

CRISTIANO APARECIDO CHAGAS

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno Cristiano Aparecido Chagas.

Campinas, 08 de março de 2006.

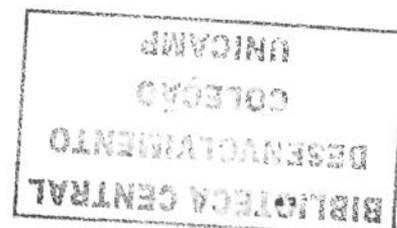
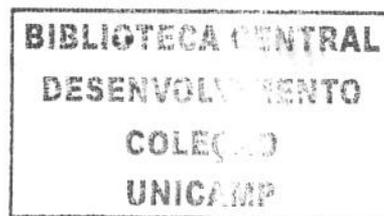
Prof. Dr. José Vassallo
Orientador.



**PESQUISA DO HERPESVÍRUS TIPO 8 (HHV8) EM
ADENÓIDES E TONSILAS DE CRIANÇAS;
UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E POR
HIBRIDIZAÇÃO "IN SITU"**

CAMPINAS

2006



CRISTIANO APARECIDO CHAGAS

**PESQUISA DO HERPESVÍRUS TIPO 8 (HHV8) EM
ADENÓIDES E TONSILAS DE CRIANÇAS;
UM ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E POR
HIBRIDIZAÇÃO “IN SITU”**

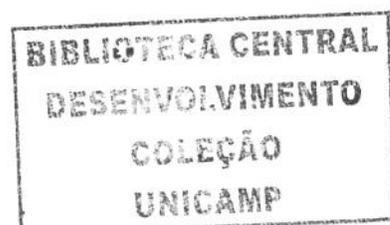
*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: JOSÉ VASSALLO

CAMPINAS

2006

ii



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

UNIDADE BC
N.º CHAMADA T/UNICAMP
C346p
V EX
TOMBO BC/ 69152
PROC. 16.123.06
C D
PREÇO 11,00
DATA 29-06-06

C346p

Chagas, Cristiano Aparecido

Pesquisa do herpesvírus tipo 8 (HHV-8) em adenóides e tonsilas de crianças; um estudo imunohistoquímico e por hibridização "in situ" / Cristiano Aparecido Chagas. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Vassallo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesvirus 8 humano. 2. Imunohistoquímica. 3. Tonsilite. I. Vassallo, José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

Título em ingles : Detection of herpesvirus type 8 (HHV8) in children's tonsils and adenoids by immunohistochemistry and in situ hybridization

Keywords: •Herpesvirus 8, human
• Immunohistochemistry
• Tonsilitis

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Prof Dr José Vassalo

Profa. Dra. Maria Regina Calil

Prof Dr Felipe Ruiz Sueiro

Prof Dr André Almeida Schenka

Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Data da defesa: 08-03-2006

BIB ID 383273

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientadora: Prof. Dr. José Vassallo

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Regina Calil

2. Prof. Dr. Felipe Ruiz Sueiro

3. Prof. Dr. André Almeida Schenka

4. Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

5. Prof. Dr. José Vassallo

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/03/06

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Fernanda e ao
meu filho Victor.*

Não posso deixar de agradecer aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica por, há 13 anos, quando eu acabara de completar 16 anos de idade, terem me recebido tão bem e terem me ensinado tanto a respeito da técnica histológica em Anatomia Patológica. Devo agradecer, sobretudo, à Sra. Maria do Carmo a quem tantas vezes recorri ao longo do meu curso de pós-graduação e que nunca me deixou esquecer uma data importante do calendário escolar. Agradeço também aos docentes do mesmo departamento, por quem tenho grande admiração e com quem aprendo a ser pesquisador e professor, principalmente à Prof. Dra. Miriam Trevisan a quem pude conhecer melhor e por quem tenho grande admiração e apreço.

Sou muito grato aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental, sobretudo à minha amiga Dra. Glauce, que tanto me ajudou com sua experiência para o desenvolvimento desta tese, e aos Srs. Júlio e Eduardo, também amigos antes de colegas, que me ajudaram em todos os momentos do desenvolvimento das técnicas histológicas, de imunoistoquímica e hibridização *in situ*.

Serei eternamente grato ao meu orientador, Prof. Dr. José Vassallo, que foi sempre mestre na tese e na vida, e amigo acima de tudo.

Não há como agradecer aos meus pais, que tantas adversidades venceram para me darem a oportunidade de poder estudar e chegar a este momento.

Por fim, quero agradecer à minha esposa Fernanda, e ao meu filho Víctor, por terem tido tanta paciência e suportado minha ausência por tantos momentos e, mais do que tudo, por fazerem parte de minha vida e por me trazerem tanta alegria.

*Quem, de três milênios,
Não é capaz de se dar conta
Vive na ignorância, na sombra,
À mercê dos dias, dos tempos.*

Johann Wolfgang von Goethe

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1.1- Biologia do vírus	18
1.2- Epidemiologia	19
1.3- Patologia	20
1.4- Métodos de detecção	21
2- OBJETIVOS	23
3- MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- Imunoistoquímica	26
3.2- Hibridização <i>in situ</i>	28
4- RESULTADOS	32
5- DISCUSSÃO	43
6- CONCLUSÃO	48
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

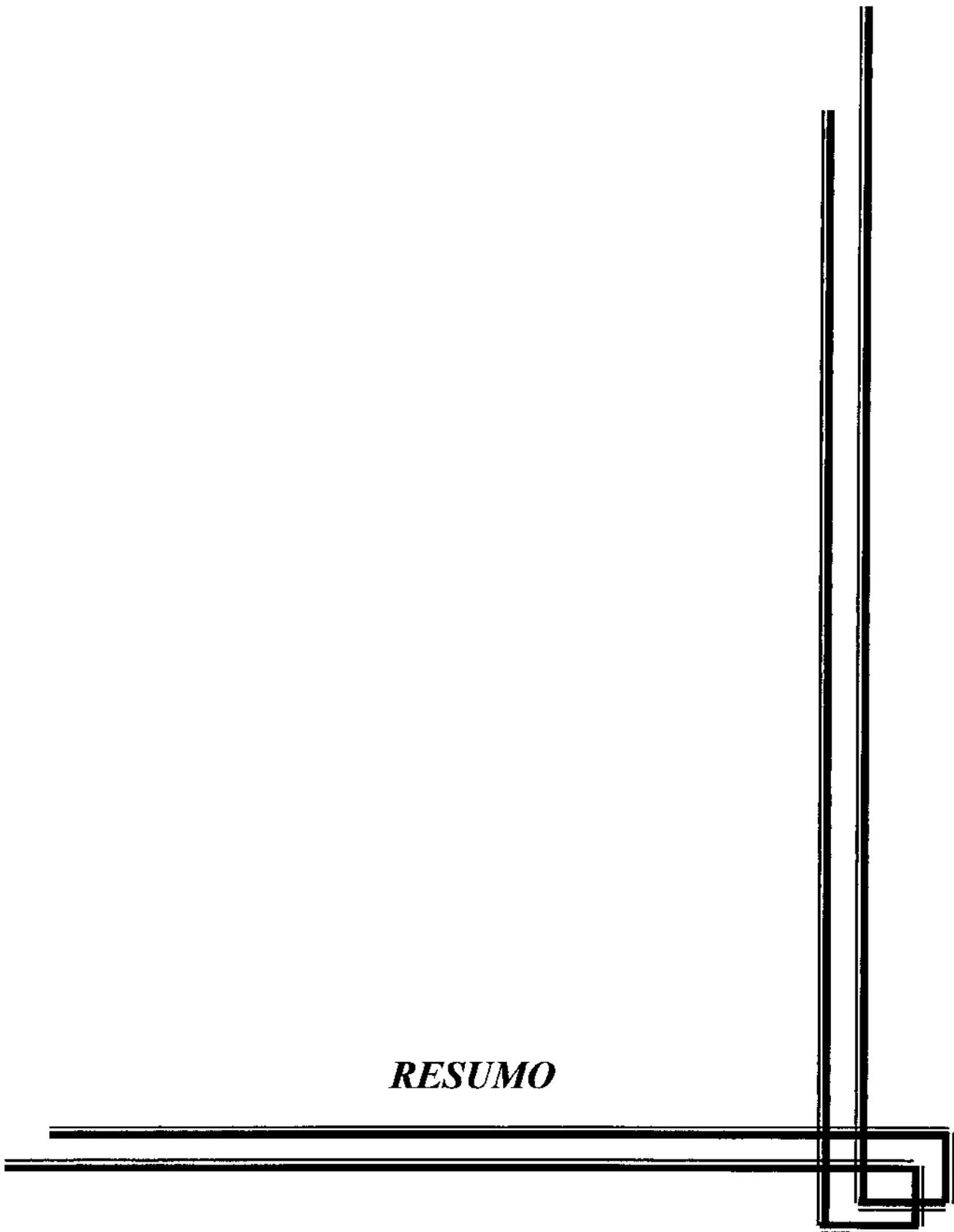
DNA	ácido desoxirribonucleico
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
BSA	soro albumina bovina
DAB	3,3' tetra-hidrocloro de diaminobenzidina
EBV	vírus de Epstein Barr
HHV1	herpesvírus humano tipo 1
HHV2	herpesvírus humano tipo 2
HHV3	herpesvírus humano tipo 3 (também denominado vírus da varicela Zóster)
HHV4	herpesvírus humano tipo 4 (também denominado vírus de Epstein Barr)
HHV5	herpesvírus humano tipo 5 (também denominado Citomegalovírus)
HHV6	herpesvírus humano tipo 6
HHV7	herpesvírus humano tipo 7
HHV8	herpesvírus humano tipo 8 (também denominado vírus humano associado ao sarcoma de Kaposi)
HIS	hibridização <i>in situ</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IQ	imunoistoquímica
KSHV	vírus humano associado ao sarcoma de Kaposi
LANA	antígeno nuclear latente
LNA	o mesmo que LANA

LSAB	sistema de detecção estrepto-avidina-biotina-peroxidase (LSAB+system-HRP, código K0690-1, Dakocytomation, Carpenteria, CA, USA)
ORF	<i>open reading frame</i> (seqüências genéticas que caracterizam o HHV8)
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucleico
RRV	<i>Rhadinovirus</i> do macaco <i>Rhesus</i>
SK	sarcoma de Kaposi
TBS	tampão Tris salino

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Número de casos positivos nas diferentes faixas etárias.....	41
Tabela 2- Casos positivos em relação ao sexo do paciente.....	41
Tabela 3- Descrição dos casos positivos em relação ao grau e à topografia da positividade.....	42

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Controle positivo para a reação imunoistoquímica proveniente de paciente acometido pelo Sarcoma de Kaposi (1000x).....	29
Figura 2- Controle positivo (seta em núcleo de célula positiva) para a reação de hibridização <i>in situ</i> proveniente de paciente acometido pelo Sarcoma de Kaposi (400x).....	30
Figura 3- Caso positivo para HHV8. Apenas um núcleo de linfócito apresenta coloração marrom. (imunoistoquímica, x 1000).....	35
Figura 4- Caso positivo para HHV8. Poucos núcleos de células epiteliais da superfície apresentam fraca coloração marrom. (imunoistoquímica, x 1000).....	36
Figura 5- Caso positivo para HHV8. Vários núcleos de linfócitos subepiteliais apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 400).....	37
Figura 6- Caso positivo para HHV8. Vários núcleos de linfócitos da zona do manto folicular apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 400).....	38
Figura 7- Caso positivo para HHV8. Vários núcleos de linfócitos intraepiteliais apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 1000).....	39
Figura 8- Caso positivo para HHV8. Vários núcleos das células epiteliais na superfície amigdaliana apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 1000).....	40

RESUMO



Contexto: o herpesvírus humano tipo 8 (HHV8) foi recentemente associado a neoplasias humanas, como o sarcoma de Kaposi e o linfoma não Hodgkin de células B das cavidades serosas em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), além da doença de Castleman multicêntrica. Estudos epidemiológicos mostraram soropositividade em porcentagens variáveis da população, inclusive em crianças. Acredita-se que a forma de transmissão seja predominantemente sexual nos adultos, mas existem formas de infecção não relacionadas à atividade sexual que explicam a soropositividade em crianças e em indivíduos que não apresentaram contato sexual prévio. O vírus foi demonstrado em células epiteliais orais descamadas, mas há apenas um raro relato sobre sua presença no anel de Waldeyer em um indivíduo HIV positivo.

