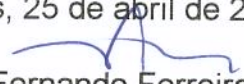


Andréa Mendonça Gusmão Cunha

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Andréa Mendonça Gusmão Cunha**.

Campinas, 25 de abril de 2001.

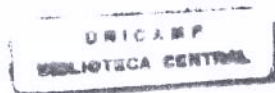

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Orientador

DETECÇÃO DO HERPESVÍRUS HUMANO 8 (HHV-8) EM PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI, MIELOMA MÚLTIPLO E EM DOADORES DE SANGUE

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa



Campinas



Andréa Mendonça Gusmão Cunha

**DETECÇÃO DO HERPESVÍRUS HUMANO 8 (HHV-8) EM
PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSÍ, MIELOMA
MÚLTIPLO E EM DOADORES DE SANGUE**

**Dissertação de Mestrado Apresentada ao Curso de pós-
graduação em Ciências Médicas da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas na área de Ciências Biomédicas.**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Campinas

2001

20115630

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C914d Cunha, Andréa Mendonça Gusmão
 Detecção do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em pacientes com
 sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo e em doadores de sangue /
 Andréa Mendonça Gusmão Cunha. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

 Orientador : Fernando Ferreira Costa
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

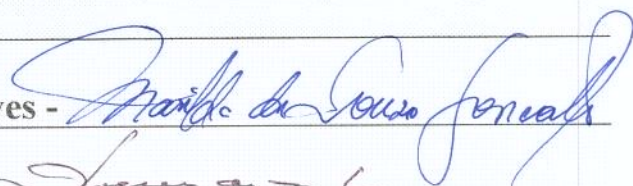
 1. MM. 2. Vírus. I. Fernando Ferreira Costa. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

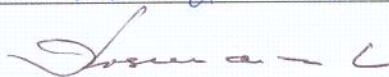
Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

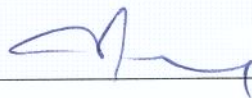
1. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves -



2. Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro -



3. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25.04.2001

*Agradeço a Deus pela realização deste trabalho e por tudo de
maravilhoso que tem continuamente nos proporcionado.*

*A minha amável mãe Helieide, pelo amor, apoio e dedicação
incondicional em todos os momentos da minha vida
Ao meu querido pai Francisco pelo amor e por me ensinar a
seguir sempre em frente
À minha preciosa avó Naidy pelo amor e pêlos ensinamentos
eternos, força e vitalidade
Aos meus irmão Saulo e David pelo carinho, incentivos e amizade.*

*Ao meu marido, por todo o seu amor, carinho, compreensão,
ternura, respeito e companheirismo
À pedrinha verde que mora no meu coração, minha filha Jade pelo
amor incondicional, ternura e afeto.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e a Profa. Dra. Sandra
Cecília Botelho Costa pela orientação, confiança, estímulo
contínuo e sobretudo pelos ensinamentos e amizade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho, especialmente:

À Dra. Marilda Gonçalves, pelos ensinamentos ao longo da minha formação acadêmica, confiança, incentivos e pela amizade.

Ao Dr. Rogério de Jesus Pedro, por sua importante colaboração e sugestões.

À Dra. Neiva e a Midore do laboratório de Imunologia do Hemocentro da Unicamp pela participação na execução dos ensaios de imunofluorescência.

À Dra. Carmen Silva Passos Lima pela participação e acompanhamento dos pacientes com mieloma múltiplo incluídos no presente estudo.

À Dra. Mônica Mello pela imensa colaboração e ensinamentos relacionados ao seqüenciamento automatizado das amostras positivas.

As amigas e companheiras diárias de trabalho Paula, Dulcineia, Jaqueline, Gláucia e Rosana pelos ensinamentos, apoio e incentivos e principalmente pela amizade.

Aos colegas de pesquisa Manoela e Edson pela troca de conhecimentos e amizade.

As amigas Sandra Bonon, Silvia e Teresa pela disposição em ajudar e amizade.

As funcionárias Angélica e Bia, responsáveis pela limpeza das vidrarias e do laboratório, pela dedicação e competência.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, pela atenção.

À todos os funcionárias da pós-graduação da FCM, especialmente à Carmen e a Marcinha pelas informações, atenção, paciência e competência.

À Sandrinha do serviço de Apoio Didático do Hemocentro, pelo interesse em ajudar, bom humor e talento.

Aos funcionários do Apoio Didático da FCM, especialmente ao Péricles, ao Paulo e a LÍlian pela competência, atenção e dedicação.

As funcionárias da Diretoria do Hemocentro Patrícia e Raquel pela atenção, paciência e pelo interesse em ajudar.

Sumário

Abreviações.....	xii
Lista de Ilustrações	xv
Resumo.....	xviii
1. Introdução	
1.1. Histórico.....	01
1.2. O Herpesvírus Humano Tipo 8	
1.2.1. Taxonomia	03
1.2.2. Estrutura	03
1.2.3. O Genoma do HHV-8	05
1.2.4. Replicação Viral e Propriedades Biológicas	07
1.3. O Sarcoma de Kaposi	
1.3.1. Descoberta e Classificação	08
1.3.2. O sarcoma de Kaposi e o HHV-8	09
1.3.3. Apresentação Clínica	10
1.4. O Mieloma Múltiplo	
1.4.1. Aspectos Gerais	10
1.4.2. O Mieloma Múltiplo e o HHV-8	11
1.5. Epidemiologia e Transmissão do HHV-8	12
1.6. Subtipos do HHV-8	13
1.7. Detecção do HHV-8	
1.7.1. Cultura Viral	14
1.7.2. Métodos Sorológicos	14
1.7.2.a. Imunoensaio Enzimático	15

1.7.2.b. Imunofluorescência	15
1.7.3. Métodos Moleculares	16
1.7.3.a. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
2. Objetivos	20
3. Casuística	21
3.1. Pacientes com Sarcoma de Kaposi	21
3.2. Pacientes com Mieloma Múltiplo	21
3.3. Doadores de Sangue	22
4. Métodos	
4.1. Extração do DNA	
4.1.1. Preparação das Amostras.....	23
4.1.2. Lise das Hemácias.....	23
4.1.3. Lise dos Leucócitos.....	23
4.1.4. Precipitação do DNA.....	24
4.2. Extração do DNA de Biópsia de Tecido à Fresco	
4.2.1. Digestão das Amostras	24
4.2.2. Extração com Fenol- Clorofórmio	24
4.2.3. Precipitação do DNA	25
4.3. Extração do DNA de Aspirado de Medula Óssea	25
4.4. Amplificação Gênica (PCR) para detecção do HHV-8	
4.4.1. Condições da Reação	25
4.4.2. Detecção	27
4.5. Amplificação Gênica (PCR) para β -Globina Humana.....	27
4.6. Normas Aplicadas para se Evitar Contaminação.....	29

4.7. Sequenciamento Gênico do HHV-8 (Método de Sanger).....	29
4.7.1. Purificação.....	30
4.7.2. Reação de Terminação.....	30
4.7.3. Reação de Sequenciamento	30
4.7.4. Eletroforese em Gel Desnaturante	31
4.8. Sequenciamento Automatizado	31
4.8.1 Purificação.....	32
4.8.2 Quantificação do Produto purificado.....	32
4.8.3 Reação de Sequenciamento.....	32
4.8.4 Análise das Amostras.....	32
4.9. Caracterização dos Subtipos do HHV-8	33
4.10. Teste sorológico de Imunofluorescência Indireta	34
4.11. Teste Estatístico	35
5. Resultados	
5.1. Padronização do PCR-duplo para Amplificação do DNA do HHV-8.....	36
5.2. Controle Interno da Reação de Amplificação	40
5.3. Detecção de Anticorpos anti-HHV-8	42
5.4. Comparação entre PCR-duplo e a Imunofluorescência Indireta	45
5.5. Genotipagem do HHV-8	49
5.5.1. Caracterização dos subtipos do HHV-8	50
5.5.2. Comparação entre as seqüências de DNAs sequenciadas	53
5.5.3. Sequências de DNA dos Pacientes com SK	54
5.6. Seqüência de DNA e Genotipagem do Controle Positivo	57
5.7. Variações Nucleotídicas	58

5.8. Comparação entre o Seqüenciamento Descrito por Sanger e o Automatizado	59
5.9. Prevalência do HHV-8 no Grupo de Pacientes com SK	62
5.10. Prevalência do HHV-8 no Grupo de Pacientes com MM	64
6. Discussão.....	68
7. Conclusões	74
8. Summary	75
9. Referências Bibliográficas	77
10. Apêndice	94

Lista de Ilustrações

Figura 01. Estrutura do Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8).....	04
Figura 02. Representação Gráfica do Genoma do HHV-8.....	06
Figura 03. Representação da Amplificação do DNA através da “Nested-PCR”.....	94
Figura 04. Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (Pacientes com SK).....	38
Figura 05. Quadro disseminado de sarcoma de Kaposi.....	95
Figura 06. Detalhe das lesões de sarcoma de Kaposi.....	95
Figura 07 Sarcoma de Kaposi afetando o globo ocular.....	96
Figura 08 Lesões sarcomatosas localizadas em membros inferiores.....	96
Figura 09. Amplificação Gênica através do PCR-duplo (Pacientes com SK).....	38
Figura 10 Amplificação Gênica através do PCR-duplo (Pacientes com MM).....	39
Figura 11. Amplificação Gênica do Gene da β -globina Humana.....	41
Figura 12. Imunofluorescência Indireta.....	44
Figura 13. Eletroferograma do Sequenciamento do Controle Positivo	57
Figura 14. Eletroferograma do Sequenciamento Automatizado (“Primer” direto).....	60
Figura 15. Eletroferograma do Sequenciamento Automatizado (“Primer” reverso).....	60
Figura 16. Sequenciamento Direto seguindo o Método de Sanger	61
Figura 17 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 01).....	97
Figura 18 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 01).....	97
Figura 19 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 02).....	98
Figura 20 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 02).....	98
Figura 21 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 03).....	99
Figura 22 Eletroferograma do Sequenciamento (“Primer KS-01” - Paciente 03).....	99

Figura 23 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 04).....	100
Figura 24 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 04).....	100
Figura 25 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 05).....	101
Figura 26 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 05).....	101
Figura 27 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 06).....	102
Figura 28 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 06).....	102
Figura 29 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 07).....	103
Figura 30 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 07).....	103
Figura 31 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 08).....	104
Figura 32 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 08).....	104
Figura 33 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 09).....	105
Figura 34 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 09).....	105
Figura 35 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 10).....	106
Figura 36 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 10).....	106
Figura 37 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 11).....	107
Figura 38 Eletroferograma do Sequenciamento ("Primer KS-01" - Paciente 11).....	107
Gráfico 01: Detecção do HHV-8.....	46
Gráfico 02: Percentual de Detecção das Bases 1055, 1086 e 1139	58
Gráfico 03: Frequência do HHV-8 com relação a opção sexual.....	62
Quadro 01: Propriedades Funcionais de Alguns Genes do HHV-8.....	05
Quadro 02: dos Subtipos do HHV-8.....	33
Quadro 03: Critérios Para Classificação dos Subtipos do HHV-8.....	50
Quadro 04: Sequência de DNA da região ORF-26 Descrita por Chang.....	53
Tabela 01. Sequência dos "Primers" Utilizados para a Detecção do HHV-8.....	26

Tabela 02. Sequência dos “Primers” para Amplificação do Gene da β -globina Humana.....	28
Tabela 03. Resultados do PCR-duplo	37
Tabela 04. Resultados dos Testes Sorológico e Molecular.....	43
Tabela 05. Relação entre “Nested-PCR” da Biópsia e a do Sangue Periférico.....	47
Tabela 06. Relação entre “Nested-PCR” da Biópsia e o Teste de Imunofluorescência.....	48
Tabela 07. Análise Seqüencial do Fragmento de DNA amplificado	51
Tabela 08. Sequenciamento do Controle Positivo.....	57
Tabela 09. Informações Gerais e Dados Clínicos dos Pacientes com Sarcoma de Kaposi.....	63
Tabela 10. Dados Clínicos dos Pacientes com Mieloma Múltiplo.....	65



Resumo

Resumo

O Herpesvírus Humano 8 (HHV-8), ou Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), foi identificado em 1994 por CHANG *et al* em biópsia de pele de pacientes com sarcoma de Kaposi (SK) associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA / AIDS). O HHV-8 pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Gamaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*, o único do gênero a infectar humanos. Possui ultraestrutura semelhante à de outros herpesvírus, apresentando regiões de DNA homólogas a dois *gama-herpesvírus*: Epstein-Barr Vírus (EBV) e o Herpes Vírus Saimiri (HVS), ambos com potencial oncogênico.

Vários estudos revelaram a associação entre o HHV-8 e todas as formas de SK: clássica, endêmica, relacionadas à AIDS e associado a transplantes, além de outras lesões proliferativas da linhagem linfóide, relacionadas ou não à AIDS, como o linfoma primário de serosas (PEL) ou linfoma de cavidades do corpo (BCBL), o linfoma primário do sistema nervoso central (LPSNC), a doença de Castleman multicêntrica (DCM) e o mieloma múltiplo (MM).

Amostras de DNA extraídos de biópsia de pele e de sangue periférico de 11 pacientes com SK, amostras de DNA extraído de aspirado de medula óssea de 48 pacientes com MM e amostras de DNA extraído de sangue periférico de 145 doadores de sangue foram analisadas. Todos os pacientes e doadores de sangue foram provenientes do Hospital de Clínicas e do Hemocentro da Unicamp. Aplicando-se a técnica de "nested-PCR" para amplificação da região ORF-26 do genoma do HHV-8, foram detectadas seqüências de DNA viral em todas as amostras (11/11) de DNA de biópsia de pele, em cinco amostras (5/11) de DNA de sangue periférico dos pacientes com SK e em uma das amostras (1/48) de DNA extraído de aspirado de medula óssea dos pacientes com mieloma múltiplo. Não foram detectadas seqüências de DNA do HHV-8 em 145 amostras de DNA provenientes dos doadores de sangue.

DI ALBERT *et al* (1997b), através do sequenciamento genômico da região da cápsula menor (ORF-26) do HHV-8, descreveram cinco subtipos virais denominados: A, B, C, D e E. A classificação dos subtipos do HHV-8 em regiões geográficas variadas revelou diferentes prevalências. Em nosso estudo, foram genotipadas onze amostras de DNA extraído de biópsia de pele de pacientes com sarcoma de Kaposi e verificamos a presença do subtipo B do HHV-8 em 73% e do subtipo C em 27% dos casos. Além das variações nucleotídicas nas posições que determinam a alteração dos aminoácidos e a caracterização dos subtipos, foram observadas variações nucleotídicas em outras posições (base 1055, 1086 e 1139).

Dentre os métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-HHV-8, os mais aplicados são os testes de imunoensaio enzimático (ELISA) e de imunofluorescência indireta (IFI). Foi utilizado o ensaio de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 e verificamos positividade do teste em todas as amostras de soro dos pacientes com SK.

O nosso trabalho permitiu a padronização de técnicas moleculares para a detecção e genotipagem do HHV-8, sendo determinado os subtipos virais circulantes em uma população de pacientes do HC-Unicamp. A aplicação do ensaio de imunofluorescência indireta permitiu a pesquisa e detecção de anticorpos anti-HHV8. Também foi possível, verificar dados relacionados a prevalência do HHV-8 em pacientes com SK, pacientes com MM e em um grupo de doadores de sangue.



Introdução

1. Introdução

1.1. Histórico

O Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV-8), ou Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), foi identificado em 1994 por CHANG *et al* em biópsia de pele de pacientes com sarcoma de Kaposi (SK) associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA / AIDS), utilizando a metodologia de RDA (“Representational Difference Analysis”), uma técnica de ampliação e comparação entre dois DNAs, usando o conceito da PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Eles mapearam uma região genômica de 1.853 pares de bases (pb), designada KS330, que apresentou homologia com a região que codifica proteínas do capsídeo viral dos *gama-herpesvírus* (CHANG *et al.*, 1994). O HHV-8 apresenta regiões de DNA homólogas a dois *gama-herpesvírus*: Epstein-Barr Vírus (EBV), que está relacionado a formação de linfoma de Burkitt e tumores nasofaríngeos em humanos e o Herpes Vírus Saimiri (HVS), que é o responsável pelo desenvolvimento de um tipo de linfoma fulminante em macacos. Esses dados indicaram que o HHV-8 também poderia ser oncogênico (O’LEARY, KENNEDY, O’D MCGEE, 1997., LEVINE & ABLASHI 1999).

Em 1996, MESRI *et al* foram os primeiros pesquisadores a conseguir isolar e transmitir o KSHV para células B CD19+, partindo de células de linfoma de cavidades do corpo (BCBL). A essa linhagem celular deu-se o nome de BC-1, a qual apresentava fragmentos genômicos do KSHV e do EBV. Verificaram que após o tratamento das células infectadas com radiação ultravioleta e DNase outras células não eram mais infectadas, porém a detecção de seqüências de DNA do vírus continuou sendo possível. Então propuseram que o material genético desse agente se encontrava envolto em um capsídeo (MESRI *et al*, 1996). Também foi sugerido que o KSHV passasse a ser denominado HHV-8, por ser detectado em linfoma de cavidades do corpo (BCBL), doença de Castleman multicêntrica (DCM), além do SK (MESRI *et al*, 1996., SAID *et al*, 1996).

Estudos posteriores associaram o HHV-8 a todas as formas de SK: clássica, endêmica, relacionadas a AIDS (CATTANI *et al*, 1999) e associados a transplantes (HUDNALL *et al*, 1998), além de outras lesões proliferativas da linhagem linfóide, relacionadas ou não à AIDS, como o linfoma primário de serosas (PEL) ou linfoma de cavidades do corpo (BCBL) (SAID *et al*, 1996, BERTI *et al*, 1997., SPIRA *et al*, 2000), doença de Castleman multicêntrica (DCM) (DUPIN *et al*, 2000) e o mieloma múltiplo (MM) (RETTIG *et al*, 1997., SAID *et al*, 1997, CHAUHAN *et al*, 1999).

O linfoma primário de serosas, conhecido como PEL (“Primary Effusion Lymphoma”), caracteriza-se pelo acúmulo de líquido linfomatoso em serosas como pleura, pericárdio e peritônio, estando associado ao HHV-8 (SPIRA *et al*, 2000). Através do uso de cultura de células provenientes do PEL de indivíduos HIV negativos, foi possível caracterizar duas linhagens celulares infectadas pelo HHV-8, denominadas BC-3 e KS-1. A linhagem KS-1 foi inoculada em camundongo imunodeficiente e produziu ascite, reforçando a hipótese de que o HHV-8 seja também o agente etiológico do PEL (SAID *et al*, 1996). Após o advento do cultivo de células infectadas pelo HHV-8, deu-se início à padronização de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-HHV-8 (DAVIS *et al*, 1996).

Atualmente, o HHV-8 tem sido indicado como o provável agente etiológico de algumas doenças linfoproliferativas, às vezes com resultados conflitantes como é o caso da associação entre o HHV-8 e o mieloma múltiplo (RETTIG. *et al*, 1997., SAID *et al*, 1997., RASK *et al*, 2000).

1.2. O Herpesvírus Humano Tipo 8

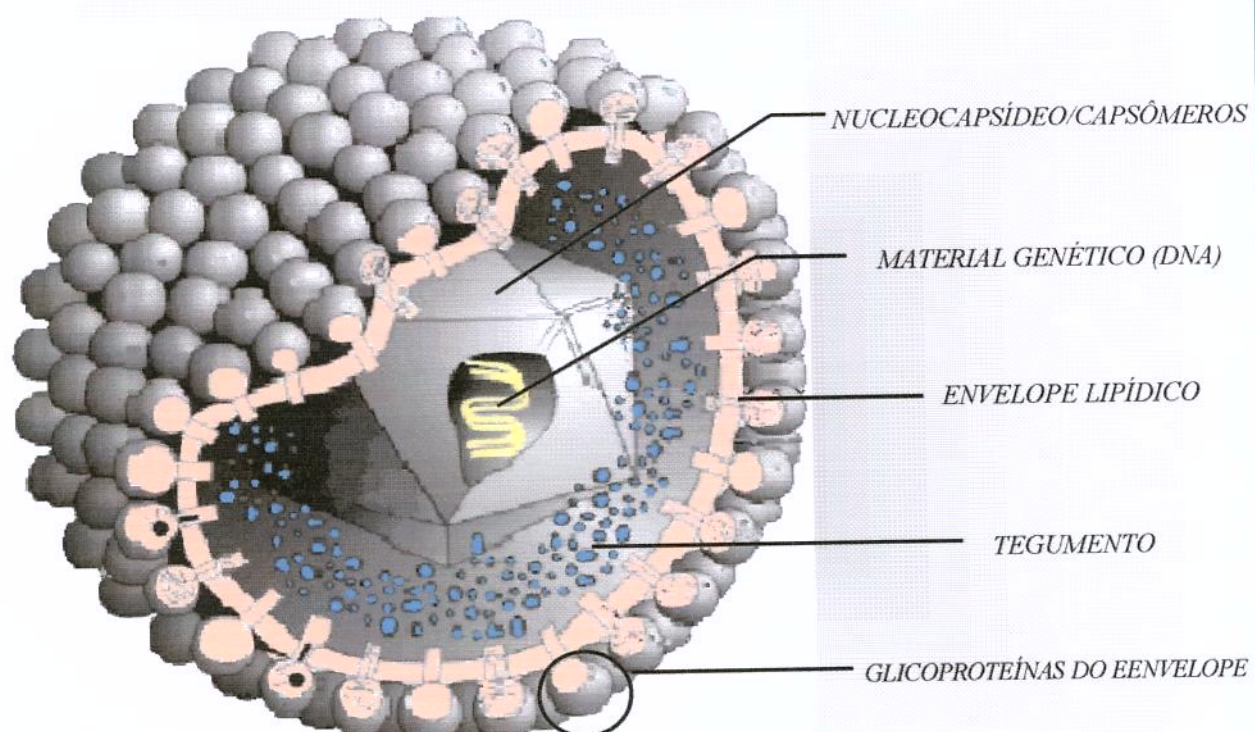
1.2.1 Taxonomia viral

O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) classificou os herpesvírus em três subfamílias: *alfa-herpesvirinae*, *beta-herpesvirinae* e *Gama-herpesvirinae*, de acordo com suas propriedades biológicas. Atualmente, há cerca de 100 herpesvírus descritos e com ampla disseminação na natureza; destes, oito infectam humanos, entre eles o Herpes Vírus Humano Tipo 8 (LEVINI & ABLASHI, 1999).

O HHV-8 pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Gamaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*, o único do gênero a infectar humanos (O'LEARY *et al*, 1997). Possui ultraestrutura semelhante a de outros herpesvírus, apresentando regiões de DNA homólogas à dois *Gama-herpesvírus*: Epstein-Barr Vírus (EBV) e o Herpes Vírus Saimiri (HVS), ambos com potencial oncogênico (LEVINI & ABLASHI, 1999).

1.2.2 Estrutura viral

Os herpesvírus apresentam uma estrutura complexa. São partículas de grandes dimensões (120- 300nm), constituídas por quatro componentes estruturais: o núcleo central, onde está localizado o material genético; o nucleocapsídeo icosaédrico composto por capsômeros que envolvem o núcleo; o envelope que contém numerosas espículas glicoproteicas em sua superfície e o tegumento, localizado entre o nucleocapsídeo e o envelope (SILVA, 2000), (Figura - 01).



Copyright 1994 - 97 Marko Reschke

Figura 01 – Estrutura do HHV-8 (www.biografix.de/hcmv/html/metaframe/htm)

1.2.3 O genoma do HHV-8

O genoma do HHV-8 tem cerca de 165 a 170 kb, sendo composto por diversos genes que codificam proteínas virais específicas, envolvidas no controle do crescimento, diferenciação celular e inibição da apoptose. Fazem parte das proteínas virais que inibem a apoptose a vIL-6, v-flip, v-bcl-2, v-cyclin, v-MIP-I e o v-MIP-II. Os genes v-MIP-I e o v-MIP-II promovem a angiogênese e a inibição da resposta inflamatória normal, podendo prejudicar a resposta antitumoral (SCHULZ & MOORE, 1999), (Quadro 01). Alguns genes do HHV-8 possuem homologia com genes celulares humanos (SARID *et al*, 1998., SCHULZ & MOORE, 1999). A interleucina 6 viral (v-IL-6) é homóloga à interleucina 6 humana (IL-6), que geralmente se encontra em níveis aumentados em determinadas doenças malignas proliferativas como o sarcoma de Kaposi, o linfoma de cavidades do corpo e o mieloma múltiplo (CANNEL & MITTNACHT, 1999., SJAK-SHIE, VESCIO, BERENSON, 1999b., JELINEK, 1999). Acredita-se que a vIL-6, sintetizada pelo HHV-8, possa estimular o surgimento e a progressão de determinadas neoplasias proliferativas associadas a esse agente (O'LEORY *et al*, 1998., CANNEL & MITTNACHT, 1999., GADO *et al*, 2000., AVELLEIRA & LUPI, 2000), (Quando 01).

Quadro 01 - Propriedades funcionais de alguns genes do HHV-8 (SCHULZ & MOORE, 1999).

Genes do HHV-8	ORFs do HHV-8	Propriedades funcionais (Presumidas)
vMIP-I	(ORF k6)	induz angiogênese
v-MIP-II	(ORF K4)	propriedade angiogênica
v-MIP-III	(ORF K4.1)	induz Th2
v-cyclin	(ORF 72)	promove o crescimento celular
v-IL-6	(ORF K2)	estimula a proliferação de células plasmáticas
v-Bcl-2	(ORF 16)	inibe a morte celular programada (apoptose)
v-FLIP	(ORF K13)	homólogo do inibidor de apoptose celular
GPCR	(ORF 74)	atividade angiogênica, promove crescimento celular
VP23	(ORF 26)	codifica proteína do capsídeo viral

Em conjunto, alguns genes contidos no genoma do HHV-8 podem ser os responsáveis por induzir a angiogênese, o crescimento celular, inibir a apoptose celular e a resposta inflamatória normal, tornando a resposta imune antitumoral deficiente, contribuindo para o surgimento e para a progressão das doenças neoplásicas associadas (SCHULZ & MOORE, 1999., ENSOLI, STURZL, MONINI, 2000).

