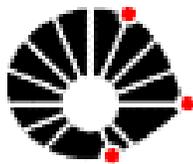


**Andréa Mendonça Gusmão Cunha**

---

---

**SOROPREVALÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA  
MOLECULAR DO HERPESVÍRUS HUMANO 8  
(HHV-8) EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS**



**Campinas**

**2005**

**Andréa Mendonça Gusmão Cunha**

---

---

**SOROPREVALÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA  
MOLECULAR DO HERPESVÍRUS HUMANO 8  
(HHV-8) EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao curso de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médica, área Ciências Biomédicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

**Universidade Estadual de Campinas**

**Campinas**

**2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**

**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

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

C914s Cunha, Andréa Mendonça Gusmão  
Soroprevalência e epidemiologia molecular do herpesvírus humano 8 (HHV-8) em populações brasileiras. / Andréa Mendonça Gusmão Cunha. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Prevalência. 2. Kaposi, Sarcoma de. 3. Doadores de sangue. 4. Herpesvírus 8 humano. 5. Transmissão vertical de doença – prevenção e controle. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

# Andréa Mendonça Gusmão Cunha

---

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

---

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

---

**Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

---

### **Membros:**

**1. Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

**2. Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto**

**3. Prof. Dr. Luiz Carlos Alcântara**

**4. Prof. Dr. Benedito Fonseca**

**5. Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos**

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

**Data: 24/02/2005**

*Agradeço a Deus a realização deste trabalho e por estar ao  
nosso lado preenchendo nossas vidas com amor, saúde,  
paz, harmonia e felicidade.*

*A minha querida mãe Helieide, pelo amor, apoio e dedicação incondicional em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu pai Francisco por me ensinar a superar todos os obstáculos e seguir sempre em frente*

*À minha estimada vó Naidy pelo amor, ensinamentos eternos, força e vitalidade.*

*Aos meus irmãos Saulo e David pelo apoio, incentivo e amizade.*

*Ao meu André, por todo o seu amor, carinho, compreensão,  
cumplicidade e por me apoiar em todos os momentos.*

*Às minhas filhas Jade e Jamile pelo amor incondicional, carinho,  
ternura e afeto.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e a Profa. Dra. Sandra  
Cecília Botelho Costa pela orientação, confiança, amizade e  
principalmente por terem me ensinado o caminho da pesquisa  
e do conhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

*A Profa. Dra. Marilda Gonçalves, por ter me recebido no CPqGM/Fiocruz, pelos ensinamentos, incentivos, amizade, confiança e por ter me apresentado ao Dr. Bernardo Galvão*

*Ao Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro, chefe do Laboratório Avançado em Saúde Pública (LASP/CPqGM/Fiocruz), pelo apoio, ensinamentos e por ter me recebido no LASP, permitindo que parte do desenvolvimento desta Tese fosse realizado na Fiocruz/ Bahia.*

*A Profa. Dra. Adele Caterino de Araújo, pesquisadora da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), pelos ensinamentos, conselhos e pela colaboração imensa neste trabalho.*

*Aos profissionais da Seção de Imunologia do IAL, especialmente a Bioquímica Elizabeth pela execução dos testes de imunofluorescência indireta.*

*Aos profissionais do Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosas de Buenos Aires, especialmente a Bioquímica Celeste Perez pela colaboração e troca de conhecimento.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Lopes, Prof. Dr. Marcelo Ramos, Prof. Dr. Benedito Fonseca e Prof. Dr. Luís Carlos Alcântara por participarem desta banca examinadora trazendo sólidos conhecimentos e valiosas experiências no campo da pesquisa científica.*

*À Dra. Neiva Gonçalves e ao Dr. Marcelo Addas do Hemocentro da Unicamp pelas informações e amostras referentes aos doadores de sangue analisados nesse estudo.*

*As amigas do Laboratório da Dra. Sandra Costa (Unicamp) Paula, Gláucia, Rosana, Ana Maria, Taty, Bia, Fernanda, Cristiane e Rose pelo carinho, troca de conhecimento, apoio, incentivo e principalmente pela amizade.*

*As amigas do Laboratório do Genoma, Ângela, Ucha, Elo e principalmente a Dulcineia (Dú), pela grande amizade e por me ajudar em momentos difíceis.*

*A todos os colegas de pesquisa do LASP/CPqGM/Fiocruz pela colaboração, amizade e troca de conhecimento, especialmente a Cecília minha primeira aluna de iniciação científica.*

*A toda equipe do Laboratório de Bioinformática do LASP, especialmente Luís e Flora pelos ensinamentos em filogenia e Aline por ter ficado ao meu lado em momentos difíceis, me ajudando a enfrentar todas as dificuldades na construção das árvores filogenéticas e por sua amizade.*

*Aos amigos e funcionários do LASP especialmente a Noilson, Jurema, D. Eugênia, D. Bete e Rodrigo pela ajuda nos momentos difíceis, pelo carinho e atenção.*

*Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas e da Fundação Oswaldo Cruz, pela atenção e dedicação.*

*A todos os funcionários da pós-graduação da FCM, especialmente Marcinha pelas informações, atenção, paciência e competência.*

*Aos funcionários do Departamento de Patologia Clínica da Unicamp, especialmente Marlúcia pelas informações constantes e dedicação.*

*A todos os parentes e amigos que me apoiaram e me incentivaram na execução dessa pesquisa, especialmente a minha sogra Nilce, meu sogro Rui, vó Maria e minha tia Eline.*

*A todos os pacientes, pela interminável contribuição à Medicina, meu carinhoso reconhecimento e gratidão.*

*Em fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.*

## Sumário

Listas de Ilustrações .....	xv
Lista de Abreviações.....	xvii
Resumo.....	xxi
Summury .....	xxiii
1. Introdução	
1.1. Histórico.....	01
1.2. O Herpesvírus Humano Tipo 8	
1.2.1. Taxonomia .....	03
1.2.2. Estrutura viral .....	04
1.2.3. O Genoma do HHV-8 .....	05
1.2.4. Replicação Viral e Propriedades Biológicas .....	10
1.3. O Sarcoma de Kaposi	
1.3.1. Descoberta e Classificação .....	11
1.3.2. O sarcoma de Kaposi e o HHV-8 .....	12
1.3.3. Apresentação Clínica .....	13
1.4. Epidemiologia e Transmissão do HHV-8 .....	13
1.5. Subtipos do HHV-8.....	16
1.6. Detecção do HHV-8	
1.6.1. Cultura Viral .....	19
1.6.2. Métodos Sorológicos .....	20
1.6.2.a. Imunoensaio Enzimático .....	21
1.6.2.b. Imunofluorescência .....	21

1.6.3. Métodos Moleculares .....	23
1.6.3.a.A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	23
2. Objetivos .....	26
3. Casuística	
3.1. Índios da Região Amazônica .....	27
3.2. Doadores de Sangue .....	28
3.3. Pacientes com Sarcoma de Kaposi .....	28
3.4. Pacientes HIV positivos .....	29
4. Métodos	
4.1. Extração do DNA	
4.1.1. Preparação das Amostras.....	30
4.1.2. Lise das Hemáceas.....	30
4.1.3. Lise dos Leucócitos.....	30
4.1.4. Precipitação do DNA.....	31
4.2. Extração do DNA de Biópsia de Tecido à Fresco	
4.2.1. Digestão das Amostras .....	31
4.2.2. Extração com Fenol- Clorofórmio .....	31
4.2.3. Precipitação do DNA .....	32
4.3. Amplificação Gênica (PCR- ORF-26) para detecção do HHV-8 .....	32
4.3.1. Condições da Reação .....	32
4.3.2. Detecção .....	33
4.4. Amplificação Gênica (PCR – ORF-K1) do HHV-8 .....	34
4.4.1. Condições da Reação .....	34
4.4.2. Detecção .....	35