Objetivos: detectar a presença do antígeno nuclear latente (LNA-1) e de RNAm do HHV8 em tecidos amigdalianos e adenoideanos de indivíduos de até 20 anos de idade; em caso de reatividade, verificar quais tipos celulares albergam o vírus (linfóides, endoteliais, estromais, epiteliais); verificar se existe preferência por um dos dois órgãos estudados, amídalas ou adenóides; verificar em que idade a frequência de positividade, se existir, se concentra (menor que 2 anos; 2 a 5; 6 a 10; maior que 10 anos); comparar a reatividade dos dois métodos.

Métodos: estudo retrospectivo em amídalas e adenóides previamente fixadas em formalina e incluídas em parafina. Um total de 343 tecidos do anel de Waldeyer foi analisado (181 amídalas e 162 adenóides), de 293 pacientes (174 do sexo masculino e 119 do feminino; média de idade 6,05 anos, desvio padrão 3,80; mediana de idade 5 anos). A detecção de antígenos protéicos do vírus foi feita por imunoistoquímica (IQ), utilizando um anticorpo anti-LNA1, revelando-se a reação pelo método do LSAB+. A detecção do RNAm viral foi feita por hibridização *in situ* (HIS), utilizando-se um coquetel de sondas T1-1.

Resultados/Conclusões: em 20 casos (6,83%) houve reatividade para o HHV8 em células morfológicamente caracterizadas como linfóides. Em 3 destes casos células epiteliais foram também positivas. Em todos os 20 casos houve reatividade à HIS, porém em apenas 2 casos houve reatividade concomitante à IQ. Em 19 casos houve reatividade nas tonsilas e em apenas um na adenóide. Houve percentual decrescente de positividade nas faixas etárias de pacientes menores de 2 anos, até 5, até 7 e maiores de 10 anos, embora sem diferenças

significativas. Nossos dados reforçam a teoria da contaminação pelo HHV8 pela saliva já na faixa etária pediátrica. O método de hibridização molecular *in situ* mostrou-se muito superior à imunistoquímica, provavelmente devido à pequena quantidade de material protéico nas células infectadas.

Palavras-chaves: herpes vírus humano tipo 8 (HHV8); anel de Waldeyer; amígdala; adenóides; imunistoquímica; hibridização molecular *in situ*

ABSTRACT

Objective: Human herpesvirus 8 (HHV8) has been associated with multicentric Castleman's disease, Kaposi's sarcoma and effusion non-Hodgkin's lymphoma. Epidemiological studies have shown seropositivity in variable proportions of populations. It seems to be sexually transmitted among adults and through oral contact among children. The virus has been demonstrated in desquamating oral epithelial cells, but there was only a rare report on its presence in the Waldeyer's ring in an HIV positive subject. The purpose of the present study is to detect HHV8 in tonsils and adenoids from children up to 20 years of age in which these organs had been surgically removed due to hypertrophy, using immunohistochemistry and *in situ* hybridization.

Methods: Paraffin wax-embedded sections consisting of 181 tonsils and 162 adenoids from 293 patients were analyzed. HHV8 was detected by immunohistochemistry (IHC) using the anti-LNA1 antibody (Novocastra) and the LSAB+ detection system (Dako). For the *in situ* hybridization (ISH), the T1-1 probe for the viral mRNA and the detection system used were provided by Novocastra.

Results: In 20 cases (6.83%), HHV8 was detected in cells morphologically characterized as lymphoid. In three of them epithelial cells were also positive. In 19 cases, the virus was detected in tonsils and in just 1 case in an adenoid. In all 20 cases detection was possible by ISH, whereas in only 2 of them there was a concomitant positivity by IHC.

Discussion/Conclusion: Our data support the oral route of contamination by HHV8 in children, in whom tonsils and adenoids may harbor the virus. It is found especially in tonsils and only rarely in adenoids. In these organs ISH is the method of choice to detect this virus, probably due to the small amount of viral proteins.

Key words: human herpes virus 8 (HHV8); Waldeyer's ring; tonsils; adenoids; immunohistochemistry; *in situ* hybridization

1- INTRODUÇÃO

1.1- Biologia do vírus

Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*. São subclassificados em alfa, beta e gama, de acordo com seus hospedeiros, alterações citológicas que provocam e estrutura molecular. Os *virions* do herpesvírus típico consistem de 4 componentes: um envelope com projeções na superfície, um tegumento entre o envelope e o nucleocapsídeo, consistindo de material amorfo, um nucleocapsídeo icosaédrico com 100 nm de diâmetro com 162 capsômeros e um “núcleo” (*core*) que consiste de material fibrilar onde o DNA se ancora. O genoma consiste de uma molécula de DNA de dupla fita, com 120 a 230 kbp (quilobases em pares) (LEVINE, 1999).

Os herpesvírus alfa de interesse para a patologia humana incluem os herpes simples 1 e 2 (HHV1 e HHV2) e o vírus da varicela-zóster (HHV3). Membros deste grupo geralmente têm ciclo reprodutivo curto, disseminação rápida em culturas de células, eficiência na destruição de células em curto período de tempo e são capazes de estabelecer latência em gânglios sensoriais (LEVINE, 1999).

Os herpesvírus beta distinguem-se morfologicamente dos demais por possuírem tegumento pronunciado. Incluem o HHV5 (citomegalovírus), o HHV6, e o HHV7. Os tipos HHV6 e 7 infectam linfócitos T (principalmente CD4+), bem como monócitos e macrófagos. Acredita-se que estejam disseminados na população (>85%), causando mais comumente roséola ou exantema súbito. O tipo 7 foi também associado a doenças febris da infância (LEVINE, 1999).

O herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) é o oitavo herpesvírus humano descrito (HHV8). Em 1994, foi identificado por técnicas de biologia molecular em tecido proveniente de paciente HIV + acometido pelo sarcoma de Kaposi (LEVINE, 1999; CHANG et al, 1994). Bem como o vírus de Epstein-Barr (EBV), com o qual apresenta homologies, trata-se de um vírus do tipo Gammaherpesvírus e está, filogeneticamente, mais próximo do RRV (do gênero *Rhadinovirus* - γ_2), presente na população de macaco *Rhesus*, (MCGEOCH & DAVISON, 1999).

1.2- Epidemiologia

De modo geral, é sabido que a região central da África (GAO et al, 1996), bem como o sul da Europa (PERNA et al, 2000), são regiões que apresentam as maiores incidências de infecção por HHV8 na população geral. No estudo de Gao et al (GAO et al, 1996), utilizando imunofluorescência, mostrou-se que em Uganda 24/47 (51%) dos indivíduos-controles eram soropositivos para HHV8, enquanto 4/107 (4%) dos doadores italianos e nenhum dos 122 doadores norte-americanos o eram. Neste estudo, mostrou-se que pacientes portadores de AIDS/SK destes três locais apresentavam soropositividade de 71-81%.

Perna et al (2000) estudaram (por imunofluorescência indireta) o soro de 970 indivíduos HIV negativos entre 1 e 70 anos, além de 742 indivíduos com diferentes tipos de risco para infecção pelo HIV. A soroprevalência do HHV8 foi de 11,5% na população geral, sendo 6% abaixo dos 16 anos e 22% acima dos 50 anos. Indivíduos de risco para infecção pelo HIV tiveram soroprevalência mais alta para HHV8. Com isto foi demonstrado que a infecção pelo HHV8 é relativamente difundida na Sicília Ocidental, podendo haver uma forma de disseminação sexual, que aumenta com a idade, e uma outra forma (provavelmente contato pessoal) em crianças. Estudando mulheres virgens e monogâmicas na Suécia, TEDESCHI et al (2000) encontraram 9% de soropositividade para HHV-8, reforçando a hipótese de uma transmissão não sexual. Em outros estudos, conclusões similares foram atingidas (KEDES et al, 1996; BOULANGER, 1998).

No Brasil, uma população de ameríndios mostrou uma alta prevalência de infecção pelo HHV8, chegando a 53% dos indivíduos, sendo 41% nas crianças abaixo de 10 anos e 65% em adultos (BIGGAR et al, 2000). Outro estudo, realizado com amostras coletadas de sete pacientes do estado de São Paulo, acometidos pelo sarcoma de Kaposi e portadores do HIV, demonstrou a presença do vírus em todos os casos (CATERINO-DE-ARAÚJO, 1998). Além disso, utilizando técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em biópsias de linfonodo de pacientes HIV negativos encontrou-se positividade em 2/25, também em São Paulo (VASSALLO et al, 2002).

Na faixa etária pediátrica, o estudo de Mayama et al (1998) revela que cerca de 50% de 215 crianças de Uganda são soropositivas para HHV8, havendo uma associação antes dos 12 anos de idade com o vírus da hepatite B. Este dado, além de reforçar uma forma de contágio não sexual, aponta para a existência de uma contaminação precoce em áreas subdesenvolvidas, onde mães mastigam os alimentos antes de os darem a seus filhos (LEVINE, 2002). Em estudo de 497 crianças e adultos de Belém, Pará, Brasil, FREITAS et al (2002) encontraram uma prevalência total de 16,3% de HHV8, detectado por imunoenensaio no soro. Neste estudo, a prevalência em indivíduos menores de 10 anos foi de 12% e cresceu com a idade, chegando a 33% em maiores de 41 anos.