O genoma do HHV-8 é constituído por um conjunto de genes e ORFs (seqüência de leitura aberta), apresentando regiões gênicas comuns aos herpesvírus e regiões específicas que caracterizam o HHV-8 (AVELLEIRA & LUPI, 2000). Uma das primeiras seqüências de DNA do HHV-8 correspondeu à região KS330, onde está incluído o ORF26, gene que codifica a proteína da cápsula do HHV-8 (CHANG *et al*, 1994). (Figura 02)

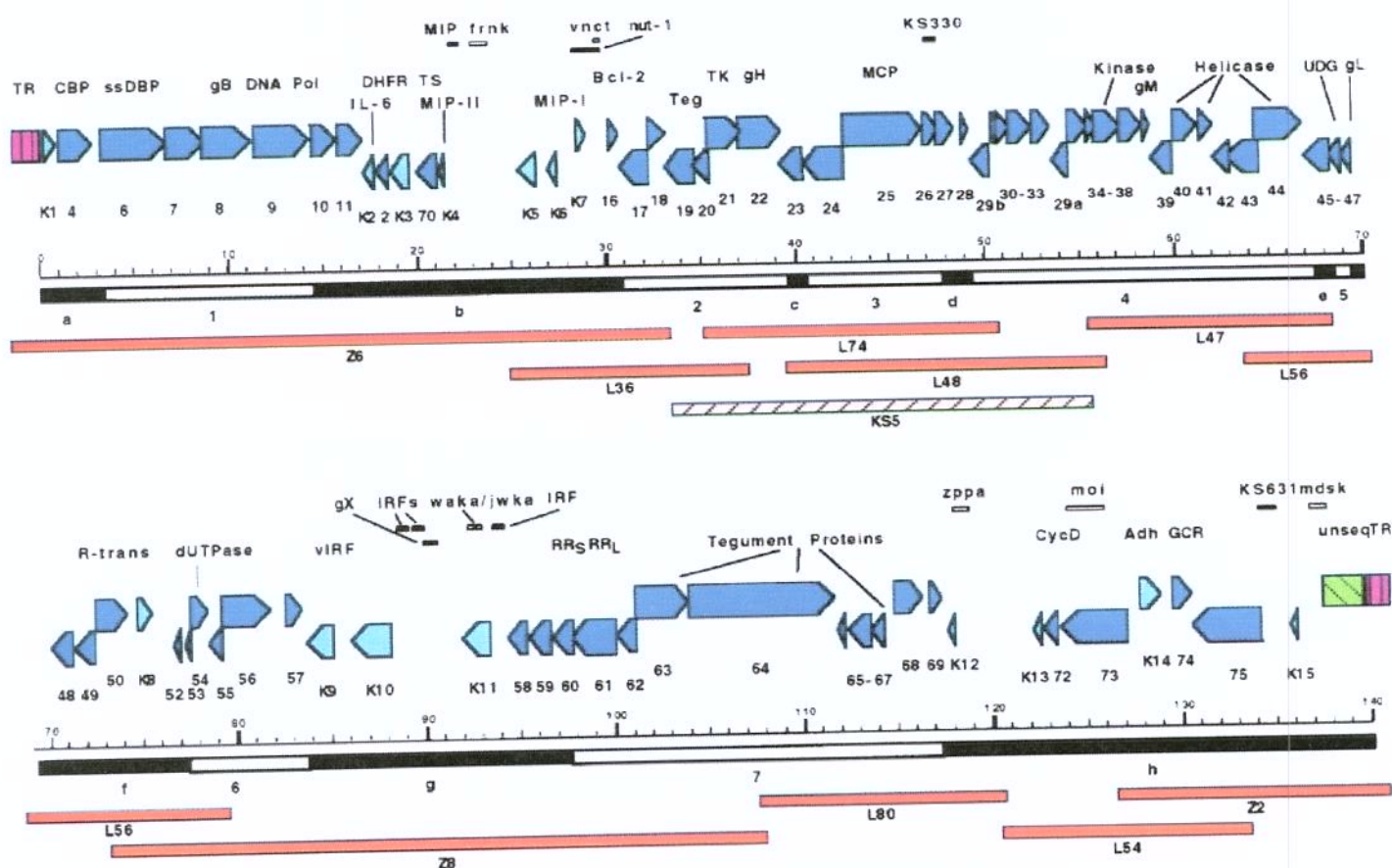


Figura 02 – Representação gráfica do genoma do HHV-8 (Adaptado de RUSSO *et al*, 1996).

1.2.4 Replicação viral e propriedades biológicas

A replicação dos herpesvírus compreende várias etapas. Para iniciar a infecção, é preciso que o vírus seja adsorvido aos receptores da superfície celular, ocorrendo a fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. Em seguida, o capsídeo desprovido de envelope é transportado para os poros nucleares, onde o DNA é liberado para o interior do núcleo celular, região na qual ocorrem a transcrição, a replicação do DNA viral e a produção de novos capsídeos (SILVA, 2000).

O DNA viral é transcrito pela RNA polimerase presente na célula do hospedeiro com participação de fatores virais em todos os estágios da infecção. A síntese de produtos virais está bem regulamentada e, dentre os vários produtos genéticos, enzimas e proteínas ligadas ao DNA viral, incluem-se: timidina cinases, DNA polimerases, ribonuclease redutases e exonucleases (SILVA, 2000).

Os herpesvírus têm a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, apresentando tropismo por determinados tecidos. As doenças associadas aos herpesvírus linfotrópicos são, na maioria dos casos, linfoproliferativas. Apenas os vírus linfotrópicos são, comprovadamente oncogênicos, podendo na maioria das vezes induzir a processos malignos linfoproliferativos (SILVA, 2000). Como exemplo, pode-se citar o HHV-8 que atualmente vem sendo associado a várias doenças proliferativas da linhagem linfóide como: o SK, a DCM e o PEL (WHITBY *et al*, 1995., SAID *et al*, 1996, TERUYA-FELDSTEIN *et al*, 1998., ASOU *et al*, 1998, CESARMAN & KNOWLES, 1999).

Todos os herpesvírus induzem a infecção latente em seus hospedeiros naturais por toda a vida. O mecanismo de latência ainda não foi totalmente elucidado porém, sabe-se que para alguns herpesvírus, a latência ocorre em tipos específicos de células que permitem a entrada do vírus, mas bloqueiam sua replicação. As análises de determinados genes dos herpesvírus que permanecem

ativos sugerem que esses genes atuam como reguladores, podendo manter o vírus em estado de latência ou ativo para a recorrência (SILVA, 2000).

1.3 O Sarcoma de Kaposi

1.3.1 Descoberta e Classificação

O Sarcoma de Kaposi (SK) foi inicialmente descrito por Morris Kaposi no ano de 1872. É uma neoplasia vascular que se caracteriza pela proliferação de células endoteliais, fibroblastos, células plasmáticas e células linfóides do processo inflamatório, ocorrendo predominantemente na pele, nos órgãos viscerais e nos linfonodos (LIN, 1998). A descrição feita por Morris Kaposi, no século XIX, caracterizou a forma clássica do SK (SKC), uma forma rara, mais freqüente na América do Norte e na Europa, acometendo homens idosos descendentes de judeus do Leste Europeu e povos da região do mar Mediterrâneo. Posteriormente, foram descritas mais três formas. A forma endêmica, ou Africana do SK (SKA), encontrada no Continente Africano, mais agressiva, acometendo adultos jovens e crianças negras. Em meados da década de 70, com o advento dos transplantes de órgãos, o uso de drogas imunossupressoras e o tratamento quimioterápico das neoplasias, verificou-se um aumento significativo dos casos de SK, diretamente associado à imunodeficiência grave. Essa forma foi denominada de forma iatrogênica do SK (SKI). Na década de 80, foi documentada uma forma mais agressiva, em geral, associada à pneumonia por *Pneumocystis carinii*, mais freqüente entre adultos jovens, do sexo masculino, homossexuais ou bissexuais dos Estados Unidos, sendo denominada de forma epidêmica do SK (SKE), que ocorre em indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (LIN, 1998., FONSECA, BOLLELA, NETO, 1999).

O SK foi uma das primeiras doenças oportunistas reconhecidas na infecção pelo HIV e atualmente ainda é a neoplasia maligna mais freqüentemente relacionada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA / AIDS) (KENNEDY *et al*, 1998).

1.3.2 Sarcoma de Kaposi e o HHV-8

Após mais de cem anos da descrição do sarcoma de Kaposi o seu agente etiológico foi identificado. Inicialmente denominado Kaposi Sarcoma Herpesvírus (KSHV), atualmente conhecido como Herpesvírus Humano 8 (HHV-8). Esse agente foi detectado em mais de 90% de todas as formas de SK (clássica, endêmica [Africana], iatrogênica e associada à AIDS) (CATHOMAS *et al*, 1996., CATTANI, *et al*, 1999). A detecção universal do HHV-8 sugere um papel central do vírus no desenvolvimento de todos os tipos de SK. Além da infecção pelo HHV-8 e imunossupressão, outros fatores podem estar envolvidos na determinação da progressão para o sarcoma de Kaposi (O'LEARY *et al*, 1997). Estudo realizado na Gâmbia/África demonstrou que entre os pacientes infectados com o HHV-8 o desenvolvimento do SK é mais freqüente entre os portadores do HIV-1 que entre os HIV-2 (ARIYOSHIKTAL *et al*, 1998)

A detecção de seqüências do HHV-8 no sangue periférico tem indicado uma probabilidade elevada para o desenvolvimento do SK (WHITBY *et al*, 1995). Foi demonstrado a presença do HHV-8 em pacientes HIV positivos sem SK que posteriormente desenvolveram a doença (MEMAR *et al*, 1997). A associação entre SK, AIDS e seqüências do HHV-8 foi confirmada na Europa, nos Estados Unidos (GAIDANO *et al*, 1996., DI ALBERT *et al*, 1997a) e no Brasil (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 1999., CUNHA *et al*, 2000). A pesquisa de anticorpos anti-HHV-8, utilizando variadas técnicas como ELISA e Imunofluorescência, tem demonstrado que pacientes com sarcoma de Kaposi sintetizam anticorpos específicos contra o HHV-8 (SPIRA *et al*, 2000).

1.3.1 Apresentação Clínica

Existem quatro apresentações do SK, mas as lesões cutâneas são clinicamente semelhantes em todas as formas. As lesões cutâneas são rosadas, vermelhas, púrpuras ou castanhas. Em indivíduos da raça negra, as lesões são bem escuras, quase negras. Podem ser maculares, platiformes, papulares ou nodulares. Em geral, localizam-se em membros inferiores, superiores, tronco, pescoço e podem variar em número, observando-se desde lesões isoladas até centenas de lesões disseminadas. O SK pode ocasionar lesões viscerais, orais e ganglionares e que, em alguns casos, precedem as lesões cutâneas. A presença de edema nos membros inferiores, na região periorbital e na genitália externa é freqüente quando ocorrem lesões nessas áreas (LIN *et al*, 1998, FONSECA *et al*, 1999).

1.4 O Mieloma Múltiplo

1.4.1 Aspectos gerais

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia plasmocítica, que causa doença disseminada. Caracteriza-se pela proliferação de plasmócitos anormais na medula óssea e, na maioria dos casos, pela secreção de uma imunoglobulina monoclonal ou de uma cadeia leve. A imunoglobulina monoclonal é detectada no soro e a cadeia leve monoclonal, excretada na urina, sendo denominada de proteína de Bence-Jones. A doença se caracteriza por uma proliferação clonal lenta, em geral, decorrem anos desde o evento oncongênico até a aparição dos primeiros sintomas, sendo rara antes dos 40 anos. Os aspectos clínicos mais típicos do MM são a anemia, as dores ósseas, a hipercalcemia e a insuficiência renal. Em geral, o mieloma, quando diagnosticado, é um tumor terminal (BARLOGIE, 1995., JELINEK, 1999).

1.4.2 O Mieloma Múltiplo e o HHV-8

Sequências de DNA do HHV-8 foram encontradas em amostras de DNA extraído de biópsias de medula óssea, células dendríticas da medula óssea e células mononucleares do sangue periférico enriquecidas com CD 68 ou CD 83 de pacientes com mieloma múltiplo (MM) (RETTIG *et al*, 1997., SAID *et al*, 1997., SJAK-SHIE *et al*, 1999a). Consequentemente, variadas amostras biológicas de pacientes com MM foram analisadas por PCR para detecção de seqüências de DNA do HHV-8 e ensaios sorológicos foram desenvolvidos destinados à pesquisa de anticorpos anti-HHV-8. (TISDALE *et al*, 1998., BECK *et al*, 2000). Entretanto, vários estudos (CULL *et al*, 1998., TISDALE *et al*, 1998., YI *et al*, 1998., BELLOS *et al*, 1998., MITTERER *et al*, 1998., SCHONRICH *et al*, 1998., TARTE *et al*, 1998., GREEF *et al*, 1999., RASK *et al*, 2000., RASMUSSEN *et al*, 2000) obtiveram resultados opostos ao encontrado por RETTIG *et al* (1997) e SAID *et al* (1997) que detectaram seqüências de DNA do HHV-8 em 90 a 100% das amostras de DNA extraído de biópsias de medula óssea de pacientes com MM. A detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em amostras biológicas de pacientes com MM, publicados por alguns pesquisadores e a não detecção ou a detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em proporção insignificante dos casos de MM, publicados por outros pesquisadores têm revelado que a associação entre o HHV-8 e o MM é uma questão polêmica a ser esclarecida.

A Interleucina 6 humana (IL-6), em geral, encontra-se em níveis elevados em pacientes com MM e age estimulando a proliferação do clone maligno. Os autores que apoiam a associação entre o HHV-8 e o MM acreditam que a Interleucina 6 viral (IL-6 v), sintetizada pelo HHV-8 e homóloga a IL-6 humana, poderia estimular o desenvolvimento e a progressão do clone maligno em pacientes com MM (O'LEORY *et al*, 1998., GADO *et al*, 2000).

1.5 Epidemiologia e Transmissão do HHV-8

Pesquisas realizadas em diversas partes do mundo vêm fornecendo dados epidemiológicos que demonstram uma ampla distribuição do HHV-8 na população geral. Na África, a prevalência do HHV-8 na população geral chega a ser maior que 50% em Uganda e Nigéria (LENNETTE, BLACKBOURN, LEVY, 1996). Nos EUA, Reino Unido e na Europa Central, Norte e Oeste, a prevalência do HHV-8 varia entre menos que 3 a 10% com algumas diferenças regionais, sendo mais freqüente nos países do mediterrâneo como Itália e Grécia (4 - 35%) (SCHULZ & MOORE, 1999). A freqüência do HHV-8 em crianças das regiões endêmicas da África tem variado entre 39 e 48%. Na Zâmbia, o SK constitui cerca de 20 a 25% de todos os casos de neoplasias malignas pediátricas (ATHALE *et al*, 1995). Nos EUA a freqüência do HHV-8 em crianças varia entre 2 e 8%, percentual bem menor que o encontrado na África (LENNETTE *et al*, 1996).

No Brasil, CATERINO *et al.*, (1999) encontraram uma soroprevalência de 7,4% (6/81) em doadores de sangue e de 16% (13/81) em um grupo de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV+). Entre os pacientes HIV+ foi demonstrado que 30,4% eram homens homossexuais ou bissexuais, 23,1% homens heterossexuais, 7,8% mulheres heterossexuais e 0,8% usuários de drogas injetáveis. Observou-se uma variação percentual dependente dos fatores de risco estudados, com maior freqüência do HHV-8 em homens homossexuais ou bissexuais (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 1999). Esses resultados concordaram com pesquisas realizadas nos EUA e na Europa onde foi demonstrada uma soroprevalência para o HHV-8 mais elevada entre homossexuais ou bissexuais masculinos e menos comum entre mulheres, usuários de drogas injetáveis e hemofílicos HIV positivo (LENNETTE *et al*, 1996).

Dados epidemiológicos sugerem que a transmissão do HHV-8 ocorre principalmente por via sexual, com baixo risco para transmissão parenteral e vertical nos EUA e no Norte da Europa (LENNETTE *et al*, 1996., MARTIN *et al*, 1999). Entretanto, em regiões endêmicas da África e da

Europa, a elevada prevalência do HHV-8 em crianças e em indivíduos de uma mesma família sugerem que deve haver outras vias de transmissão (MAYAMA *et al*, 1998., MOORE, 2000., PERNA *et al*, 2000., PLANCOULAIN *et al*, 2000). A soropositividade, e em alguns casos a soroconversão têm sido associado ao elevado número de parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis e em alguns estudos prática de sexo anal e contato oral-genital (SCHULZ *et al*, 1999., BLACKBOURN *et al*, 1999). O HHV-8 tem sido encontrado no sêmen em (13 – 20%) dos pacientes com SK, porém é incerto se a quantidade do vírus presente no sêmen é suficiente para transmissão sexual (MONINE *et al*, 1996). A presença do HHV-8 em secreções nasais e salivares pode representar uma outra via de transmissão (MONINE *et al*, 1996). Algumas pesquisas têm demonstrado a transmissão através do transplante renal de doadores com sorologia positiva para o HHV-8 e receptor com sorologia negativa para o HHV-8 com soroconversão pós-transplante (REGAMEY *et al*, 1998, HUDNALL *et al*, 1998).

1.6 Subtipos do HHV-8

Através do seqüenciamento de regiões gênicas específicas do HHV-8 foi possível a caracterização de diferentes subtipos virais. DI ALBERTI *et al* (1997b), seqüenciando a região OFR-26 do genoma do HHV-8, descreveram cinco subtipos denominados: A, B, C, D e E. Essa classificação foi baseada em determinadas variações dos nucleotídeos nas posições 1032 e 1132, com mudanças nos respectivos aminoácidos (DI ALBERT *et al*, 1997b). A prevalência dos subgrupos tem variado a depender da região geográfica, com maior frequência dos subgrupos A e D nos EUA e África, B e C na Itália, Reino Unido e em algumas populações do Brasil (DI ALBERT *et al*, 1997a, CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 1997., BORALEVI *et al*, 1998., CUNHA *et al*, 2000). Também foi correlacionado o subtipo com a patogenicidade viral e maior agressividade do tumor em alguns pacientes com SK. O subtipo A, predominante nos EUA, parece estar associado a

um maior grau de patogenicidade e agressividade, ocorrendo com frequência lesões viscerais (BORALEVI *et al*, 1998).

1.7 Detecção do HHV-8

1.7.1 Cultura Viral

A técnica da cultura celular pode ser usada para detecção do HHV-8 em células do sangue periférico, aspirado de medula óssea e plasma de indivíduos infectados pelo HHV-8.

Trata-se de uma metodologia de alta sensibilidade para detecção do HHV-8, porém apresenta algumas dificuldades técnicas consideráveis. Exige condições laboratoriais especiais de segurança, não disponíveis na maioria dos serviços, apresenta difícil execução e demanda muito tempo para resultados confiáveis, levando semanas para se evidenciar o crescimento do vírus (RENNE *et al*, 1996; SAID *et al*, 1996).

1.7.2 Métodos Sorológicos

Dentre os métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-HHV-8, os mais aplicados são os testes de imunoensaio enzimático (ELISA) e de imunofluorescência indireta (IFI). Esses métodos detectam anticorpos produzidos contra os HHV-8 e são de fácil execução. O requisito principal para a obtenção de resultados positivos é a capacidade do paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada contra os HHV-8. Assim, uma limitação importante desses métodos aparece quando ocorre redução na resposta imunológica, como pode acontecer em pacientes imunossuprimidos (CHATLYNNE *et al*, 1999., MARTIN *et al*, 2000).

A avaliação sorológica é o meio mais acurado de determinar uma história passada de infecção pelo HHV-8, estabelecida pela presença de anticorpos específicos da classe IgG (CHATLYNNE *et al*, 1999, ROIIT *et al*, 1999).

1.7.2a Imunoensaio enzimático (ELISA)

A técnica de enzima-imunoensaio baseia-se na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas e permitem a detecção, a titulação e a quantificação de substâncias de interesse biológico. Neste ensaio, a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Esse teste foi desenvolvido como uma alternativa ao radioimunoensaio, o qual utiliza isótopos radioativos para detecção de antígenos e de anticorpos. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. No teste de Elisa indireto, amplamente empregado para pesquisa de anticorpos, o antígeno purificado é imobilizado numa placa de plástico, onde o soro a ser testado é adicionado. Se na amostra existirem anticorpos contra o antígeno imobilizado, ocorrerá a ligação entre os dois imunorreagentes. A seguir, o sistema é lavado, removendo-se os anticorpos não ligados. Na etapa seguinte, adiciona-se um conjugado à placa (anti-imunoglobulina humana, marcada com uma enzima). Finalmente, acrescenta-se um substrato que sofre a ação da enzima, gerando um produto colorido, detectado visualmente ou por fotometria. A técnica permite detectar quantitativamente diferentes classes de imunoglobulinas, possuindo boa sensibilidade e especificidade, sendo aplicada para detecção de anticorpos anti-HHV-8 em amostras de soro ou plasma (CHATLYNNE *et al*, 1999., ROITT *et al*, 1999., DAVIS *et al*, 1996).

1.7.2b Imunofluorescência (IF)

O teste de imunofluorescência é utilizado para pesquisa de anticorpos em espécimes clínicos. Baseia-se na capacidade das moléculas de anticorpos se ligarem covalentemente a fluorocromos sem perder sua reatividade específica com o antígeno. Os fluorocromos mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína e rodamina B, que absorvem e emitem luz na faixa do visível. A emissão de fluorescência deve ser analisada em microscópio de fluorescência.

Os testes de imunofluorescência podem ser classificados em direto ou indireto. O ensaio de imunofluorescência direta (IFD) é empregado na pesquisa e na localização de antígenos em células ou tecidos, através de um anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado). O conjugado se fixa ao antígeno, formando um complexo estável. O anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparado é examinado em microscópio de imunofluorescência. Esse teste apresenta sensibilidade e especificidade elevadas, mas requer o preparo de um conjugado específico para cada sistema que se queira estudar. O ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) tem sido empregado para amplificar o sinal e aumentar a sensibilidade, podendo ser usado para pesquisa de antígenos ou de anticorpos. A imunofluorescência indireta é o teste de referência na sorologia de muitas doenças. Apresenta várias vantagens, pois é sensível, específico e reprodutível, de padronização e execução simples, o mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes e podem-se determinar as classes e subclasses de anticorpos utilizando-se conjugados específicos. A necessidade de microscópio de imunofluorescência, a subjetividade na leitura e a não automação representam limitações do teste (ROITT *et al*, 1999). O teste de imunofluorescência indireta tem sido utilizado para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 em amostras biológicas de interesse, tendo demonstrado ser sensível e específico (DAVIS *et al*, 1996).

1.7.3 Métodos Moleculares

Dos métodos moleculares, o que vem sendo mais utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo amplamente utilizada para detecção de seqüências de DNA correspondentes a diversas regiões do HHV-8. Também tem-se utilizado as técnicas de hibridação e sequenciamento (ASCERL *et al*, 1999).

1.7.3a A Reação em Cadeia da Polimerase

Com o início da amplificação de DNA, por meio da reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR), a detecção do HHV-8 foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus. A amplificação gênica pela PCR é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI, SCHARF, FALOONA, 1985).

A PCR permite a amplificação de um fragmento específico de DNA, escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede, em milhares de vezes, a inicial. Todos os métodos anteriormente empregados no estudo de uma determinada porção de DNA tinham, como objetivo comum aumentar a sensibilidade na detecção do fragmento alvo que está presente em baixa concentração na amostra. Contrastando com essa orientação, a PCR é capaz de aumentar significativamente o número do fragmento gênico escolhido, por meio da síntese enzimática de numerosas cópias da porção original (SAIKI *et al*, 1985., COSTA & COSTA, 1992), (Figura 03 do apêndice pág. 94).

De fato, é possível conseguir expressiva amplificação do fragmento de DNA originário de uma única célula. De maneira sucinta, este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA, por meio de dois oligonucleotídeos sintéticos (“primers”) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às das duas extremidades do fragmento alvo, e levados a efeito por uma reação enzimática, mediada pela polimerase de atividade em elevadas temperaturas (“*Taq* polimerase”). Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas (SAIKI *et al*, 1985., COSTA & COSTA, 1992):

- Desnaturação: Separação das hélices do DNA a ser amplificado.
- Pareamento: Ligação complementar entre os “primers” e o DNA a ser amplificado.
- Extensão: Síntese do DNA pela “*Taq* polimerase”.

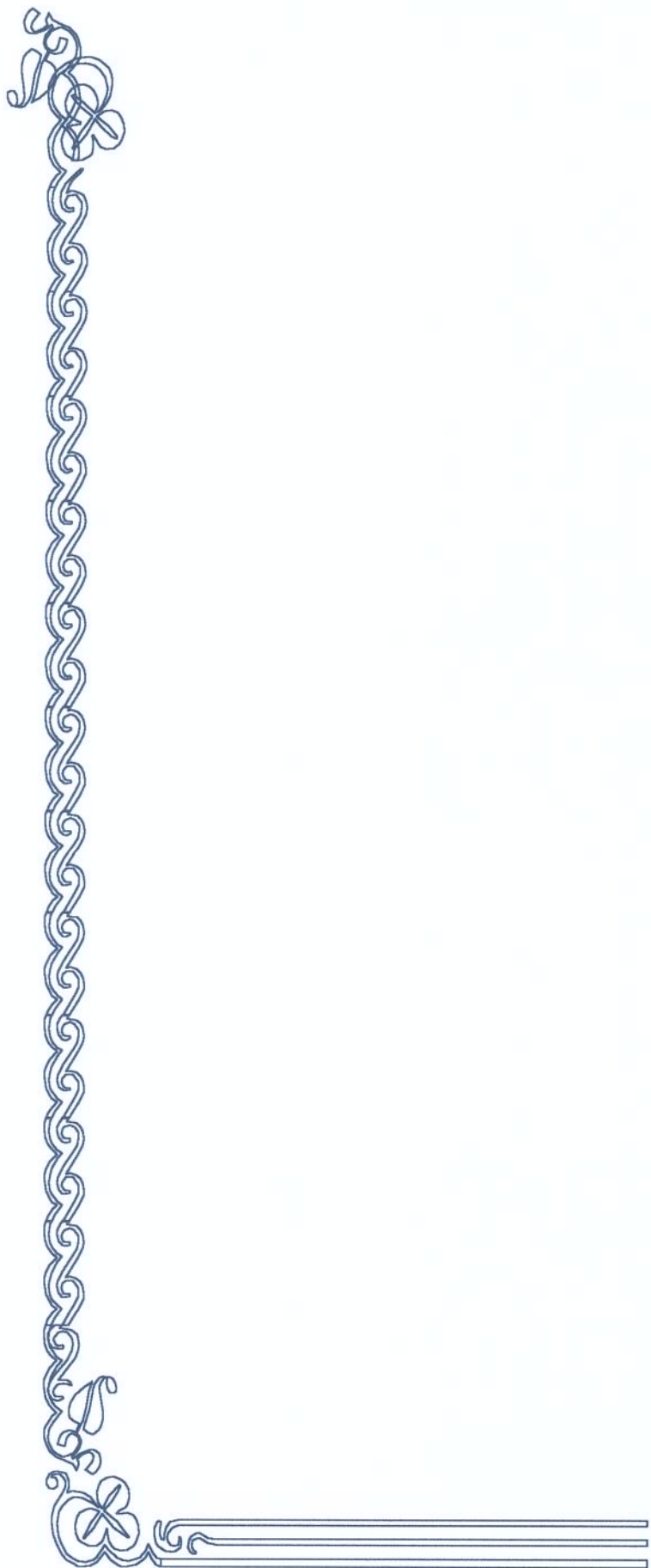
A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta, em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada na fase precedente. Portanto, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial (2^n), facultando, no final de 30 ciclos, um acréscimo da ordem de 10^6 cópias, valendo-se de uma única célula (SAIKI *et al*, 1985), (Figura 03 do apêndice pág. 94).

A técnica de PCR é muito suscetível à contaminação por produtos de amplificações prévias podendo resultar em resultados falso-positivos. Para que não ocorra contaminação da PCR é fundamental a implantação de normas e procedimentos especiais no laboratório. Além disso, tratando-se de uma reação enzimática, várias substâncias presentes no material a ser examinado podem inibir a reação de amplificação, levando a resultados falso negativos. Para minimizar esse tipo de problema, é recomendado o uso de um controle interno da reação de amplificação (KWOK & HIGUCHI, 1989).

A escolha de “primers” para amplificação clínica requer o uso de seqüências genômicas específicas de regiões altamente conservadas do HHV-8. Essa escolha é fundamental para garantir uma boa sensibilidade e especificidade para o teste de PCR (GAIDANO *et al*, 1997).

Sensibilidade e especificidade maiores foram alcançadas pela técnica de PCR-duplo (“nested PCR”). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma seqüência alvo em dois passos: na primeira amplificação, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto desta primeira reação, um novo par de “primers” é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior, por isso o aumento da sensibilidade e especificidade da reação (GAIDANO *et al*, 1997., COSTA & COSTA, 1992).

Baseado no exposto julgamos fundamental o desenvolvimento de pesquisas científicas em vários países, inclusive no Brasil, com a finalidade de se investigar a distribuição do HHV-8 na população geral, determinar os subtipos circulantes, as prováveis vias de transmissão e para esclarecer o papel desse agente na patogênese de algumas doenças neoplásicas como o sarcoma de Kaposi, o linfoma primário de cavidades do corpo, a doença de Castleman e o mieloma múltiplo.



Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos principais:

1- Padronizar a reação em cadeia da polimerase, duplo PCR (“Nested-PCR”) para detecção de seqüências de DNA do HHV-8 nos pacientes com sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo e em doadores de sangue avaliados no presente estudo.

