

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DE AMOSTRAS

4.1.1. Local do estudo

O Estudo foi realizado na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo no Departamento de Triagem de doadores e no Departamento de Hemofilia.

4.1.2. População em estudo

As amostras de plasma e PBMC de dois grupos de indivíduos atendidos pela FPS/HSP foram incluídos neste estudo. O primeiro grupo compreende 400 doadores de sangue (55% homens, 45% mulheres) e o segundo grupo abrange 50 indivíduos politransfundidos (28 homens, 22 mulheres), Tabela 4, que assinaram o consentimento informado e forneceram 5 mL de sangue total para a pesquisa do HHV-8. **(ANEXO A)**

Aos candidatos, incluídos no estudo, era fornecida uma explicação resumida sobre os objetivos da pesquisa e suas implicações, ressaltando o caráter confidencial das informações que seriam fornecidas. **(ANEXOS B)**

Os doadores foram entrevistados, utilizando-se um questionário padronizado e pré-codificado **(ANEXOS C)**. Eram coletadas informações sociodemográficas.

A entrevista foi realizada durante a doação de sangue. As amostras eram coletadas após assinatura do consentimento informado em tubo com EDTA, centrifugadas durante 5 minutos a 1.500 rpm e separadas em microtubos de 1,5 mL de sangue total e 1,5 mL de plasma e armazenadas a -20°C .

4.1.3. Local de Realização dos Exames Sorológicos e DNA

Todos os procedimentos foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Sorologia da FPS/HSP. As células BCBL-1 foram fornecidas pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

4.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O trabalho realizado caracteriza um estudo seccional e soropidemiológico.

4.3. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

4.3.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFA)

Os antígenos do HHV-8, para a realização da técnica de IFA foram obtidos a partir de células BCBL-1, uma linhagem celular, proveniente de linfoma de células B de cavidade, infectadas com HHV-8 latente, fornecidas

pelo Dr. Niel Constantine, do Institute of Human Virology, University of Maryland Baltimore, EUA.

As células BCBL-1 foram mantidas a 37°C em meio RPMI-1640 (Gibco BRL), suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL®), benzilpenicilina potássica 100 U/mL (Megapen-5®), sulfato de estreptomicina 100mg/ml (FURP) e anfotericina B 2µg/mL (Fungizon®).

Para detecção dos anticorpos de fase lítica, a cultura foi estimulada com 20 ng/mL de acetato de tetradecanoil forbol (TPA, Sigma®) durante 96 horas para indução da transcrição do genoma viral, somente 30% da cultura respondem ao estímulo, e as demais células se mantêm em fase latente-LANA. Esta cultura apresentou células com antígenos de fase lítica e latente, e nós utilizamos esta cultura para realizar a detecção tanto dos anticorpos de fase lítica como os anticorpos de fase latente.

Uma linhagem de células B não infectadas chamadas de células Ramos foi utilizada como controle de reações inespecíficas.

4.3.1.1. Preparação das lâminas de IFA

As suspensões de células BCBL-1 estimuladas com TPA, foram lavadas três vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2) por meio de centrifugação a 800g durante 10 minutos e ressuspensas em PBS, na concentração aproximada de ± 10 células/mL. Colocamos 10 µL da suspensão de células em cada área demarcada da lâmina, deixamos secar

a temperatura ambiente e fixamos em acetona gelada durante 10 minutos. As lâminas preparadas foram armazenadas a -70°C até o momento de uso.

4.3.1.2. Procedimento da Reação de IFA

O ensaio de Imunofluorescência Indireta foi realizado segundo método descrito por Gao et al. (1996). (70) As lâminas foram removidas do freezer -70°C e deixadas à temperatura ambiente durante 10 minutos para secar. Depois bloqueadas com 20 μL BSA-PBST a 3% durante 30 minutos em câmara úmida. Para amostras e controles negativo e positivo foi realizado uma diluição de 1/80, sendo 10 μL da amostras e controles para 390 μL BSA-PBST pH 7,4. Foi aspirado a solução do bloqueio e adicionado 20 μL das amostras e controles diluídos e suas respectivas cavidades e incubado a 37°C durante 30 minutos. Depois lavadas 3 vezes com intervalos de 5 minutos em PBS e secadas com secador. Para cada orifício foi adicionado 20 μL da solução de conjugado (solução de anti- IgG humano isoticionato fluoresceína a uma diluição de 1/100 em PBS mais azul de evans 0,01mg/mL) e incubado a 37°C durante 30 minutos depois lavadas 3 vezes com intervalos de 5 minutos em PBS e secadas com secador.