1.3- Patologia

Dos processos patológicos associados ao HHV8, o sarcoma de Kaposi (SK) é o mais bem estudado. Nesta neoplasia, o vírus aparece infectando as células fusiformes típicas deste tumor, além de células endoteliais (SHULZ et al, 2000; BOSHOF et al, 1995). No entanto, em outros dois processos patológicos o vírus parece ter papel importante em seu estabelecimento e evolução: no linfoma não Hodgkin das cavidades serosas (BOSHOF et al, 1995) e na doença de Castleman (SOULIER et al, 1995; DUPIN et al, 2000).

Os mecanismos genéticos, que relacionam o HHV8 a neoplasias estão baseados na “codificação” pelo vírus de proteínas homólogas a proteínas do ciclo celular. Uma v-ciclina pode inativar o gene supressor do retinoblastoma (SARID et al, 1999), enquanto uma proteína viral homóloga à proteína bcl-2 (v-bcl2) pode bloquear a apoptose (SARID et al, 1997). Por sua vez, uma v-interleucina-6 induz proliferação de células linfóides B, ativação da angiogênese e inibição da resposta imune de células T “helper”. Esta v-interleucina-6 tem sido postulada como a responsável pelo desenvolvimento do SK (NICHOLAS et al, 1997).

Estudos usando culturas de células simultaneamente positivas para CD19 e HHV8, obtidas de material de biópsia de SK, misturadas com culturas de células CD19 positivas normais, demonstraram infecção destas últimas pelo vírus (LEVI, 1997).

Virtualmente todos os casos de linfomas das cavidades serosas (neoplasia originada de linfócitos B) mostraram-se infectados pelo HHV8 (NADOR et al, 1996). Além disso, a doença de Castleman multicêntrica está intimamente relacionada com a positividade para HHV8 e é uma doença que apresenta hiperplasia dos folículos linfóides e células B plasmocitóides positivas para o HHV8 (SOULIER et al, 1995; DUPIN et al, 2000).

1.4- Métodos de detecção

Os primeiros métodos sorológicos utilizaram a linhagem BC1 coinfectada por HHV-8 e EBV. Estes testes evidenciam dois tipos de anticorpos séricos: por um lado anticorpos dirigidos contra as proteínas p226 e p234, antígenos nucleares de fase latente; por outro lado, evidenciam anticorpos dirigidos contra a proteína p40, um antígeno específico do ciclo lítico. Estes testes mostraram sensibilidade de 80% e especificidade compreendida entre 82 e 100% (BOULANGER, 1998).

Após se verificar o aparecimento de linhagens infectadas por HHV-8 na ausência de infecção pelo EBV, foram desenvolvidos outros testes. O antígeno LNA-1 (latency-associated nuclear antigen), uma proteína codificada pela seqüência viral ORF73, expresso por células da linhagem BCBL1, serviu como alvo para anticorpos em técnica de imunofluorescência. Anticorpos dirigidos contra uma proteína viral codificada pela seqüência genética ORF65, além de anticorpos específicos para a própria proteína LNA-1, podem ser detectados pela técnica ELISA (BOULANGER, 1998).

Em tecidos, podem-se utilizar técnicas imunoistoquímicas. O anticorpo anti-LNA-1 já é comercializado para detecção de células infectadas pelo HHV8, aparecendo como reatividade nuclear. Esta técnica, assim como a hibridização *in situ* (HIS), é extremamente útil, porque pode ser usada em tecido fixado rotineiramente para histologia e incluído em parafina, podendo ser utilizado em material retrospectivo de arquivo anatomopatológico (DUPIN et al, 2000; BROUSSET et al, 2001).

A hibridização *in situ* é um método eficiente em detectar material genético viral. Um coquetel de sondas dirigidas para a marcação do RNA mensageiro viral T1.1 que se acumula no núcleo das células infectadas com um grande número de cópias, pode ser

utilizado para a verificação da infecção pelo HHV8. A HIS pode ser feita em cortes de biópsias congeladas ou em material parafinado de arquivo (LI et al, 1996, ZHONG et al, 1996).

Técnicas de PCR utilizando diversos *primers* (ORF-K-1, por exemplo) são usadas na detecção de HHV8 tanto em tecidos congelados, quanto em blocos de parafina (VASSALLO et al, 2002). Esta técnica é muito mais sensível do que as anteriores, porém há perda da morfologia, uma vez que o DNA deve ser extraído do tecido. Desta forma, pode-se saber que o tecido é positivo para o vírus, porém não se obtém informação sobre que tipo celular é o infectado.

Isso posto, há que se destacar que, embora o HHV8 apresente grande importância na Patologia Humana, sua via de transmissão oral ainda não está completamente estabelecida. Em uma excelente revisão sobre a transmissão e reativação do HHV8, Corey et al (2002) relatam a detecção deste vírus em células epiteliais descamadas e em tonsilas de indivíduos HIV positivos. No entanto, não existem estudos sobre a detecção do HHV8 no anel de Waldeyer em crianças e adolescentes. Uma vez que nesta faixa etária há abundante material cirúrgico nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, oriundo de ressecções por aumento de volume destes tecidos, propusemo-nos a estudá-lo quanto à presença deste vírus, na tentativa de contribuir para o conhecimento das suas formas de infecção no homem.

2- OBJETIVOS

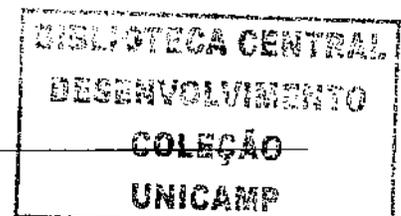
Verificar a presença do antígeno nuclear latente (LNA-1) e de RNAm do HHV8, respectivamente, por imunistoquímica e HIS, em tecidos amigdalianos e adenoideanos de indivíduos de até 20 anos de idade;

Em caso de reatividade, verificar quais tipos celulares albergam o vírus (linfóides, endoteliais, estromais, epiteliais) do ponto de vista morfológico;

Verificar se existe preferência por um dos dois órgãos estudados: amídalas ou adenóides;

Verificar em que idade a frequência de positividade, se existir, se concentra (menor que 2 anos; 2 a 5; 6 a 10; maior que 10 anos);

Comparar a reatividade dos dois métodos utilizados.



3- MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo retrospectivo e descritivo, utilizamos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina e arquivados no serviço de Anatomia Patológica, somando um total de 343 tecidos do anel de Waldeyer, sendo 181 blocos de amídalas e 162 blocos de adenóide, provenientes de 293 pacientes (53 pacientes possuíam tanto blocos de amídalas, quanto de adenóide). Estas crianças foram previamente submetidas a tonsilectomia ou adenotonsilectomia por tonsilites de repetição ou por aumento do volume adenotonsilar. O material cirúrgico foi fixado em formalina a 10% e incluído em parafina. Os dados sobre sexo e idade foram recuperados das requisições de exame anatomopatológico e demonstraram que a amostra era composta por 174 meninos e 119 meninas com idades variando de zero a 20 anos.

Para a detecção do HHV8, duas técnicas foram utilizadas, a imunistoquímica e a hibridização “in situ”. Para ambas as técnicas, novos cortes histológicos de 4 µm feitos a partir dos blocos selecionados foram colocados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução de organossilano a 20% (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma, cód. A3648, St. Louis, MO, USA) em acetona e colocadas por 1 hora em estufa a 100°C. A partir disto, as lâminas estavam prontas para seguir com os protocolos específicos.

3.1- Imunoistoquímica

As lâminas foram desparafinadas com um banho em xilol a 100°C e posterior passagem em mais dois xilóis a temperatura ambiente. Após, as lâminas foram banhadas em três álcoois absolutos, um álcool 80% e um álcool 50% para hidratação progressiva. Foram, então, lavadas em água corrente por 3 minutos e passadas em água destilada.

Para inibição da peroxidase endógena, as lâminas passaram por: 3 banhos de 3 minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% a temperatura ambiente e novamente lavadas em água corrente por 3 minutos e passadas por água destilada.

A recuperação antigênica foi feita pela imersão das lâminas em tampão citrato 10mM, pH6.0, durante 30 minutos a cerca de 98°C usando panela a vapor. Após isto, esperou-se 15 a 20 minutos para que o conjunto (lâminas imersas no tampão) esfriasse. Foi,

então, feita a lavagem das lâminas em água corrente por 3 minutos, com posterior passagem em água destilada e imersão em solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 (PBS) durante 5 minutos.

As lâminas foram incubadas com anticorpo primário por 30 minutos em estufa a 37°C e, após, incubadas por toda a noite (16-20 horas) a 4°C em câmara úmida. Na manhã seguinte, retirou-se o excesso do anticorpo primário; seguindo-se 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada a temperatura ambiente. Foi usado anticorpo primário monoclonal (anti-LNA1, clone 13B10, código NCL-HHV8-LNA, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), produzido em camundongo.

Para a detecção da reação antígeno-anticorpo foi utilizado o método LSAB acoplado à peroxidase (LSAB+ system-HRP, código K0690-1, Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA), seguindo recomendações de protocolo do fabricante. Assim, as lâminas foram lavadas em PBS com 3 banhos de 5 minutos cada e sobre os cortes foi colocado o anticorpo secundário biotilado. As lâminas foram colocadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Com o fim desta incubação, as lâminas foram lavadas como anteriormente e sobre os cortes pingamos, desta feita, o complexo streptoavidina-peroxidase, seguindo-se, novamente, incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

A coloração foi realizada com de 60 mg de DAB (3,3 tetra-hidroclorato de diamino-benzidina, Sigma, código D5637, St. Louis, MO, USA), cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo, dissolvido em 100 ml de PBS com 1 ml de dimetilssulfóxido e 0,5 ml de peróxido de hidrogênio 10%, com posterior lavagem em água corrente. Seguiu-se contracoloração com hematoxilina de Harris e nova lavagem em água corrente. A seguir, as lâminas foram desidratadas com banhos em álcool absoluto e passadas em xilol para posterior montagem com resina Entellan (Merck, cód. 7961, Darmstadt, Alemanha).

A positividade foi evidenciada pela marcação dos núcleos em marrom que contrasta com o roxo dos núcleos das células não marcadas e coradas apenas pela hematoxilina de Harris.

3.2- Hibridização *In Situ*

A hibridização *in situ* foi feita utilizando-se o coquetel de sondas contra o RNAm T1.1 do vírus HHV-8, marcadas com fluoresceína (código NCL-HHV8, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). A revelação da hibridização foi feita utilizando-se um “kit” de detecção de sondas marcadas com fluoresceína (código NCL – ISH – D, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK).

As lâminas foram desparafinadas com dois banhos de xilol de 5 minutos cada e a hidratação foi feita em gradientes decrescentes de concentração de etanol: duas vezes em etanol absoluto, uma vez em etanol 95% e uma vez em etanol 70%, sendo de 2 minutos cada banho.