2- Determinar a incidência do Herpes Vírus Humano tipo 8 (HHV-8) em pacientes com Sarcoma de Kaposi atendidos no Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em pacientes com Mieloma Múltiplo e em doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP.

3- Determinar os subtipos do HHV-8 (A, B, C, D ou E) entre os pacientes com sarcoma de Kaposi incluídos neste estudo.



Casuística

3. *Casuística*

3.1. *Pacientes com Sarcoma de Kaposi*

Foram estudados 11 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de sarcoma de Kaposi (SK), em seguimento no Ambulatório de Moléstias Infecciosas, do Hospital de Clínicas da Unicamp, Campinas, São Paulo; no período de abril de 1999 a maio de 2000. A média de idade foi de 37 anos, variando de 27 a 79 anos e todos pertenceram ao sexo masculino. Como critério de inclusão, todas as amostras apresentaram diagnóstico anatomopatológico compatível com SK e todos os pacientes responderam a um questionário e assinaram à um termo de consentimento aprovados pelo comitê de ética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, cópia do parecer (pág. 93) do apêndice.

3.2. *Pacientes com Mieloma Múltiplo*

De forma consecutiva, foram avaliados 48 pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo, em seguimento no Ambulatório de Hematologia, do Hemocentro da Unicamp; no período de março de 1999 a julho de 2000. A média de idade foi de 56,5 anos, variando de 29 a 78 anos, sendo 50% pertencente ao sexo masculino e 50% ao sexo feminino. Como critério de inclusão, tinham diagnóstico de Mieloma Múltiplo e não haviam recebido tratamento ou apresentavam quadro de recidiva sem tratamento por pelo menos três meses. Além disso, todos os pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética Médica da Faculdade de ciências Médicas da Unicamp.

3.3. Doadores de sangue

Foi realizado um estudo retrospectivo, no qual amostras de DNA de 145 doadores de sangue provenientes do Hemocentro da Unicamp foram analisadas através PCR-duplo (“Nested-PCR”), a fim de se estimar a frequência do HHV-8 nesse grupo. As amostras foram coletadas ao acaso, sem distinção de sexo, raça, idade ou qualquer outro fator.



Métodos

4. Métodos

4.1. Extração do DNA do sangue periférico

4.1.1. Preparação das amostras:

As amostras de sangue periférico, recebidas em tubo com anticoagulante (EDTA), foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos para a separação do plasma, o qual foi descartado.

4.1.2. Lise das hemácias:

As hemácias (sedimentadas) foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH_4Cl), a 0,144 M, 5 vezes o volume de células e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) a 0,01M, 0,5 vezes o volume de células. Após quinze minutos em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado durante 20 minutos a 2500 rpm, esta etapa foi repetida mais uma vez e, posteriormente, o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos submetido à etapa seguinte.

4.1.3. Lise dos Leucócitos:

Os leucócitos foram lisados com lavagens de solução TKM1 (Tris-HCl 10 mM (pH=7,6); KCl 10 mM; MgCl_2 10 mM e EDTA 20 mM) e centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas; aproximadamente 3 gotas de Triton X-100 (Nuclear) foram adicionadas na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e após essa etapa, foi acrescentado ao precipitado a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris-HCl 10 mM (pH=7,6); KCl 10 mM; NaCl 0,4 M; MgCl_2 10 mM; EDTA 2 mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado durante 40 minutos à 56°C e então foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5 M. Nessa etapa o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril.

4.1.4. Precipitação do DNA:

Ao sobrenadante, foram adicionados 4,0 ml de etanol absoluto gelado (EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0 ml de álcool 70% gelado e, a seguir, foi centrifugado à 2500 rpm, por 1 minuto. Descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH₂O). O DNA foi incubado por 8 horas em banho-maria a 37°C, ou levado a uma temperatura de aproximadamente 4°C por 16 horas para solubilização do precipitado, sendo sua concentração estimada em espectrofotômetro, por meio do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm. (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATS, 1989).

4.2. Extração do DNA de biópsia de tecido à fresco

4.2.1- Digestão das amostras

Colocar uma secção de 3 a 7 mm de tecido não fixado, já macerado, dentro de um tubo estéril de 1,5 mL. Adicionar ao tecido 190 µL de solução contendo 0,1 M de Tris – HCl, Ph igual a 7,5, 1% de SDS e 10 µL de uma solução contendo 10 mg/mL de proteinase K. Incubar em banho-maria à 55°C, por 3 horas ou durante 12 horas (“over-night”).

4.2.2-Extração com Fenol – Clorofórmio

Acrescentar 200 µl de fenol e agitar bem (utilizar o vortex para este procedimento). Em seguida adicionar 200 µl de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), agitar no vórtex e centrifugar a 14.000 rpm, por um minuto. Transferir o sobrenadante para outro tubo e acrescentar, novamente, 200 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), agitar no vórtex e centrifugar a 14.000 rpm, por um minuto.

4.2.3- Precipitação do DNA

Transferir o sobrenadante para um outro tubo e adicionar 25 μL de acetato de sódio 3M, 900 μL de etanol 100% gelado (- 20°C) e homogeneizar. Incubar a - 70 °C por 30 minutos e, depois, centrifugar a 15.000 rpm por 15 minutos. Para finalizar, descartar o sobrenadante, deixar o precipitado (“pellet”) secar e depois ressuspendê-lo com água estéril.

4.3. *Extração do DNA de aspirado de medula óssea*

Foi utilizado o Kit DNAZOL (Gibico-BRL) para extração do DNA, seguindo as normas descritas pelo fabricante.

4.4. *Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do HHV-8:*

4.4.1 Condições da reação:

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por SAIKI *et al.*(1985) com algumas modificações. A orientação dos “primers” faz com que a síntese do DNA ocorra na região interna entre eles. Desse modo, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta, em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada no ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento da ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única célula (SAIKI *et al.*, 1985).

Para cada reação de amplificação, utilizou-se 0,8 a 1,0 μL do DNA a ser estudado, seguindo os procedimentos técnicos para extração como descrito anteriormente para cada amostra, em um volume total de 30,0 μL de reação. Foram adicionados 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 2,0 pmol de cada “primer” KS 4 e

KS 5, que flanqueiam uma região de 571pb (Tabela 01 - ver sequência nucleotídica), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase.

Para a técnica de duplo-PCR (“Nested PCR”), as condições de reação foram as mesmas utilizadas na 1ª reação de PCR, sendo que para a 2ª reação uma alíquota do produto da 1ª foi reamplificada com os “primers” (KS 1 e KS 2), que flanqueiam uma região de 233pb, um fragmento interno ao amplificado na primeira reação (tabela 01 - ver sequência nucleotídica).

Tabela 01: Sequência dos “primers” utilizados para a detecção do Herpesvírus Humano Tipo 8.

Nome	Sequência (5' → 3')	Sentido	Tipo
KS 4	AgCACTCGCAgggCAGTACg	Direto	“primer” externo
KS 5	gACTCTTCgCTgATgAACTgg	Reverso	“primer” externo
KS 1	AgCCgAAAggATTCCACCAT	Direto	“primer” interno
KS 2	TCCgTgTTgTCTACgTCCAg	Reverso	“primer” interno

Sequências dos “primers” descritos por Chang *et al.*, 1994.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e, no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

Para a 1ª reação, os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
- Pareamento: 58°C - 1 minuto;
- Extensão: 72°C - 1 minuto.

Para a “Nested-PCR” não houve alteração no ciclo de amplificação.

4.4.2 Detecção:

Cerca de 6,0µl do produto da “Nested PCR”, acrescidos de 2,0µl do corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Nas amostras positivas, observou-se um fragmento de 233 pb, ao passo que nas amostras negativas não houve fragmento amplificado. Como controle positivo da reação, foi usada uma alíquota de DNA extraído de biópsia de tecido de um paciente com diagnóstico de sarcoma de Kaposi e sorologia positiva para o HHV-8, fornecido pelo laboratório de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (SP); como controle negativo, uma amostra de DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo certamente negativa para o vírus e um branco da reação contendo água.

4.5. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para a β -globina humana

A amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana, seguiu a metodologia descrita por SAIKI *et al.* (1985), com algumas modificações. O produto amplificado foi utilizado como controle interno da reação duplo PCR (“Nested-PCR”). O fragmento obtido, 365 pb, indicou que o DNA extraído era de boa qualidade e que não houve inibição da reação, resultado indispensável para um diagnóstico seguro.

As condições de reação utilizadas para a amplificação do gene da β -globina foram as mesmas aplicadas para a detecção do HHV-8, variando a temperatura de pareamento. Os “primers” utilizados na 1ª reação foram P3 e P5 e na “Nested-PCR” P3 e 109 (tabela 02).

Tabela 02: Sequência dos “primers” utilizados para amplificação do gene da β -globina humana.

Nome	Sequência (5' → 3')	Sentido	Tipo
P3*	AgACAgAgAAGACTCTTg	Direto	“primer” externo e interno
P5	TCATTcGtCTgTTTCCCATTc	Reverso	“primer” externo
109	CCCTTCCTATgACATgAACTTAACCAT	Reverso	“primer” interno

Sequências dos “primers” descritos por SAIKI *et al.* (1985). * O “primer” P3 foi utilizado na 1ª e 2ª reações.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C, durante 5 minutos e, no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

O ciclo de amplificação foi padronizado para as 2 reações e o programa foi o seguinte:

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
- Anelamento: 55°C - 1 minuto;
- Extensão: 72°C - 1 minuto.

O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.6. Normas aplicadas para se evitar contaminação:

A fim de se eliminarem problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- o estabelecimento de normas e procedimentos para limpeza e assepsia das vidrarias, pipetas e do ambiente de trabalho;
- o ambiente utilizado para a extração do DNA foi diferente daquele destinado à amplificação da sequência alvo (PCR);
- as amostras a serem amplificadas foram manipuladas em bancada com fluxo laminar, o que torna o ambiente estéril;
- um outro ambiente foi utilizado para se fazer a eletroforese;
- antes da abertura dos “eppendorffs”, foi efetuada rápida centrifugação para que a reação contida no tubo ficasse concentrada na região inferior evitando sua dispersão por aerossol;
- foram utilizadas ponteiras com filtro e “eppendorffs” novos e estéreis no manuseio das amostras;
- trocas constantes de luvas foram realizadas durante todo o procedimento.

4.7 Seqüenciamento do fragmento de DNA amplificado (Método de Sanger):

O método de seqüenciamento direto descrito por “Sanger” foi utilizado para a genotipagem do HHV-8 em algumas amostras de pacientes com sarcoma de Kaposi e comparação das seqüências de DNA obtidas com o seqüenciamento automatizado (“ABI PRISM 310”). Para a realização do seqüenciamento foi utilizado o “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (“Amersham Life Science, Cleveland, Ohio 44128, USA”).

4.7.1 Purificação:

Esta etapa é exigida, pois garante a remoção de oligonucleotídeos e dNTPs que podem interferir na reação de seqüenciamento. Cerca de 20 µl do produto amplificado foi purificado com o Kit para purificação da Qiagen, seguindo as normas descritas pelo fabricante.

4.7.2 Reação de Terminação:

Foram utilizados à reação de terminação, 2,0µl de dGTP Master Mix (7,5µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), para cada reação, o produto amplificado (PCR-duplo) purificado, acrescidos de 1,2 pmols do “primer” e 0,5µl de [$\alpha^{33}\text{P}$]ddATP.

4.7.3 Reação de Seqüenciamento:

Para a reação de seqüenciamento utilizou-se: 2,0µl de tampão de reação (260 mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl₂), 2,0 µl do produto da amplificação purificado, 1,0 µl de “primer” marcado, 2,0 µl de Thermo Sequenase DNA polimerase e 13,0 µl de dH₂O. Um volume de 4,5 µl da reação de seqüenciamento + 2,5 µl do produto da reação de terminação + 1 gota de óleo mineral foram submetidos ao seguinte programa em termociclador Robocycler 40 (Stratagene): 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, perfazendo um total de 35 ciclos. Após esta reação de seqüenciamento, foi adicionada a cada amostra, 4,0 µl da solução de parada “Stop solution” (95% formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol).

4.7.4 Eletroforese em gel desnaturante:

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 6% na proporção de 19:1 acrilamida/bis acrilamida, em tampão de corrida TTE (Tris 72mM, pH8,0, Taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM), uréia 7 M, persulfato de amônio a 10% (APS) e 0,04% de TEMED. O gel foi preparado em placas de dimensões 38 cm X 50 cm com espaçadores de 0,4 mm de espessura e de gradiente de espessura com 0,25 mm até 0,4 mm.

Para a separação dos fragmentos marcados radioativamente, o gel foi submetido a uma corrida eletroforética com potência constante de 90W, com prévio aquecimento do sistema de eletroforese por cerca de 1 hora.

Foram aplicados 4,0 µl de cada amostra previamente desnaturadas durante 5 minutos a 94°C. A corrida durou cerca de 3 horas e a seguir o gel foi transferido para um papel de filtro 3mm e levado à secadora de gel a vácuo (Bio-Rad) durante 2 horas a 80°C. O gel foi mantido em contato com um filme de raio-X, temperatura a ambiente por 12 horas. Em seguida foi revelado e a leitura foi comparada com as seqüência descritas no Banco de Dados (Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.8 Seqüenciamento do DNA (Método Automatizado)

O seqüenciamento automatizado foi realizado no aparelho “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” da “Biosystems”, um equipamento moderno, rápido e de fácil operação. Para tal, os produtos do duplo PCR para região alvo (ORF-26) do HHV-8 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio e posterior visualização sob luz UV. Somente as bandas bem definidas, sem excesso de reagentes, com ausência de bandas inespecíficas foram selecionadas e submetidas às etapas subseqüentes.

4.8.1. Purificação:

Os produtos amplificados ("Nested-PCR") selecionados foram purificados com o Kit da QIAGEN ("QIAquick PCR Purification Kit") seguindo, rigorosamente, as normas descritas pelo fabricante.

4.8.2. Quantificação do Produto Purificado:

Para o sequenciamento, os produtos da "Nested-PCR" purificados, foram quantificados utilizando-se um marcador de massa molecular (Load mass - Gibco-BRL), através de uma corrida em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualização das bandas sob luz UV. A comparação da intensidade das bandas obtidas com as bandas do marcador permitiu estimar a quantidade de DNA presente nas amostras.

4.2.3. Reação de Sequenciamento:

Foram utilizados de 15 a 45ng do produto da "Nested-PCR" purificado para uma reação de 10µL, contendo 3µL de "Big Dye Terminator Ready Reaction" ("ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit") e 1µL de um dos oligonucleotídeos iniciadores ("Forward or reverse") utilizados na "Nested-PCR", adicionado-se água destilada até o volume final.

As condições da reação de sequenciamento foram as seguintes: desnaturação inicial à 96°C por 10 segundos, hibridação dos oligonucleotídeos a 57°C por 5 segundos e extensão à 60°C por 4 minutos, sendo processados 25 ciclos.

4.8.4. Análise das Amostras:

As amostras foram, em seguida, analisadas no sequenciador automático "ABI PRISM 310".

4.9 Caracterização dos subtipos do HHV-8

Os subtipos virais foram determinados segundo critérios de classificação descritos por Di Albert *et al*, 1999. Segundo os autores as variações nos aminoácidos 134 (base- 1033) e 167 (base 1132) localizados na região ORF- 26 do HHV-8 permitem a distinção de cinco subtipos virais (A, B, C, D e E). As alterações para classificação dos subtipos do HHV-8 se encontram na Quadro 02. (DI ALBERT *et al*, 1997a e ., DI ALBERT *et al*, 1997b).

Quadro 02 – Classificação dos subtipos do HHV-8, segundo variações nos aminoácidos 134 e 167 presentes na região ORF-26 do genoma viral (DI ALBERT *et al*, 1997a).

Subtipos do HHV-8	AMINOÁCIDO 134	AMINOÁCIDO 167
A	Prolina (ccc)	Ac. Aspártico (gat)
B	Leucina (ctc)	Ac. Aspártico (gat)
C	Isoleucina (atc)	Glycina (ggt)
D	Treonina (acc)	Glycina (ggt)
E	Leucina (ctc)	Glycina (ggt)

4.10 Imunofluorescência Indireta

Para detecção de anticorpos específicos contra o HHV-8 foi utilizado o Kit de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti- HHV-8 da empresa Americana Biotrin (<http://www.biotrin.com>). Este ensaio sorológico é capaz de detectar anticorpos anti-HHV-8 na fase primária, latente, persistente ou reativada da infecção viral.

O ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI) é um método rápido, sensível e de fácil execução para determinação de anticorpos anti-HHV-8. O procedimento da reação de IFI compreende basicamente duas etapas. Na primeira, o soro ou plasma humano a ser analisado é posto em contato com células infectadas com o HHV-8 fixadas em lâmina. Nesse ensaio sorológico de IFI (Kit da Biotrin) é utilizada a linhagem celular KS-1, derivada de paciente com linfoma de cavidade do corpo, não estando infectado com o vírus da imunodeficiência humana. Se houver a presença de anticorpos IgG anti- HHV-8 na amostra testada, ocorrerá a formação de um complexo anticorpo da amostra com o antígeno fixado na lâmina. Se não houver a presença de anticorpos específicos na amostra testada, não haverá formação do complexo antígeno- anticorpo e todos os componentes do soro serão eliminados na etapa de lavagem. A segunda etapa envolve a adição de anti- anticorpos humano marcados (Anti-Ac*) com uma substância fluorescente. Nas reações positivas (com presença de anticorpos), haverá formação do complexo Ag-Ac-Anti-Ac* e será observado uma coloração verde-maçã em microscópio de imunofluorescência. Nas amostras negativas não ocorrerá formação do complexo e não será observado a emissão de fluorescência.

As reações foram processadas seguindo rigorosamente os critérios metodológicos do referido Kit. Foram utilizados, além dos controles positivo e negativo do próprio Kit, mais quatro amostras de soro de doadores de sangue saudáveis, não pertencentes a grupos de risco e com PCR negativo para o HHV-8.

4.11 *Teste Estatístico*

A avaliação estatística dos resultados baseou-se na análise descritiva das variáveis de interesse, comparando-se algumas dessas variáveis. Foram utilizadas tabelas de frequências para as variáveis categóricas (Sexo, Grupo, Tratamento para o SK, etc...) e estatísticas descritivas para a variável contínua (Idade). Para verificar a presença de associação (diferença) entre os grupos com relação às variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher. Na comparação da variável Idade entre os grupos (SK e MM) foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que compara dois grupos em função da soma dos postos das observações. Em ambos os testes, a diferença entre os grupos será significativa quando o p-valor do teste for ≤ 0.05 . O programa computacional utilizado foi o The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 6.12 (SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA). A análise estatística foi realizada pela Comissão de Pesquisa, estatística da FCM, UNICAMP em fevereiro de 2001.



Resultados

5 Resultados

5.1 Padronização do PCR-duplo (Nested-PCR) para amplificação da região ORF 26 do HHV-8

Para a padronização inicial do PCR-duplo foram utilizadas as condições sugeridas por CHANG *et al* (1994), sendo realizadas algumas modificações visando a obtenção de uma banda nítida, de boa intensidade, na altura correspondente ao produto amplificado e a eliminação de bandas inespecíficas e excesso de reagentes.

Optou-se pela aplicação do PCR-duplo com a finalidade de aumentar a especificidade e sensibilidade do método. Em amostras com baixa viremia, o uso desta técnica amplia o número de cópias de DNA do HHV-8 milhares de vezes. (GAIDANO *et al*, 1997).

O PCR-duplo foi aplicado para pesquisa e detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em amostras de DNA de pacientes com sarcoma de Kaposi, com mieloma múltiplo e em um grupo de doadores de sangue. Foram analisadas amostras de DNA extraído de biópsia (Figuras 05, 06, 07, 08 do apêndice pág. 95 e 96) e sangue periférico de onze pacientes com SK confirmados por exame anatomopatológico. Desses, dez pacientes tinham diagnóstico sorológico positivo para HIV, com quadro de SIDA e um caso apresentou sorologia negativa para o HIV. Detectaram-se seqüências de DNA do HHV-8 em todas as amostras de DNA de biópsia (11/11) e em 45,5% das amostra de DNA de sangue periférico (5/11) dos pacientes com SK através do PCR-duplo (Tabela 03 & Figura 09).

Foram analisadas 48 amostras de DNA extraídos de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo. Detectaram-se seqüências de DNA do HHV-8 em apenas uma amostra (1/ 48), utilizando-se a técnica de PCR-duplo (Figura 10).

No grupo de doadores de sangue, não houve amplificação de seqüências de DNA do HHV-8, sendo todas as amostras negativas.

Tabela 03 - Resultados da reação de PCR-duplo para a detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em amostras de DNA extraído de sangue periférico e de biópsia dos pacientes com diagnóstico de sarcoma de Kaposi.

Nº Pac.	Data da Coleta	HIV	PCR Biópsia	PCR Sangue
01	26/ 06/ 99	+	+	+
02	26/ 06/ 99	+	+	+
03	29/ 06/ 99	+	+	-
04	30/ 07/ 99	+	+	+
05	24/ 08/ 99	+	+	+
06	31/ 08/ 99	+	+	+
07	30/ 03/ 00	+	+	-
08	07/ 04/ 00	+	+	-
09	12/ 04/ 00	+	+	-
10	04/ 05/ 00	+	+	-
11	01/ 06/ 00	-	+	-

Nº Pac - Número de identificação dos pacientes., Data da Coleta - Todas as amostras foram coletadas na referida data., PCR-duplo biópsia- PCR-duplo para detecção do DNA do HHV-8 em amostras de biópsia., PCR-duplo sangue – PCR-duplo para detecção do DNA do HHV-8 em amostras de sangue periférico.

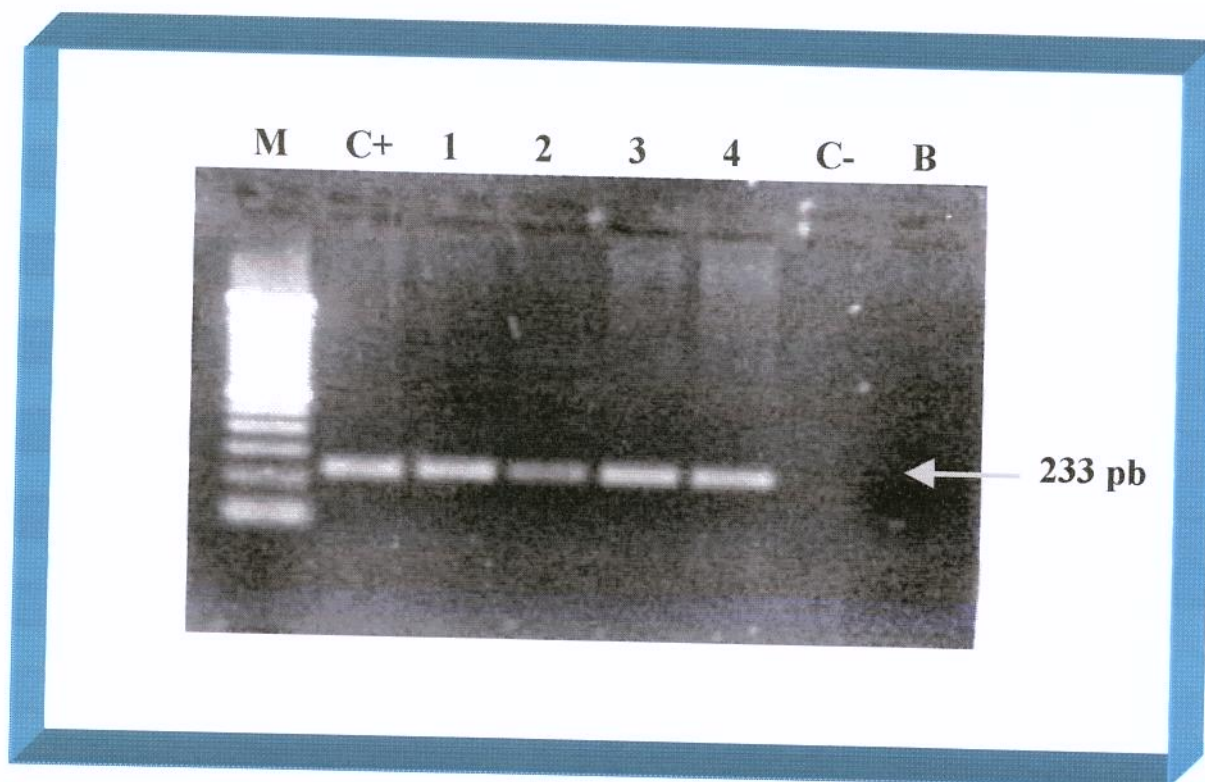


Figura 09 – Amplificação de 233 pb do DNA do HHV-8 com os “primers” KS-1 e KS-2 (Técnica de PCR-duplo) em pacientes com sarcoma de Kaposi (SK). Eletroforese em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio

Legenda referente à Figura 09

M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Gibico-BRL, USA)

C+ - Controle positivo para reação

1 e 2 – PCR positivo para amostras de biópsia de pacientes com SK

3 e 4 – PCR positivo para amostra de sangue periférico de pacientes com SK

C⁻ - Controle negativo para presença de DNA do vírus

B – Branco da reação (H₂O)

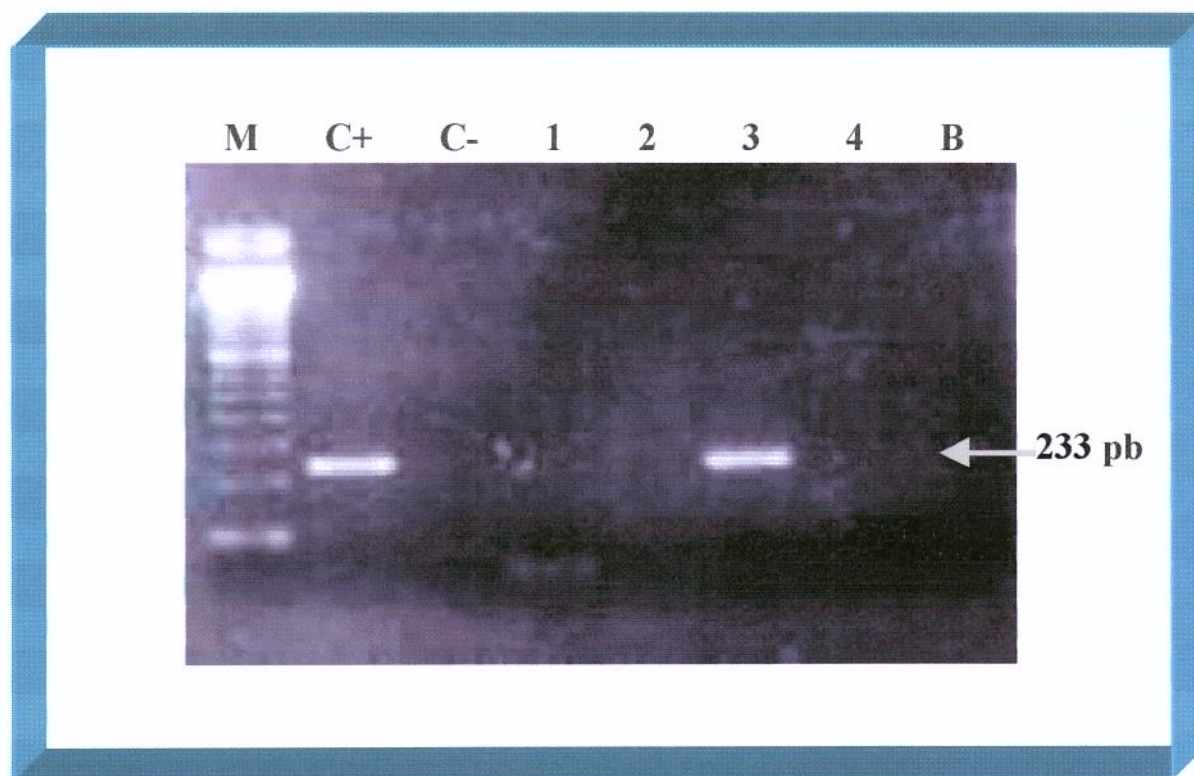


Figura 10 – Amplificação de 233 pb do DNA do HHV-8 com os “primers” KS-1 e KS-2 (Reação de PCR-duplo) em pacientes com mieloma múltiplo (MM). Eletroforese em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio

Legenda referente à Figura 10

- M** Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA)
- C+** Controle positivo para reação
- C⁻** Controle negativo para presença de DNA do vírus
- 3** PCR positivo para amostras de pacientes com MM
- 1, 2 e 4** PCR negativo para amostra de pacientes com MM
- B** Branco da reação (H₂O)

5.2 Controle interno da reação de amplificação e da amostra

Como controle interno da reação de amplificação e da amostra, todas as amostras foram submetidas a técnica de PCR-duplo destinada a amplificação de uma região específica do gene da β -globina humana. A Figura 10 representa a amplificação dessa região, sendo observado um fragmento de 366 pb nas amostras positivas. Somente as amostras com reação de amplificação positiva foram incluídas no presente estudo (Figura 10).