As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 9,2. A leitura realizou-se em microscópio de imunofluorescência (Olympus®) com aumento de 400 vezes. Em todas as lâminas foram colocados controles negativos e positivos para anticorpos anti-HHV-8, e para cada reação foi testado o

controle positivo em diluições seriadas de 1:20 a 10.240 para a verificação da sensibilidade do teste. Como controle negativo foi utilizada uma amostra de um indivíduo saudável com resultados negativo para IFA e PCR. O controle positivo é de um paciente com AIDS e SK, com altos títulos de anticorpos contra antígenos da fase latente e lítica do HHV-8, repetidamente reativo pela IFA.

As células eram consideradas positivas por antígeno lítico a uma diluição de 1:80 quando era observada uma fluorescência clara e uniforme. Para antígeno nuclear latente, as células eram consideradas positivas se observado 50-80% de reatividade nas células. Todas as amostras que apresentaram positividade inicial eram re-testadas novamente. Amostras que produziram resultados inconclusivos eram re-testadas 3 vezes.

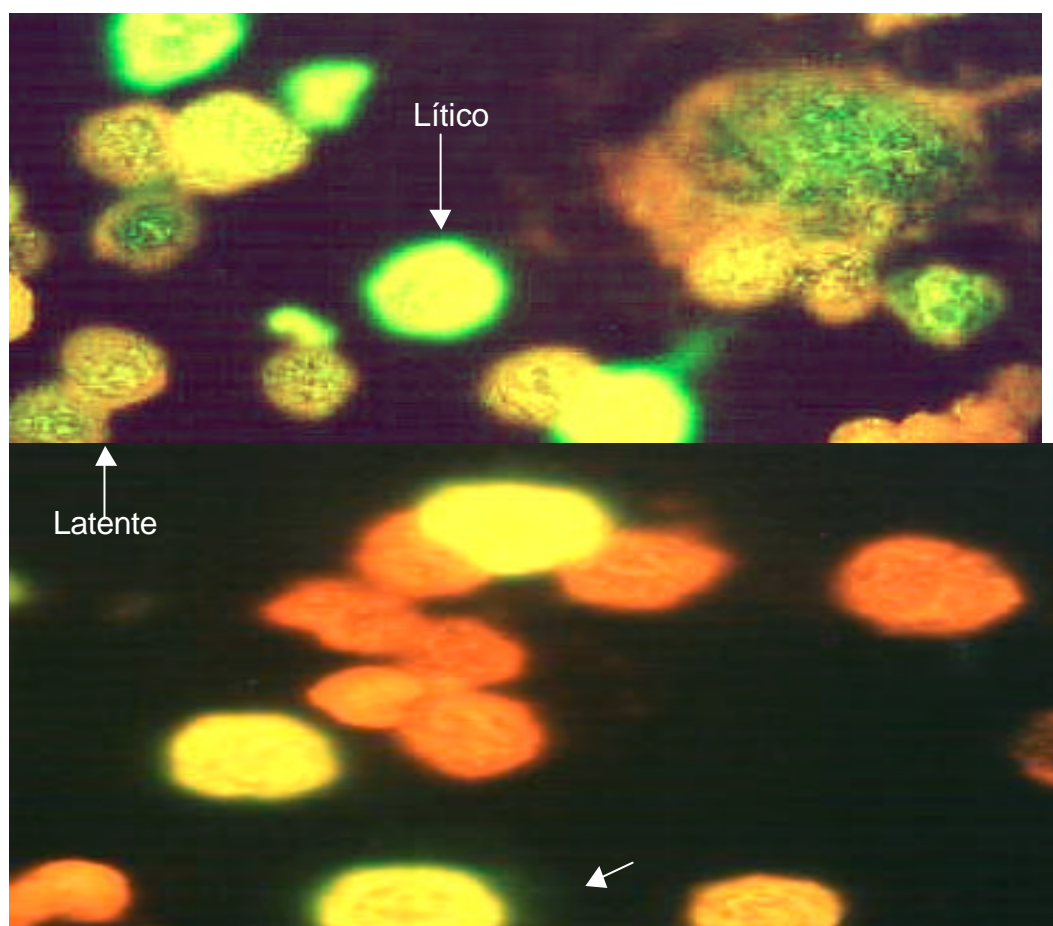


Figura 11. Reação de Imunofluorescência positiva para anticorpos contra antígenos da fase lítica do HHV-8 em células BCBL-1 tratadas com TPA. (Cortesia Profa. Dra. Vanda Ueda - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