4.5. Amplificação Gênica para $\beta$ -Globina Humana .....	37
4.6. Sequenciamento Automatizado .....	38
4.6.1. Purificação.....	38
4.6.2. Quantificação do Produto purificado .....	38
4.6.3. Reação de Sequenciamento .....	39
4.6.4. Análise das seqüências de DNA.....	39
4.7. Genotipagem .....	40
4.8. Teste sorológico de Imunofluorescência Indireta (In house – ANLS) .....	41
4.9. Teste sorológico de Imunofluorescência Indireta (In house – IAL) .....	41
4.10. Análise Estatística .....	42
<b>5. Resultados</b>	
5.1. Soroprevalência do HHV-8 em Doadores de Sangue .....	43
5.1.1. Ensaio de IFI .....	43
5.1.2. Triagem Sorológica .....	44
5.1.3. Soroprevalência X Domicílio dos Doadores .....	45
5.2. Soroprevalência do HHV-8 na Região Amazônica .....	45
5.2.1. Ensaio de IFI .....	45
5.3. Epidemiologia Molecular do HHV-8 .....	51
5.3.1. Amplificação da $\beta$ -globina Humana .....	51
5.3.2. Detecção da Região ORF-26 .....	52
5.3.2.a. Índios da Região Amazônica .....	52
5.3.2.b. Pacientes HIV positivos .....	54
5.3.2.c. Pacientes com Sarcoma de Kaposi .....	55

5.3.3. Padronização e Amplificação da ORF-K1 .....	56
5.3.4. Classificação Genotípica .....	61
6. Discussão.....	70
7. Conclusões .....	83
8. Referências Bibliográficas .....	85
9. Apêndice .....	108

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 01.</b> Representação Esquemática da Família Herpesviridae .....	03
<b>Figura 02.</b> Estrutura do Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8).....	04
<b>Figura 03</b> Estrutura Tridimensional do HHV-8 .....	05
<b>Figura 04.</b> Representação Gráfica do Genoma do HHV-8 .....	08
<b>Figura 05.</b> Representação Gráfica do Genoma do HHV-8 (Epissomal) .....	09
<b>Figura 06.</b> Região ORF-K1 do HHV-8 .....	18
<b>Figura 07</b> Árvore Radial (Subtipos) .....	18
<b>Figura 08.</b> Imunofluorescência Indireta (Fotos do IAL) .....	49
<b>Figura 09.</b> Localização Geográfica das Tribos Tiriyo e Waiampi .....	50
<b>Figura 10.</b> Amplificação Gênica do Gene da $\beta$ -globina Humana.....	51
<b>Figura 11.</b> Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (ORF-26).....	55
<b>Figura 12.</b> Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (VR1- 309pb).....	58
<b>Figura 13.</b> Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (VR1- 246pb).....	59
<b>Figura 14.</b> Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (VR2- 757 pb).....	60
<b>Figura 15.</b> Amplificação Gênica através da “Nested-PCR” (VR2- 679 pb).....	61
<b>Figura 16.</b> Árvore Filogenética (PAUP), Fragmento VR1 (ORF-K1) .....	68
<b>Figura 17.</b> Árvore Filogenética (PAUP), Fragmento VR2 (ORF-K1) .....	69
<b>Gráfico 01:</b> Representação Gráfica dos testes de IFI em Doadores de Sangue .....	44
<b>Gráfico 02:</b> Testes de IFI em índios .....	46
<b>Gráfico 03:</b> Soroprevalência do HHV-8 X Faixa Etária .....	47
<b>Quadro 01:</b> Propriedades Funcionais de Alguns Genes do HHV-8.....	07
<b>Tabela 01.</b> Seqüência dos “Primers” para a Detecção da região ORF-26.....	33

<b>Tabela 02.</b> Seqüência dos “Primers” para a Detecção (VR1) ORF-K1 .....	36
<b>Tabela 03.</b> Seqüência dos “Primers” para a Detecção (VR2) ORF-K1 .....	36
<b>Tabela 04.</b> Seqüência dos “Primers” para Amplificação do Gene da $\beta$ -globina Humana.....	37
<b>Tabela 05.</b> Soroprevalência do HHV-8 em Doadores de Sangue .....	43
<b>Tabela 06.</b> Soroprevalência em Índios da Região Amazônica .....	47
<b>Tabela 07.</b> Soroprevalência do HHV-8 X Faixa Etária (índios) .....	48
<b>Tabela 08.</b> Análise Estatística (índios) .....	48
<b>Tabela 09.</b> Informações Gerais sobre as Tribos Tiriyó e Waiampi .....	50
<b>Tabela 10.</b> Tabela com os protótipos da região ORF-K1 do HHV-8 .....	67

## *Lista de Abreviações e Siglas*

$\mu$ l	<b>Microlitros</b>
aa	<b>Aminoácido</b>
AIDS/SIDA	<b>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida</b>
Asp	<b>Acido Aspartico</b>
BC-1	<b>Linhagem celular de fluido ascítico humano infectado pelo HHV-8 e EBV</b>
BC-2	<b>Linhagem celular de fluido ascítico humano infectado pelo HHV-8 e EBV</b>
BC-3	<b>Linhagem celular de fluido ascítico humano infectado pelo HHV-8</b>
BCBL	<b>Linfoma de cavidades do corpo</b>
BCBL-1	<b>Linhagem célula B obtida de linfoma de cavidades do corpo</b>
BCP-1	<b>Linhagem celular de sangue periférico humano infectada com o HHV-8</b>
cut of	<b>Limiar de positividade</b>
DCM	<b>Doença multicêntrica de Castleman</b>
dH <sub>2</sub> O	<b>Água destilada, deionizada e estéril</b>
DNA	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
dNTP	<b>Desoxirribonucleotídeos trifostato</b>
DST	<b>Doença sexualmente transmissível</b>
EBV	<b>Epstein-Barr vírus</b>
EDTA	<b>Ácido etilenodiaminotetracético</b>
ELISA	<b>“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – teste sorológico imunoenzimático</b>
Fab	<b>Porção variável da molécula da imunoglobulina</b>
Fc	<b>Porção constante da molécula da imunoglobulina</b>
Gly	<b>Glicina</b>
HHV-8	<b>Herpesvírus Humano Tipo 8</b>

HIV	<b>Vírus da Imunodeficiência Humana</b>
HVS	<b>Herpesvírus Saimiri</b>
ICTV	<b>Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus</b>
IF	<b>Imunofluorescência</b>
IFI	<b>Imunofluorescência Indireta</b>
IFI-LANA	<b>Ensaio de Imunofluorescência humana para detecção de anticorpos de fase latente do HHV-8</b>
IFI-Lítico	<b>Ensaio de Imunofluorescência humana para detecção de anticorpos de fase lítica do HHV-8</b>
IgG	<b>Imunoglobulina da classe G</b>
IgM	<b>Imunoglobulina da classe M</b>
IL-6	<b>Interleucina-6 humana</b>
Ile	<b>Isoleucina</b>
Kb	<b>Quilobases</b>
KS-1	<b>Linhagem celular de fluido ascítico infectada pelo HHV-8</b>
KSHV	<b>Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi</b>
Leu	<b>Leucina</b>
LPSNC	<b>Linfoma Primário do Sistema Nervoso Central</b>
M	<b>Molar</b>
mA	<b>Miliampere</b>
Mab	<b>Anticorpo Monoclonal</b>
ml	<b>Mililitros</b>
MM	<b>Mieloma múltiplo</b>
mM	<b>Milimolar</b>
mm	<b>Milímetros</b>
mRNA	<b>RNA mensageiro</b>

ng	<b>Nanogramas</b>
nm	<b>Namômetros</b>
ORF	<b>Open Reading Frame/Seqüência</b>
P <sub>32</sub>	<b>Fósforo 32</b>
pb	<b>Pares de bases</b>
PBL	<b>Leucócitos do sangue periférico</b>
PCR	<b>Reação em Cadeia da Polimerase</b>
PEL	<b>Linfoma primário de serosas</b>
pg	<b>Picogramas</b>
pH	<b>Potencial hidrogeniônico</b>
pmol	<b>Picomoles</b>
Pro	<b>Prolina</b>
RNA	<b>Ácido ribonucleico</b>
rpm	<b>Rotações por minuto</b>
SDS	<b>Duodecil sulfato de sódio</b>
SK	<b>Sarcoma de Kaposi</b>
SKA	<b>Forma Endêmica ou Africana do Sarcoma de Kaposi</b>
SKC	<b>Forma Clássica do Sarcoma de Kaposi</b>
SKE	<b>Forma Epidêmica ou Associada a AIDS do Sarcoma de Kaposi</b>
SKI	<b>Forma Iatrogênica do Sarcoma de Kaposi</b>
SNC	<b>Sistema nervoso central</b>
TKM1/ TKM2	<b>Tampões de lise celular</b>
Tris	<b>Tris (hidroximetil) aminometano</b>
Ty-1	<b>Linhagem celular de fluido pericárdico infectada pelo HHV-8</b>
U	<b>Unidades</b>

UDI	<b>Usuário de Drogas Injetáveis</b>
V	<b>Volt</b>
V/h	<b>Volt por hora</b>
vIL-6	<b>Interleucina- 6 viral</b>
W	<b>Wattz</b>

## *Resumo*

O Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) foi identificado em 1994 por CHANG *et al* em biópsia de pele de pacientes com sarcoma de Kaposi associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O HHV-8 é um oncovírus membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Gamaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*, o único do gênero a infectar humano. 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.

