitas de DNA (“hot start”), seguida por 35 a 40 ciclos de amplificação constituídos por 3 etapas cada. As temperaturas de desnaturação das fitas de DNA, de ligação dos *primers* ao DNA e extensão dos produtos amplificados (*amplicons*) apresentavam distintas características para cada agente [Tabela 3]. Após os ciclos de amplificação o produto foi mantido a uma temperatura de 72°C, objetivando permitir uma extensão final completa dos produtos amplificados e então conservados a 4°C. Os *amplicons* foram detectados, utilizando 10µL da mistura da PCR, através de eletroforese em gel de agarose, com concentrações variáveis entre 1 e 3%, em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo a 1µg/mL e então visualizados em luz ultravioleta e digitalizados pelo UVP® Vision Works.

### ***Citomegalovirus (CMV)***

A PCR foi realizada utilizando-se *primers* específicos para o CMV [Tabela 1]. Estes amplificam uma seqüência conservada do genoma que codifica uma porção do antígeno denominado *major immediate-early antigen*

**Tabela 3:** Parâmetros dos ciclos da PCR para cada agente, com temperatura e tempo de aquecimento inicial ("hot start"), número de ciclos, temperatura e tempo das etapas de cada ciclo (desnaturação, ligação e extensão), temperatura e tempo da extensão final e o tamanho do respectivo fragmento amplificado.

| Agente                      | "Hot start" |        |    | Ciclos |        |    | Desnaturação |        |    | Ligação |    |        | Extensão |        |    | Extensão final |    |        | Fragmento |
|-----------------------------|-------------|--------|----|--------|--------|----|--------------|--------|----|---------|----|--------|----------|--------|----|----------------|----|--------|-----------|
|                             | °C          | T(min) | N  | °C     | T(min) | N  | °C           | T(min) | °C | T(min)  | °C | T(min) | °C       | T(min) | °C | T(min)         | °C | T(min) |           |
| <b>CMV</b>                  | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 55           | 1      | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 434       |
| <b>Herpes</b>               | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 55           | 1      | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 386       |
| <b>HPV</b>                  | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 55           | 1      | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 450       |
| <b>HIV</b>                  | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 55           | 1      | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 419       |
| <b>HIV (nested)</b>         | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 60           | 1      | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 316       |
| <b>M. tuberculosis</b>      | 94          | 5      | 35 | 94     | 1      | 35 | 65           | 2      | 72 | 2       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 123       |
| <b>M. avium</b>             | 94          | 5      | 40 | 94     | 1      | 40 | 55           | 2      | 72 | 2       | 72 | 6      | 72       | 6      | 72 | 10             | 72 | 10     | 1300      |
| <b>M. intracellulare</b>    | 94          | 5      | 40 | 94     | 1      | 40 | 55           | 2      | 72 | 2       | 72 | 6      | 72       | 6      | 72 | 10             | 72 | 10     | 1300      |
| <b>T. pallidum</b>          | 94          | 5      | 40 | 94     | 1'15"  | 40 | 60           | 1'15"  | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 657       |
| <b>T. pallidum (nested)</b> | 94          | 5      | 40 | 94     | 1'15"  | 40 | 60           | 1'15"  | 72 | 1       | 72 | 1      | 72       | 1      | 72 | 10             | 72 | 10     | 495       |
| <b>H. ducreyi</b>           | 94          | 5      | 25 | 94     | 1      | 25 | 40           | 1      | 72 | 3       | 72 | 3      | 72       | 3      | 72 | 10             | 72 | 10     | 799       |

(MIE).<sup>55</sup> Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de fibroblastos de pulmão fetal humano infectados com a cepa AD169. A PCR foi realizada em um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**. Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

### ***Vírus Herpes***

Foi utilizado como controle positivo DNA extraído de cultura de células Vero (fibroblastos originários de células de rim de macaco verde africano) infectados com o vírus herpes. A PCR foi realizada em um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**, utilizando-se *primers* específicos para os vírus herpes **[Tabela 1]**. Estes *primers* amplificam tanto HSV tipo 1 e 2, quanto o VZV. Isto é possível graças ao alto grau de homologia entre os genes UL 15 do HSV e UL 42 do VZV, utilizados para o desenho dos *primers* utilizados.<sup>13</sup> Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