Os tecidos foram, então, submetidos à digestão enzimática para remoção das proteínas associadas aos ácidos nucleicos e, assim, tornar o RNAm do espécime acessível às sondas. A digestão enzimática consistiu da imersão das lâminas em solução de proteinase K 5µg/mL em PBS durante 15 minutos a 37°C e, após, lavadas em água destilada por 5 minutos e desidratadas a seguir com gradiente progressivo de concentração de etanol: um banho em etanol 50%, um de etanol 70%, um etanol absoluto e secagem ao ar.

A sonda foi pingada sobre os cortes e estes foram cobertos com uma lamínula. As lâminas, colocadas em câmara úmida e escura, foram deixadas a 37° por 16 a 20 horas (“over night”).

Na manhã seguinte, as lâminas foram lavadas com três banhos de 3 minutos cada em TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton X-100). Em seguida, as lâminas foram incubadas por 10 minutos com soro normal de coelho diluído a 1:5 em TBS, adicionado de 3% de soro albumina bovina (BSA). Um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com fosfatase alcalina [coelho F (ab^o) anti-FITC/fosfatase alcalina] foi diluído a 1:150 em tampão TBS com 3% de BSA e colocado sobre o corte histológico. Seguiu-se uma incubação dos cortes de 30 minutos com esse anticorpo à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas com dois banhos de 3 minutos cada em TBS e um banho de 5 minutos em tampão substrato de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM,

NaCl 150 mM, pH 9,0) e incubadas por toda a noite, por cerca de 16 a 20 horas, (“over night”) no escuro com a solução de substrato de fosfatase alcalina diluída a 1:50 no tampão substrato pH 9,0 e acrescentada de levamisol diluído 1:1000 para inibição de atividade de fosfatase alcalina endógena. Seguiu-se contracoloração com hematoxilina de Harris e montagem em meio aquoso.

A visualização da positividade foi feita pela verificação de núcleos marcados em preto que contrastam com a hematoxilina que deixa os núcleos corados em roxo.

Um controle positivo foi colocado para cada reação, representando caso de sarcoma de Kaposi previamente testado e sabidamente positivo para os dois métodos (Figuras 1 e 2). Controle negativo foi colocado, sendo constituído pelo mesmo caso do controle positivo, com omissão do anticorpo primário e da sonda específica na reação.

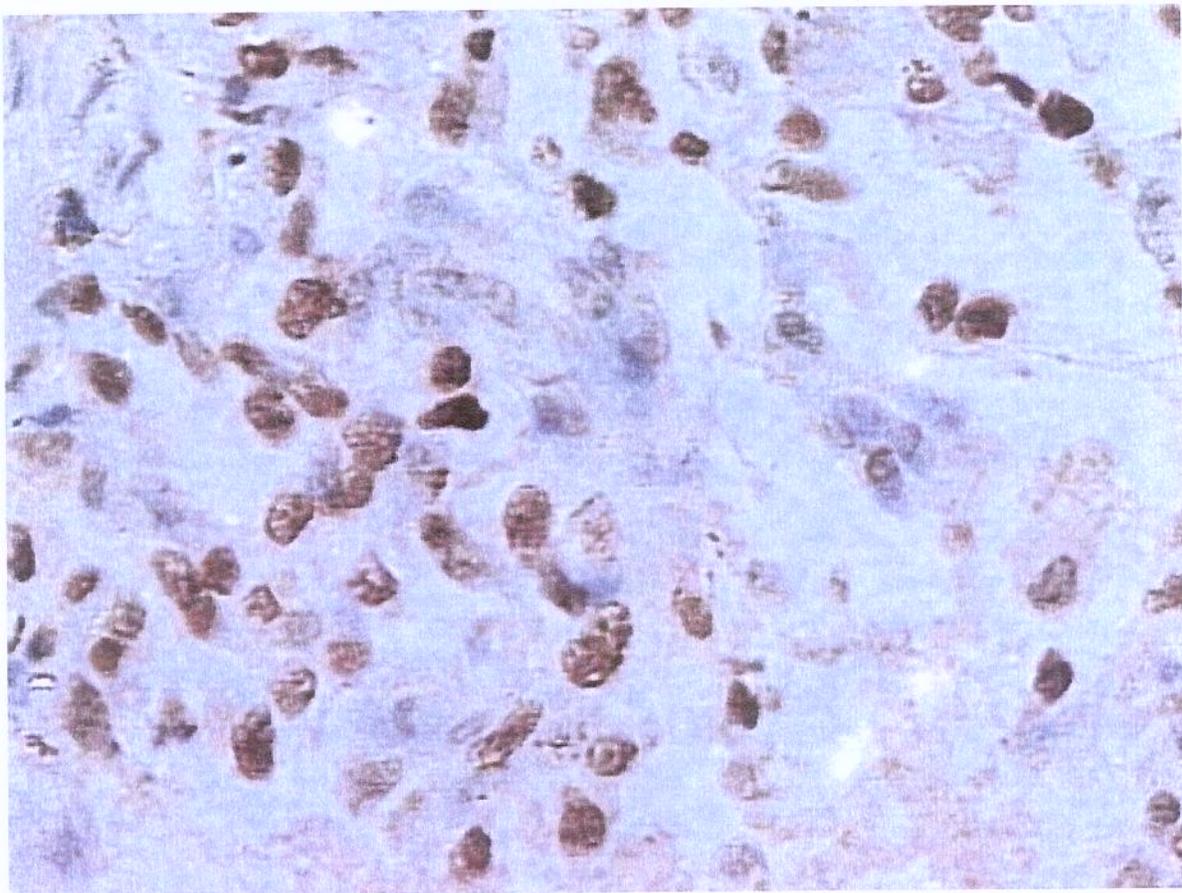


Figura 1- Controle positivo para a reação imunoistoquímica proveniente de paciente acometido pelo Sarcoma de Kaposi (1000x)

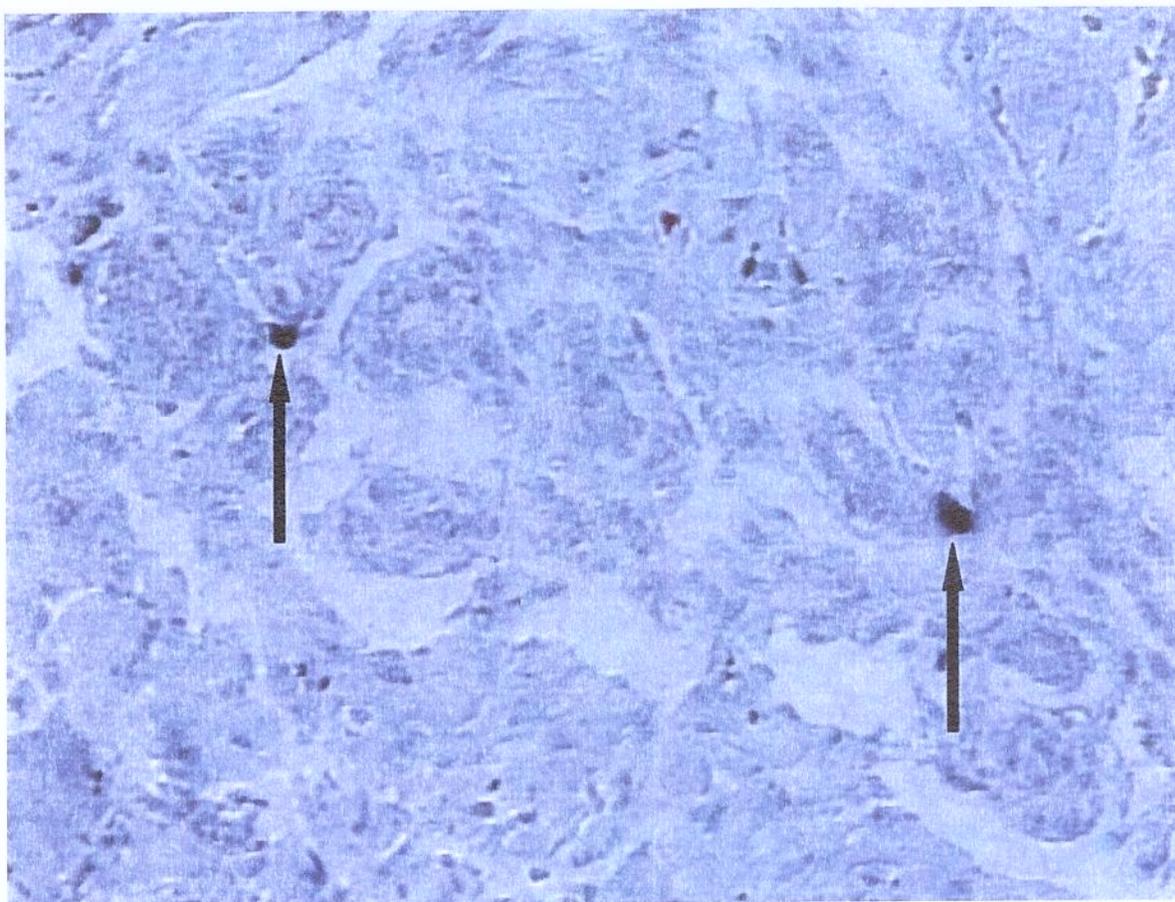


Figura 2- Controle positivo (seta em núcleo de célula positiva) para a reação de hibridização *in situ* proveniente de paciente acometido pelo Sarcoma de Kaposi (400x)

O número de células positivas foi contado a partir da seleção de campos na objetiva panorâmica, onde houve maior reatividade, e foram atribuídos os seguintes valores semiquantitativos:

0 = casos sem reatividade;

+ = casos com menos de 5 células positivas no corte histológico;

++ = casos com 6 a 15 células positivas no corte histológico;

+++ = casos com 16 ou mais células positivas no corte histológico.

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar as diferenças nas faixas etárias (menores de 2 anos, de 2 a 5 anos, de 6 a 10 anos e maiores de 10 anos) e entre os gêneros nos casos positivos. Foi considerado o limite de significância de 0,05 para o valor de p .

4- RESULTADOS

Foi estudado um total de 343 tecidos do anel de Waldeyer, sendo 181 blocos de amígdala e 162 blocos de adenóide, provenientes de um total de 293 pacientes submetidos a tonsilectomia e adenotonsilectomia. Dentre os 239 pacientes estudados, 174 eram do sexo masculino e 119 do feminino. A média de idade foi 6,05 anos, com desvio padrão de 3,80. A mediana de idade foi de 5 anos, sendo que a menor e a maior idade foram de zero e 20 anos, respectivamente.

Dos 293 casos estudados, 20 casos mostraram-se positivos (6,83%) para o HHV8. Nos 20 casos foi possível, por meio da HIS, verificar a presença de RNAm T1.1, enquanto em apenas 2 destes, a presença da proteína nuclear latente do HHV-8 foi demonstrada pela IQ. Esta, por sua vez, não foi exclusivamente positiva em nenhum caso.