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 das linhagens linfóides, relacionadas ou não à AIDS, como o linfoma primário de serosas (PEL) ou linfoma de cavidades do corpo (BCBL) e a doença de Castleman multicêntrica (DCM).

No presente estudo, com a utilização dos ensaios sorológicos de imunofluorescência indireta foi possível determinar que o HHV-8 é endêmico em duas tribos indígenas (Tiriyó e Waiampi), localizadas na região Amazônica. Anticorpos anti-HHV-8 foram detectados em 56,8% dos índios (558/982), em todas as faixas etárias (0-81 anos) e em ambos os sexos. Nessas populações, a elevada prevalência em crianças menores de 2 anos (44,4%) e crianças de 2-9 anos (35,0%) sugerem a existência de vias de transmissão não-sexual do HHV-8, através da transmissão vertical ou pelo contato com secreções contaminadas.

A soroprevalência do HHV-8 em doadores de sangue da cidade de Campinas foi baixa (2,8%), sendo todos os casos positivos pertencentes ao sexo masculino (9/319) e faixa etária de 31 a 50 anos. Curiosamente, todos os casos de pacientes com SK acompanhados no Hospital de Clínicas da Unicamp também pertenceram ao sexo masculino, sendo detectados anticorpos anti-HHV-8 em todos os casos de SK avaliados.

A genotipagem do HHV-8 através do sequenciamento de regiões hipervariáveis do genoma viral, como a ORF-K1, possibilitou a classificação dos principais subtipos virais (A, B, C, D e E). Para realizar a genotipagem do HHV-8 nós padronizamos técnicas moleculares para amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da região hipervariável ORF-K1 do HHV-8, possibilitando a construção de árvores filogenéticas e a determinação dos subtipos virais. Em pacientes com SK da cidade de Campinas foram detectados os subtipos A, B e C do HHV-8, com maior percentual do subtipo C. Em índios da região Amazônica foram detectados os subtipos A e E do HHV-8. Nosso estudo foi o primeiro a realizar genotipagem em amostras de indivíduos com sorologia positiva para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) da cidade de Salvador, sendo detectados os subtipos B e subtipo indeterminado do HHV-8. Com isso, foi possível determinar que os subtipos A, B, C e E do HHV-8 estão presentes em populações brasileiras. Todas as seqüências nucleotídicas dos fragmentos VR1 e VR2 do HHV-8 obtidas no presente estudo serão depositadas no banco de dados NCBI/*Nucleotide Sequence Database* (GenBank) informando a comunidade científica mundial dados relevantes referentes às cepas do HHV-8 circulantes no Brasil.

Em nosso estudo, a análise de amostras provenientes de doadores de sangue e pacientes com sarcoma de Kaposi da cidade de Campinas, pacientes HIV positivos de Salvador e de índios da região Amazônica resultou na obtenção de dados de soroprevalência e de epidemiologia molecular do HHV-8 em populações brasileiras. O conhecimento de técnicas sorológicas e moleculares aplicado no presente estudo poderá ser utilizado pelos Laboratórios de Biologia Molecular da Unicamp e do LASP/CPqGM/Fiocruz, possibilitando a implantação de técnicas para o diagnóstico e genotipagem do HHV-8 nos referidos centros.

## *Summary*

CHANG et al first identified human Herpesvirus Type 8 (HHV-8) in 1994 from skin biopsies of patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) associated Kaposi's Sarcoma (KS). HHV-8 is an oncovirus from the *Herpesviridae* family, *Gamaherpesvirinae* subfamily and *Rhadinovirus* genus. It is the only one of its genus to infect humans. Its ultra structure reminds other herpesvirus, presenting DNA regions similar to two *gama-herpesvirus*: Epstein-Barr Virus (EBV) and Saimiri Herpesvirus (SHV), both with oncogenic potential.

Studies have revealed the association between HHV-8 and all forms of KS: classic, endemic, related to AIDS and associated to transplants, besides other lymphoid proliferative diseases related or not to AIDS, such as primary effusion lymphoma (PEL), body cavity lymphoma (BCBL) and Castleman's disease (CD).

In this study, using indirect immunofluorescence serologic assays, it was possible to determine that HHV-8 is endemic in two Amerindian tribes (Tiriyo and Waiampi), from the Amazon region. Anti-HHV-8 antibodies were detected in 56.8% of the Amerindians (558/982), in all ages (0-81 years old) and both sexes. In these populations, high prevalence in children younger than 2 years old (44.4%) and children from 2 to 9 years old (35.0%) suggests non-sexual routes of transmission of HHV-8, through vertical transmission or contact to contaminated secretions.

HHV-8 seroprevalence in blood donors from Campinas was low (2.8%). All positive cases were male (9/319) with 31 to 50 years of age. Curiously, all KS patients assessed in our study were male and anti-HHV-8 antibodies were detected in all cases.

Genotyping of HHV-8 through sequencing of hypervariable regions of the viral genome, such as ORF-K1, made possible formulate a classification of the main viral subtype (A, B, C, D and E) and its variants. In order to perform HHV-8 genotyping, we standardized molecular techniques for amplification and sequencing of two fragments (VR1 and VR2) from the hypervariable ORF-K1

region of HHV-8, building up phylogenetic trees and determining viral subtypes. Patients with SK from the city of Campinas had subtypes A, B and C detected, with greater frequency of subtype C. Subtypes A and E were detected in Amazonic Amerindians. This study was the first to perform genotyping in samples of patients with Human Immunodeficiency Virus (HIV) positive serology from the city of Salvador, detecting subtype B and an undetermined subtype. Thus, it was possible to determine that HHV-8 subtypes A, B, C and E are present in Brazilian populations. All nucleotide sequences of HHV-8 fragments VR1 and VR2 found during this study will be deposit at the NCBI/*Nucleotide Sequence Database* (GenBank), informing the scientific community with important data of HHV-8 strains in Brazil.

Analysis of samples from blood donors and Kaposi's Sarcoma in Campinas, HIV positive patients in Salvador and Amerindians from the Amazon region made up a databank of seroprevalence and molecular epidemiology of HHV-8 in Brazilian populations. The knowledge of serological and molecular techniques developed in this study may be used by Molecular Biology Laboratories at Unicamp and LASP/Fiocruz, allowing the implantation of HHV-8 diagnostic and genotyping techniques in these centers.

## 1. Introdução

### 1.1. Histórico

O Herpesvírus Humano 8 (HHV-8), ou Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), foi identificado em 1994 por CHANG *et al.* Devido a dificuldade de cultivo do HHV-8 em células, a análise do DNA foi a primeira metodologia utilizada para identificação do HHV-8. Os primeiros experimentos foram realizados em amostras de DNA extraído de 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 a técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Foi mapeada uma região genômica de 1.853 pares de bases (pb), designada KS330, que apresentou similaridade com a região que codifica proteínas do capsídeo viral dos *gama-herpesvírus* (CHANG *et al.*, 1994). O HHV-8 apresenta regiões de DNA similar a dois *gama-herpesvírus*: Epstein-Barr Vírus (EBV), que está relacionado à formação de linfomas 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 reforçaram a hipótese 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 cultivar o KSHV em 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