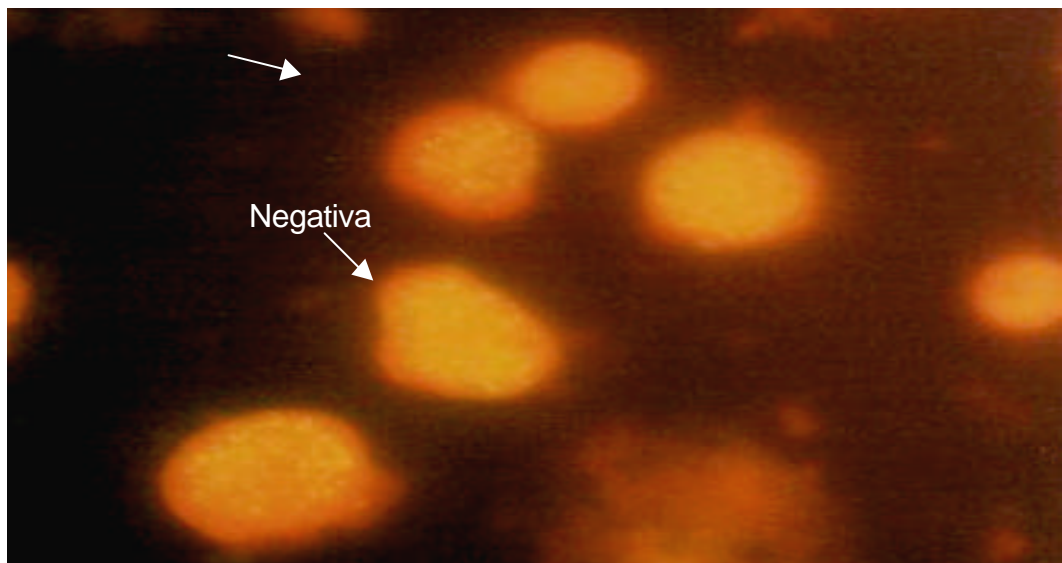


Figura 12. Reação de Imunofluorescência negativa para anticorpos contra o HHV-8 em células BCBL-1. (Cortesia Profa. Dra. Vanda Ueda - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

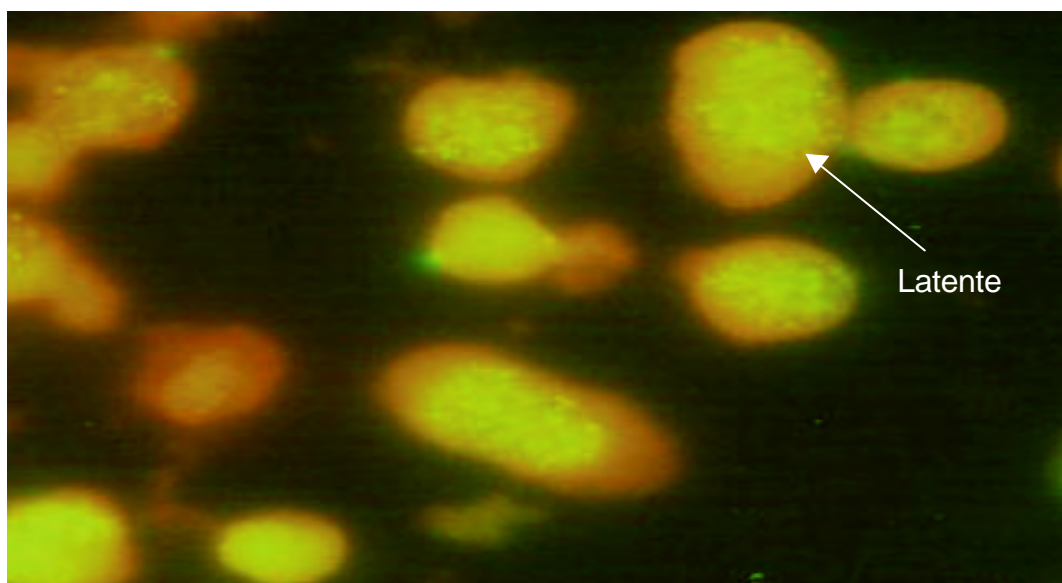


Figura 13. Reação de Imunofluorescência positiva para anticorpos contra antígenos de fase latente (LANA) do HHV-8 em células BCBL-1. (Cortesia Profa. Dra. Vanda Ueda - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase “NESTED PCR”