Dentre os casos positivos, 12 pacientes eram do sexo masculino e 8 do feminino. A média de idade dos casos positivos foi de 3,5 anos, com desvio padrão de 2,96. A mediana da idade dos casos positivos foi de 3,5 anos, sendo a menor idade 1 e a maior 14 anos. (Tabelas 1 e 2). Não houve diferenças estatisticamente significantes em relação à faixa etária acometida ($p= 0,19$) e ao gênero dos pacientes ($p= 0,48$).

As amígdalas positivas somaram 19 casos (10,5% do total de 181 amígdalas estudadas), enquanto em apenas um caso a presença do vírus foi verificada em adenóide pela HIS (0,6% do total de 162 adenóides estudadas). Nenhum paciente apresentou simultaneamente amígdala e adenóide positivas.

No que se refere ao tipo celular positivo para o HHV-8 pode-se, pela morfologia, dizer que as células positivas foram pequenos e médios linfócitos na sua maioria. Apenas em três casos, o epitélio superficial mostrou núcleos positivos.

Todas as regiões das tonsilas apresentaram células positivas em maior ou menor grau. Em 2 casos, não se verificaram células positivas em centros germinativos. Em todos os outros havia núcleos de células com morfologia de pequenos linfócitos marcados no interior dos centros germinativos, sempre em número pequeno. A zona do manto foi uma região em que a concentração de células positivas foi um tanto variável: em 7 casos, a zona do manto tinha uma grande concentração de células positivas; outros 2 casos tinham células

marcadas de maneira mais esparsa e em quantidade muito menor nesta região histológica; por fim, 10 casos não apresentaram células positivas na zona do manto. Regiões interfoliculares apresentaram células positivas esparsas, sendo que em 2 casos elas eram mais raras e, nos outros 17 casos, sua quantidade era relativamente grande. Em todos os casos positivos era possível verificar a presença de células marcadas no linfoepitélio das criptas, em maior ou menor grau: em 1 caso, a marcação era mais rara, enquanto em 18 casos a marcação era mais acentuada.

É importante ressaltar que toda esta descrição foi feita com base na positividade para a reação de HIS. Dos casos positivos para a IQ (duas amídalas), um mostrou raros núcleos positivos em região interfolicular e outro mostrou células, aparentemente epiteliais, coradas no epitélio de revestimento superficial.

Dos 20 casos positivos, 1 deles deve ser considerado à parte. Trata-se do único caso em que a positividade se deu em adenóide. Neste, a marcação foi muito difusa e as células coradas estavam, sobretudo, no epitélio de revestimento (epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado) e se verificava, facilmente, que se tratava de células epiteliais em sua maioria. Contudo, células com morfologia de linfócitos pequenos também apresentaram positividade em regiões interfoliculares. Os dados de positividade em cada caso são mostrados na Tabela 3. Imagens demonstrando a reatividade nuclear para HHV8 nos em alguns dos casos positivos são mostradas nas Figuras 3 a 8.

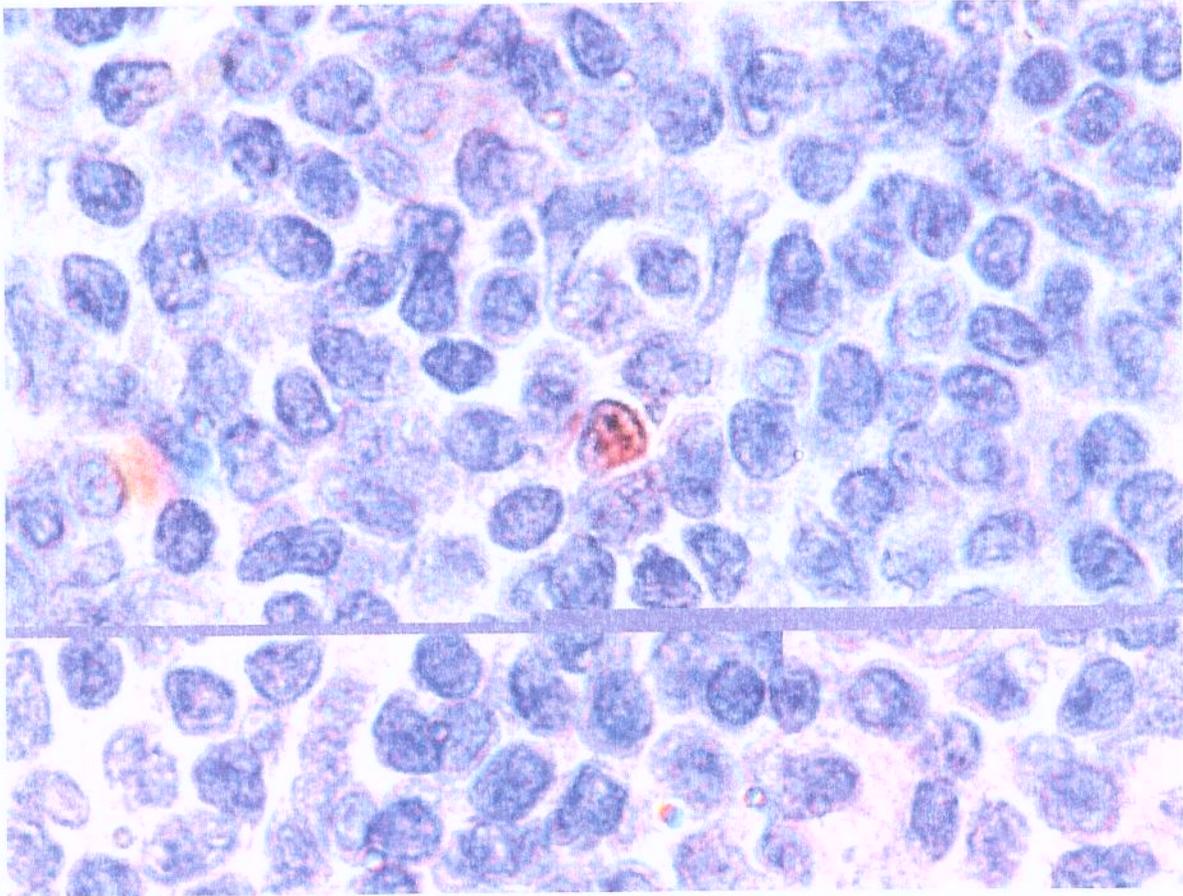


Figura 3- Caso positivo para HHV8. Notar que apenas um núcleo de linfócito apresenta coloração marrom. (imunohistoquímica, x1000).

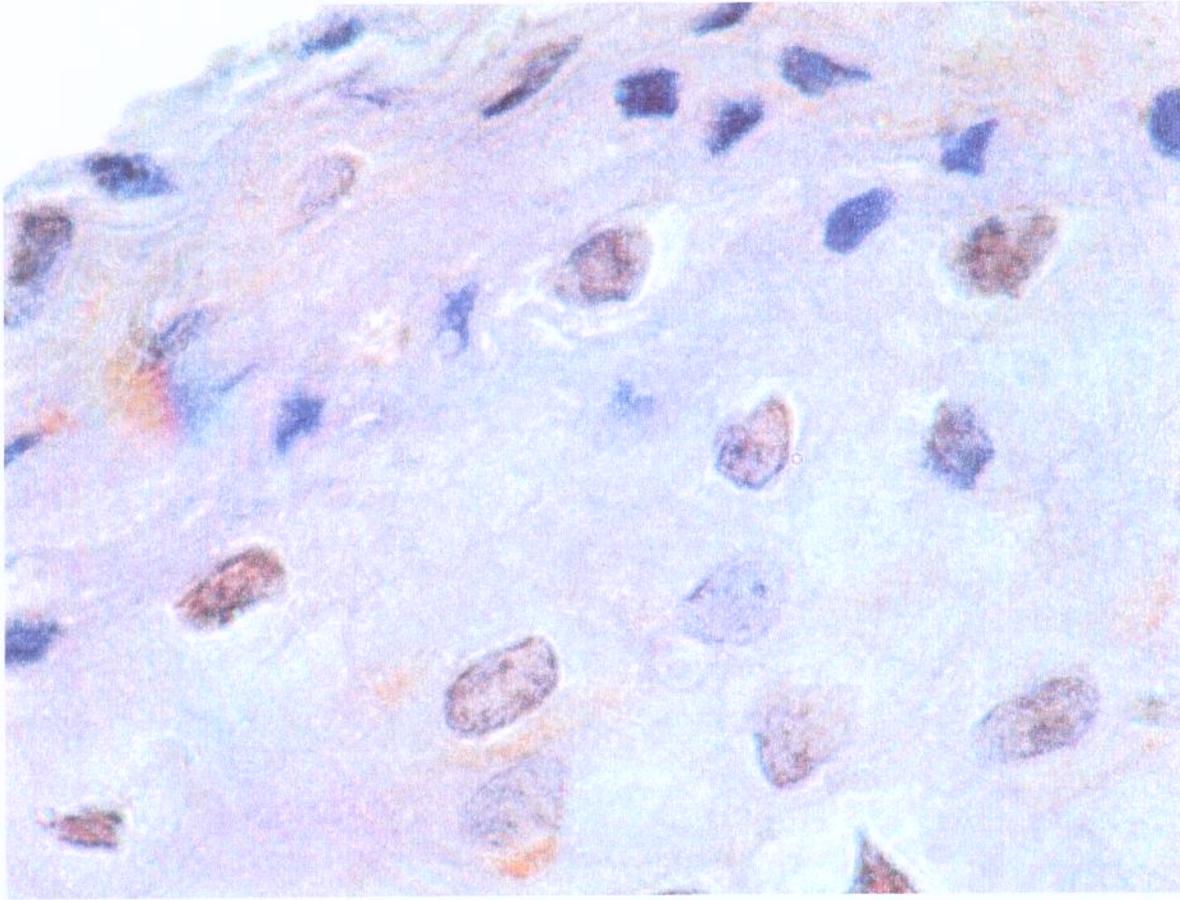


Figura 4- Caso positivo para HHV8. Notar que poucos núcleos de células epiteliais da superfície apresentam fraca coloração marrom. (imunoistoquímica, x 1000).