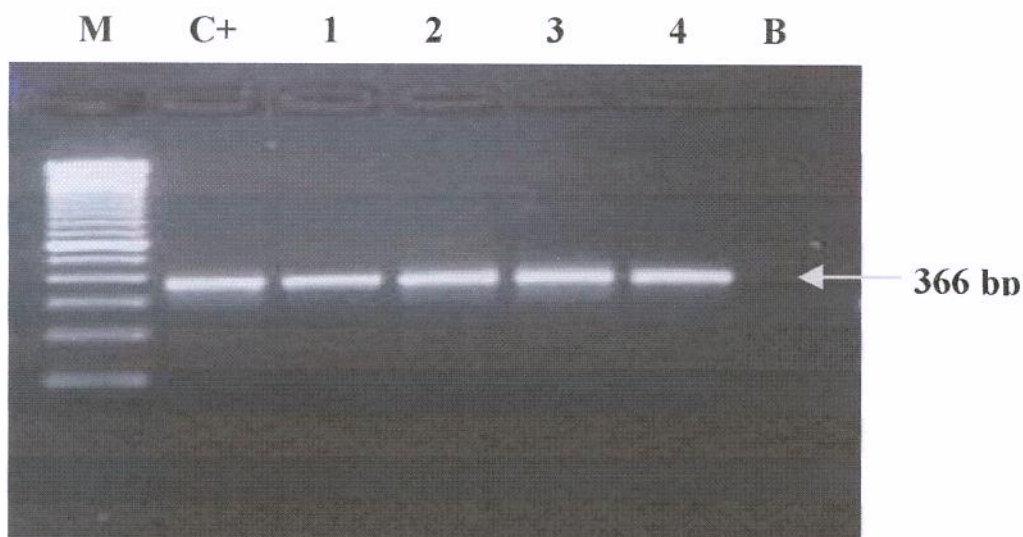


Figura 11 – Amplificação de 366 pb da β -globina humana com os “primers” P3 e P 109 (produto da reação de PCR-duplo) em pacientes com sarcoma de Kaposi (SK), mieloma múltiplo (MM) e em doadores de sangue. Eletroforese em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio.

Legenda referente à Figura 11

M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA)

C+ - Controle positivo para reação

1 e 2 - PCR positivo para amostras de pacientes com SK

2 - PCR positivo para amostra de paciente com MM

3 - PCR positivo para amostra de doadores de sangue

B – Branco da reação (H_2O)

5.3 Detecção de anticorpos anti-HHV-8

Foi utilizado o ensaio de Imunofluorescência Indireta (Kit Biotrin – EUA), para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 em amostras de soro dos pacientes com sarcoma de Kaposi (SK). Devido a dificuldades na obtenção (somente por importação, disponível apenas para pesquisa) e custo elevado do “Kit Biotrin”, foi possível a compra de apenas um Kit contendo 50 testes para detecção de anticorpos anti-HHV-8. Por esse motivo, a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 foi realizada apenas no grupo de pacientes com SK.

Todas as amostras de soro dos pacientes com sarcoma de Kaposi com diagnóstico confirmado por exame anatomopatológico e PCR-duplo para o HHV-8 positivo apresentaram positividade no ensaio sorológico para detecção de anticorpos específicos contra o HHV-8 (Figura 12 & Tabela 04)). Além dos controles positivo e negativo fornecidos pelo “Kit Biotrin”, foram testadas amostras de soro de quatro doadores de sangue utilizados como controle pelo laboratório de Imunologia do Hemocentro, obtendo-se para essas amostras testes de IFI para detecção de anticorpos anti-HHV-8 negativos em todos os ensaios sorológicos.

Tabela 04 - Resultados da reação de PCR-duplo para a detecção de seqüências de DNA do HHV-8 e do ensaio de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-HHV-8 em amostras biológicas dos pacientes com diagnóstico de sarcoma de Kaposi.

Nº Pac.	Iniciais dos Pac.	IFI	PCR Biópsia	PCR Sangue
01	R.J.C.	+	+	+
02	L.M.G.	+	+	+
03	R.B.S.	+	+	-
04	M.A.F.	+	+	+
05	S.B.	+	+	+
06	M.A.T.	+	+	+
07	L.R.S.	+	+	-
08	I.F.S.	+	+	-
09	P.A.R.L.M.	+	+	-
10	E.F.G.	+	+	-
11	J.L.	+	+	-

Nº Pac - Número de identificação dos pacientes., Pacientes - Iniciais dos nomes dos pacientes., IFI - Ensaio sorológico de Imunofluorescência indireta para detecção de Anticorpos-anti-HHV-8., PCR biópsia- “Nested-PCR” para detecção do DNA do HHV-8 em amostras de biópsia., Data da Coleta - Todas as amostras foram coletadas na referida data., PCR sangue - “Nested-PCR” para detecção do DNA do HHV-8 em amostras de sangue periférico.

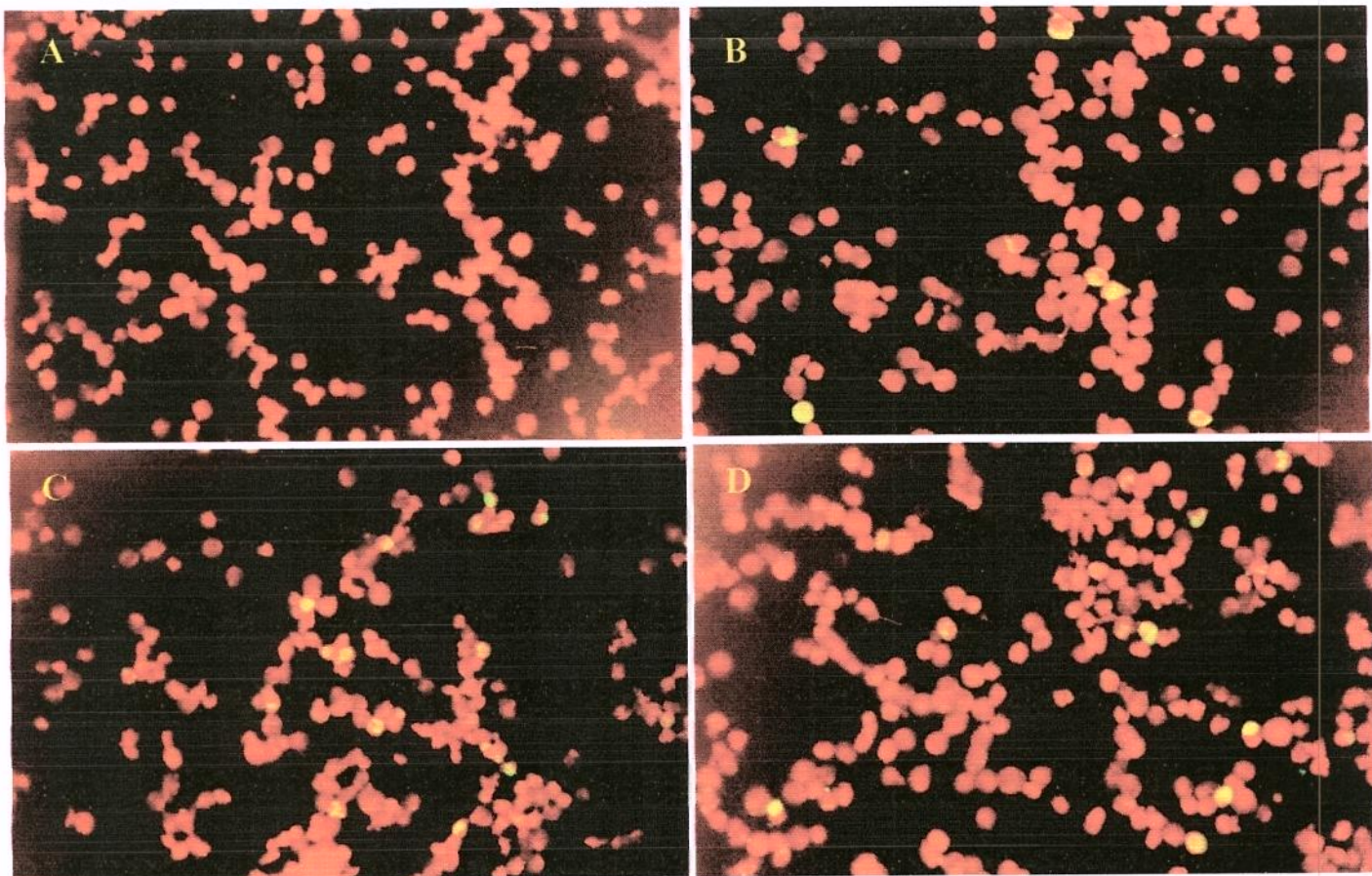


Figura - 12 - Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-HHV-8. Kit da Biotrin (EUA).

A - Controle Negativo do Kit Biotrin.

B - Controle Positivo do Kit Biotrin.

C - Amostra de soro do paciente (KS- 01) com sarcoma de Kaposi e presença de anticorpos anti-HHV-8.

D - Amostra de soro do paciente (KS- 11) com sarcoma de Kaposi e presença de anticorpos anti-HHV-8.

5.4 Comparação entre os resultados obtidos pela técnica de PCR-duplo e pelo ensaio sorológico de Imunofluorescência Indireta para diagnóstico do HHV-8.

O PCR-duplo para detecção de sequência específica de DNA do HHV-8 em amostras de biópsias de lesões sarcomatosas e o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-HHV-8 em amostras de soro dos respectivos pacientes mostraram igual potencial de detecção. Em ambos os ensaios, a detecção do HHV-8 foi positiva em 100% (11/11) das amostras biológicas provenientes dos pacientes com sarcoma de Kaposi analisadas no presente estudo.

O DNA extraído das amostras de sangue periférico dos pacientes com sarcoma de Kaposi foi submetido à análise pela técnica de PCR-duplo tendo como resultado uma positividade de 45,5% (5/11).

A presença do Vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV) foi verificada em 90,9% (10/11) dos pacientes com sarcoma de Kaposi, infectados pelo HHV-8. O paciente de número 11 não estava infectado pelo HIV, apresentando sarcoma de Kaposi e diagnóstico sorológico (IFI) e molecular (PCR-duplo) positivos para o HHV-8.

A fim de se avaliar a sensibilidade dos métodos para detecção do HHV-8, foi considerada a PCR-duplo para detecção de sequências de DNA extraído de biópsia de pele de pacientes com SK como padrão ouro para diagnóstico do HHV-8. Comparou-se o método escolhido como padrão ouro com a PCR-duplo para detecção de sequências de DNA extraído do sangue periférico de pacientes com SK e com a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 utilizando a Imunofluorescência Indireta (IFI) e verificou-se que o PCR-duplo com DNA extraído de sangue periférico apresentou uma sensibilidade de 45% com relação ao padrão ouro (Tabela 05) e o ensaio sorológico (IFI) uma sensibilidade de 100% (Tabela 06), (Gráfico 01).

O Gráfico 02 representa a comparação entre os três testes (PCR-duplo realizado em amostras de sangue periférico, em biópsia de pele e o ensaio de IFI realizados para o diagnóstico do HHV-8 em onze pacientes com quadro clínico e exame anatomopatológico compatível com SK.

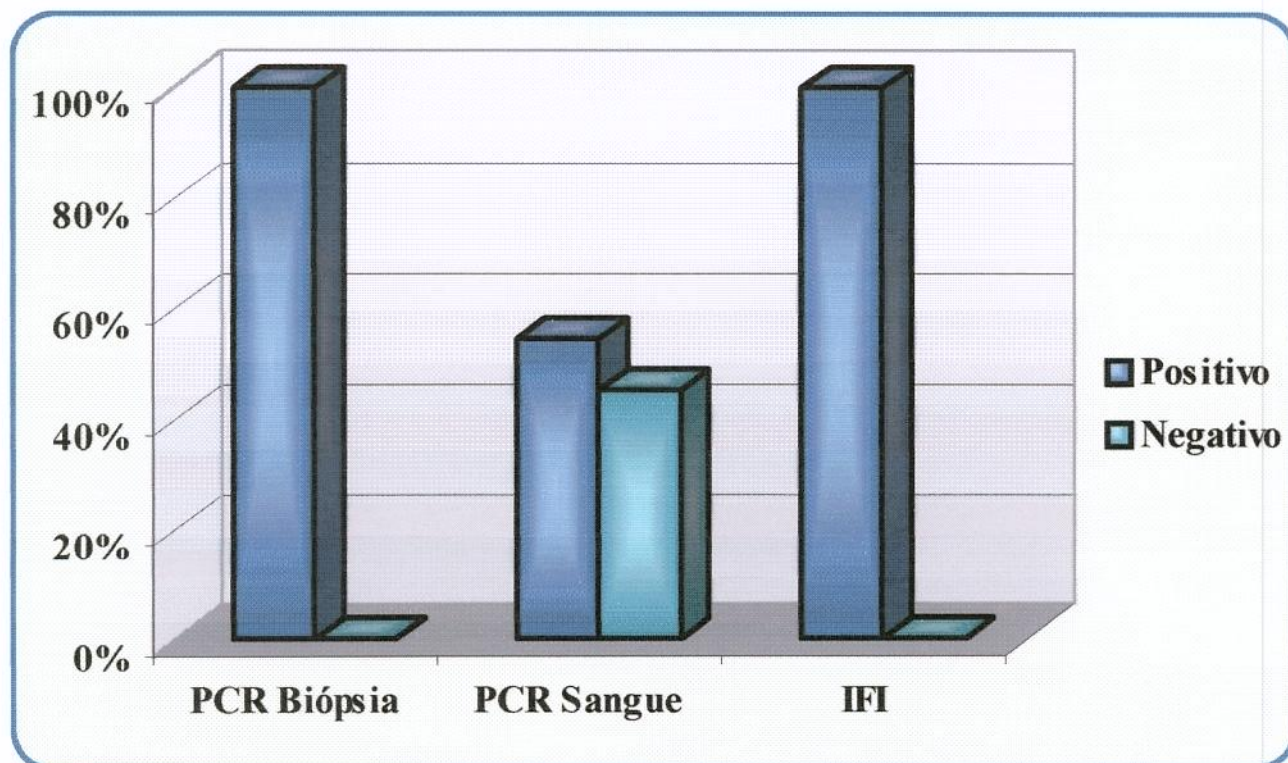


Gráfico 01: Representação gráfica entre os testes para detecção do HHV-8.

Tabela 05 – Relação entre o PCR-duplo para detecção de seqüências do HHV-8 de DNA extraído de biópsia de pele de pacientes com SK com a o PCR-duplo com DNA extraído de sangue periférico uma sensibilidade de 45% com relação ao padrão ouro (Tabela 05) para detecção de seqüências do HHV-8 de DNA extraído do sangue periférico de pacientes com SK

	Nested-PCR (B) +	Total
Nested-PCR (SP) +	5	5
Nested-PCR (SP) -	6	6
Total	11	11

Cálculo para estimar a sensibilidade

$$\text{Sensibilidade} = 5/11 = 0,45 \times 100 = 45\%$$

Este resultado indica que o PCR-duplo com DNA extraído de sangue periférico apresenta uma sensibilidade de 45% com relação ao padrão ouro para detecção de seqüências do HHV-8 em pacientes com SK.

Os cálculos utilizados nessa análise se basearam na definição de sensibilidade. Sensibilidade é a probabilidade de um teste positivo entre os indivíduos doentes, ou seja, sensibilidade é igual ao número de indivíduos com teste positivo e com a doença (Positivo Verdadeiro - a), dividido pela soma dos positivos verdadeiros (a) mais os indivíduos com teste negativo, porém, com a doença (Negativo Falso - b), logo, $S = a / (a + b)$ (FLETCHER *et al*, 1989).

Tabela 06 – Relação entre o PCR-duplo para detecção de seqüências do HHV-8 em amostras de DNA extraído de biópsia de pele de pacientes com SK com o ensaio sorológico de IFI para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8.

	Nested-PCR (B) +	Total
IFI +	11	11
IFI -	0	0
Total	11	11

Cálculo para estimar a sensibilidade

$$\text{Sensibilidade} = 11/11 = 1 \times 100 = 100\%$$

Este resultado indica que o ensaio sorológico (IFI) para detecção de anticorpos contra o HHV-8 em pacientes com SK tem uma sensibilidade de 100% quando comparada com a técnica considerada padrão ouro.

Os cálculos utilizados nessa análise se basearam na definição de sensibilidade. Sensibilidade é a probabilidade de um teste positivo entre os indivíduos doentes, ou seja, sensibilidade é igual ao número de indivíduos com teste positivo e com a doença (Positivo Verdadeiro - a), dividido pela soma dos positivos verdadeiros (a) mais os indivíduos com teste negativo, porém com a doença (Negativo Falso - b), Logo, $S = a / (a + b)$ (FLETCHER *et al*, 1989).

Pacientes			
Nº	Variação do ácido nucléico	Variação do aminoácido/ (aa)	Subtipos
Nº 07	C → T (1033)	Pro → Leu / 134	B
Nº 08	C → T (1033) C → T (1086) A → C (1139)	Pro → Leu / 134	B
Nº 09	C → T (1033)	Pro → Leu / 134	B
Nº 10	C → T (1033) C → T (1086) A → C (1139)	Pro → Leu / 134	B
Nº 11	C → T (1033)	Pro → Leu / 134	B

5.5.2 Comparação entre a sequência de DNA da região ORF-26 do genoma do HHV-8 descrita por Chang *et al*, (1994) e as sequências de DNA da região ORF-26 dos pacientes com sarcoma de Kaposi avaliados no presente estudo.

SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO ORF-26 DO HHV-8

```

      990 ↓      1000 ↓      1010 ↓      1020 ↓      1030 ↓
.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA

      1040 ↓      1050 ↓      1060 ↓      1070 ↓      1080 ↓
CCCCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC

      1090 ↓      1100 ↓      1110 ↓      1120 ↓      1130 ↓
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG

      1140 ↓      1150 ↓      1160 ↓      1170 ↓      1180 ↓
GATGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT

      1190 ↓      1200 ↓      1210 ↓      1220 ↓
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....
  
```

Quadro 04: Sequência original da sequência nucleotídica referente a região ORF-26 do HHV-8 descrita por CHANG *et al*, 1994.

Sequência do oligonucleotídeo direto – em cor vermelho

Sequência do oligonucleotídeo reverso – em cor rosa

As setas numeradas correspondem à posição do nucleotídeo inserido na sequência descrita por CHANG *et al*, 1994 e publicada no GenBank

5.5.2 Sequências de DNA da região ORF – 26 do HHV-8 obtida após análise das amostras dos pacientes com SK. Resultado do estudo do eletroferograma obtido com o sequenciamento automatizado “ABI PRISM 310”.

Comparando-se a sequência de DNA da região ORF-26 do HHV-8 descrita por CHANG *et al*, 1994 (Quadro 04) com as sequências de DNA dos pacientes com SK (região ORF-26 - fragmento de 233pb) foi possível identificar as variações nas bases: (1032, 1033, 1132, 1055, 1086 e 1139). Para obtenção do fragmento amplificado (233pb), foram realizadas duas reações de sequenciamento (Aparelho ABI PRISM 310"), uma utilizando o "primer" direto KS-1 e a outra com o "primer" reverso KS-2. A análise de ambas as sequências permitiu a obtenção completa do fragmento de 233pb. Logo abaixo, seguem as sequências de DNA dos pacientes avaliados neste estudo. Para facilitar a análise, o vermelho corresponde à sequência do “primer” direto (KS - 1), o rosa “primer” reverso (KS - 2), em preto a sequência está idêntica à descrita por CHANG *et al*, 1994. As variações nucleotídicas encontradas em cada paciente estão identificadas em azul.

Sequências de DNA dos pacientes com sarcoma de Kaposi avaliados no presente estudo

1- Paciente Nº- 01 (Figuras 17 e 18 do Apêndice pág. 97)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CATCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GGTGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

2- Paciente Nº- 02 (Figuras 18 e 19 do Apêndice pág. 98)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CATCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GGTGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

3- Paciente N°- 03 (Figuras 21 e 22 do Apêndice pág. 99)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CATCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCTCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GGTGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

4- Paciente N°- 04 (Figuras 23 e 24 do Apêndice pág. 100)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGTTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GATGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

5- Paciente N°- 05 (Figuras 25 e 26 do Apêndice pág. 101)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGTTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GATGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

6- Paciente N°- 06 (Figuras 27 e 28 do Apêndice pág. 102)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCTCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GATGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

7- Paciente N°- 07 (Figuras 29 e 30 do Apêndice pág. 103)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GATGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

8- Paciente N°- 08 (Figuras 31 e 32 do Apêndice pág. 104)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
AGCAGTTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
GATGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

9- **Paciente N°- 09** (Figuras 33 e 34 do Apêndice pág. 105)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
 CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
 AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
 GATGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
 TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

10- **Paciente N°- 10** (Figuras 35 e 36 do Apêndice pág. 106)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
 CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
 AGCAGTTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
 GATGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
 TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

11- **Paciente N°- 11** (Figuras 36 e 37 do Apêndice pág. 107)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA
 CCTCGTGTTC CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC
 AGCAGCTGTT GGTGTACCAC ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG
 GATGATGTAA ATATGGCGGA ACTTGATCTA TATACCACCA ATGTGTCATT
 TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA CAACACGGAT.....

5.6 Sequência de DNA da região ORF – 26 do Controle Positivo utilizado no presente estudo.

Resultado da análise do eletroferograma.

A genotipagem do controle positivo utilizado nos experimentos deste trabalho permitiu identificar que essa amostra pertence ao subtipo C do HHV-8. Logo abaixo, está descrita a sequência de DNA do controle positivo (Região ORF-26 - 233pb). O vermelho corresponde ao “primer” direto (KS - 1), o rosa “primer” reverso (KS - 2), em preto à sequência está idêntica a descrita por Chang et al, 1994 (Quadro 04) e em azul as variações nucleotídicas identificadas (Tabela 08 e Figura 13).

Controle + (AL)

.....AGCC GAAAGGATTC CACCATTGTG CTCGAATCCA ACGGATTTGA CATCGTGTTT
 CCCATGGTCG TGCCGCAGCA ACTGGGGCAC GCTATTCTGC AGCAGCTGTT GGTGTACCAC
 ATCTACTCCA AAATATCGGC CGGGGCCCCG GGTGATGTCA ATATGGCGGA ACTTGATCTA
 TATACCACCA ATGTGTCATT TATGGGGCGC ACATATCGTC TGGACGTAGA
 CAACACGGAT.....

Tabela 08: Análise das variações de base e caracterização do subtipo do HHV-8 na amostra utilizada como controle positivo

Pacientes				
Nº	Variação do ácido nucléico	Variação do aminoácido / (aa)	Subtipos	
Controle Positivo AL	C → A (1032)			
	C → T (1033)	Pro → Leu / 134		
	A → G (1132)			
	A → C (1139)	Asp → Gly / 167		C

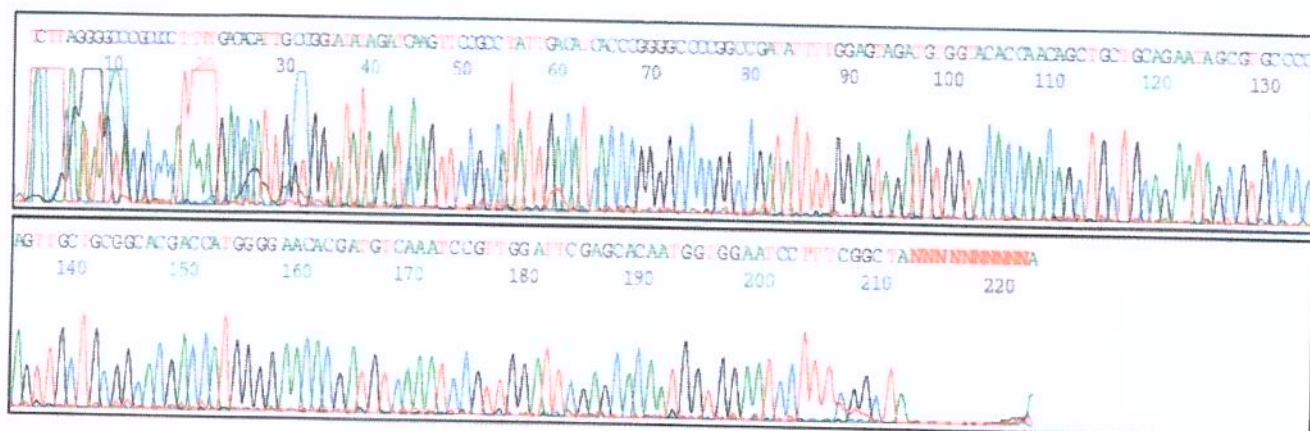


Figura 13: Eletroferograma referente ao sequenciamento do Controle Positivo

5.7 Variações nucleotídicas nas posições 1055, 1086 e 1139 detectadas no sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 em pacientes com SK.

Verificou-se a presença de variações nucleotídicas específicas em três diferentes posições (bases – 1055, 1086 e 1139) em alguns pacientes com sarcoma de Kaposi. A variação na base 1139 foi detectada em 45,45% (05/11), seguida das variações nas base 1086 presente em 36,36% (04/11) e da 1055 presente em 27,27% (03/11) no grupo de pacientes com SK (Gráfico 02). Entretanto, as referidas variações não ocasionaram a substituição dos respectivos aminoácidos.