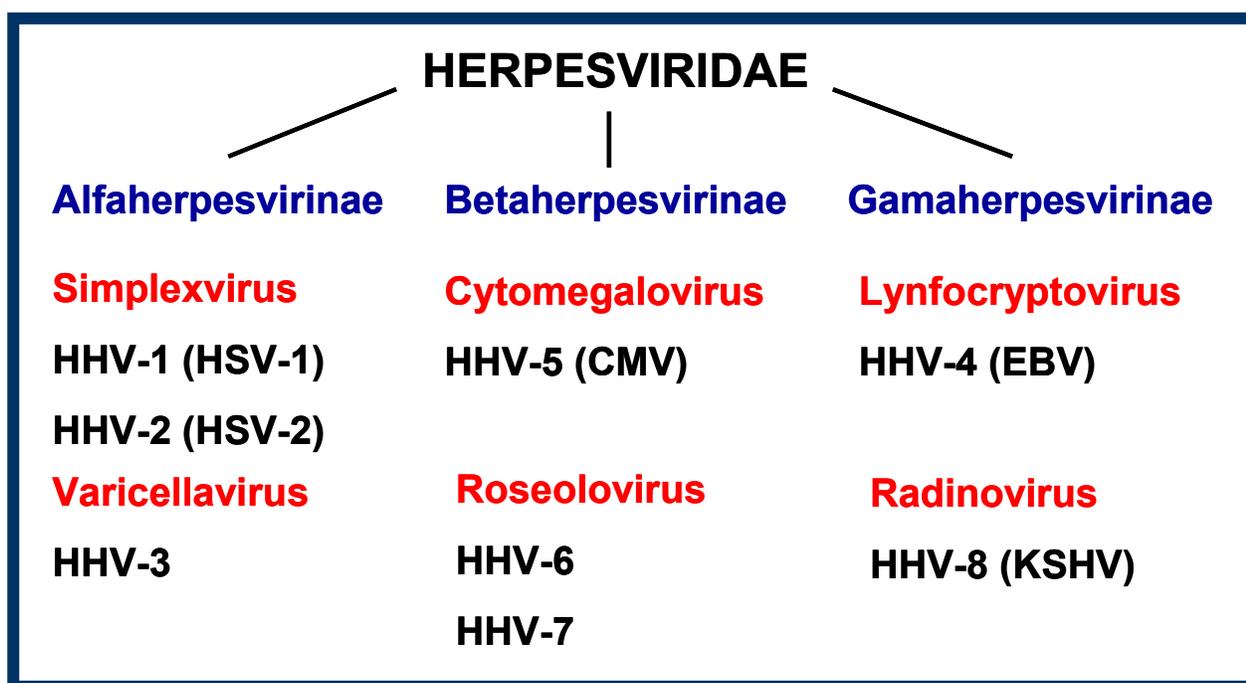
envolto em um capsídeo (MESRI *et al*, 1996). Também foi sugerido que o KSHV passasse a ser denominado HHV-8, por ser detectado em outras doenças proliferativas da linhagem B, além do SK (MESRI *et al*, 1996., SAID *et al*, 1996). Vários estudos associaram o HHV-8 a todas as formas de SK: clássica, endêmica, relacionadas a AIDS (CATHOMAS *et al*, 1996., 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 efusional primário (PEL) ou linfoma de cavidades do corpo (BCBL) (SAID *et al*, 1996, BERTI *et al*, 1997., SPIRA *et al*, 2000) e a doença de Castleman multicêntrica (DCM) (DUPIN *et al*, 2000).

O linfoma efusional primário, 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).

## 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 (Figura 01). Atualmente, há cerca de 100 herpesvírus descritos e com ampla disseminação na natureza; destes, oito infectam humanos, entre eles o Herpes Vírus Humano 8 (LEVINI & ABLASHI, 1999).



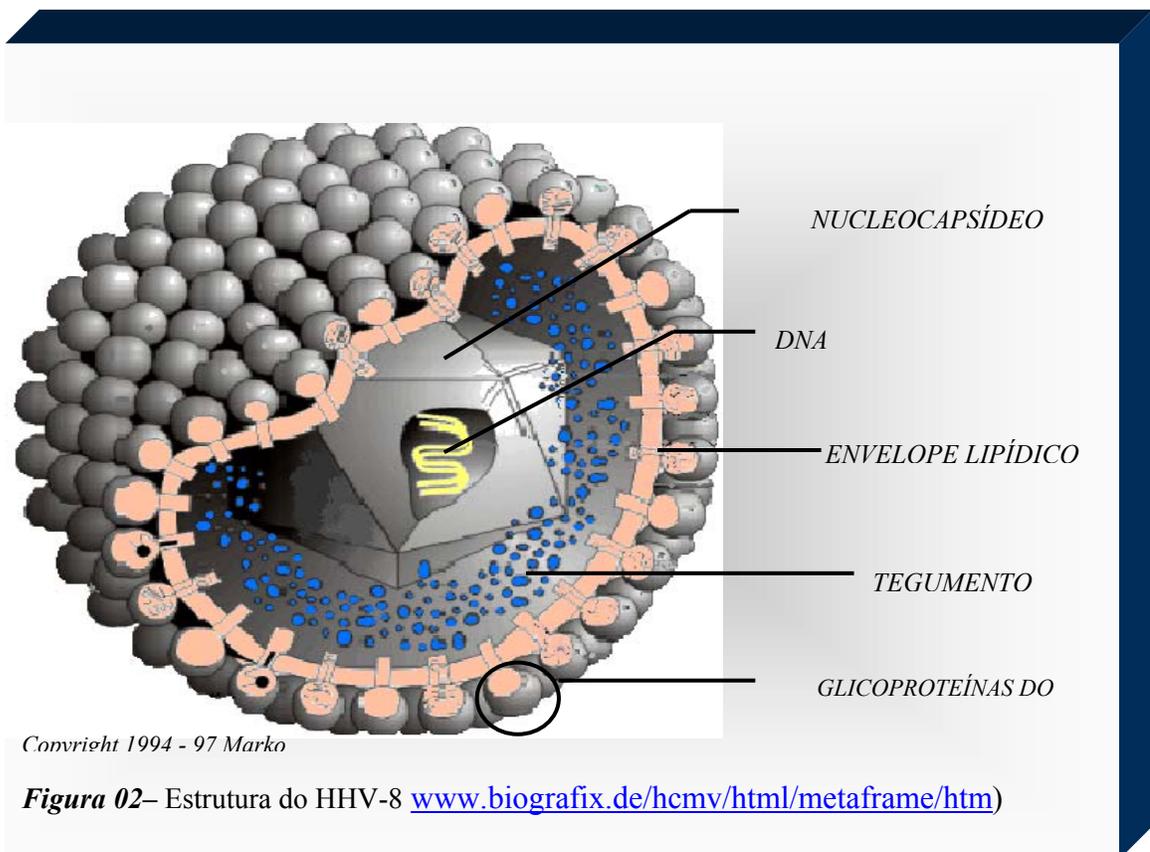
**Figura 01.** Representação esquemática dos herpesvírus que infectam humanos, família *Herpesviridae*, subfamílias em azul, gêneros em vermelho e abreviação das oito espécies em negro (Adaptado de GERAMINEJAD *et al*, 2002).

O HHV-8 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*, o único do gênero a infectar humano (O'LEARY *et al*, 1997). Possui ultraestrutura

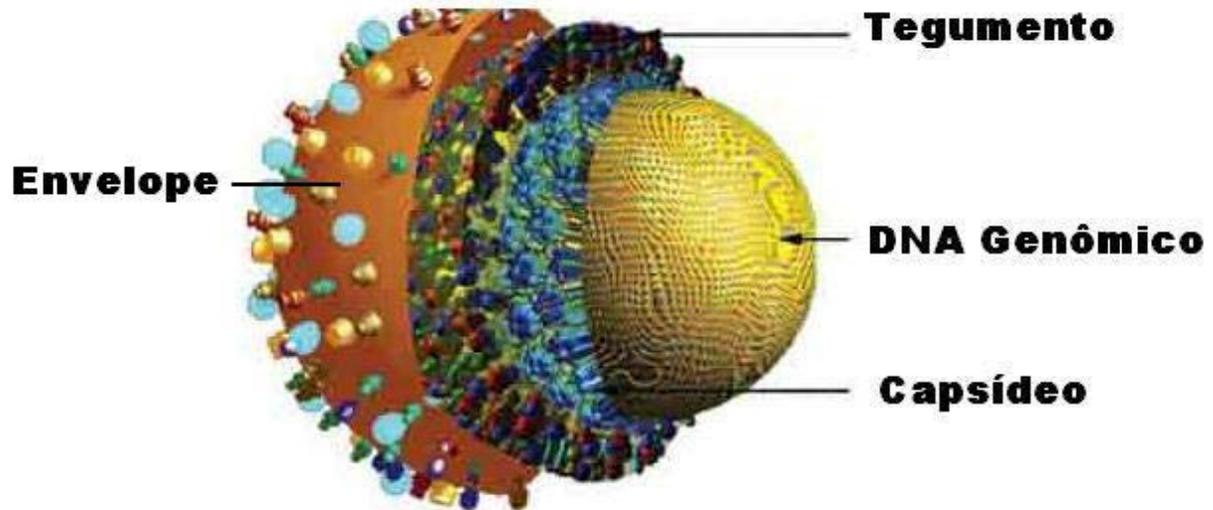
comum aos herpesvírus, apresentando regiões de DNA similares a dois *Gamaherpesvírus*: Epstein-Barr Vírus (EBV) e o Herpes Vírus Saimiri (HVS), ambos com potencial oncogênico (LEVINI & ABLASHI, 1999).