### ***Papilomavirus humano (HPV)***

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de biópsia de uma lesão condilomatosa da região vulvar de uma paciente atendida no Ambulatório de Moléstias Infecciosas de Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO)

do HCFMRP-USP. O DNA foi extraído pelo protocolo de fenol-clorofórmio-etanol (ver extração). A PCR foi realizada em um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**, utilizando-se *primers* específicos para o HPV [**Tabela 1**]. Os primers foram desenhados para amplificar uma região do genoma de cerca de 450 pares de bases, comum aos vários sorotipos do HPV.<sup>127</sup> Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

### ***Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)***

Foi utilizado como controle positivo DNA extraído de sobras de sangue de pacientes sabidamente HIV-positivos encaminhados ao laboratório de sorologia para detecção de anticorpos anti-HIV. A PCR foi realizada com *primers* específicos para o HIV [**Tabela 1**] e utilizando um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**. Os *primers* utilizados amplificam um segmento do gene ENV, responsável pela codificação de uma região bem conservada da alça V3 da proteína gp120.<sup>99</sup> Posteriormente, foi realizado o *nested PCR* em todas as amostras usando-se os *primers* listados na **Tabela 1**. As condições de realização da PCR e do *nested PCR* encontram-se descritos na **tabela 3**. Os *amplicons* foram detectados por eletroforese em agarose a 2%.

***Mycobacterium tuberculosis***

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de escarro positiva para o *Mycobacterium tuberculosis*. A PCR foi realizada com *primers* específicos para este agente [Tabela 1], em um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**. Os *primers* utilizados amplificam uma porção da seqüência de inserção repetitiva IS6110 do genoma das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*.<sup>60</sup> Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 3%.

***Mycobacterium avium***

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de escarro positiva para o *Mycobacterium avium*. A PCR foi realizada com *primers* específicos para este agente [Tabela 2] e utilizando um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**. Os *primers* utilizados foram desenhados para amplificar a região conservada 16s RNAr, do genoma do *M avium*.<sup>37</sup> Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

***Mycobacterium intracellulare***



Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de escarro positiva para o *Mycobacterium intracellulare*. A PCR foi realizada com *primers* específicos para este agente [Tabela 2] e utilizando um termociclador com as condições descritas na tabela 3. Os *primers* utilizados foram desenhados para amplificar a região conservada 16s RNAr, do genoma do *M Intracellulare*.<sup>37</sup> Os *amplicons* foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

### ***Treponema pallidum***

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de biópsia de uma lesão vulvar ulcerada de uma paciente com diagnóstico clínico e sorológico de sífilis primária, atendida no Ambulatório de Moléstias Infecciosas de Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do HCFMRP-USP. A PCR foi realizada com *primers* específicos para o *Treponema pallidum* [Tabela 2] e utilizando um termociclador com as condições descritas na tabela 3. Posteriormente, foi realizado o *nested PCR* em todas as amostras usando-se os *primers* listados na Tabela 2. As condições de realização da PCR e do *nested PCR* encontram-se descritos na tabela 3. Os *primers* foram desenhados para amplificação da seqüência genômica, patógeno-específica e altamente conservada, que codifica um antígeno de membrana de 47-kDa (tpp47).<sup>26</sup> Os *amplicons* foram detectados por eletroforese em agarose a 2%.

***Haemophilus ducreyi***

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de material liofilizado de *H. ducreyi*, obtido do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. A PCR foi realizada com *primers* específicos para o *Haemophilus ducreyi* [Tabela 2], utilizando-se um termociclador com as condições descritas na **tabela 3**. Os *primers* foram desenhados para amplificação do gene 16S RNAr, que apresenta múltiplas cópias no genoma bacteriano.<sup>40</sup> Os *amplicons* foram detectados por eletroforese em agarose a 1%.