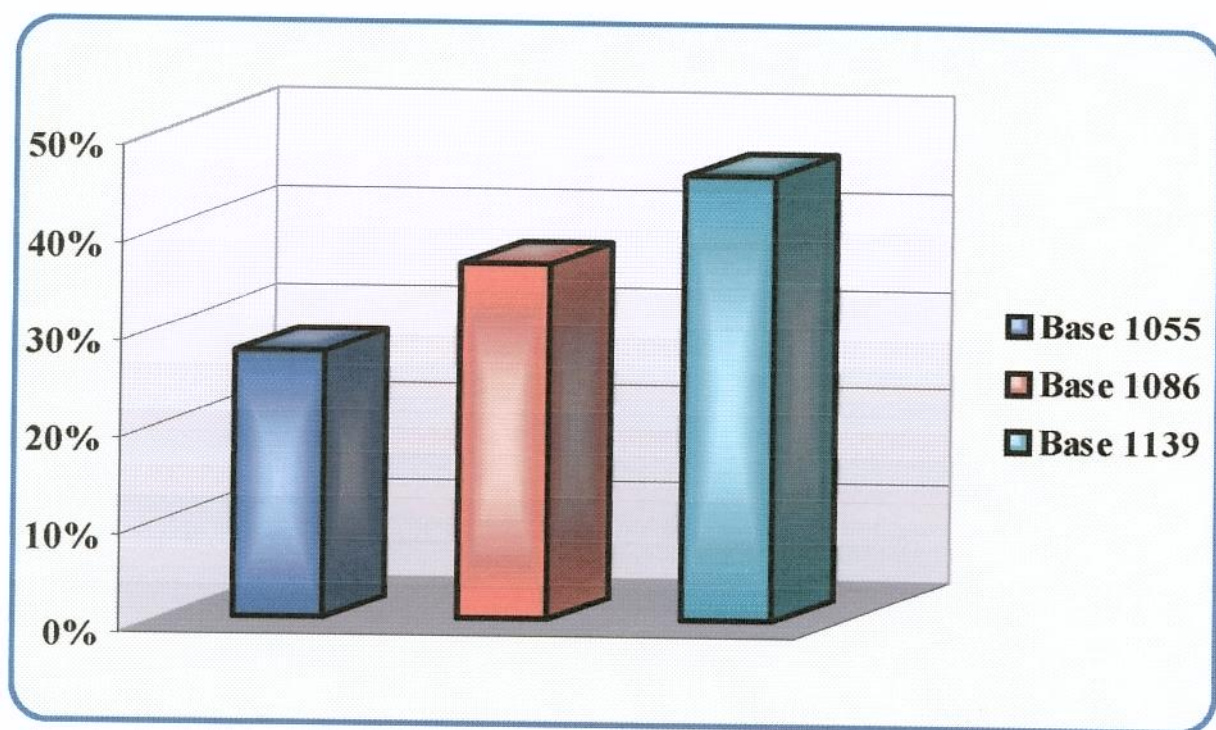


Gráfico 02: Representação gráfica do percentual de detecção das variações nas bases 1055, 1086 e 1139 encontradas no sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 em pacientes com SK

5.8 Comparação entre o seqüenciamento direto descrito por Sanger e o seqüenciamento automatizado realizado no aparelho “ABI PRISM 310”

Foi realizado o seqüenciamento direto descrito pelo método de SANGER *et al*, (1977) para região ORF-26 do HHV-8 em algumas amostras e posterior comparação com os resultados obtidos no seqüenciador automático “ABI PRISM 310”. A análise comparativa demonstrou concordância de resultados.

A figura 14 representa o seqüenciamento automatizado no aparelho “ABI PRISM 310” e a figura 15 representa o seqüenciamento direto pelo método de SANGER *et al* (1977), realizados com a mesma amostra de um paciente (número 05) com sarcoma de Kaposi avaliado em nosso estudo. A seqüência de bases obtidas com o seqüenciamento automatizado (Figuras 14 e 15) foi idêntica à obtida com o seqüenciamento direto seguindo o método de Sanger (Figura 16).

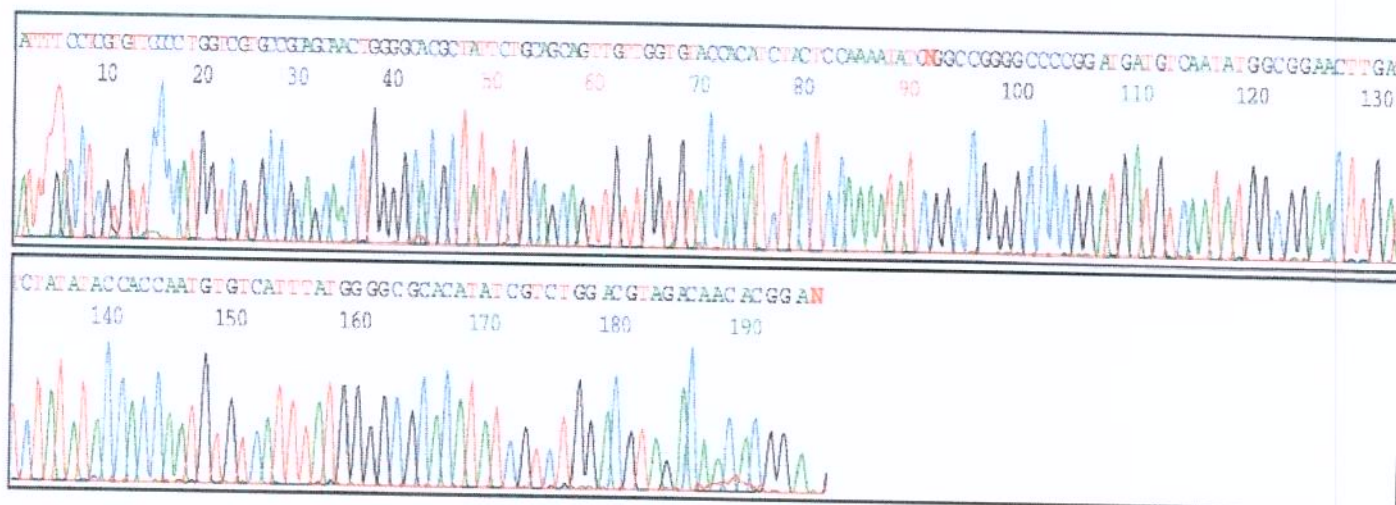


Figura 14: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" direto (KS-01)

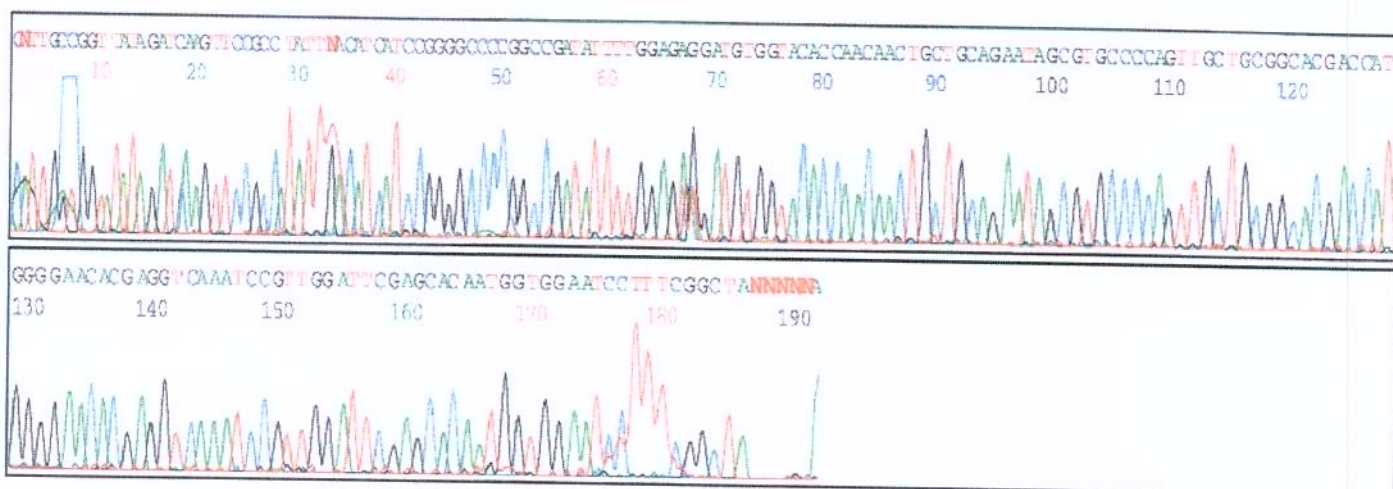


Figura 15: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 05) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 14, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 15 o "primer" reverso (KS-02).

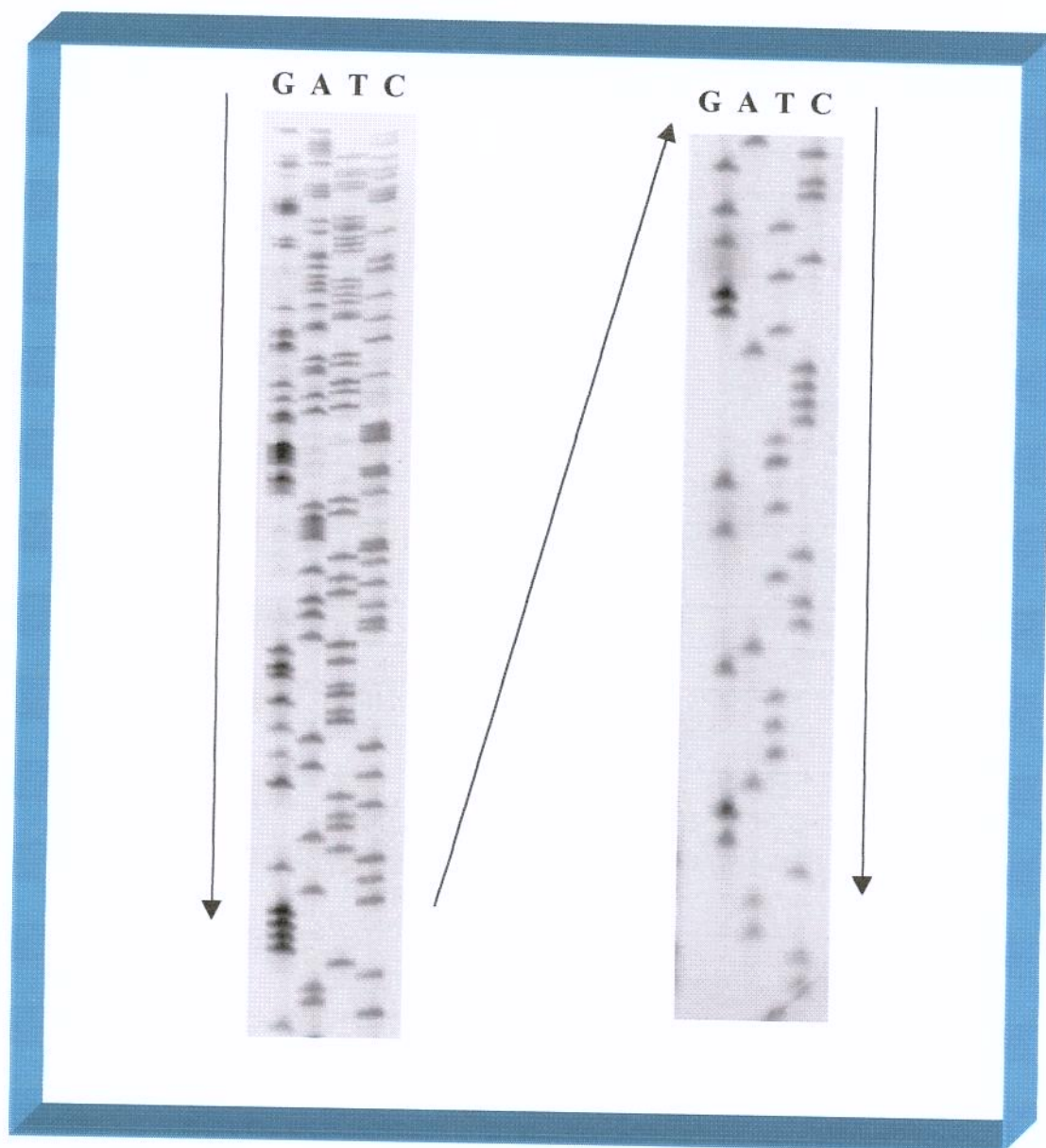


Figura 16 - Seqüenciamento direto, seguindo o método de Sanger. Seqüência de DNA da região ORF-26 do HHV-8 obtida com a análise da amostra (número 05) de um paciente com sarcoma de Kaposi. Na reação de seqüenciamento, foi utilizado o “primer anti-sense” KS-1. As setas indicam o sentido da leitura.

5.9 Prevalência do HHV-8 relacionado ao sexo, idade, estado civil, sexualidade, uso de drogas injetáveis, HIV e forma do SK no grupo de pacientes com sarcoma de Kaposi avaliados no presente estudo.

Todos os pacientes com sarcoma de Kaposi (11/11) avaliados no presente estudo pertenciam ao sexo masculino. A média de idade foi de 37 anos, variando de 27 a 79 anos. Com relação à sexualidade, a maioria referiu ser bissexual (05/11), seguido de homossexual (03/11) e heterossexual (03/11), (Gráfico 03). O estado civil que prevaleceu foi o de solteiro 81,8% (09/11), sendo 18,2% (02/11) casado. Apenas 9% (01/11) relatou o uso de drogas injetáveis. A presença do HIV foi verificada em 90,9% (10/11) dos casos, caracterizando uma maior prevalência do sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS. Foi verificado apenas um caso (01/11) com a forma clássica do sarcoma de Kaposi (Tabela 09).

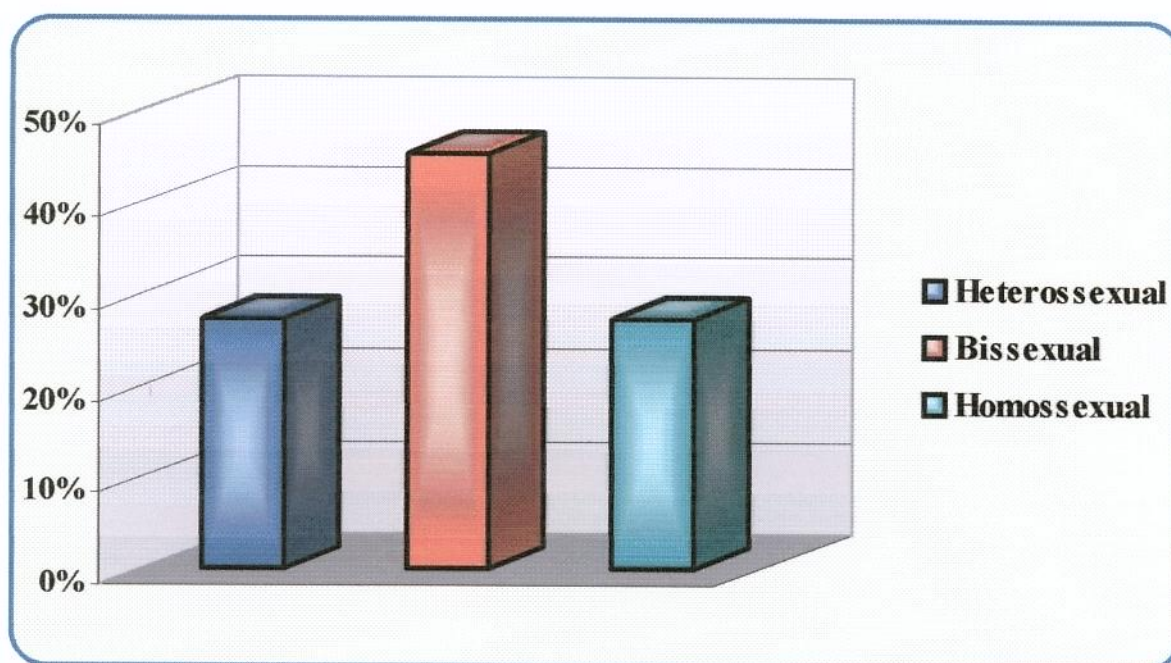


Gráfico 03: Frequência do HHV-8 com relação à opção sexual nos 11 pacientes com SK.

Tabela 09 – Informações gerais e dados clínicos coletados mediante análise de prontuários médicos e questionários aplicados aos pacientes com diagnóstico de sarcoma de Kaposi.

Nº Pac.	Sexo/idade	Estado civil	Sexualidade	HIV	UDI	Forma do SK
01	M / 33	Solteiro	Homossexual	+	Não	Associado a AIDS
02	M / 42	Solteiro	Homossexual	+	Não	Associado a AIDS
03	M / 29	Solteiro	Heterossexual	+	Sim	Associado a AIDS
04	M / 34	Solteiro	Bissexual	+	Não	Associado a AIDS
05	M / 36	Solteiro	Bissexual	+	Não	Associado a AIDS
06	M / 32	Solteiro	Homossexual	+	Não	Associado a AIDS
07	M / 32	Casado	Heterossexual	+	Não	Associado a AIDS
08	M / 36	Solteiro	Bissexual	+	Não	Associado a AIDS
09	M / 27	Solteiro	Bissexual	+	Não	Associado a AIDS
10	M / 31	Solteiro	Bissexual	+	Não	Associado a AIDS
11	M / 79	Casado	Heterossexual	-	Não	Clássica

Nº Pac - Número de identificação dos pacientes., SK - Sarcoma de Kaposi., M – Sexo masculino., HIV – Sorologia para o HIV., UDI - Usuário de drogas injetáveis.

5.10 Prevalência do mieloma múltiplo com relação ao sexo, à idade, ao estadiamento da doença e à detecção do HHV-8 em aspirado de medula óssea.

Dentre os 48 pacientes com MM avaliados no referido estudo detectou-se seqüência de DNA do HHV-8 em aspirado de medula óssea em apenas um caso (1/48). O paciente positivo para o HHV-8 pertencia ao sexo masculino, tinha 51 anos e foi classificado no estadio III (estadiamento do mieloma múltiplo), apresentando quadro de recidiva (Tabela 10).

Avaliando o grupo de pacientes com MM, verificou-se que 50% (24/48) dos casos pertenciam ao sexo feminino e 50%, ao sexo masculino. A média de idade no grupo foi de 56,5 anos (variando entre 29 e 78 anos). Com relação ao estadiamento da doença, não foi possível classificar 10 pacientes (10/48) devido à ausência de alguns exames essenciais para concluí-lo. Foram estadiados 79,2% (38/48) dos pacientes com MM. A maioria pertencia ao estadio IIIA - 47,36% (18/38), seguindo os estadios IIIB - 28,94% (11/38), IIA - 13,16% (05/38), IA - 7,89% (03/38) e IIB - 2,63% (01/38). (Tabela 10)

Tabela 10: Informações gerais e dados clínicos referentes aos pacientes com diagnóstico de MM.

Nº	Paciente	Sexo	Idade	Condição	Estadio	Data do diagnóstico	Data da coleta
01	C.A.A.	M	34	R	III B	29/05/98	10/03/99
02	M.R.	M	64	VT	III A	22/02/99	16/03/99
03	B.B.M.	M	51	R	III A	05/09/97	16/03/99
04	L.A.S.	F	51	R	III A	23/03/97	16/03/99
05	S.M.S.	F	63	VT	III B	09/04/99	13/04/99
06	M.L.S.	F	63	VT	III A	15/04/99	16/04/99
07	J.F.M.	M	53	VT	III A	31/03/99	04/05/99
08	T.T.	F	53	VT	II A	18/05/99	18/05/99
09	N.V.	M	53	R	II A	26/02/96	26/05/99
10	O.A.S.F.	M	70	VT	IA	07/06/99	02/07/99
11	S.J.S.	M	67	VT	III A	04/05/99	28/05/99
12	A.P.C.	M	70	R	III B	16/12/96	14/06/99
13	O.M.	M	78	R	NR	07/11/97	25/06/99
14	R.T.S.G.	F	42	R	IA	28/01/88	16/07/99
15	M.O.	F	41	R	IIIA	15/10/97	21/07/99
16	J.L.S.	M	69	VT	IIIB	22/07/99	23/07/99
17	A.P.O.	F	54	VT	NR	20/07/99	23/07/99
18	P.S.P.	M	69	R	IIIB	20/01/97	14/03/00
19	M.C.	M	68	R	IIIA	06/01/94	06/08/99
20	M.S.P.	F	58	R	IIA	07/01/98	17/08/99

Nº	Paciente	Sexo	Idade	Condição	Estadio	Data do diagnóstico	Data da coleta
21	C.G.G.	F	76	VT	IIIA	25/07/99	26/08/99
22	S.A.M.	F	43	VT	IIIB	26/08/99	26/08/99
23	V.A.O.	M	69	VT	IIB	27/10/99	27/10/99
24	V.M.J.	F	61	R	IIIB	26/03/99	01/09/99
25	J.C.S.	F	58	VT	NR	16/08/99	15/09/99
26	P.L.M.	M	49	VT	IIIB	21/09/99	21/09/99
27	J.C.S.	M	46	VT	IIIB	29/09/99	30/09/99
28	R.B.R.	F	76	R	IIIA	09/03/93	30/09/99
29	J.S.P.	F	60	VT	NR	15/11/99	17/11/99
30	J.A.A.	M	59	VT	IIIB	23/02/00	23/02/00
31	J.P.S.	F	53	VT	IIIA	11/11/99	24/11/99
32	M.M.S.	F	57	R	IA	17/12/90	24/11/99
33	O.P.	M	29	R	IIIA	24/08/98	01/02/00
34	M.A.S.D.	F	43	R	NR	12/11/99	04/02/00
35	M.P.	F	54	R	IIIA	20/03/98	08/02/00
36	D.L.A.	F	54	VT	NR	29/02/00	29/02/00
37	E.A.M.F.	M	46	R	IIA	13/04/98	14/03/00
38	W.R.S.	M	43	R	IIIA	21/02/95	06/07/00
39	M.R.B.M.	F	61	VT	NR	22/03/00	22/03/00
40	A.O.L.	F	48	VT	NR	17/05/00	18/05/00
41	M.T.S.M.	F	63	R	IIIA	29/10/97	26/04/00

Nº	Paciente	Sexo	Idade	Condição	Estadio	Data do diagnóstico	Data da coleta
42	I.S.S.	F	56	VT	IIIB	26/04/00	26/04/00
43	V.R.	M	49	VT	NR	02/05/00	02/05/00
44	M.A.L.	F	56	VT	IIIA	08/05/00	08/05/00
45	P.L.	M	61	R	IIIA	24/09/91	09/05/00
46	M.T.N.	M	64	VT	IIA	30/06/00	12/07/00
47	M.M.	M	43	VT	NR	10/05/00	26/07/00
48	J.F.R.	M	64	R	IIIA	28/01/97	26/07/00

M – Sexo masculino., F – Sexo feminino., VT – Virgem de tratamento para o mieloma múltiplo.,
R – Recidiva da doença. sem tratamento a pelo menos 3 meses., NR – Não realizado



Discussão

6. Discussão

O herpesvírus humano 8 (HHV-8) é o único membro do gênero *Rhadnovirus* a infectar humanos. Como os herpesvírus em geral, o HHV-8 pode permanecer latente no organismo manifestando-se em estados de imunossupressão como AIDS, terapia pós-transplante e tratamento quimioterápico (O'LEORY *et al*, 1997., LEVINE & ABLASHI, 1999).

A detecção universal de seqüências de DNA do HHV-8, aplicando-se a técnica de PCR-duplo, em variadas amostras biológicas de pacientes com todas as formas de sarcoma de Kaposi tem validado a hipótese de que o HHV-8 é o agente etiológico do SK (CATHOMAS *et al*, 1996; HUDNALL, *et al*, 1998., CATTANI *et al*, 1999; CUNHA *et al*, 2000). No presente estudo, verificou-se a presença de seqüências de DNA do HHV-8 em amostras de DNA extraído de biópsia de pele e de sangue periférico de pacientes com SK, utilizando o PCR-duplo para amplificação da região ORF-26 do genoma viral. Observou-se que o diagnóstico molecular do HHV-8 foi mais sensível para as amostras de DNA extraídas de biópsia de pele, no qual detectaram-se seqüências de DNA viral em todos os casos de SK (11/ 11). Em amostras de DNA extraído de sangue periférico, a positividade foi de 45,5% (5/ 11). Nossos dados, como o de outros autores (WHITBY *et al*, 1995., CATHOMAS *et al*, 1996., KENNEDY *et al*, 1998), indicam fortemente que o HHV-8 seja o agente etiológico do sarcoma de Kaposi.

A utilização de ensaios sorológicos, como ELISA e Imunofluorescência, demonstrou que pacientes infectados com o HHV-8 sintetizam anticorpos contra o HHV-8 (CHATLYNNE *et al*, 1998; MARTIN *et al*, 2000). A presença de anticorpos anti-HHV-8 em pacientes com SK foi verificada em cerca de 90 a 100% dos casos por vários autores (DAVIS *et al*, 1996., CHATLYNNE *et al*, 1998; MARTIN *et al*, 2000). O diagnóstico sorológico do HHV-8 em um grupo de pacientes HIV positivos, sem SK, e o acompanhamento desses pacientes revelou que aqueles com sorologia positiva para o HHV-8 desenvolveram o SK e os pacientes com sorologia negativa não tiveram essa

doença. (WHITBY *et al*, 1995) Com isso, verificou-se que os pacientes que desenvolveram o SK estavam previamente infectados com o HHV-8. A utilização do teste de Imunofluorescência Indireta para a detecção de anticorpos anti-HHV-8 foi aplicada neste estudo e verificou-se uma sorologia positiva em todas as amostras de soro dos pacientes com SK avaliados.

A genotipagem do HHV-8, através do seqüenciamento genômico, permitiu a classificação dos subtipos virais (DI ALBERT *et al*, 1997a e 1997b). DI ALBERT *et al* (1997b) analisaram variações nos aminoácidos 134 e 167 presentes na região ORF-26 do HHV-8 e descreveram cinco subtipos virais (A, B, C, D e E). A classificação dos subtipos do HHV-8 em variadas regiões geográficas revelou diferentes prevalências a depender da região estudada. Nos EUA e na África, prevalecem os subtipos A e D, na Itália e no Reino Unido prevalecem os subtipos B e C (DI ALBERT *et al*, 1997a). Em nosso estudo, foi seqüenciada a região da cápsula menor (ORF-26) do HHV-8, onde foi obtida uma seqüência de 233 pb. Foram analisadas amostras de biópsia à fresco de onze pacientes com sarcoma de Kaposi. Segundo os critérios de classificação de DI ALBERT ET AL (1997a e 1997b) verificamos a presença dos subtipos B e C, sendo a variante B mais freqüente que a C. Além das variações nucleotídicas nas posições que determinam a alteração dos aminoácidos e a caracterização dos subtipos, foram observadas variações nucleotídicas nas posições (base 1055, 1086 e 1139). Nossos resultados concordaram com CATERINO-DE-ARAUJO *et al* (1998), em pesquisa realizada na Itália, onde foram analisadas sete amostras de DNA extraído de biópsia de tecido embocado em parafina de pacientes brasileiros com SK, tendo sido encontrado os subtipos B e C do HHV-8, sendo também verificadas variações nos nucleotídeos 1055, 1086 e 1139. (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 1998). Essas variações podem representar o perfil epidemiológico da população brasileira infectada pelo HHV-8 e estarem associadas ao potencial de virulência dos subtipos virais circulantes em São Paulo.

As vias de transmissão do HHV-8 ainda não foram completamente elucidadas. A elevada prevalência do HHV-8 entre homossexuais e bissexuais do sexo masculino e a baixa prevalência em mulheres, usuários de drogas injetáveis e hemofílicos nos EUA e Europa, indicam a relação sexual e algumas práticas sexuais (sexo anal e contato oral-anal) como uma das principais vias de transmissão desse agente. Todos os casos de sarcoma de Kaposi avaliados em nosso estudo pertencem ao sexo masculino e a maioria (81,8 %), referiu ser homossexual ou bissexual, concordando com o descrito na literatura (LENNETTE *et al*, 1996; CATERINO-DE-ARAÚJO *et al*, 1999). Apenas dois casos (18,2 %) referiram ser heterossexuais. Um deles, casado, 78 anos, sem história de homossexualismo, promiscuidade, uso de drogas injetáveis ou transfusão sangüínea. O segundo caso, solteiro, 29 anos, sem história de homossexualismo ou transfusão sangüínea, relatou ser usuário de drogas injetáveis, com história de promiscuidade, referindo ter praticado sexo com inúmeras parceiras sem nunca ter feito uso de preservativo. Esses dois casos podem ter se infectado com o HHV-8 através do contato sexual natural, pelo uso de drogas injetáveis, ou uma outra via de transmissão não identificada.

Em algumas regiões da África, onde o HHV-8 é endêmico, grande parte da população está infectada com o HHV-8, incluindo crianças e adolescentes, sugerindo-se outras vias de transmissão como a transmissão vertical (WHITBY *et al*, 1999., LAMPINEN *et al*, 2000) ou através de secreções como saliva, secreção nasal, sêmen e secreção vaginal (BLACKBOURN, *et al*, 1998., LADUCA *et al*, 1998., CATTANI *et al*, 1999., WHITBY *et al*, 1999., SMITH *et al*, 1999). A presença de seqüências de DNA do HHV-8 em secreções de pacientes infectados pelo vírus, reforça a hipótese da transmissão através do contato com secreções contaminadas (LADUCA *et al*, 1998., CATTANI *et al*, 1999).