### 1.2.2 Estrutura viral

Os herpesvírus apresentam uma estrutura complexa. São partículas de grandes dimensões (120- 300 nm de diâmetro), 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), (Figuras – 02 e 03).



## Modelo Tridimensional do HHV-8



**Figura 03.** Estrutura tridimensional do HHV-8 proposta por Louis E. Henderson, Frederick Câncer Research Center, 2002 ([www.prn.org](http://www.prn.org)).

### 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. As proteínas virais 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 são semelhantes a 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 doenças neoplásicas proliferativas associadas a esse agente (O'LEORY *et al*, 1998., CANNEL & MITTNACHT, 1999., GADO *et al*, 2000., AVELLEIRA & LUPI, 2000), (Quando 01).

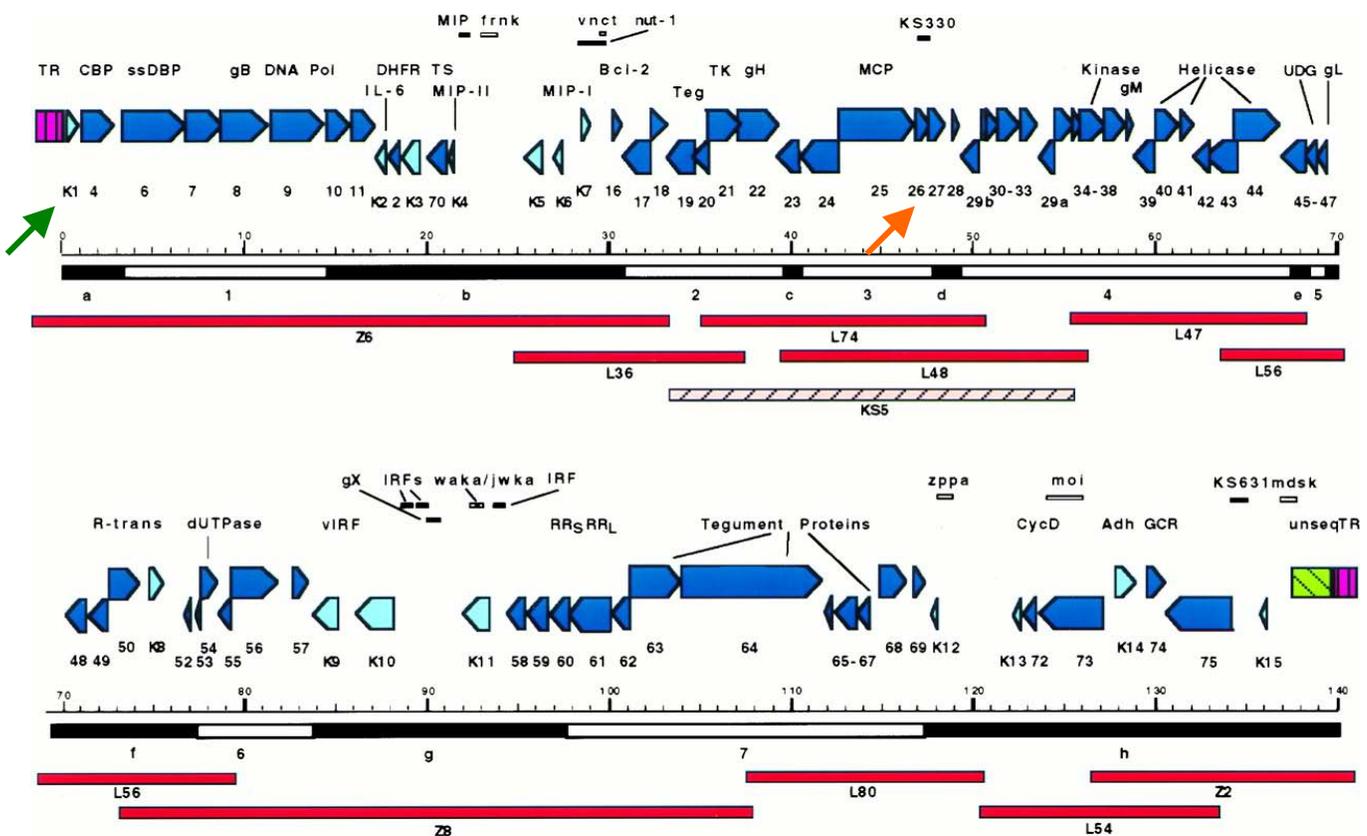
Com o sequenciamento completo do HHV-8 foi possível verificar a forma linear do genoma viral, constituído por uma única região de cadeia longa codificante de 140,5 Kb, com cerca de 53,5% de G+C. Nas extremidades do genoma verificou-se a presença de regiões contendo seqüências nucleotídicas repetidas constituídas por 801 pb, com cerca de 84,5% de G+C (RUSSO *et al*, 1996., NEIPEL *et al*, 1997). Através do mapeamento do genoma do HHV-8 foram identificados genes comuns aos herpesvírus em geral, genes homólogos ao HSV e ao EBV e genes específicos do HHV-8. Os genes específicos foram nomeados com a inicial K (para KSHV) de forma seqüencial, seguido dos números de 1 a 15 (RUSSO *et al*, 1996.). Posteriormente foram incluídas mais quatro ORFs denominadas K4.1, K4.2, K8.1 e K10.1 (NEIPEL *et al*, 1997).

**Quadro 01** - Propriedades funcionais de alguns genes do HHV-8 (SCHULZ & MOORE, 1999; ZONG *et al*, 1999; McGeoch & Davison, 1999; Neipel *et al*, 1997; RUSSO *et al*, 1996).

<b>ORFS HHV-8</b>	<b>REGIÃO CODIFICANTE</b>	<b>PROPRIEDADES FUNCIONAIS PRESUMIDAS</b>
<b>ORF-9</b>	DNA polimerase	Polimeriza o DNA
<b>ORF-16</b>	v-Bcl-2	Inibe apoptose
<b>ORF-26</b>	VP23	Codifica proteína do capsídeo viral
<b>ORF-71</b>	v-FLIP	Inibe apoptose
<b>ORF-72</b>	V-Ciclina	Estimula proliferação Celular
<b>ORF-74</b>	v-GPCR	Estimula proliferação celular e angiogênese
<b>ORF-K1</b>	Proteína transmembrana	Proliferação celular e sinalização
<b>ORF-K2</b>	v-IL-6	Estimula proliferação de plasmócitos
<b>ORF-K6</b>	v-MIP-I	Induz angiogênese
<b>ORF-K4</b>	v-MIP-II	Induz angiogênese
<b>ORF-K4.1</b>	v-MIP-III	Induz Th2
<b>ORF-K7</b>	Proteína transmembrana	Inibe apoptose
<b>ORF-K8</b>	Glicoproteína	Transcrição
<b>ORF-K9</b>	v-IRF-1	Inibição da síntese de interferon
<b>ORF-K12</b>	Proteína Kaposina	Proteína hidrofóbica
<b>ORF-K13</b>	v-FLIP	Homólogo do inibidor de apoptose
<b>ORF-K15</b>	Proteína da membrana	Sinalização