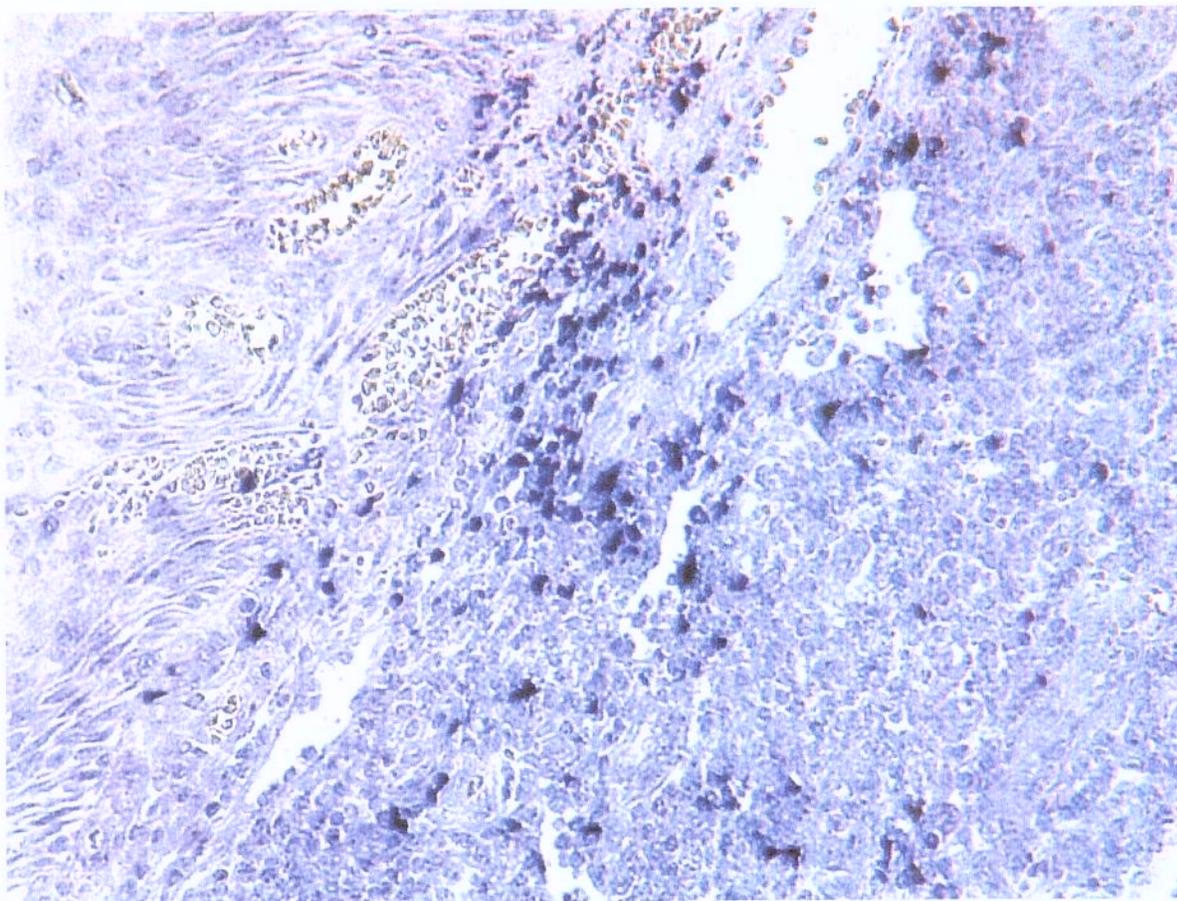


Figura 5- Caso positivo para HHV8. Notar que vários núcleos de linfócitos subepiteliais apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 400).

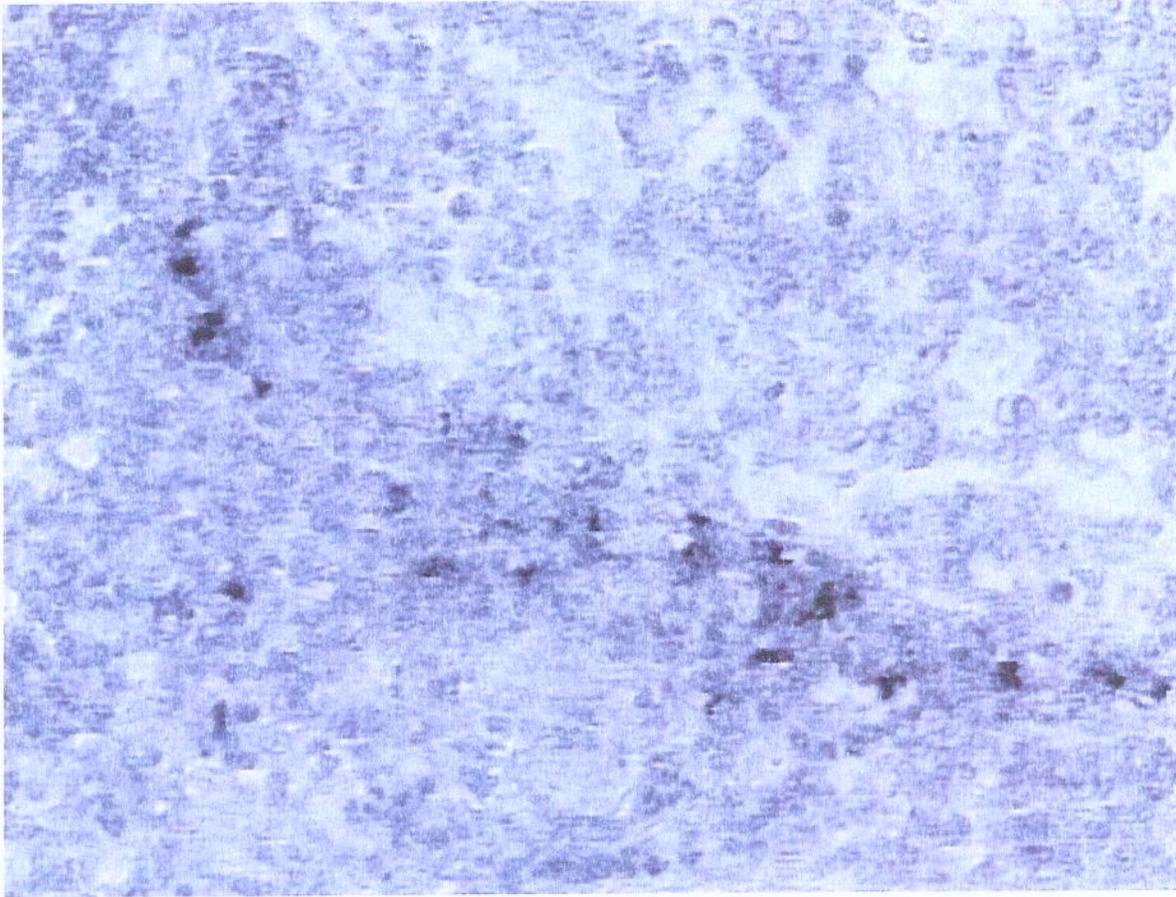


Figura 6- Caso positivo para HHV8. Notar que vários núcleos de linfócitos da zona do manto folicular apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 400).

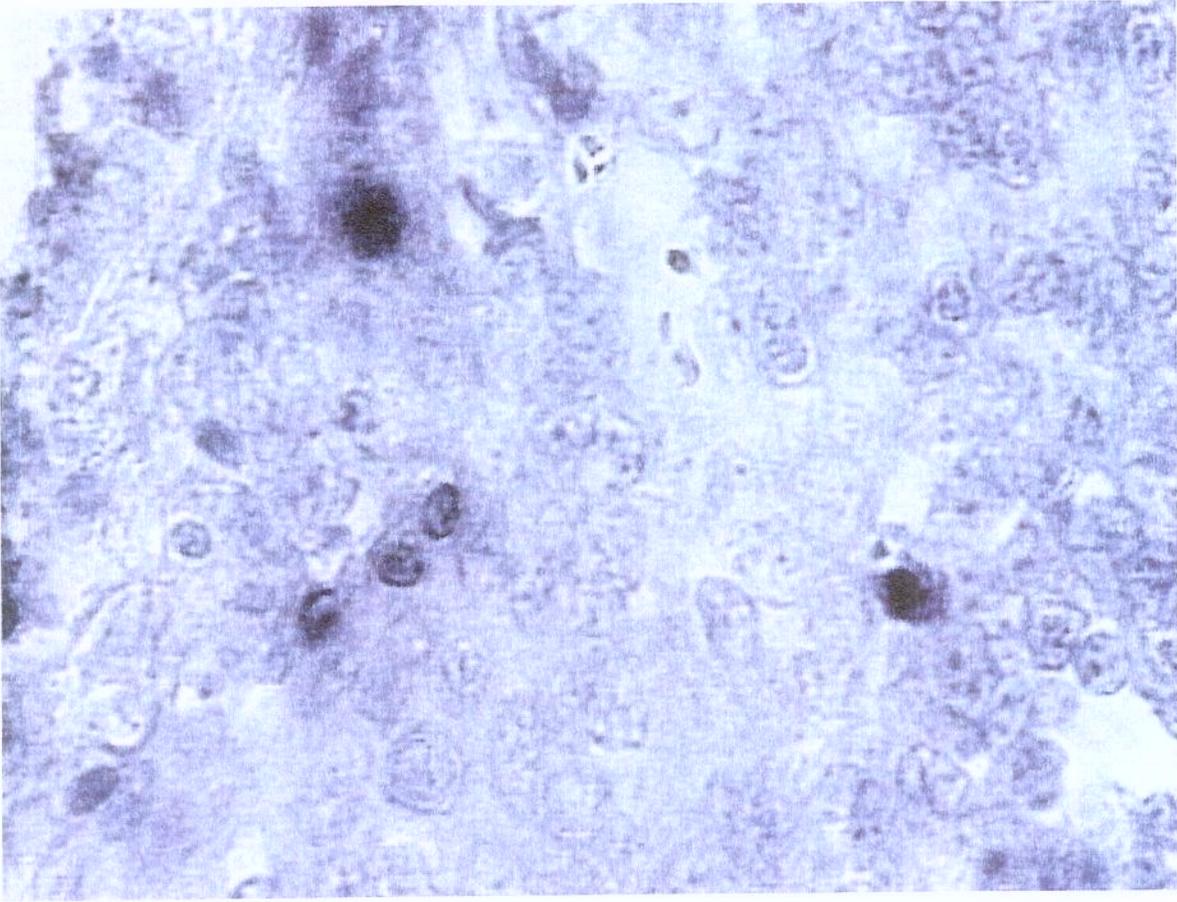


Figura 7- Caso positivo para HHV8. Notar que vários núcleos de linfócitos intraepiteliais apresentam coloração negra. (hibridização “in situ”, x 1000).