O HHV-8 também foi associado a algumas doenças proliferativas como a doença de Castleman multicêntrica (DCM), o linfoma primário de cavidades do corpo (BCBL), o linfoma

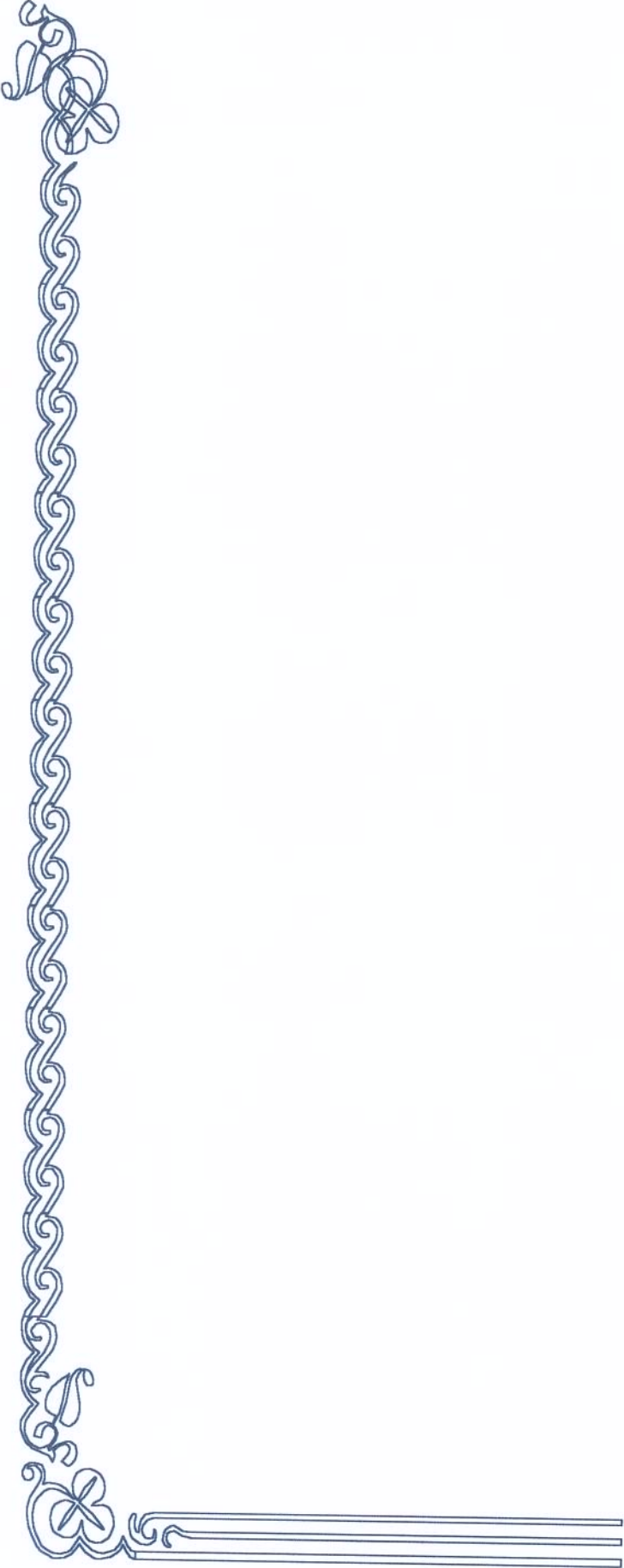
primário do sistema nervoso central e ao mieloma múltiplo. A detecção em 90 a 100% dos casos, de seqüências de DNA do HHV-8 em amostras de DNA extraído de biópsias de medula óssea, células dendríticas da medula óssea e células mononucleares do sangue periférico enriquecidas com CD 68 ou CD 83 de pacientes com mieloma múltiplo (RETTIG *et al*, 1997., SAID *et al*, 1997., SJAKSHIE *et al*, 1999a), fizeram surgir a hipótese de que o HHV-8 poderia ser o agente etiológico do mieloma múltiplo. No entanto, vários pesquisadores tentaram reproduzir os trabalhos publicados pelos autores que detectaram seqüências de DNA do HHV-8, estudando amostras de DNA extraído de biópsias de medula óssea, de células dendríticas da medula óssea e de células mononucleares do sangue periférico enriquecidas com CD 68 ou CD 83, além de aspirados de medula óssea e produtos de leucoafereses de pacientes com MM (CULL *et al*, 1998., TISDALE *et al*, 1998., YI *et al*, 1998., BELLOS *et al*, 1998., MITTERER *et al*, 1998., SCHONRICH *et al*, 1998., TARTE *et al*, 1998., GREEF *et al*, 1999., RASK *et al*, 2000., RASMUSSEN *et al*, 2000) e obtiveram resultados incompatíveis com os descritos pelos referidos autores, não encontrando seqüências de DNA do HHV-8 ou detectando-as em percentual insignificante de casos de MM. Nós avaliamos amostras de DNA extraído de aspirado de medula óssea de 48 pacientes com diagnóstico de MM e detectamos a seqüência de DNA do HHV-8 em apenas uma das amostras (01/48). Nossos achados, assim como outros (CULL *et al*, 1998., MITTERER *et al*, 1998, TARTE *et al*, 1998., GREEF *et al*, 1999., RASK *et al*, 2000., RASMUSSEN *et al*, 2000) concordam que o HHV-8 possa ocasionalmente infectar biópsias e aspirados de medula óssea, não sendo esta uma condição obrigatória para o desenvolvimento ou a progressão do mieloma múltiplo. Portanto, a associação entre o HHV-8 e o mieloma múltiplo ainda é uma questão a ser esclarecida.

Pesquisas realizadas em diversas partes do mundo vêm fornecendo dados epidemiológicos que demonstram uma variada distribuição do HHV-8 na população geral. Em algumas regiões da África, a prevalência do HHV-8 na população geral chega a ser maior que 50%, como em Uganda e

Nigéria (LENNETTE *et al*, 1996., MOORE, 2000). Nos EUA, Reino Unido, e na Europa Central, Norte e Oeste, a prevalência do HHV-8 varia entre menos que 3 a 10% com algumas diferenças regionais, sendo mais freqüente nos países do mediterrâneo como Itália e Grécia (4 - 35%) (SCHULZ & MOORE, 1999., MOORE, 2000). A freqüência do HHV-8 em crianças das regiões endêmicas da África tem variado entre 39 a 48%. Em Zâmbia o SK constitui cerca de 20-25% de todos os casos de neoplasias malignas pediátricas (ATHALE *et al*, 1995). Nos EUA, a freqüência do HHV-8 em crianças varia entre 2 e 8%, bem menor que o percentual encontrado na África (LENNETTE *et al*, 1996). No Brasil, CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, (1999) encontraram uma soroprevalência de 7,4% (6 / 81) na população geral (doadores de sangue) e de 16% (13 / 81) em um grupo de pacientes portadores do HIV que residem no estado de São Paulo. Na Amazônia, um estudo realizado em várias tribos indígenas que habitam essa região mostrou resultados impressionantes. Foi realizado estudo com amostras de soro e DNA extraído de sangue periférico dos índios da região amazônica, aplicando-se a Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 e o PCR-duplo para detecção de seqüências de DNA do HHV-8 (região ORF-26). A soroprevalência do HHV-8 em 781 índios foi de 53% e o diagnóstico molecular, avaliando 19 amostras de DNA extraído de sangue periférico foi positivo em três casos (16%) (BIGGAR *et al*, 2000). Nós avaliamos amostras de DNA extraído de sangue periférico de 145 doadores de sangue, utilizando o PCR-duplo e observamos que não houve amplificação de seqüências de DNA do HHV-8 nas amostras analisadas.

Desde a descoberta do HHV-8, variadas doenças proliferativas foram associadas a esse novo vírus. Inúmeras publicações, em distintas regiões geográficas, têm confirmado a associação entre o HHV-8 e todas as formas do sarcoma de Kaposi, do linfoma primário de cavidades do corpo e da doença de Castleman multicêntrica (ALLAIN, 2000., CESARMAN & KNOWLES, 1999., MESRI *et al*, 1996., SAID *et al*, 1996).

A alta prevalência do HHV-8 na África e em alguns países do sul da Europa comparada à baixa frequência na população geral de outros países tem demonstrado uma distribuição geográfica diferenciada do vírus, bem como dos diferentes subtipos descritos. Com isso, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas científicas em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, a fim de se estudar os subtipos circulantes, as prováveis vias de transmissão, bem como o verdadeiro papel desse vírus na patogênese das diversas doenças neoplásicas, às quais vem sendo associado.



Conclusões

7 Conclusões

7.1 Para o diagnóstico do HHV-8 a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 no soro (imunofluorescência indireta) mostrou ser mais sensível que a detecção de seqüências de DNA do HHV-8 no sangue periférico (PCR-duplo). A detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em biópsia de lesão sarcomatosa (PCR-duplo) foi tão sensível quanto o diagnóstico sorológico (Imunofluorescência Indireta). Os dados deste trabalho, concordam com os dados da literatura que, indicam o HHV-8 como o agente causal do sarcoma de Kaposi devido a detecção de seqüências de DNA e de anticorpos anti-HHV-8 em amostras biológicas provenientes dos pacientes com SK avaliados no presente estudo.

7.2 Nas amostras estudadas foi possível identificar os subtipos B e C do HHV-8, dentre os cinco subtipos virais já descritos, com maior percentual do subtipo B.

7.3 Detectou-se seqüências de DNA do HHV-8 em aspirado de medula óssea em um caso de 48 paciente com mieloma múltiplo investigados no presente estudo. Os dados obtidos sugerem que o HHV-8 não tem um papel fundamental no surgimento ou no desenvolvimento do mieloma múltiplo. Entretanto, não foi possível descartar a hipótese de que o vírus 8, em casos ocasionais, possa infectar aspirados de medula óssea e contribuir para o desenvolvimento da neoplasia.

7.4 Não foram detectadas seqüências de DNA do HHV-8 nas amostras de doadores de sangue do Hemocentro. Contudo, estima-se que a presença do HHV-8 entre os doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp seja baixa.



Summary

Summary

Human herpesvirus 8 (HHV-8), or Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV), was identified in 1994 by Yuan Chang *et al* in skin biopsies from patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) related Kaposi's sarcoma. HHV-8 belongs to *Herpesviridae* family, *Gamaherpesvirinae* subfamily and *Radinovirus* genus, the only one from this genus which infects humans. Its ultrastructure is similar to other herpesvirus, presenting DNA-sequence homologies to two gamaherpesvirus: Epstein Bar Virus (EBV) and Herpesvirus Saimiri (HSV), both oncogenic.

Later studies associated HHV-8 to all forms of Kaposi's sarcoma (KS): classic, endemic, AIDS related and transplant related, besides other lymphoproliferative diseases, related or not to AIDS, as primary effusion lymphoma (PEL), primary central nervous system lymphoma (PCNSL), Castleman's disease (CD) and multiple myeloma (MM).

We analyzed DNA samples of skin biopsies and peripheral blood from 11 patients with Kaposi's sarcoma, DNA samples of bone marrow aspirate from 48 multiple myeloma patients, and DNA samples of peripheral blood from 145 blood donors. Using "Nested-PCR" to amplify the ORF-26 region of HHV-8 genome, we identified DNA sequences in all DNA samples of skin biopsies, in 45,5% of DNA samples of peripheral blood from KS patients and in one DNA sample from bone marrow aspirate of multiple myeloma patients. HHV-8 DNA sequences were not detected in 145 DNA samples from blood donors.

HHV-8 genotyping through DNA sequences allowed viral classification into five subtypes described by Di Albet *et al* (1997) named A, B, C, D and E. Epidemiological studies showed that different geographic regions present different frequencies of these HHV-8 subtypes. Analysing

eleven DNA samples from skin biopsies of Kaposi's sarcoma patients, we showed 73% of subtype B and 27% subtype C. We also found other nucleotides variations in bases 1055, 1086 and 1139.

Among serologic methods to detect anti-HHV-8 antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent assay (IF) are mostly used. We used IF to search for anti-HHV-8 antibodies, which was positive in all serum samples of Kaposi's sarcoma patients.

Our study allowed molecular techniques standardization for HHV-8 DNA detection and sequencing, and IFI assay for detection of anti-HHV-8 antibodies. It also found HHV-8 frequency in KS patients, MM patients and blood donors, besides determining its subtypes.



Ref. Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

- ALLAIN, J. P. – Emerging viral infections relevant to transfusion medicine. – *Blood* **14**: 173-181, 2000.
- ARIYOSHIK, K., SCHIM VAN DER LOEFF, M., COOK, P., WHITBY, D., CORRAH, T., JAFFAR, S., CHAM, F., SABALLY, S., O'DONOVAN, D., WEISS, R. A., SCHULZ, T. F., WITTLE, H. - Kaposi's sarcoma in the Gambia, west Africa is less frequent in human immunodeficiency virus type 2 than in human immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of human herpesvirus 8. *Journal. Hum. Virol.*, **1(3)**: 193-199, 1998.
- ASCHERL, G., HOHENADL, C., MONINE, P., ZIETZ, C., BROWNING, P., ENSOLI, B., STURZL, M. - Expression of human herpesvirus-8 (HHV-8) encoded pathogenic genes in Kaposi's Sarcoma (KS) primary lesions. -. *Advances in Enzyme Regulation*; **39**: 331-339, 1999.
- ATHALE UH, PATIL PS *et al.* Influence of HIV Epidemic on the Incidence of Kaposi's Sarcoma in Zambia Children. *Journal of Acquired Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*; **8**: 96-100, 1995.
- AVELLEIRA, J. C. R., LUPI, O. – “Infecção pelo Herpesvírus Humano 8” – In LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. – *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda., Cap. **12**: 203-219, 2000.
- BART, B. - "Plasma cell myeloma" - In BEUTLER, E., LICHTMAN, M. A., COLLIER, B. S., KIPPS, T. J. - *Williams Hematology*, 5th, McGraw Hill, **114**: 1109 - 1123, 1995.

- BECK, R., NEIPEL, F., CANJI, B., HEBART, H., KANZ, L., JAHN, G. & EINSELE, H. Absence of human herpesvirus 8 DNA sequences in leucapheresis products in bone marrow samples of patients with advanced multiple myeloma. *Br. J. Hematol*, **109**, 671-678, 2000.
- BELLOS, F., CREMER, F. W., EHRBRECHT, E., GOLDSCHMIDT, H., MOOS, M. – Leukapheresis cells of patients with multiple mieloma collected after mobilization with chemotherapy and G-CSF do not bear Kaposi's sarcoma associated herpesvirus DNA. – *British Journal of Hematology*; **103**: 1192-1197, 1998.
- BERTI, E., MARZANO, A., DECLEVA, I., BESTSTTI, G., PIZZUTO, M., POIREL, L., CAPRA, M., PARRAVICINI, C., CORBELLINO, M. – Simultaneous onset of primary cutaneous B-cell lymphoma and herpesvirus 8-associated Kaposi's sarcoma. – *British Journal of Dermatology*, **136**: 924-929, 1997.
- BIGGAR R, WHITBY D, MARSHALL V *et al* - Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians hiperendemic population with a new subtype. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 1562-1568, 2000.
- BLACKBOURN, J. D., LENNETTE, E. T., Ambroziak J., Mourich, D. V., Levy, J. A. - Human Herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *Journal of Infectious Diseases*, **177**: 213-216, 1998.
- BLACKBOURN, J. D., OSMOND, D., LEVY, J. A., LENNETTE, E. T., - Increased Human Herpesvirus 8 seroprevalence in Young Homosexual Men who Have multiple sex contacts with different partners. *Journal of Infectious Diseases*, **179**: 237-239, 1999.

- BLACKBOURN, D., AMBROZIAK, J., LENNETTE, E., ADAMS, M., RAMACHANDRAN, B. – Infection human herpesvirus 8 in healthy North American blood donor. – *Lancet*, **349**: 609-611, 1997.
- BORALEVI F, MASQUELIER B, DENAYROLLES M et al. Study of Herpesvirus 8 (HHV-8) Variants from Kaposi's Sarcoma in France: Is HHV-8 Subtype A Responsible for More Aggressive Tumors? *The Journal of Infectious Diseases*; **178**:1546-7, 1998
- BURGER, R., NEIPEL, F., FLECKENSTEIN, B., SAVINO, R., CILIBERTO, G., KALDEN, J.R. & GRAMATZKI, M. Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood*, **91**, 1858-1863, 1998.
- CANNEL, C., MITTNACHT, S. – Viral encoded cyclins. *Cancer Biology*, **9**: 221-229, 1999.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A. – Human Herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brasil. - *Journal of Infectious Diseases*; **177**:1136-1137, 1998
- CATERINO-DE-ARAUJO, A, CALABRO, M. L., SANTOS-FORTUNA, E., SULEIMAN, J., CHIECO-BIANCHI, L. - Searching for Human Herpesvirus 8 Antibodies in Serum Sample from patients Infected with Human immunodeficiency Virus Type 1 and Blood Donors from São Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*; **179**:1591-92, 1999.
- CATHOMAS, G., MC GANDY, C. E., TERRACIANO, L. M., ITIN, P. H., De ROSA, G., GUDAT, F. - Detection of herpesvirus-like DNA by nested PCR on archival skin biopsy specimens of various forms of Kaposi sarcoma - *J Clin Pathol*, **49**: 631-633, 1996.
- CATTANI, P., CAPUANO, M., CERIMELE, F., PAROLA, I. L., SANTANGELO, R., MASINE, C., CERIMELE, D., FADDA, G. – Human Herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of

- nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from Human Immunodeficiency virus- soronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's sarcoma. – *Journal of Clinical microbiology* **37** (4) : 1150-1153, 1999.
- CESARMAN, E., KNOWLES, D. M. – The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/ HHV-8) in lymphoproliferative diseases. *Cancer Biology*, **9**: 165-174, 1999.
- CHATLYNNE, L. G., LAPPS, W., HANDY M., HUANG, Y. Q., MASOOD, R., HAMILTON, A. S., SAID, J. W., KOEFFER, H. P., KAPLAN, M. H., FRIEDMAN-KIEN, A., GILL, P. S., WHITMAN, J. E., ABLASHI, D. – Detection and titration of Herpesvirus 8 – specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's Sarcoma patients using whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. – *Blood*, **92**: 53-58, 1998.
- CHATLYNNE, L. G., ABLASHI, D. V. – Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). – *Cancer Biology*, **9**: 175-185, 1999.
- CHAUHAN, D., BHARTI, A., RAJE, N., GUSTAFSON, E., PINKUS, G. S., PINKUS, J. L., TEOH, G., HIDESHIMA, T., TREON, S. P., FINGEROTH, J. D., ANDERSON, K. C. – Detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus DNA sequences in multiple myeloma bone marrow stromal cells. *Blood*, **93**: 1482-1486, 1999.
- CHANG, Y., CESARMAN, E., PESSIN, M.S., ET AL – Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **266**:1965-1969, 1994.
- COSTA, F. F., COSTA, S. C. B. - Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. - *Rev. Bras. Reumatol*, **32** (2): 142-146, 1992.

- CULL, G. M., TIMMS, J. M., HAYNES, N. H., RUSSELL, N. H., IRVING, W. L., BALL, J. L., THOMSON, B. J. – Dendritic cells cultured from mononuclear cells and CD34 cells in myeloma do not harbor human herpesvirus 8. *British Journal of Haematology*, **100**: 793-796, 1998.
- CUNHA, A. M. G., COSTA, F.F., PEDRO, R. J., COSTA, S.C.B. - Detecção do Herpesvírus Humano Tipo 8 em pacientes com sarcoma de Kaposi. *Rev. Bras. de Clínica & Terapêutica*, **36 (5)**: 171-174, 2000.
- DAVIS, D. A., HUMPHREY, R. W., NEWCOMB, F. M., O'BRIEN T. R., GOEDERT, J. J., STRAUS, S. E., YARCHOAN, R. – Detection of Serum Antibodies to a Kaposi's Sarcoma – Associated Herpesvirus Specific Peptide. – The Journal of Infectious Diseases, **175**: 1071-9, 1996.
- DI ALBERT, L., NGUI, S. L., PORTER S. R., SPEIGHT, P. M., SCULLY, C. M., ZAKREWSKA, J. M., WILLIAMS, I. G., ARTESE, L., PIATHELLI, A., TEO, C. G. - Presence of Human Herpesvirus 8 variants in the Oral Tissues of Human Immunodeficiency Virus – Infected Persons. *The Journal of Infectious Diseases* **175**:703-7, 1997a.
- DI ALBERT, L., PIATTELLI, A., ARTESE, L., FAVIA, G., PATEL, S., SAUNDERS, N., PORTER, S. R., SCULLY, C. M., NGUI, S., TEO, C. - Human Herpesvirus 8 variants in sarcoid tissues. *The Lancet*, **350**: 1655-61, 1997b.
- DUPIN, N., DISS, T. L., KELLAN, P., TULLIEZ, M., DU, M. Q., SICARD, D., WEISS, R. A., ISAACSON, P. G., BOSHOFF, C. – HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8 positive plasmablastic lymphoma. – *Blood*, **95**: 1406-1412, 2000.

- DUPIN, N., FRANCK, N., CALVEZ, V., GORIN, I., GRANDADAM, M., HURAUX, M., LEIBOWITCH, M., AGUT, H., ESCANDE, J. P. – Lack of evidence of human herpesvirus 8 DNA sequence in HIV-negative patients with various lymphoproliferative disorders of the skin. *British Journal of Dermatology*, **136**: 827-830, 1997.
- ENSOLI, B., STURZL, M., MONINI, P. – Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. – *Seminars in Cancer Biology*, **10**: 367-381, 2000.
- FARAH, S. B. - "DNA no diagnóstico das doenças humanas- Reação em Cadeia da Polimerase". DNA Segredos e Mistérios, ed. Sarvier, Cap 5: 121-125, 1998.
- FLETCHER, R. H., FLETCHER, S. W., WAGNER, E. H. – Epidemiologia Clínica, 2ª ed, editora Artes Médicas, cap. 3: 68-108, 1991.
- FONSECA, B. A. L., BOLLELA, V. R., NETO, R. J. P. – Sarcoma de Kaposi e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: Características desta associação, incluindo novos conceitos sobre patogênese e tratamento. – *Medicina- Ribeirão Preto*, **32**: 26-39, 1999.
- GADO, K., DOMJAN, G., HEGYESI, H., FALUS, A. – Role of interleucina-6 in the pathogenesis of multiple mieloma. – *Cell Biol Int*, **24** (4): 195-209, 2000.
- GAIDANO, G., CAPELLO, D., PASTORE, C., ANTINORI, A., GLOGHINI, A., CARBONE, A., LAROCCA, L. M., SAGLIO, G. – Analysis of Human Herpesvirus Type 8 Infection in AIDS-Related and AIDS-Unrelated Primary Central Nervous System Lymphoma. – *The Journal of infections diseases*, **175**:1193-1197, 1997.

- GAIDANO, G., PASTORE, C., GLOGHINI, A., CUSINI, M., NONDEDÉU, J., VOLPE, G., CAPELLO, D., VACCHER, E., BORDES, R., TIRELLI, U., SAGLIO, G., CARBONE, A. – Distribution of human herpesvirus-8 sequences throughout the spectrum of AIDS-related neoplasm. – *AIDS*, **10**: 941-949, 1996.
- GREEF, C., VOORD, W., BAKKUS, M., CORTHALS, J., HEIRMAN, C., SCHOTS, R., LACOR, P., CAMP, B., RIET, I. – Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) DNA sequences are absent in leukapheresis products and *ex vivo* expanded CD34+ cells from multiple myeloma patients. – *British Journal of Hematology*, **106**: 1033-1036, 1999.
- GRIFFITHS, AA. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LE WONTIN, R. C., GELBAR, W. M. – "Polimerase Chain Reaction". *An Introduction to Genetic Analysis*, 7 th - FREEMAN ed., **12**: 390, 2000.
- HUDNALL DS et al. - Human Herpesvirus 8 Activation in Renal transplant Recipients. - *The Journal of Infectious Diseases* **178**: 1791-1794, 1988.
- JELINEK, D. F. - "Mechanisms of myeloma cell growth control" - In Kyle, R. A., Gertz, M. AA. - Hematology / Oncology Clinics of North America, **13(6)**: 1145-1148, 1999.
- KENNEDY, M. M., COOPER, K., PICTON, S., BIDDOLPH, S., LUCAS, S. B., O'DMCGEE, J., O'LEARY, J. J. – Identification of HHV-8 in early Kaposi's sarcoma: implications for Kaposi's sarcoma pathogenesis. – *J Clin Pathol:Mol Pathol*, **51**:14-20, 1998.
- KWOK, S., HIGUCHI, R. - Avoiding false positive with PCR. - *Nature*, **339**: 237 - 238, 1989.

- LACOSTE, V., JUDDE, J. G., BRIERE, J., TULLIEZ, M., GARIN, B., KASSA-KELEMBHO, E., MORVAN, J., COUPPIÉ, P., CLYTI, E., VILA, J. F., DELMER, A., MAUCLERE, P., GESSAIN, A. – Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in Africa: Both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/ K15 loci, are frequent and widespread. *Virology*, **278**: 60-74, 2000.
- LADUCA, J. R., LOVE, J. L., ABBOTT, L. Z., DUBE, S., FREIDMAN-KIEN, A. E., POIESZ, B. J. - Detection of Human Herpesvirus 8 sequences in tissues and bodily fluids. - *Journal of Infectious Diseases* **178**: 1610-1615, 1988.
- LAMPINEN, T. M., KULASINGAM, S., MIN, J., BOROK, M., GWANZURA, L., LAMB, J., MAHOMED, K., WOELK, G. B., STRAND, K. B., BOSCH, M. L., EDELMAN, D. C., CONSTANTINE, N. T., KATZENSTEIN, D., WILLIAMS, M. A. - Detection of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus in oral and genital secretions of Zimbabwean women. *Journal of Infectious Diseases* **181**: 1785-1790, 2000.
- LENNETTE, E. T., BLACKBOURN, D. J., LEVY, J. A. – Antibodies to human herpesvirus type 8 in general population and Kaposi's sarcoma patients. – *Lancet*, **348**: 858-861, 1996.
- LEVINE, P. H., ABLASHI, D. V. – An etiologic perspective of the new Herpesviruses: HHV-7 and HHV-8. *Infect Med*, **16** (1) : 24-34, 1999.
- LIN, J. – Pathogenesis of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8. – *Infections in Medicine*, **5** (4) : 264-272, : 1998.

- LUPPI, M., BAROZZI, P., MARASCA, R., SAVARIANO, M., TORELLI, G. – HHV-8 associated primary cerebral B-cell lymphoma in HIV-negative patient after long-term steroids. *The Lancet*, **347**: 980, 1996.
- MAYAMA, S., CUEVAS, L. E., SHELDON, J., OMAR, O. H., SMITH, D. H., OKONG, P., SILVEL, B., HART, C. A, SCHULZ, T. F. - Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) in Uganda children and adolescents. *Int. J. Cancer*, **77(6)**: 817-820, 1998.
- MARTIN, J. N., GANEM, D. E., OSMOND, D. H., PAGE-SHAFER K. A., DON MACRAE, KEDES, D. H. – Sexual Transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection – *the New England Journal of Medicine*, **338**: 948-954, 1998.
- MARTIN, J. N., OSMOND, D. H. – Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and sexual transmission of cancer risk – *Curr. Opin. Oncol*, **11(6)**: 508-515, 1999.
- MARTIN, J. N., AMAD, Z., COSSEN, C., LAM, P. K., KEDES, D. H., PAGE-SHAFER K.A., OSMOND, D. H., FORGHANI, B. – Use of epidemiologically well-defined subjects and existing immunofluorescence assays to calibrate a new enzyme immunoassay for Human Herpesvirus 8 antibodies. – *Journal of Clinical Microbiology*, **38 (2)** :696-701, 2000.
- MEMAR, O. M., RADY, P. L., GOLDBLUM, R.M., YEN, A., TYRING, S. K. – Human herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with penphigus. *Arch Dermatol*, **133**: 1247-1251, 1997.