4.3.2.1. Teste de sensibilidade da técnica de Nested PCR

Para realizar o teste de sensibilidade do PCR Nested foram utilizados 10 mL de uma cultura de células BCBL-1 infectada com HHV-8, estas foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm. Após, desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado foi acrescentado 10 mL de PBS pH 7,4, repetindo esse procedimento por mais duas vezes. Depois o precipitado foi ressuspendido em 5mL de PBS, sendo efetuada a quantificação das células no equipamento Coulter T-890 para obter o número de células por mL. Segundo Rabkins et al. (1998), em cada célula infectada existem de 30 – 70 cópias, foram consideradas um número médio de 50 cópias de vírus por célula e multiplicado pelo número de células. (189)

Foi realizada a extração do DNA e diluição seriada até que o número de cópias fosse zero.

Realizou-se o Nested PCR e a leitura em gel de agarose para determinar a sensibilidade, como mostra figura a 15.

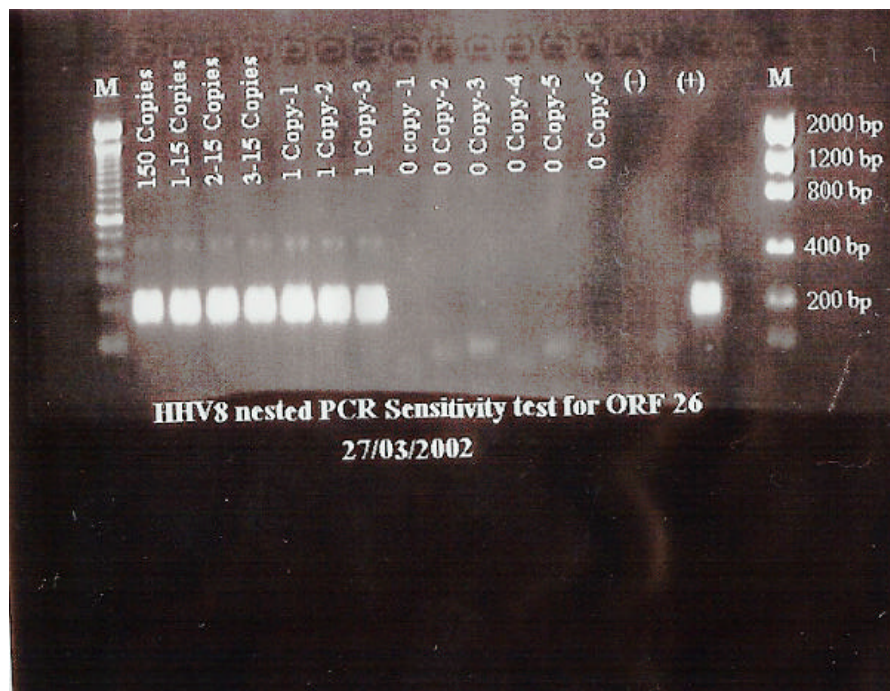


Figura 14. Teste de sensibilidade do Nested PCR.

4.3.2.2. Extração NASBA Manual

O DNA foi extraído do sangue com EDTA pelo kit NucliSens (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands®), segundo protocolo do fabricante. Descrevendo brevemente, em tubo eppendorf 1,5 mL, 100µL de sangue com EDTA era adicionado à 900µL de tampão de lise. Um volume de 50µL de sílica foi adicionado, e a mistura incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, e a cada 2 minutos eram homogeneizados por inversão. Depois de centrifugados a 1.500 g durante 2 minutos. Posteriormente os sobrenadantes foram removidos, os precipitados de sílica foram

ressuspendidos em 1mL de tampão de lavagem, e centrifugados a 10.000 g durante 1 minuto, seqüencialmente foram lavados em tampão de lavagem; etanol 70% (2 vezes) e 1 vez em acetona. Os precipitados foram incubados a 56°C durante 10 minutos, depois de secos, foram adicionados 50 µL de tampão de eluição aos precipitados, e novamente incubados a 56°C durante 10 minutos, sendo homogeneizados a cada 2 minutos em vórtex. Após centrifugação de 10.000 g durante 5 minutos, os produtos eluídos foram transferidos para novos microtubos, e centrifugados novamente para retirar partículas de sílica. O mesmo produto foi usado para amplificação do HHV-8 e a quantificação do DNA usando marcadores de peso molecular de 100 pb.