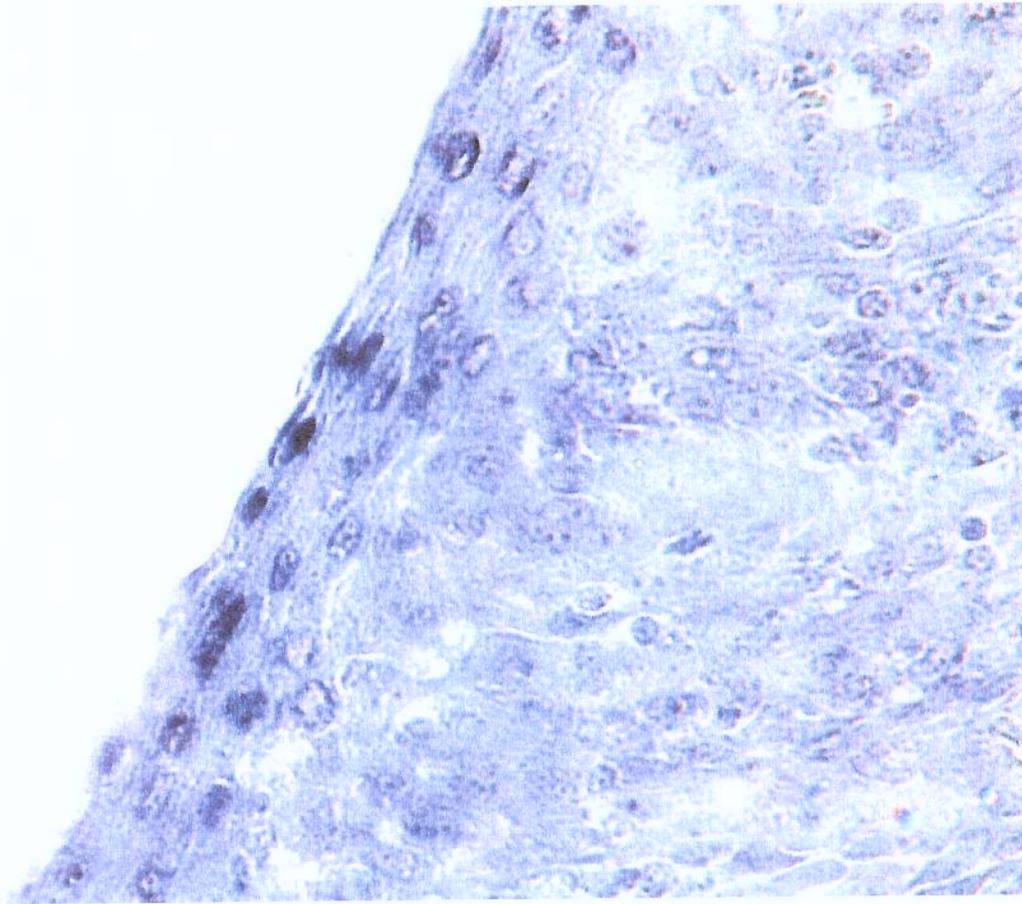


Figura 8- Caso positivo para HHV8. Notar que vários núcleos das células epiteliais superfície amigdaliana apresentam coloração negra. (hibridização “*in situ*”, x 1000).

Tabela 1- Número de casos positivos para HHV8 nas diferentes faixas etárias

Idade	Número total de pacientes	Número de casos positivos	Proporção dos positivos na faixa etária
< 2 anos	16 (5,46%)	2 (10%)	12,50%
2-5 anos	141 (48,12%)	13 (65%)	9,22%
6 a 10 anos	93 (31,74%)	4 (20%)	4,30%
> 10 anos	43 (14,68%)	1 (5%)	2,33%
Totais	293	20	6,83%

[p= 0,19; teste exato de Fisher]

Tabela 2- Casos positivos para HHV8 em relação ao gênero do paciente

Sexo	Número total de pacientes	Número de casos positivos	Proporção dos positivos no gênero
Masculino	174 (59,39%)	12 (60%)	6,89%
Feminino	119 (40,61%)	8 (40%)	6,72%
Totais	293	20	6,83%

[p= 0,48; teste exato de Fisher]

Tabela 3- Descrição dos casos positivos para HHV8 em relação ao grau e à topografia da positividade

Caso	Número do bloco	Intensidade da HIS + a +++	Centro germinativo	Zona do Manto	Região Interfolicular	Linfoepitélio criptico	Epitélio superficial	Intensidade da IQ + a +++
1*	6098-99	+++	++	+++	+++	+++	+++	0
2	6321-00	+++	+	+++	+++	+++	0	0
3	6598-00	+++	++	+++	+++	+++	0	0
4	8813-00	+++	++	+++	+++	+++	0	0
5	9037-00	+++	+	+++	+++	+++	0	0
6	352-01	+++	+	0	+++	+++	0	0
7	4889-01	+++	++	0	+++	+++	0	0
8	5179-01	+++	0	0	++	+++	+++	0
9	7314-01	+++	++	0	+++	++	0	0
10	7504-01	+++	+	+	+++	+++	+++	+
11	8301-01	+++	++	0	+++	+++	0	0
12	8834-01	+++	++	0	+++	++	0	0
13	10087-01	+++	++	0	+++	+++	0	0
14	13542-01	+++	+	0	+++	++	0	0
15	22422-01	+++	+	0	+++	+++	0	0
16	22421-02	+++	++	+++	+++	+++	0	0
17	526-03	++	+	+	++	+	0	+++
18	3139-03	+++	+	+++	+++	+++	0	0
19	7681-03	+++	+	+	+++	+++	0	0
20	32921-04	+++	0	0	++	+++	0	0

* caso positivo em adenóide

0 = casos sem reatividade

+ = casos com menos de 5 células positivas no corte histológico;

++ = casos com 6 a 15 células positivas no corte histológico;

+++ = casos com 16 ou mais células positivas no corte histológico.



5- DISCUSSÃO

É necessário destacar que o presente estudo não pretende apresentar a incidência ou a prevalência do HHV8 na população de crianças e adolescentes, não se tratando, neste sentido, de um estudo epidemiológico. O fato da amostra não ser aleatória, mas selecionada (crianças com hiperplasia de tonsila submetidas a tonsilectomia e adenotonsilectomia), não convém a um estudo epidemiológico que vise estabelecer incidência e prevalência. Os resultados, no entanto, demonstram a presença do HHV8 na amostra estudada e estabelecem as tonsilas como um reservatório do vírus, o que, como discutido a seguir, pode ter importância no conhecimento das formas de transmissão do vírus.

De modo geral, a epidemiologia do HHV8 apresenta diferenças entre regiões geográficas, as quais parecem estabelecer-se em um contexto relacionado a variações sócio-econômicas e culturais. Por um lado, em regiões economicamente mais desenvolvidas, a população afetada é adulta e a rota de infecção pelo vírus parece ser predominantemente sexual (GAO et al., 1996; KEDES et al., 1996; FUJII et al., 1999; GOUDSMIT et al., 2000; TEDESCHI et al., 2000). Por outro lado, em regiões economicamente menos desenvolvidas, uma rota alternativa de infecção deve ser considerada, porque existe nelas uma importante prevalência do vírus em crianças. Esta prevalência aumenta com o aumento da idade, segundo demonstram alguns trabalhos. Em um estudo realizado no estado do Pará, onde se utilizou um método de detecção pelo ELISA, desenvolvido comercialmente, uma prevalência de 16% em crianças, adolescentes e adultos jovens foi encontrada, sendo 10% em crianças com menos de 10 anos e 13,3% em crianças com idades entre 10 e 20 anos (FREITAS et al., 2002). Outro estudo demonstrou, por meio de imunofluorescência indireta, prevalência de 6% em crianças menores do que 16 anos no oeste da Sicília (PERNA et al., 2000). Em Uganda, a prevalência é maior em todas as faixas etárias, sendo que, em crianças com idade inferior a 5 anos, foi de 37%, enquanto na faixa etária de 5 a 9 anos foi de 58%. Neste estudo, foi utilizado o ELISA para detecção de anticorpos contra uma proteína viral (MAYAMA et al., 1998). Novamente na América do Sul, Plancolaine et al (2000) demonstraram através do método ELISA uma população endêmica na Guiana Francesa com 2% de prevalência em crianças com idade entre 2 e 4 anos, cerca de 5% na faixa de 5 a 9 anos, por volta de 12% entre 10 e 14 anos e 15% entre 15 e 19 anos.

A frequência do HHV8 no presente estudo foi de 6,83%, destacando que as idades variaram de 0 a 20 anos na amostra total e 1 a 14 anos nos casos positivos. Não houve diferença significativa entre os gêneros dos pacientes positivos, nem entre as faixas etárias propostas. Esta proporção de 6,83% não pode ser comparada com os trabalhos anteriores, uma vez que naqueles há estudo apenas em populações onde a prevalência do vírus é endêmica. Além disto, o método de detecção utilizado, o sorológico, difere deste estudo que utilizou imunistoquímica e hibridização *in situ* em tecidos fixados em formalina e parafinados.

O modo de transmissão do HHV8 considerado para a infecção em crianças tem sido discutido, sobretudo, quanto à possibilidade da transmissão se dar pela saliva. Estudos epidemiológicos (PLANCOLAINE et al., 2000), que relacionam a infecção em pessoas da mesma família, e de biologia molecular (KOELLE et al., 1997; PAUK et al., 2000; COREY et al., 2002), que demonstram a presença de seqüências de DNA viral na saliva e em células epiteliais da mucosa bucal, apóiam esta hipótese. Nosso trabalho ajuda a alicerçá-la na medida em que demonstra que as tonsilas constituem reservatório para o HHV8. Assim sendo, as partículas virais seriam misturadas à saliva, propiciando a contaminação de terceiros. O vírus poderia disseminar-se através do contato boca-objeto-boca das mães e crianças ou das crianças entre si. Da cavidade oral o vírus poderia albergar-se nas criptas tonsilares e proliferar, disseminando-se e infectando latentemente as células do anel de Waldeyer. O fato de a expressão do HHV8 ser aparentemente mais freqüente nas faixas etárias mais baixas (Tabela 1), embora sem diferença estatística significativa, pode significar que a contaminação se dá precocemente, principalmente na faixa em que as crianças apresentam com mais intensidade a fase oral e que ele pode tornar-se menos freqüente no tecido amigdalino após um período de permanência nele.

Como harmonizar a observação de nosso estudo, onde se observa uma freqüência decrescente de positividade nas faixas etárias, com os dados sorológicos que indicam uma positividade crescente no decorrer da infância? Unicamente pelo fato de o presente estudo não poder ser considerado de prevalência, conforme foi explicitado no primeiro parágrafo desta discussão. Desta forma, seria plausível pensar que, embora a freqüência de infecção pelo HHV8 cresça com o passar da idade, a sua permanência nas

amídalas torna-se mais fugaz. Isto pode ocorrer devido a uma crescente maturação do sistema linfóide, que se tornaria mais eficaz em “clarear” as partículas virais, tornando-as indetectáveis pelos métodos histopatológicos. Enquanto isto, sorologicamente, a prova do contato prévio com o vírus continuaria a existir.

Neste particular, o comportamento do HHV8 em relação ao anel de Waldeyer assemelha-se mais ao do EBV (vírus de Epstein-Barr) e contrasta com o HSV1 e 2, todos membros da família dos herpesvírus. Em estudos anteriores de nosso grupo, demonstramos a presença do EBV em cerca de 30% das adenóides e amídalas estudadas, principalmente em células linfóides, porém raramente em células epiteliais. (ENDO et al., 2001; ENDO et al., 2002). Em contraste, nenhum dos casos por nós estudados neste material expressou o HSV1 e 2 por HIS (VASSALLO et al., 2005).