- MESRI, E. A , CESARMAN, E., ARVANITAKIS, L., RAFII, S., MOORE, M. A. S., POSNETT, D. N., KNOWLES, D. M., ASCH, A. S. – Human Herpesvirus-8 / Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J. Exp Med.*, **183**: 2385-2390, 1996.
- MITTERER, M., MAIR, W., GATTI, D., SHELDON, J., VACHULA, M., COSER, P., SCHULTZ, T. F. – Dendritic cells derived from bone marrow and CD34+ selected blood progenitor cells of myeloma patients, cultured in serum-free media, do not contain the Kaposi sarcoma herpesvirus genome. – *British journal hematology*, **102**: 1338-1340, 1998.
- MONINI, P., LELLIS, L., FABRIS, M., RIGOLIN, F., CASSAI, E. – Kaposi's Sarcoma – Associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen.- *The New England Journal of Medicine*, **334** (18):1168-72, 1996.
- MOORE, P. S., KINGSLEY, L. A., HOLMBERG, S. D., SPIRA, T., GUPTA, P., HOOVER, D. R., PARRY, J. P., CONLEY, L. J., JAFFE, H. W., CHANG, Y. – Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. – *AIDS*, **10**: 175-180, 1996.
- MOORE, P. S. – The emergence of Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) – *The New Eng. J. of med.* – **343** (19): 1411-13, 2000.
- NEIPEL, F., FLECKENSTEIN, B. – The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma. – *Seminars in Cancer Biology*, **9**: 151-164, 1999.
- O'LEARY, J., KENNEDY, M. M., O'D MCGEE, J. – Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV / HHV-8): epidemiology, molecular biology and tissue distribution. – *J Clin Pathol*, **50**: 4-8, 1997.

- O'LEARY, J. J., SILVA, I., UHLMANN, V., PRASAD, M., LUTTICH, K., MAFFEI, A., PICTON, S. – HHV-8 in multiple myeloma: is this the first paracrine model of human tumorigenesis and do Koch's postulates apply? – *J Clin Pathol:Mol Pathol*, **51**: 201-203, 1998.
- PASTORE, C., GLOGHINI, VOLPE, G., NOMDEDEU, J., LEONARDO, E., MAZZA, U., SAGLIO, G. – Distribuição of Kaposi's sarcoma herpesvirus sequences among lymphoid malignancies in Italy and Spain – *British Journal of Hematology*, **91**: 918-920, 1995.
- PAUK, J., HUANG, M., BRODIE, S. J., WALD, A., KOELLED. M., SCHACKER, T., CELUM, C., SELKE, S., COREY, L. – Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. – *The New Eng. J. of Med.*, **343** (19): 1369-77, 2000.
- PERNA, A. M., BONURA, F., VATALE, F., VIVIANO, E., DI BENEDETTO, M. A., AJELLO, F., VILLAFRATE, M. R., PRESTILEO, T., MANCUSO, S., GOEDERT, J. J., ROMANO, N. *Int. j. Epidemiol* **29**(1): 175-179, 2000.
- PLANCOULAIN, S., ABEL, L., VAN BEVEREN, M., TREGOUET, D. A., JOUBERT, M., TORTEVOYE, P., DE THE, G., GESSAIN, A. - Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. - *Lancet*, **365**(9235): 1062-1065, 2000.
- RASK, C., KELSEN, J., OLESEN, G., NIELSEN, J. L., OBEL, N., ABILDGAARD, N.. Danish patients with untreated multiple myeloma do not harbor human herpesvirus 8. *British. Journal. Hematology*, **108**(1), 96-98, 2000.

- RASMUSSEN, T., DAHL, I. M., JENSEN, L., JOHNSEN, H. E. – CD68+/ CD83+/ CD1a-dendritic cell subsets from patients with multiple myeloma are not infected with human herpesvirus 8. – *Med Oncol*, **17** (3) : 189-194, 2000.
- REGAMEY, N., TAMM, M., WERNLI, A., THIEL, G., CATHOMAS, G., ERB, P. – Transmission of Human Herpesvirus 8 infection from renal transplant donors to recipients. - *The New England Journal of Medicine*, **339** (19):1358-63, 1998.
- RENNE, R., ZHONG, W., HERNDIER, B., MCGRATH, M., ABBEY, N., KEDES, D., GANEM, D. – Lytic growth of Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. – *Nature Medicine*, **2** (3): 342-346, 1996.
- RETTIG, M. B., Ma, H. J., VESCIO R. A., PÖLD, M., SCHILLER, G., BELSON, D., SAVAGE, A., NISHIKUBO, C., WU, C., FRASER, J., SAID, J. W., BERENSON, J. R. – Kaposi's sarcoma – Associated Herpesvirus Infection of Bone Marrow Dendritic Cell from Multiple Myeloma Patients. *Science*, **276**: 1851-1854, 1997.
- ROIIT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. - "Técnicas Imunológicas" - *Imunologia*, 1ª ed. Bras., editora Manole LTDA, Cap: **29**: 381 - 387, 1999.
- RUSSO, J. J., BOHENZKY, R. A., CHIEN, M., CHEN, J., YAN, M., MADDALENA, D., PARRY, J. P., PERUZZI, D., EDELMAN, I. S., CHANG, Y., MOORE, P. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 14862-14867, 1996.
- SAIKI, R. K., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIN, N. – Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**:1350-1354, 1985.

- SAID, J. W., TAKEUCHI, S., TASAKA, T., ASOU, H., CHO, S., VOS, S., CESARMAN, E., KNOWLES, D. M., KOEFFLER, H. P. – Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus (KSHV or HHV-8) in primary effusion lymphoma: Ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cell. *Blood*, **87**:4937, 1996.
- SAID, J. W., RETTIG, M. R., HEPPNER K., VESCIO, R. A., SCHILLER, G., HONG, J. M. BELSON, D., SAVAGE, A., SHINTAKU, P., KOEFFLER, H. P., ASOU, H., PINKUS, J., SCHRAGE, M., GREEN, E., BERENSON, J. R. – Localization of Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus in bone marrow biopsy samples from patients with multiple myeloma. – *Blood*, **90** (11): 4278-4282, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. – *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, Laboratory, 1989.
- SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A. R. – DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings Natl. Academy Science, USA*, **74**: 5463-5467, 1977.
- SARID, R., FLORE, O., BOHENZKY, R. ^a, CHANG, Y., MOORE, P. – Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). – *Journal of Virology*, **72** (2): 1005-1012, 1998.
- SCHONRICH, G., RAFTERY, M., SCHNITZLER, M., SCHNITZLER, P., ROHR, U., GOLDSCHMIDT, H. – Absence of a correlation between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/ HHV-8) and multiple myeloma. – *Blood*, **92** (9): 3474-3491, 1998.
- SCHULZ T. F., MOORE P. S. - Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new human tumor virus, but how?. *Trends in microbiology*, **7**:196-200, 1999.

- SCOTT, L.L.; HOLLIER, L.M.; DIAS, K. – Perinatal Herpesvirus Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, **11**: 27-53, 1997.
- SILVA, A.G. – Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. – *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda., Cap. 1: 01-14, 2000.
- SJAK-SHIE, N.N., VESCIO, R.A., BERENSON, J.R. - HHV-8 infection and multiple myeloma .- *Journal of Leucocyte Biology*, **66**: 357-360, 1999a.
- SJAK-SHIE, N.N., VESCIO, R.A., BERENSON, J.R. "The role of Human Herpesvirus-8 in the pathogenesis of multiple myeloma" . In Kyle, R. A. And Gertz, M. A. Hematology / Oncology Clinics of North America, **13(6)**: 1159-1167, 1999b.
- SMITH, N. A., SABIN, C. A., GOPAL, R., BOURBOULIA, D., LABBET, W., BOSHOFF, C., WEISS, R. A., BEST, J. M., WHITBY, D. - Serologic evidence of Human Herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual Sex. *Journal of Infectious Diseases* **180**: 600-606, 1999.
- SPIRA, T. J., LAM, L., DOLLARD, S. C., MENG, Y., PAU, C. P., BLACK, J. B., BURNS, D., COOPER, B., HAMID, M., HUONG, J., KITE-POWELL, K., PELLETT, P. E. – Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of Human Herpesvirus 8 infection. – *Journal of Clinical Microbiology* **38 (6)**: 2174-2180, 2000.
- TARTE, K., OLSEN, S. J., LU, Z. Y., LEGOUFFE, E., ROSSI, J., CHANG, Y., BERNARD, K. – Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma and not infected with Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus. - – *Blood*, **91 (6)**: 1852-1857, 1998.

- TISDALE, J. F., STEWART, A. K., DICKSTEIN, B., LITTLE, R. F., DUBÉ, I., CAPPE, D., DUNBAR, C. E., BROWN, K. E. – Molecular and Serological examination of relationship of Human Herpesvirus 8 to multiple myeloma: orf 26 sequences in bone marrow stroma are not restricted to myeloma patients and other regions of the genome are not detected. – **Blood**, **92** (8): 2681-2687, 1998.
- YI, QING., EKMAN, M., ANTON, D., BERGENBRANT, S., OSTERBORG, A., GEORGII-HEMMING, P., HOLM, G., NILSSON, K., BIBELFELD, P. – Blood Dendritic Cells from Myeloma Patients Are Not Infected With Kaposi Sarcoma – Associated Herpesvirus (KSHV / HHV-8). – **Blood**, **92**: 402-404, 1998.
- WHITBY, D., HOWARD, M. R., TENANT-FLOWERS, M., BRINK, N. S., BOSHOFF, C., HATZIOANNOU, T., SUGGETT, F. E. A., ALDAM, D. M., DENTON, A. S., MILLER, R. F., WELLER, I. V. D., WEISS, R. A., TEDDER, R. A., SCHUIZ, T. F. – Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. – **The lancet**, **346** (23): 799-802, 1995.
- WHITBY, D., SMITH, N. A., MATTHEWS, S., O'SHEA, S., SABIN, C., KULASEGARAM, R., BOSHOFF, C., WEISS, R. A., RUITER, A., BEST, J. M. - Human Herpesvirus 8: Seroepidemiology women and detection in the genital tract of seropositive women. *Journal of Infectious Diseases* **179**: 234-236, 1999.

SITES REFERIDOS:

www.science.mcmaster.ca/biology/virology/

www.medscape.com

www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm

www.ncbi.nlm.nih.gov/



Apêndice



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☐ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 XX 19 7888936
fax 0 XX 19 7888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER: Nº 088/99

P. DE PESQUISA: DETECÇÃO DO HHV-8 EM PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI, MIELOMA MÚLTIPLO E DOADORES DE SANGUE

PESQUISADOR: Andréa Mendonça Gusmão Cunha

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

Em 14/09/1999 na VIII Reunião Ordinária do CEP

Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Amplificação do DNA pela “Nested-PCR”

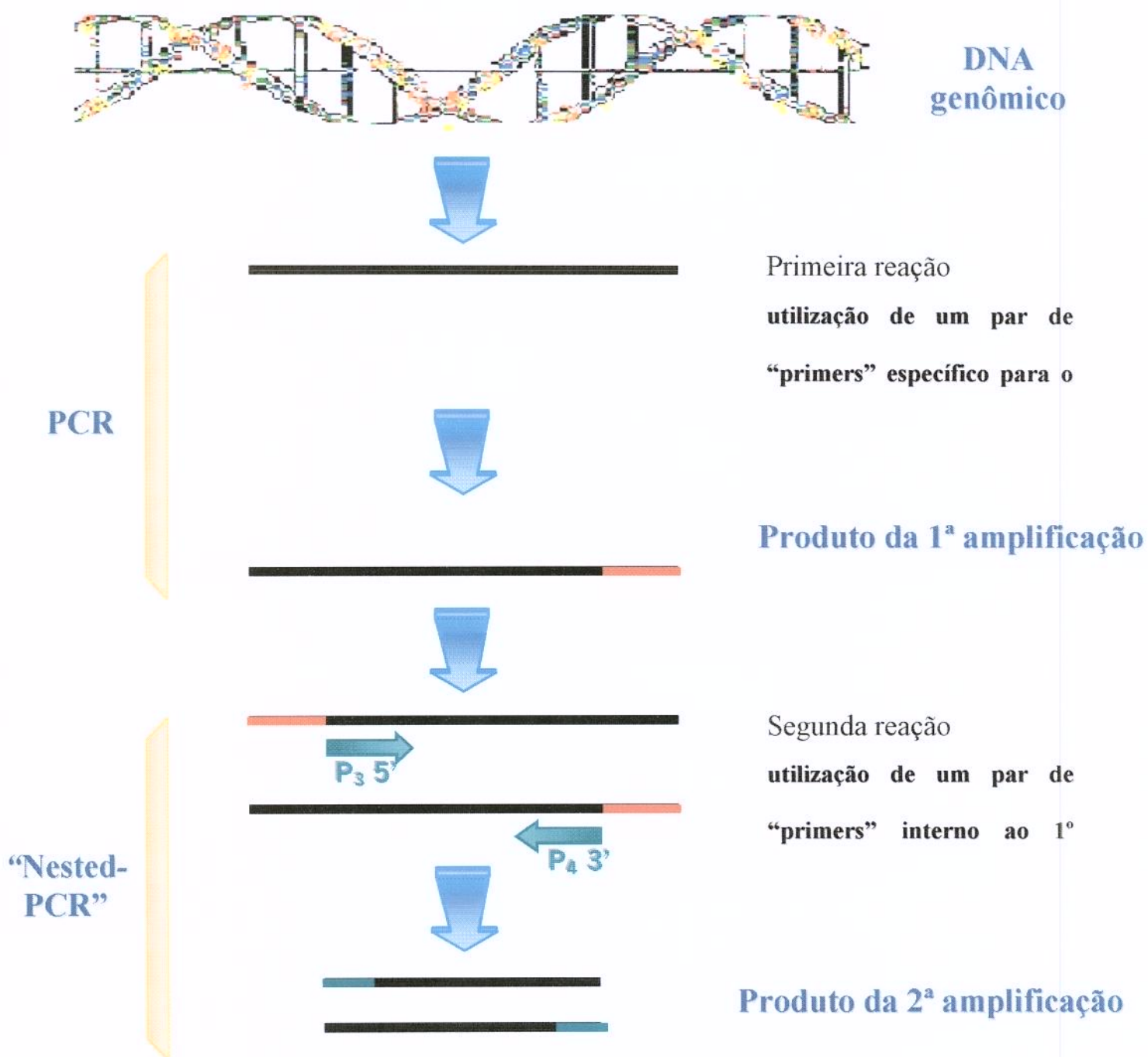


Figura 03: Esquema demonstrativo da PCR e “Nested-PCR”.

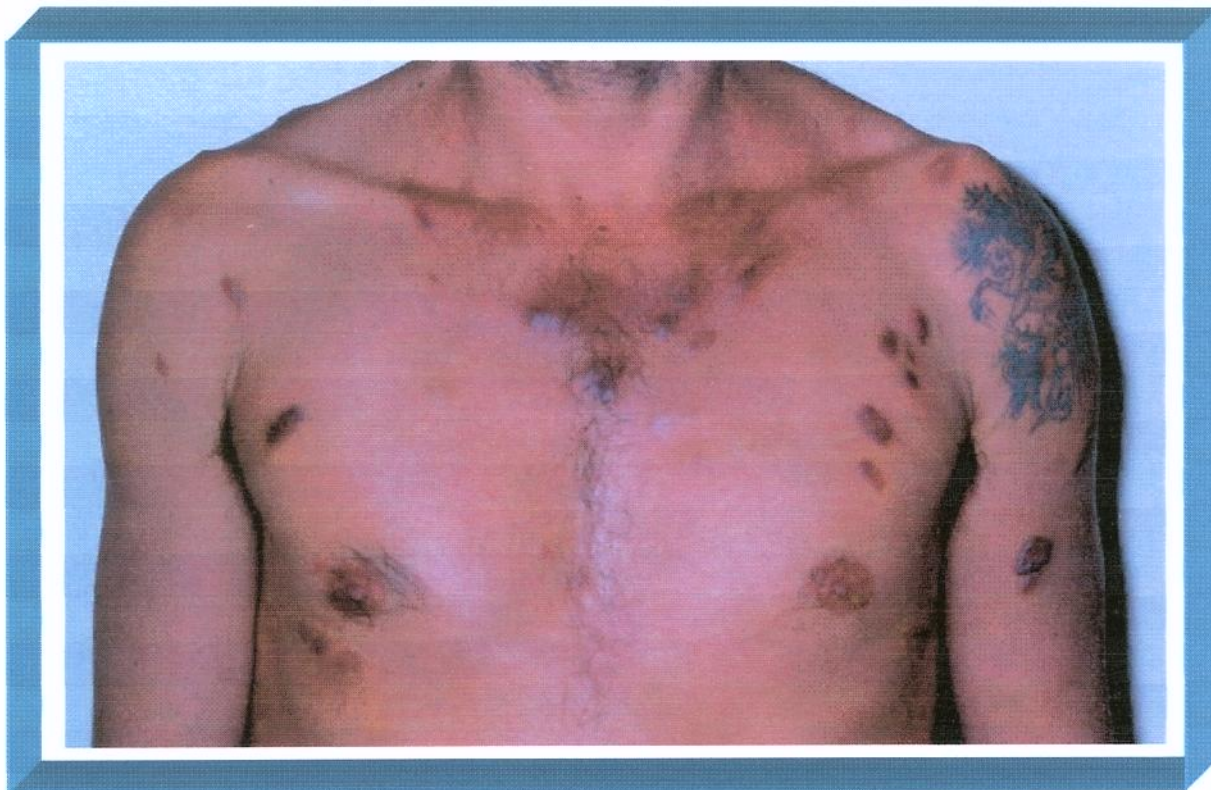


Figura 06 – Quadro extenso de sarcoma de Kaposi em paciente com AIDS, paciente N° 07.



Figura 07 – Detalhe das lesões de sarcoma de Kaposi, violáceas e com aspecto alongado típico, , paciente N° 07.



Figura 08 – Sarcoma de Kaposi afetando o globo ocular direito em paciente com AIDS, paciente N° 07.



Figura 09 – Lesões sarcomatosas localizadas em membros inferiores em paciente com AIDS, paciente N° 07.

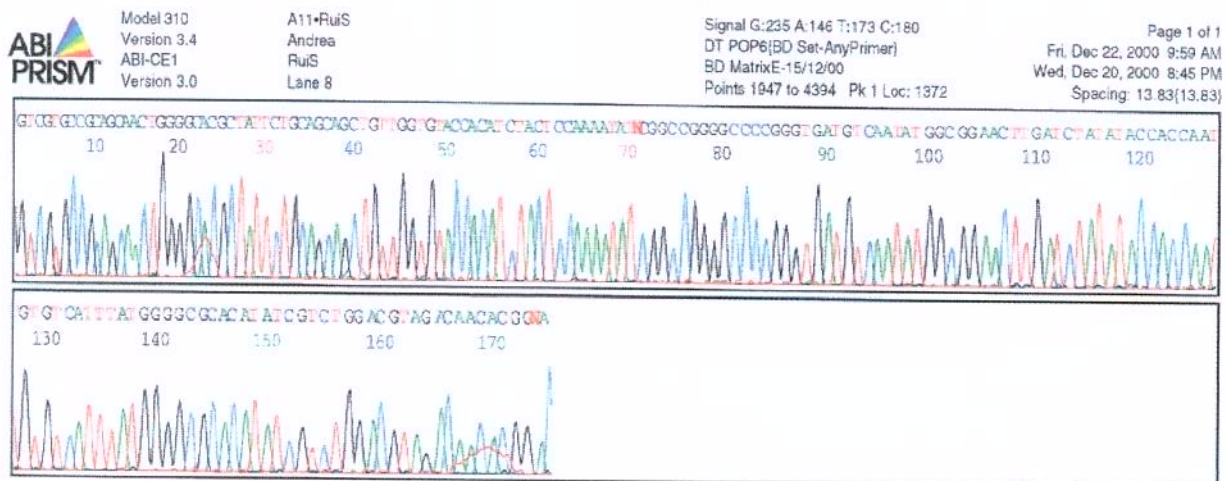


Figura 17: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

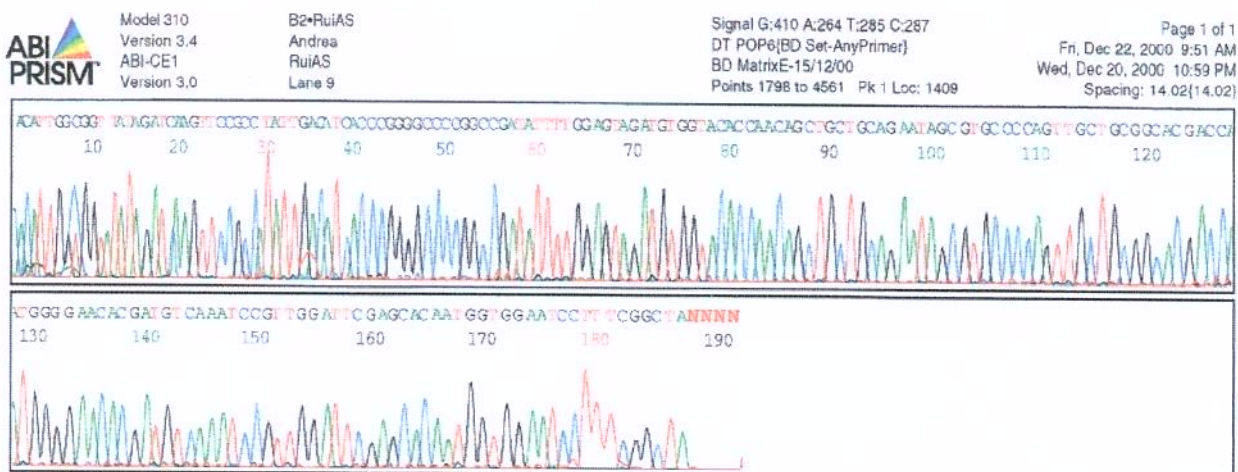


Figura 18: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao seqüenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 01) com sarcoma de Kaposi. Na reação de seqüenciamento referente à Figura 17, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 18 o "primer" reverso (KS-02).

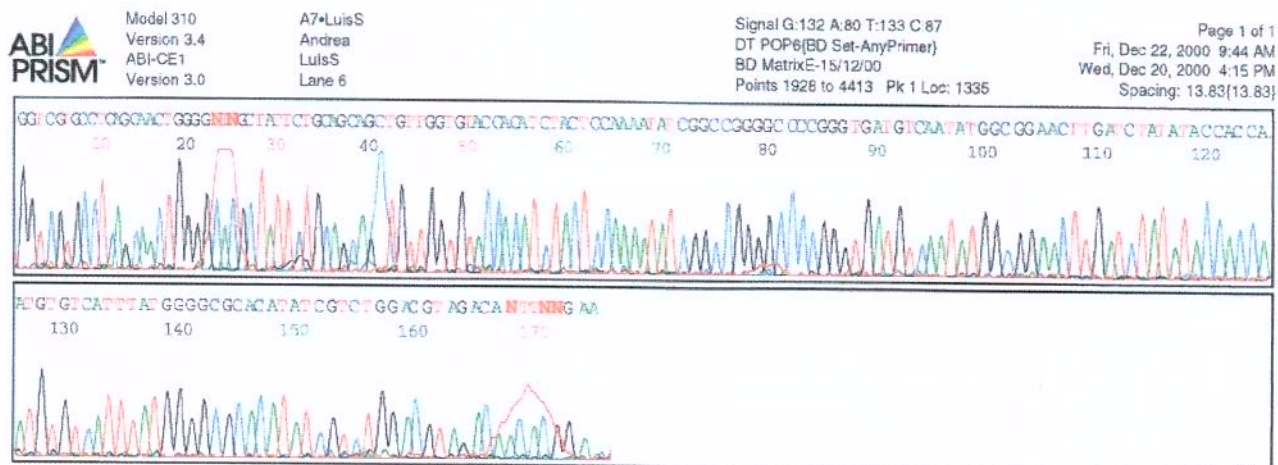


Figura 19: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

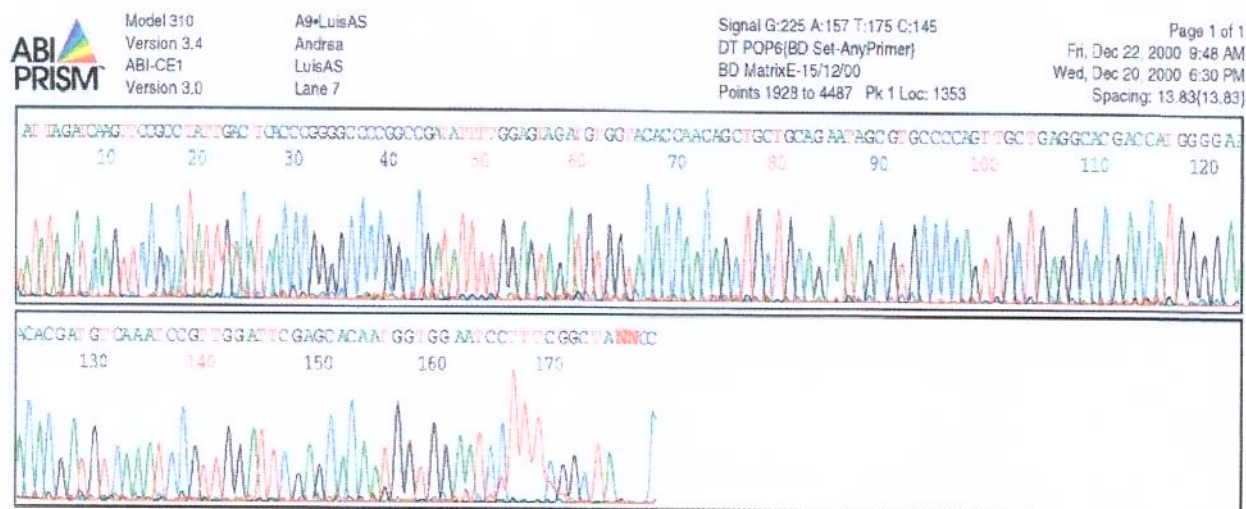
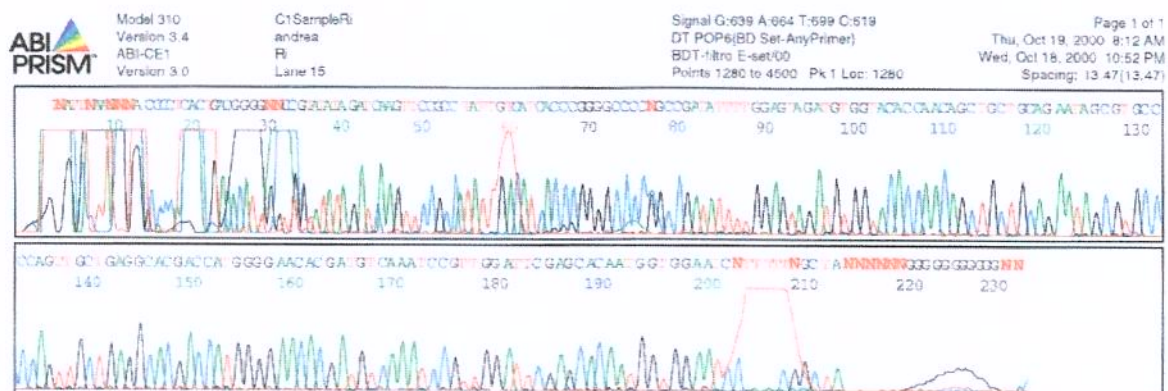


Figura 20: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferograma correspondente ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 02) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 19, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na figura 20 o "primer" reverso (KS-02).