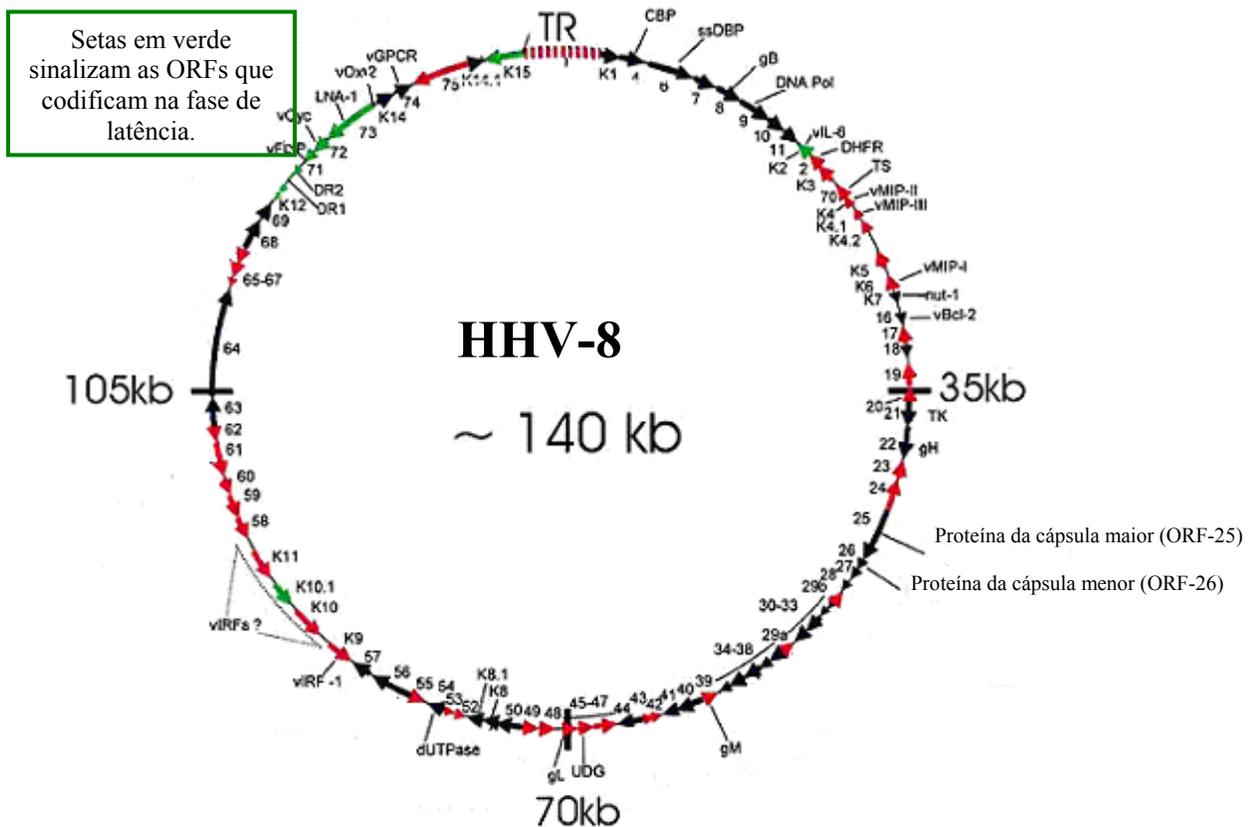
Em conjunto, alguns genes do HHV-8 podem ser os responsáveis por induzir a angiogênese, o crescimento celular, inibir a apoptose celular e a resposta inflamatória normal, tornando a resposta imune antitumoral deficiente, contribuindo para o surgimento e para a progressão das doenças neoplásicas associadas (SCHULZ & MOORE, 1999., ENSOLI, STURZL, MONINI, 2000).

O genoma do HHV-8 é constituído por um conjunto de genes e ORFs (*Open Reading Frame*), apresentando regiões gênicas comuns aos herpesvírus e regiões específicas que caracterizam o HHV-8 (AVELLEIRA & LUPI, 2000), (Figuras 04 e 05). Uma das primeiras seqüências de DNA do HHV-8 correspondeu à região KS330, onde está incluído o ORF26, gene que codifica a proteína do capsídeo do HHV-8 (CHANG *et al*, 1994), (Figuras 04 e 05).



**Figura 04 – Representação gráfica do genoma do HHV-8 na forma linear.** A região hipervariável ORF-K1 está indicada com uma seta verde, localizada no início do genoma. A região ORF-2, muito utilizada para detecção molecular, está indicada com uma seta laranja. (Adaptado de RUSSO *et al*, 1996).

O genoma do HHV-8 na forma epissomal (circular) apresenta cerca de 140 Kb de extensão, contendo ORFs que codificam em polaridade positiva ou negativa e que codificam proteínas virais presentes na infecção latente (SHARP & BOSHOFF, 2000). Células humanas infectadas com o HHV-8 em sua forma latente abrigam inúmeras cópias desse agente com o genoma em forma circular. A proteína viral LANA exerce um papel fundamental na manutenção da forma epissomal do HHV-8, mantendo o estado de latência viral e a imortalização das células hospedeiras infectadas. Foi demonstrado que a forma epissomal do HHV-8 ocorre devido à fusão de zonas de repetição presentes nas extremidades do genoma linear (Sharp and Boshoff, 2000).



**Figura 05. Representação esquemática do genoma do HHV-8 na forma circular (epissomal).** As setas no sentido horário sinalizam as ORFs que codificam em polaridade positiva e as que estão no sentido anti-horário em polaridade negativa. (Adaptada de Sharp and Boshoff, 2000).

#### **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 à 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 ocorre a replicação do DNA viral (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, sendo sintetizadas enzimas e proteínas ligadas ao DNA viral como a 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: SK, 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). Durante a fase de latência do HHV-8 em células espinhosas e endoteliais das lesões de SK ocorre a expressão de quatro transcritos: LANA

(Latency Associated Nuclear Antigen, K-12 (Kaposina), v-ciclina e v-FLIP. Todos esses transcritos tem a função de alterar o ciclo celular e inibir apoptose, sendo que o K-12 parece atuar aumentando a atividade da proteína-quinases celulares (SANTOS, 2002). Na fase lítica ocorre a expressão de genes virais das fases imediata, intermediária e tardia da infecção viral. Experiências “in vitro” demonstraram a participação de três ORFs envolvidas no processo de indução do tumor: ORF-K1, ORF-K-9 e ORF-K74. Como a célula morre após a expressão dos genes de fase lítica da infecção viral, ainda não foi possível comprovar a participação desses genes na patogênese “in vitro” (SANTOS, 2002).

## **1.6 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, constitui a forma 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, foram observados aumento dos casos de SK associado à imunodeficiência grave, 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 seu agente etiológico (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 SK (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 demonstrada 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-ARAÚJO *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).

### **1.3.3 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, localiza-se nas extremidades do corpo, em membros inferiores e superiores, podendo surgir no tronco, pescoço etc... Podem variar em número, observando-se desde lesões isoladas até centenas de lesões disseminadas por todo o corpo, caracterizando o estagio mais grave da doença. O SK também 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).

### **1.6 Epidemiologia e Transmissão do HHV-8**

A detecção sorológica e molecular do HHV-8 tem sido aplicada em diversos estudos epidemiológicos e de transmissão viral. Pesquisas realizadas em diversas partes do mundo vêm fornecendo dados epidemiológicos que demonstram uma distribuição variada do HHV-8 na população geral. Na África o HHV-8 é endêmico, sendo detectado em mais de 50% da população geral de Uganda e Nigéria (LENNETTE *et al*, 1996). Em países do mediterrâneo como Itália e Grécia a prevalência do HHV-8 tem variado de 4-35% (SCHULZ & MOORE, 1999). A soroprevalência para o HHV-8 tem sido baixa, menor que 5%, em países da Ásia, norte da Europa,

Austrália e EUA (SCHULZ *et al*, 2002). Regiões da África e Itália, com elevada soroprevalência para o HHV-8, possuem um número elevado de casos de SK, confirmando essa associação (Gao *et al*, 1996., WHITBY *et al*, 1998., REZZA *et al*, 1999., CATTANI *et al*, 2000., SCHULZ *et al*, 2002). O mesmo não ocorre no Egito, país Africano com elevada soroprevalência para o HHV-8 e poucos casos de SK (ANDREONI *et al*, 1999) e em tribos indígenas da região Amazônica, onde o HHV-8 é endêmico, sem relato de SK (BIGGAR *et al*, 2000).

A frequência 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 frequência do HHV-8 em crianças varia entre 2 e 8%, percentual bem menor que o encontrado na África (LENNETTE *et al*, 1996).

Na América do Sul, a soroprevalência para o HHV-8 foi de 3,8% em doadores de sangue do Brasil, Chile e Argentina (PEREZ *et al*, 2004). No Brasil a soroprevalência em doadores de sangue e na população geral do estado de São Paulo tem variado de 2,5% a 7,4% (CATERINO *et al*, 1999., ZAGO *et al*, 2000., CUNHA *et al*, 2004., PEREZ *et al*, 2004., SOUZA *et al*, 2004). Na população geral de Belém a soroprevalência foi de 16% (FREITAS *et al*, 2002) e em tribos indígenas da Amazônia de 53% (BIGGAR *et al*, 2000).