4.3.2.2. Amplificação

O HHV-8 foi amplificado segundo o protocolo utilizado pôr L. Bélec et al. (1998), (121) pôr PCR Nested utilizando os seguintes primers:

- "Primers" externos: KS1/KS2 descrito por Chang et al. (1996).(59)

KS1: 5'- AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT – 3'

KS2: 5'- TCC GTG TTG TCT ACG TCC AG – 3'

- "Primers" internos: WH-KS-1/WH-KS-2

WH-KS-1: 5' – GTG CTC GAA TCC AAC GGA TT – 3'

WH-KS-2: 5' – ATG ACA CAT TGG TGG TAT AT – 3'

O ciclo inicial da PCR consistiu de uma desnaturação a 94°C / 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (desnaturação: 94°C / 45

segundos; anelamento: 55 °C / 45 segundos; extensão: 72°C / 60 segundos), e um último ciclo de extensão 15 minutos / 72°C, contendo 25 pmol de cada primer, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 200 uM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂ e 50 mM HCl. Foram transferidos 5 µL do produto do primeiro PCR para o segundo PCR interno, consistindo de uma desnaturação inicial de 94°C / 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C / 60 segundos; 60°C / 60 segundos; 72°C / 60 segundos) e um último de 15 minutos à 72°C.

4.3.2.3. Detecção

Este PCR Nested é 100 a 1000 vezes mais sensível para a detecção de seqüências de HHV-8 do que o PCR simples que utiliza os primers KS 330₂₃₃, e permite uma detecção menor do que 5 cópias do genoma externo, previamente determinada por comparação de diluição serial de um DNA padrão contendo uma quantidade conhecida de HHV-8 DNA. Ao final da PCR Nested foi visualizado um produto de 170 pb através da U.V por brometo de etídio, em gel de agarose a 2%.

4.3.3. Reação de Seqüenciamento

Purificação do produto amplificado da reação de Nested PCR foram purificados na fase de pré-seqüenciamento utilizando o kit da Qiagen PCR Purification Kit QIAquick (cat.No.28106) conforme protocolo do fabricante.

4.3.3.1. Quantificação do produto de PCR

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizado sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. A quantificação foi visual comparado com o marcador de peso molecular Low DNA mass ladder (GIBCO).

4.3.3.2. Reação de seqüenciamento

Preparar o mix da reação de seqüenciamento utilizando o "kit" ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), adicionar 1,0 ul ou 2,0 ul do produto amplificado purificado (15 - 45 ng de DNA previamente quantificado) e amplificar em termociclador automático utilizando 25 ciclo de 96°C por 10 seg., 50 °C por 5 seg. e 60 °C por 4 minutos.

Purificar o produto da reação de seqüenciamento utilizando 2,0 ul acetato de sódio 3 M pH 4,6, 10 ul de água MilliQ e 50 ul etanol 95%, agitar e precipitar por 15 min. a temperatura ambiente. Centrifugar por 20 min em velocidade máxima, aspirar o sobrenadante e lavar o pellet 2 vezes com etanol 70%. Adicionar ao pellet seco 6 ul da mistura formamida mais loading (5+1), aplicar 2 ul e seqüenciar em seqüenciador automático ABI 377.

Mix da reação de seqüenciamento:

Mix (kit ABI PRISM)	4,0 ul.
"Primers"	(1,0 pmol/ul) 1,0ul.
DNA purificado (15-45 ng)	1,0 a 2,0 ul.
Água Milli Q qsq	10,0ul.
Amostra primeira amplificação	1,0 a 3,0 ul.

4.4. ANÁLISE DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram realizadas usando Epi-info versão 6.04. Para comparar a valores qualitativos entre receptores e doadores de sangue, com e sem detecção de anticorpos, correções usadas pelo método de Yate's. Teste paramétricos (tabela 2 por 2 com testes exatos de Fisher's) e testes não paramétricos (teste U de Mann Whitney) foram usados para comparar validade de dados quantitativos. Validade foi expressa como média \pm SEM. Validade de p menor que 0.05 foi considerado sendo estatisticamente significante (intervalo de confiança > 95%).