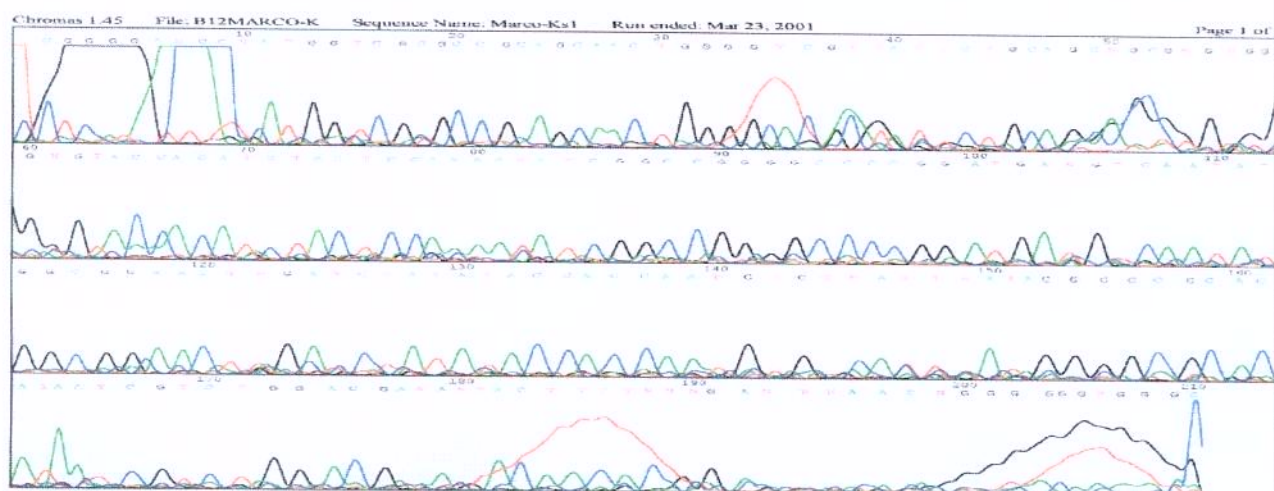


Figura 23: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" direto (KS-01)

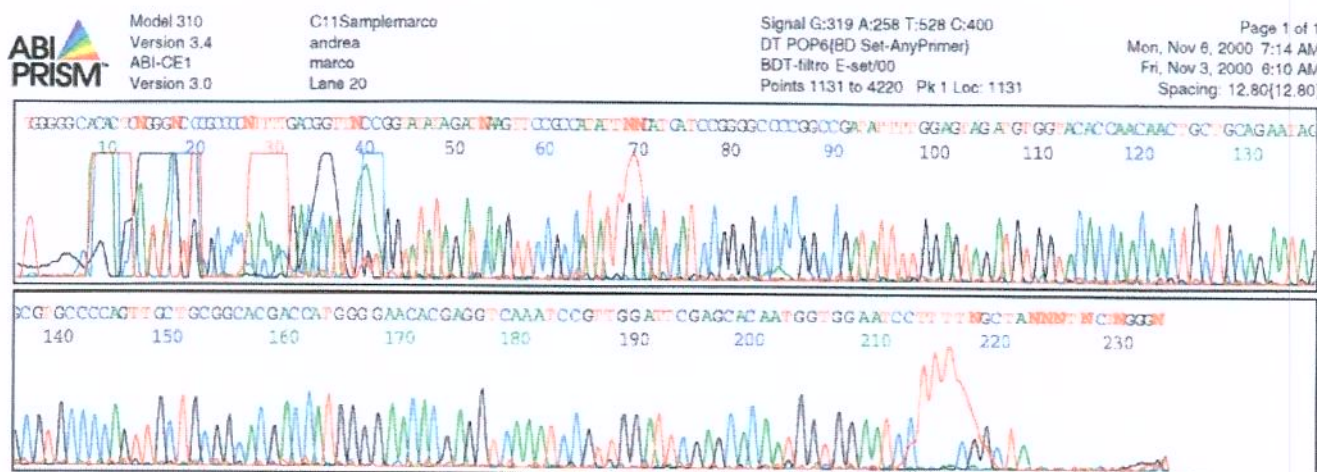


Figura 24: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" reverso (KS-02)

Eletroferograma correspondente ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número-04) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 23, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e a figura 24 com o "primer" reverso (KS-02).

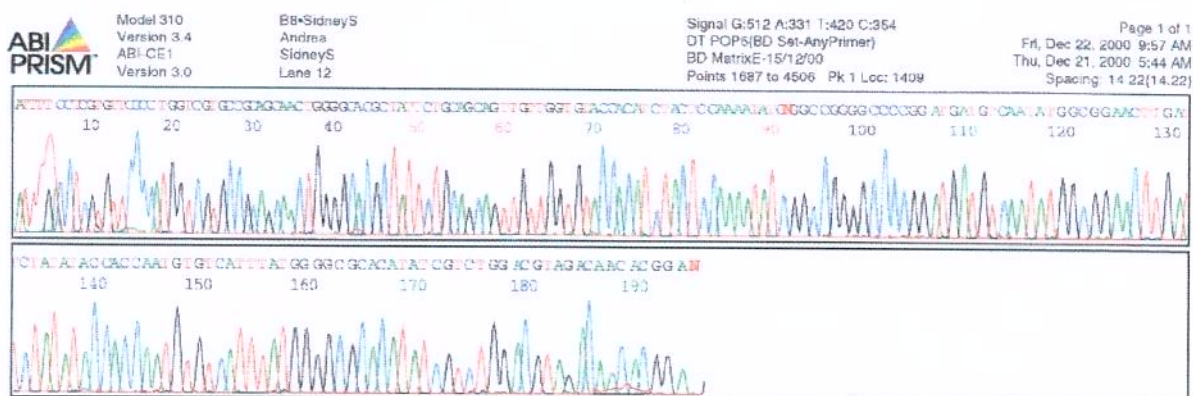


Figura 25: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

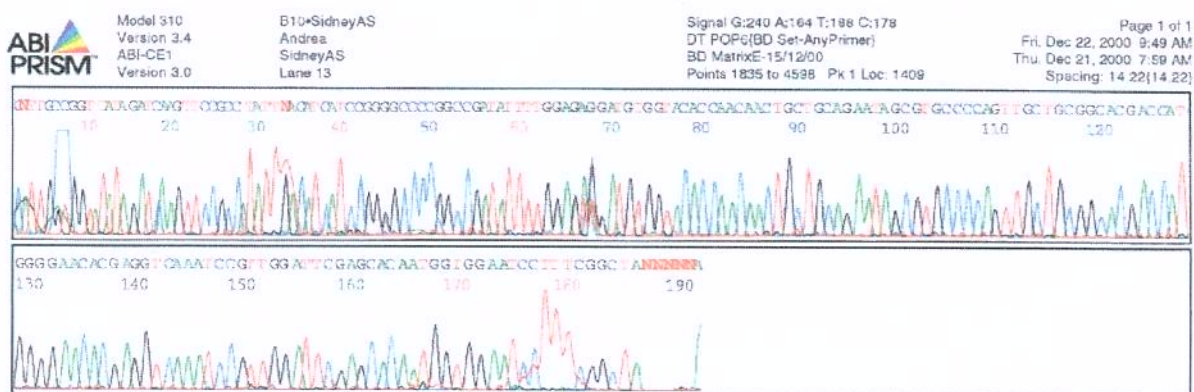


Figura 26: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao seqüenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 05) com sarcoma de Kaposi. Na reação de seqüenciamento referente à Figura 25, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 26 o "primer" reverso (KS-02).

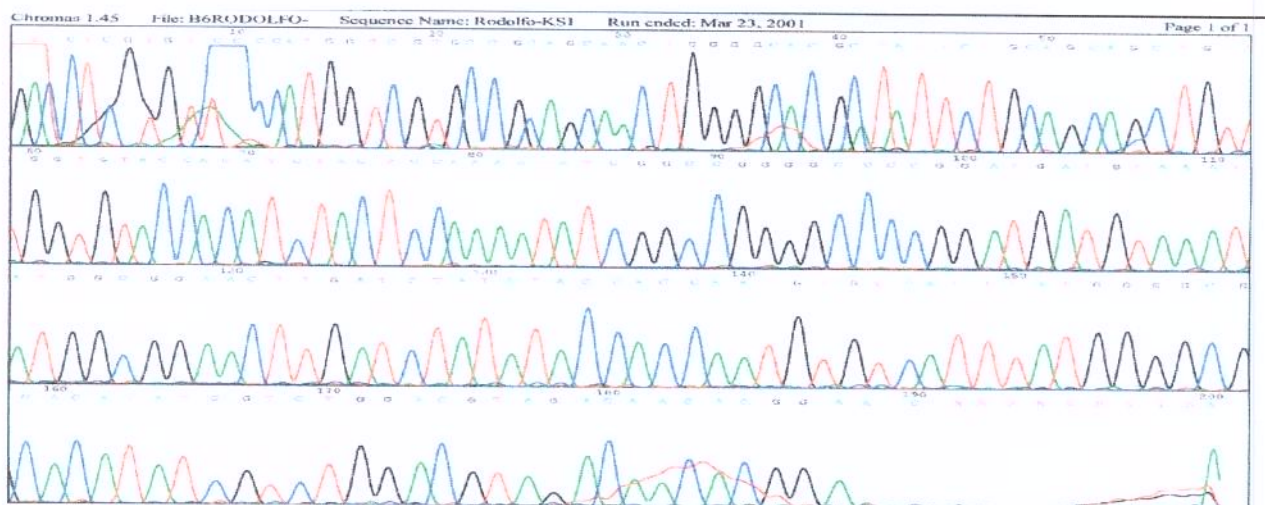


Figura 29: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

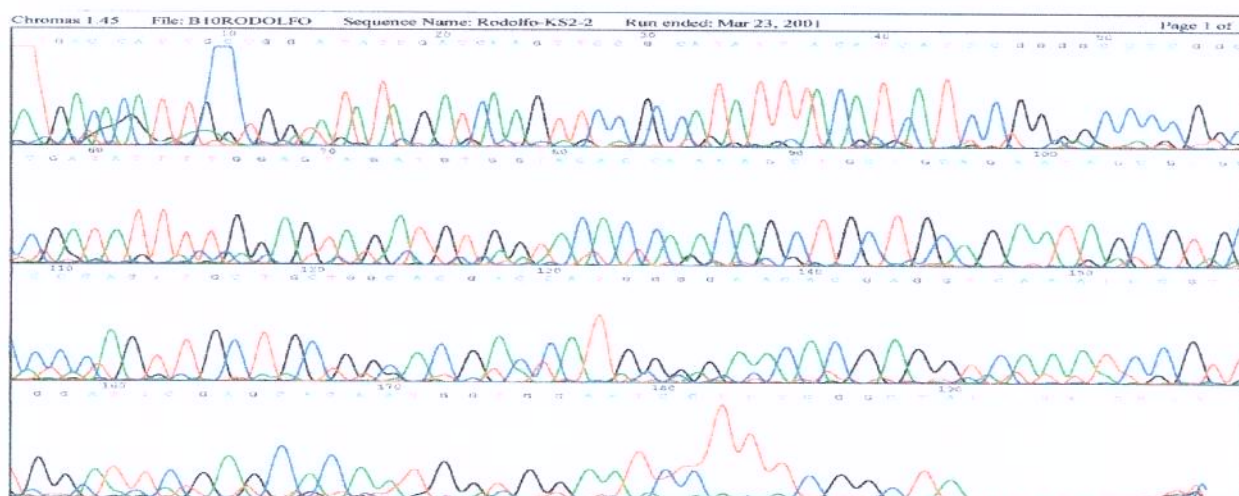


Figura 30: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 07) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 29, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 30 o "primer" reverso (KS-02).

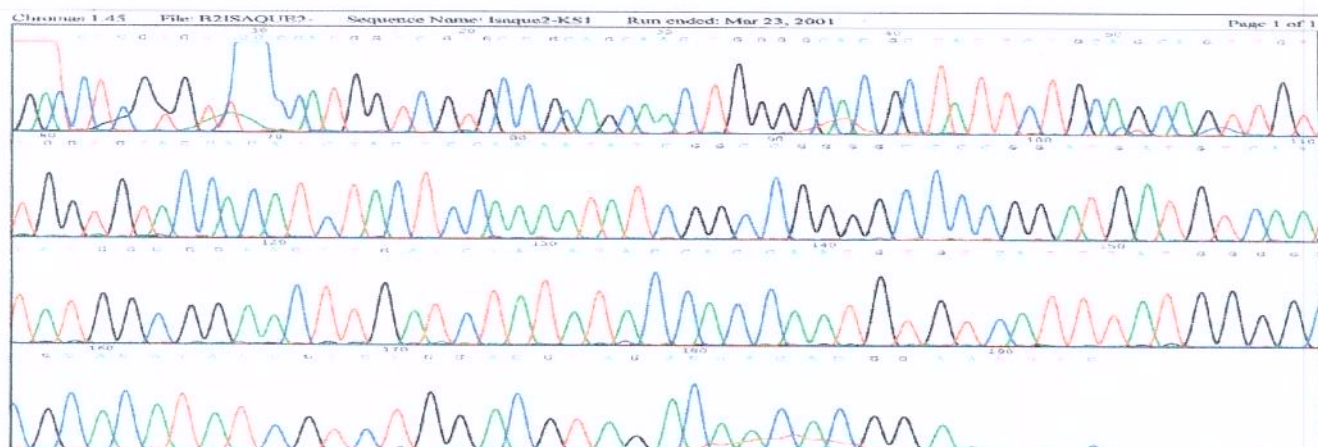


Figura 31: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" direto (KS-01)

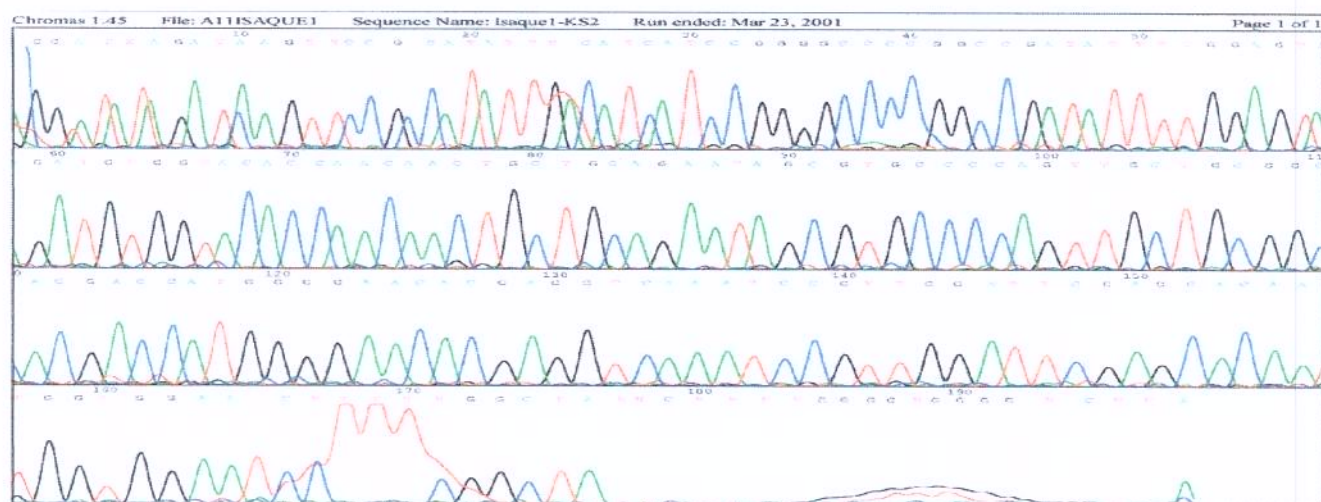


Figura 32: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao seqüenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 08) com sarcoma de Kaposi. Na reação de seqüenciamento referente à Figura 31, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 32 o "primer" reverso (KS-02).

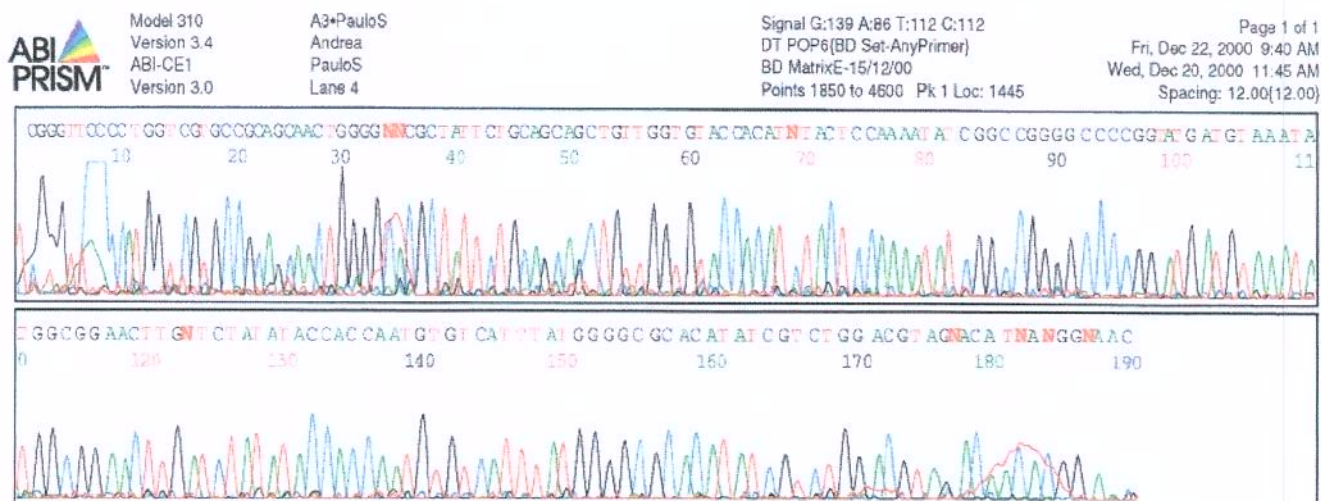


Figura 33: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

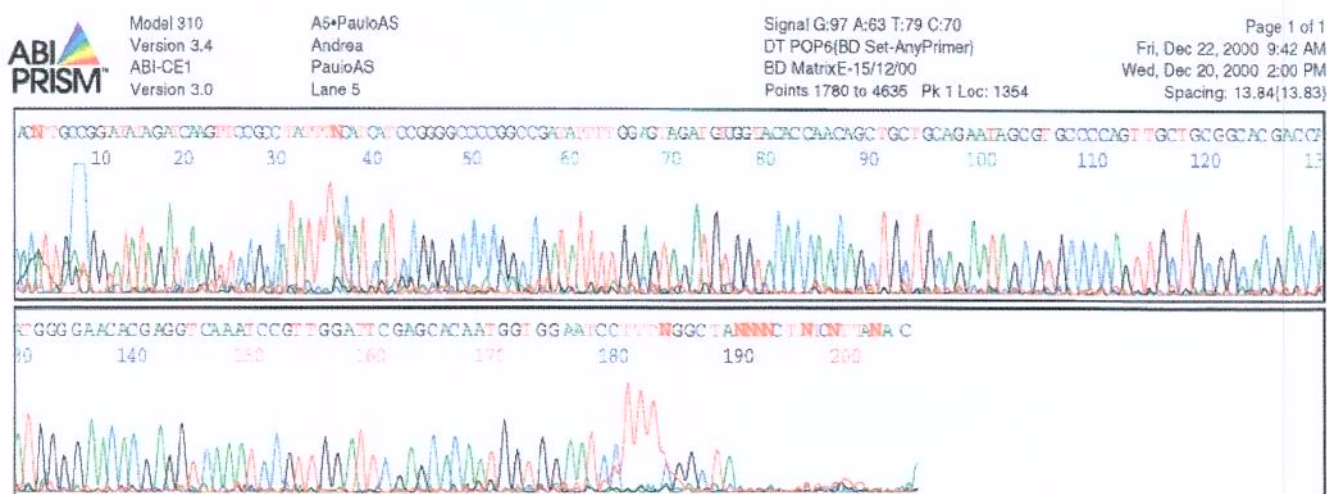


Figura 34: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao seqüenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 09) com sarcoma de Kaposi. Na reação de seqüenciamento referente à Figura 33, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 34 o "primer" reverso (KS-02).

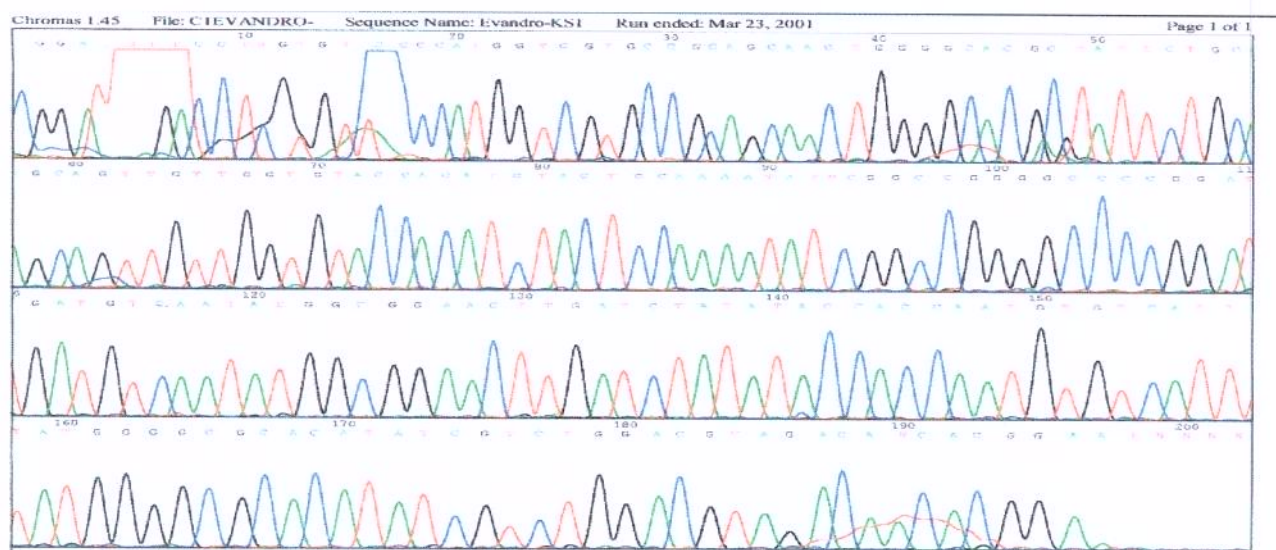


Figura 35: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" direto (KS-01)

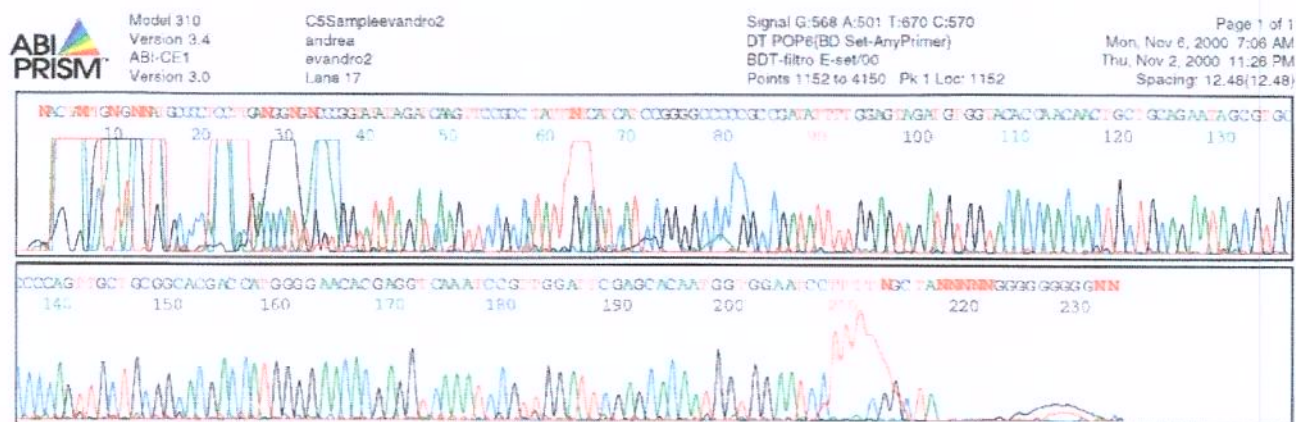


Figura 36: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer" reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 10) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 35, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 36 o "primer" reverso (KS-02).

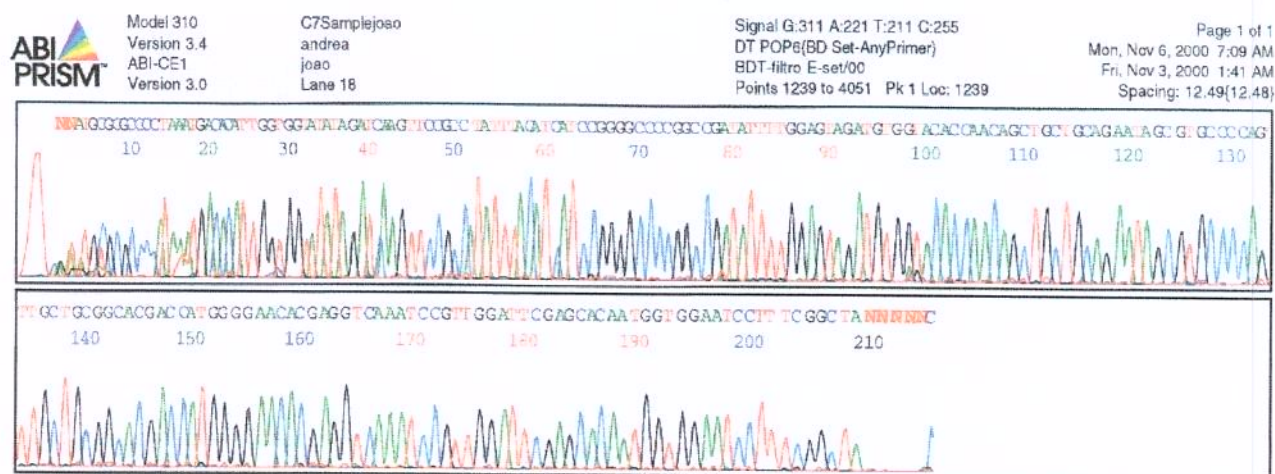


Figura 37: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " direto (KS-01)

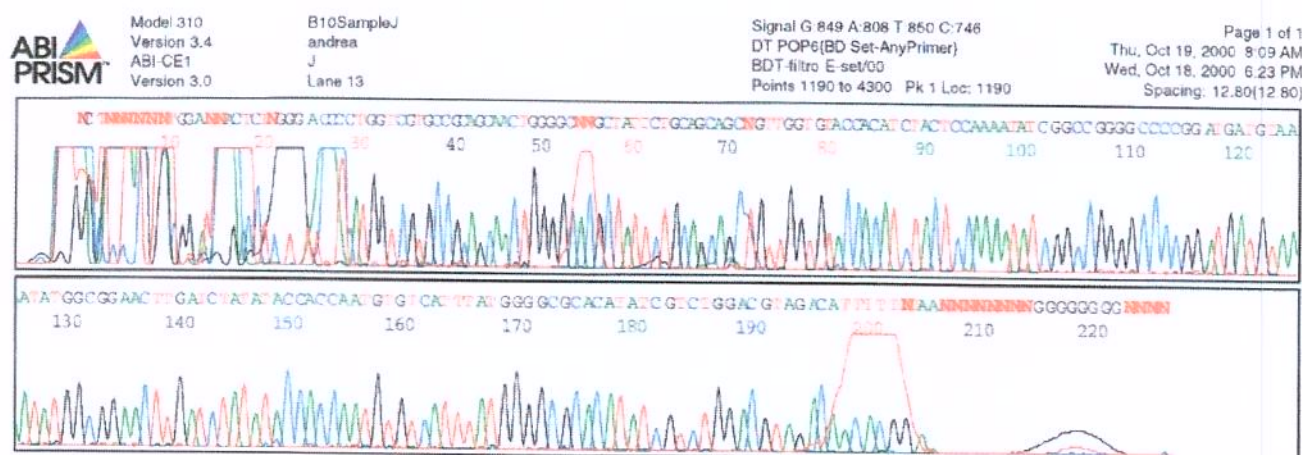


Figura 38: Sequência de DNA do HHV-8 obtida com o "primer " reverso (KS-02)

Eletroferogramas correspondentes ao sequenciamento da região ORF-26 do HHV-8 utilizando amostra de DNA do paciente (número - 11) com sarcoma de Kaposi. Na reação de sequenciamento referente à Figura 37, foi utilizado o "primer" direto (KS-01) e na Figura 38 o "primer" reverso (KS-02).