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+) na cidade de São Paulo. 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 frequência 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 do sexo masculinos e menos comum entre mulheres, usuários de drogas injetáveis e hemofílicos HIV positivos (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, da Europa e em tribos indígenas da Amazônia a elevada prevalência do HHV-8 em crianças e em indivíduos de uma mesma família, sugere que deve haver outras vias de transmissão (MAYAMA *et al*, 1998., MOORE, 2000., PERNA *et al*, 2000., PLANCOULAINÉ *et al* ,2000., BIGGAR *et al*, 2000). Estudos epidemiológicos, realizados em populações endêmicas, vêm fornecendo dados que indicam a existência de várias vias de transmissão viral. A detecção de seqüências de DNA e de anticorpos anti-HHV-8 em crianças indicam que pode estar ocorrendo transmissão vertical ou através do contato com secreções infectadas como a saliva e o leite materno (BIGGAR *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). Alguns autores encontraram altas taxas de infecção pelo HHV-8 em grupos de indivíduos promiscuo, exposto a risco de adquirir viroses e DST, que vivem em condições precárias de higiene e saúde (SCHULZ *et al*, 1999., VERBEEK *et al*, 1999., REGAMEY *et al*, 1998). 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., BIGGAR *et al*, 2000).

Alguns estudos têm indicado o transplante de órgão como sendo uma das vias de transmissão do HHV-8. Já foram relatados casos de soroconversão para o HHV-8 pós-transplantes

em indivíduos submetidos a transplante de coração, renal e hepático (EDMOND *et al*, 2002; MILLIANCOURT *et al*, 2001). Também foram verificados casos de reativação viral pós-transplante tendo como consequência o desenvolvimento de doenças como o sarcoma de Kaposi, o linfoma de cavidades e rejeição do órgão implantado (JONES *et al*, 1998; KAPELUSHNIK *et al*, 2001; EDMOND *et al*, 2002; MARCELIN *et al*, 2004).

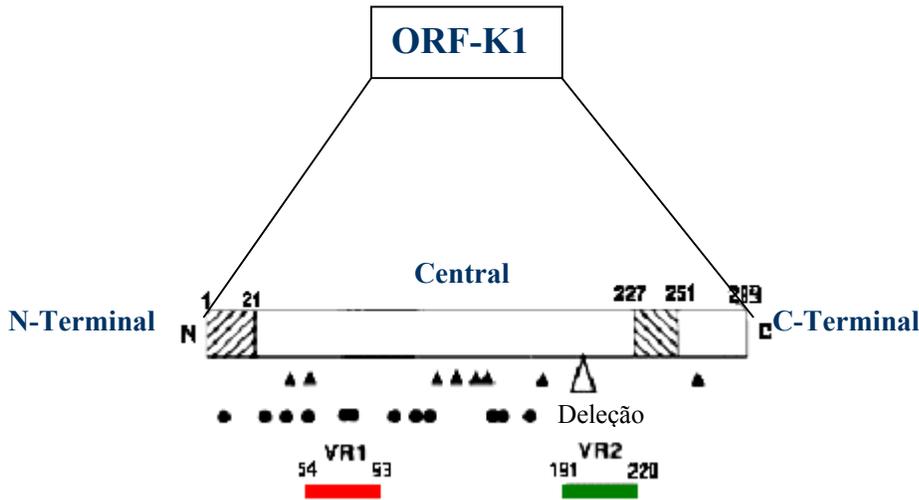
A via parenteral está sendo investigada como uma provável via de transmissão do HHV-8, principalmente através da transfusão sanguínea. O citomegalovírus (CMV) e outros herpesvírus podem ser transmitidos através da transfusão sanguínea e ambos, o CMV e o HHV-8 são transmitidos através do transplante órgãos sólidos (PARRAVICINI *et al*, 1997). O HHV-8 foi detectado em linfócitos CD 19+ de doadores de sangue americanos saudáveis (BLACKBOURN *et al*, 1997). ENBOM *et al*, 2002 detectaram seqüências do HHV-8 em amostras de DNA extraído de sangue periférico de doadores de sangue que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, sugerindo que a transmissão do HHV-8 pode ocorrer através do contato com sangue contaminado. Como nenhum estudo conseguiu documentar a transmissão do HHV-8 através da transfusão sanguínea (ENGELS *et al*, 1999., HUDALL *et al*, 2003), essa ainda é uma questão a ser esclarecida.

### **1.5. Subtipos do HHV-8**

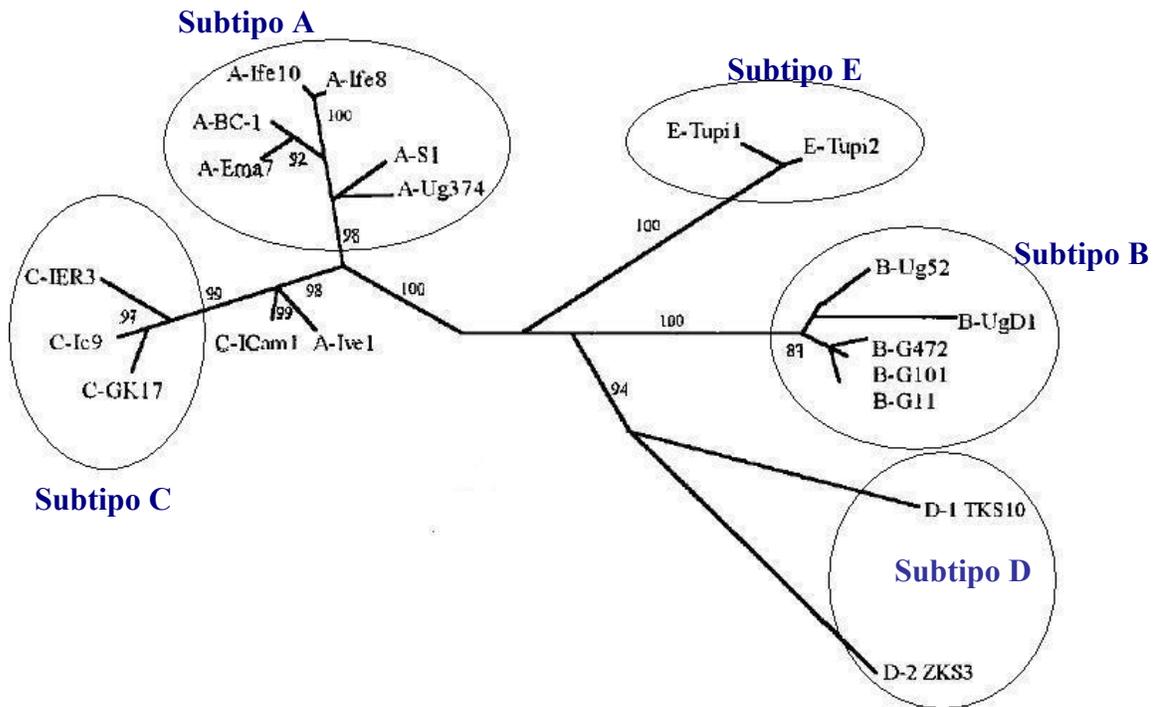
A classificação dos subtipos do HHV-8 foi inicialmente proposta em 1997 por Di Albert e por Zong (DI ALBERT *et al*, 1997., ZONG *et al*, 1997). Di Albert, através da análise de variações nucleotídicas pontuais dentro de um fragmento de 233 pb da região ORF-26 detectou quatro subtipos virais (A, B, C e D). Zong, analisando seqüências nucleotídicas das regiões ORF-26 e ORF-75 de um fragmento de 2.500 pb classificaram três subtipos do HHV-8 (A, B e C). Estudos recentes apontam que a região ORF-26 não é indicada para genotipagem viral por conter um

número muito pequeno de variações nucleotídicas e conseqüentemente não fornecer informações suficientes para genotipagem viral (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999). Por ser facilmente amplificada essa região está comumente sendo utilizada no diagnóstico molecular do HHV-8 (triagem seqüencial).

Atualmente, a região gênica mais utilizada para determinar os subtipos do HHV-8 é a região ORF-K1. Essa região é subdividida em três fragmentos: a porção N-terminal, conservada, composta pelos aminoácidos (aa) 1 ao 19; uma porção central, hipervariável composta pelos aa 20 ao 226, seguido de uma porção C-terminal, relativamente conservada, aa 227 ao 276 (Figura 06). Dentro da região central da ORF-K1 existem dois fragmentos altamente variáveis denominados VR1 (aa 51 ao 92) e VR2 (aa 191 ao 231) (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999), (Figura 06). Através do sequenciamento dos fragmentos hipervariável da ORF-K1 do HHV-8 tem sido possível à caracterização dos diferentes subtipos virais e de suas variantes. Baseados no exposto foram descritos, cinco subtipos do HHV-8 denominados: A, B, C, D e E (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., BIGGAR *et al*, 2000., WHITBY *et al*, 2004), (Figuras 07). Por ser altamente variável a análise de seqüências de DNA da região ORF-K1 tem sido aplicada em estudos de genotipagem viral por diversos pesquisadores (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., MENG *et al*, 1999., LACOSTE *et al*, 2000., WHITBY *et al*, 2004). Estudos de filogenia têm contribuído de modo altamente significativo na determinação do perfil epidemiológico, distribuição dos subtipos virais em regiões geográficas distintas. Através das análises filogenéticas é possível comparar características nucleotídicas presentes nas seqüências de DNA correspondentes a vários subtipos virais provenientes de variadas regiões geográficas, contribuindo para esclarecer a origem desse agente viral. O desenvolvimento de novos programas para análise filogenética tem contribuído muito no desenvolvimento de estudos de filogenia aplicados a virologia.