Segundo nossos resultados, embora a adenóide possa se constituir eventualmente em reservatório do vírus (apenas 1 em 162 foi positiva para o HHV8, ou 0,6%), há nítida predileção do acometimento nas amídalas palatinas (19 das 181 amídalas estudadas, ou 10,5%). Este dado pode, por um lado, refletir o contato mais fácil da saliva recém-contaminada pelo vírus com as amídalas (localizadas mais caudalmente e no caminho da saliva a ser deglutida) que com as adenóides, localizadas mais cranialmente, na rinofaringe, protegidas do contato com a saliva pela úvula, durante a deglutição. Por outro lado, poderia refletir uma quantidade maior de células com o receptor para o vírus nas amídalas como provavelmente acontece em relação ao EBV que tem preferência pela adenóide porque esta contém mais linfócitos B com receptor CD21 para o vírus de Epstein-Barr (Endo et al, 2002).

Houve, em nosso estudo, uma grande diferença entre os resultados obtidos com os dois métodos. Enquanto a imunoistoquímica demonstrou apenas dois casos positivos com raríssimos núcleos corados, pela HIS foram encontrados 20 casos positivos com vários núcleos marcados em várias áreas histológicas em cada um destes casos. Embora este trabalho seja original em detectar o HHV8 em tonsilas, ele não demonstra, neste aspecto, os mesmos achados da literatura referentes à detecção do vírus pela IQ comparada à HIS (PATEL et al., 2004; ROBIN et al., 2004). Aqui, no entanto, deve-se observar que, de maneira geral, a IQ apresenta bons resultados na detecção do HHV8 quando realizada em

casos de sarcoma de Kaposi, onde a quantidade de proteínas virais está, provavelmente, muito aumentada quando comparada ao tipo de infecção que se apresenta neste trabalho. Neste tipo de infecção, a busca pelo RNAm T1, através da HIS, se mostrou mais sensível do que a busca pela proteína nuclear latente feita através da IQ.

A maior sensibilidade da IQ no sarcoma de Kaposi certamente se explica pela maior quantidade da proteína LNA-1 nas células tumorais. De fato, esta proteína está intimamente relacionada com a carcinogênese do tumor, na medida em que parece ter efeito nas proteínas supressoras de tumor p53 e do retinoblastoma causando-lhes diminuição de suas funções, e ação de indução do ciclo celular (DOURMISHEV et al, 2003). O RNAm T1.1 se acumula no núcleo das células infectadas pelo vírus e a sequência ORF que o codifica não foi identificada, assim como a proteína da qual faz parte o polipeptídeo traduzido a partir deste RNAm (ZHONG et al, 1996).

Para os casos apresentados aqui, o padrão de sensibilidade para os métodos de detecção do vírus no sarcoma de Kaposi não serve como referência, devido às diferenças no tipo de tecido, no tipo de infecção e, em consequência destes, no tipo de expressão gênica viral.

No que se refere aos tipos celulares que expressaram positividade para o HHV8 neste trabalho, embora o reconhecimento das células tenha sido em caráter puramente morfológico, foi evidente a marcação de células com morfologia de linfócitos na maioria dos casos, além de células epiteliais em três casos. Está bem estabelecido na literatura que não só linfócitos B e células epiteliais, mas também, células endoteliais e macrófagos podem albergar o vírus (AKULA et al, 2002, VALMARY et al, 2005). Akula e colaboradores demonstraram que o mecanismo de entrada do HHV-8 na célula hospedeira se dá graças a uma glicoproteína do envelope viral denominada gpK8.1 que interage com um receptor de membrana da célula hospedeira, a integrina alfa-3-beta-1, e, então, promove uma cascata de sinais que polimeriza os microfilamentos do citoesqueleto que, por sua vez, promovem a endocitose do vírus (AKULA et al., 2002). Para uma melhor caracterização das células infectadas seria necessária sua imunofenotipagem, lançando mão de um protocolo de dupla marcação com a utilização da HIS para a detecção do vírus e uma IQ para a imunofenotipagem das células infectadas.

6- CONCLUSÃO

A detecção do HHV8 no anel de Waldeyer em 6,83% de nossos casos reforça a hipótese da contaminação pelo vírus através da saliva já na faixa etária pediátrica.

Nos casos positivos, o HHV8 concentra-se predominantemente em células linfóides e menos intensamente em células epiteliais dos órgãos estudados.

Houve nítida predileção da positividade para o HHV8 em tonsilas, o que provavelmente se deve à proteção exercida pela úvula e pela topografia das adenóides à exposição ao material infectado pelo vírus ao adentrar a cavidade oral.

Embora houvesse percentual decrescente de positividade nas faixas etárias estudadas, esta diferença não foi significativa estatisticamente; este achado pode refletir um clareamento mais eficiente das partículas virais neste tecidos linfóides com o amadurecimento do sistema imune.

Neste tipo de pesquisa, o método de hibridização molecular "in situ" mostrou-se muito superior a imunoistoquímica, provavelmente devido à pequena quantidade de material protéico nas células infectadas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akula SM, Wang F-Z, Pramod N-P, Zeng L, Chandran B. Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV/HHV-8) interactions with host cell receptors. In: Program And Abstracts Of The 6th International Conference On Malignancies In Aids And Other Immunodeficiencies, Bethesda, Maryland. Abstract S16, 2002.

Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181: 1562-8.

Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nature Medicine* 1995; 1: 1274-8.

Boulanger E. L'herpèsvirus humain 8 (HHV8): I. Caractérisation et épidémiologie. *Annales de Biologie Clinique* 1998; 56: 643-50.

Brousset P, Cesarman E, Meggetto F, Lamant L, Delsol G. Colocalization of the viral interleukin-6 with latent nuclear antigen-1 of human herpesvirus-8 in endothelial spindle cells of Kaposi's sarcoma and lymphoid cells of multicentric Castleman's disease. *Human Pathology* 2001; 32: 95-100.

Caterino-De-Araújo, A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 1998; 177: 1136-7.

Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M.S.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D.M. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266: 1865-9.

Corey, L.; Brodie, S.; Huang, M.L.; Koelle, D.M.; Wald, A. HHV-8 infection: a model for reactivation and transmission. *Reviews in Medical Virology* 2002; 12: 47-63.

Dourmishev AD, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003; 67: 175-212.

Dupin N, Diss TL, Kellam P, Tulliez M, Du MQ, Sicard D et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 2000; 95:1406-12.

- Endo LH, Ferreira D, Montenegro MC, Pinto GA, Altemani A, Bortoleto Júnior AE et al. Detection of Epstein-Barr virus in tonsillar tissue of children and the relationship with recurrent tonsillitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2001; 58: 9-15.
- Endo LH, Vassallo J, Sakano E, Brousset P. Detection of Epstein-Barr virus and lymphoid subsets in adenoids from children under the age of 2 years. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2002; 66: 223-6.
- Freitas RB, Freitas MR, Linhares AC. Prevalence of Human Herpesvirus 8 antibodies in the population of Belém, Pará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 2002; 44: 309-13.
- Fujji T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *Journal of Medical Virology* 1999; 57: 159-62.
- Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nature Medicine* 1996; 2: 925-8.
- Goudsmit J, Renwick N, Dukers NHTM, Coutinho RA, Heisterkamp S, Bakker M, et al. Human herpesvirus 8 infection in the Amsterdam cohort studies (1984-1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 4838-43.
- Kedes DH, Operskalski E, Bush M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Medicine* 1996; 2: 918-24.
- Koelle D, Huang M, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of KS-associated herpesvirus DNA in saliva of HIV-infected men: clinical and immunological correlates. *Journal of Infectious Diseases* 1997; 176: 94-102.
- Levi JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, 8). *The Lancet* 1997; 349: 558-63.
- Levine PH, Ablash DV. An etiologic perspective of the new herpesviruses: HHV-7 and HHV-8. *Infections in Medicine* 1999; 16: 24-34.

Levine A. Transmission of HHV8. Disponível em <http://www.medscape.com/viewarticle/418930>, acessado em 17.07.2002.

Li JJ, Huang YQ, Cockerell CJ, Friedman-Kien AE. Localization of human herpes-like virus type 8 in vascular endothelial cells and perivascular spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma lesions by *in situ* hybridization. *American Journal of Pathology* 1996; 148: 1741-8.

Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith PO, Silvel B, et al. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *International Journal of Cancer* 1998; 77: 817-20.

McGeoch DJ, Davidson A. The descent of herpesvirus 8. *Cancer Biology* 1999; 9: 201-209.

Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Said J, et al. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood* 1996; 88: 645-56.

Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sanford G, Wan X, Ciuffo D, et al. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Medicine* 1997; 3: 287-92.

Patel RM, Goldblum JR, Hsi ED. Immunohistochemical detection of human herpesvirus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. *Modern Pathology* 2004; 17: 456-60.

Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacher T, et al. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 1369-77.

Perna AM, Bonura F, Vitale F, Viviano E, Di Benedetto MA, Ajello F, et al. Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. *International Journal of Epidemiology* 2000; 29: 175-9.

Plancolaine S, Abel L, Van Beveren M, Tréguoët D-A, Joubert M, Tortevoyné P, et al. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *The Lancet* 2000; 356: 1062-5.

- Robin YM, Guillou L, Michels JJ, Coindre JM. Human herpesvirus 8 immunostaining – A sensitive and specific method for diagnosing Kaposi sarcoma in paraffin-embedded sections. *American Journal of Clinical Pathology* 2004; 121: 330-4.
- Sarid R, Sato T, Bohenzky J, Russo JJ, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nature Medicine* 1997; 3: 293-8.
- Sarid R, Wiezorek JS, Moore PS, Chang Y. Characterization and cell cycle regulation of the major Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) latent genes and their promoter. *Journal of Virology* 1999; 73: 1438-46.
- Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 1995; 86: 1276-80.
- Shulz TF. KSHV (HHV8) Infection. *Journal of Infection* 2000; 41: 125-9.
- Tedeschi R, Caggiari L, Silins I, Kallings I, Andersson-Elström A, Paoli P, et al. Seropositivity to human herpesvirus 8 in relation to sexual history and risk of sexually transmitted infections. *International Journal of Cancer* 2000; 87: 232-5.
- Valmary S, Richard P, Brousset P. Frequent detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus in germinal centre macrophages from AIDS-related multicentric Castleman's disease. *AIDS* 2005;19:1229-31.
- Vassallo J, Camargo LZ, Chagas CA, et al. Search for herpesvirus 1 and 2 by in situ hybridization in tonsils and adenoids. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2005; 69: 345-9.
- Vassallo J, Rebouças I, Brousseut P. Detection of HHV8 in reactive lymphoid tissue of patients from São Paulo state, Brazil. *Journal of Clinical Pathology* 2002; 55: 78-9.
- Zhong W, Wang H, Herndier B, Ganem D. Restricted expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 6641-6646.