**Figura 06:** Estrutura da região ORF-K1 contendo 289 aa, sendo dividida em três porções denominadas: N-terminal, central e C-terminal. O fragmento hipervariável VR1 está indicado em vermelho, variando do aminoácido 54 a 93, em verde o fragmento VR2 variando do aminoácido 191 a 228. Os círculos indicam 12 resíduos conservados de cisteína e os triângulos preenchidos indicam sítios de N-glicosilação. O triângulo vazado indica uma região de deleção que pode estar presente em determinados subtipos. Esquema adaptado de ZONG *et al*, 1999.



**Figura 07:** Árvore radial (Neighbor-joining) correspondente à sequência completa da região ORF-K1. O alinhamento foi feito no programa “CLUSTAL W”. Sequências protótipos foram obtidas no “GenBank” para demonstrar a classificação dos subtipos do HHV-8 segundo variações nucleotídicas presentes na região hipervariável ORF-K1. Os subtipos estão separados por círculos e indicados em azul. Figura adaptada de Biggar *et al*, 2000.

A prevalência dos subtipos do HHV-8 tem variado a depender da região geográfica e de características étnicas. Na Europa e nos EUA foi detectada uma maior prevalência dos subtipos A e C do HHV-8, na Ásia do subtipo C, na África dos subtipos B e A5 (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., LACOSTE *et al*., 2000., COOK *et al*, 2002., BRAYFIELD *et al*, 1994). O subtipo D foi identificado em regiões da Austrália e Japão (ZONG *et al*, 1999., MENG *et al*, 2001). No Brasil foram relatados os subtipos A, B e C no estado de São Paulo e o subtipo E em índios da região Amazônica (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 2003., BIGGAR *et al*, 2000., NASCIMENTO *et al*, 2004).

Alguns trabalhos tentaram correlacionar o subtipo viral com a patogenicidade e maior agressividade do tumor em pacientes com SK. O subtipo A, predominante nos EUA, parece estar associado a um maior grau de patogenicidade e agressividade, ocorrendo com frequência o surgimento de lesões viscerais (BORALEVI *et al*, 1998).

## **1.6 Detecção do HHV-8**

### **1.6.1 Cultura Viral**

A técnica da cultura celular para isolamento viral é uma metodologia extremamente difícil e pouco utilizada para o diagnóstico do HHV-8. 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).

### 1.6.2 Métodos Sorológicos

Através do isolamento do HHV-8 de células B presentes em alguns fluidos corporais (sangue periférico, fluido peritoneal, pleural ou pericárdico) de pacientes com BCBL/PEL permitiu a obtenção de antígenos virais do HHV-8 que foram utilizados na implantação de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos.

As primeiras linhagens celulares utilizadas nos ensaios sorológicos foram as duplamente infectadas (EBV e HHV-8), denominadas BC-1 e BC-2 (GAO *et al*, 1996). Posteriormente foram obtidas linhagens infectadas apenas pelo HHV-8, conhecidas como: BCBL-1 (obtida de fluido de paciente com BCBL/PEL com AIDS, RENNE *et al*, 1996); KS-1 e BC-3 (isolado de paciente com fluido ascítico, HIV negativo, SAID *et al*, 1996); BCP-1 (obtida de sangue periférico de paciente com BCBL/PEL, HIV positivo/ BOSHOF *et al*, 1988) e TY-1 (obtida de fluido pericárdico de paciente com BCBL/PEL, HIV positivo/ KATANO *et al*, 1999).A obtenção dessas linhagens permitiu a padronização de técnicas sorológicas utilizadas para detecção de anticorpos anti-HHV-8.

Dentre os métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-HHV-8, os mais aplicados são os testes de imunoenensaio 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). Conseqüentemente, a utilização de métodos

sorológicos para detecção de anticorpos virais tem sido amplamente utilizada em inquéritos soroepidemiológicos.

### **1.6.2a Imunoensaio enzimático (ELISA)**

A técnica de enzimaensaio 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 radioensaio, o qual utiliza isótopos radioativos para detecção de antígenos e 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).

### **1.6.2b Imunofluorescência (IF)**

O teste de imunofluorescência é utilizado para pesquisa de anticorpos em amostra de soro ou plasma. 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 varias vantagens, pois é sensível, específico e reprodutível, de padronização e execução simples, o mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes e pode se determinar às classes e subclasses de anticorpos se utilizando 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).

A utilização dos ensaios sorológicos tem proporcionado o conhecimento sobre a distribuição do HHV-8 em vários continentes, sendo identificadas zonas endêmicas e populações de risco, propensas a desenvolver doenças associadas ao HHV-8. Em pacientes HIV positivas a detecção de anticorpos anti-HHV-8 pode prevê o desenvolvimento do SK em 1/3 dos casos (GAO *et al*, 1996).

### 1.6.3 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 se tem utilizado as técnicas de hibridação e sequenciamento (ASCERL *et al*, 1999).

#### 1.6.3a A Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de um fragmento específico de DNA. 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).

De fato, é possível conseguir expressiva amplificação do fragmento de DNA originário de uma única célula. Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA, por meio de dois oligonucleotídeos sintéticos (“*primers*”) com orientações opostas, com seqüências complementares as extremidades do fragmento alvo. Essa reação ocorre mediante ação da “*Taq* polimerase”, capaz de atuar em elevadas temperaturas. Cada ciclo de reação de amplificação é constituído pôr 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).

A técnica de PCR é muito suscetível à contaminação por produtos de ampliações 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 resultado falso negativo. 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 requer o uso de seqüências genômicas específicas correspondente a um fragmento conservado da seqüência a ser amplificada. 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 “Nested-PCR”. Esta técnica 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 (GAIDANO *et al*, 1997., COSTA & COSTA, 1992).

Pouco se sabe sobre a distribuição do HHV-8 no Brasil, sendo de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas de soroprevalência e de epidemiologia molecular, com a finalidade de conhecer o perfil epidemiológico do HHV-8 nas diferentes regiões geográficas brasileiras. Estudos moleculares permitirão a caracterização e identificação dos diferentes subtipos do HHV-8. A obtenção de seqüências de DNA de regiões variáveis do genoma do HHV-8 aliado ao avanço tecnológico na área de bioinformática tem permitido a realização de análise filogenética, possibilitando inferências referentes à evolução e ancestralidade desse agente viral.

Baseado no exposto é de extrema importância 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, caracterizar os grupos de risco, determinar os subtipos circulantes e as prováveis vias de transmissão viral.

## **2. Objetivos:**

### **Objetivo Geral:**

Estimar a soroprevalência e epidemiologia molecular do Herpesvírus Humano 8 em índios da região Amazônica, doadores de sangue e pacientes com sarcoma de Kaposi da cidade de Campinas e em pacientes HIV positivos da cidade de Salvador.

### **Objetivos Específicos do Estudo**

Aplicar a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-HHV-8.

Comparar os resultados da triagem sorológica incluída na rotina do banco de sangue com a sorologia para detecção de anticorpos-anti-HHV-8 em doadores de sangue do Hemocamp.

Padronizar técnicas moleculares para o diagnóstico do HHV-8.

Realizar genotipagem e análise filogenética do HHV-8 em todas as amostras positivas para os fragmentos VR1 e/ou VR2 da região ORF-K1 do genoma viral.

### 3. Casuística

#### 3.1. Índios da Região Amazônica

Foram analisadas amostras de índios de duas tribos da região Amazônica: Tiriyo e Waiampi. A tribo Tiriyo é composta por cerca de 1700 índios, destes 750 vivem no Brasil, distribuídos em 15 aldeias e o restante no Suriname. A tribo waiampi vive entre o Brasil e a Guiana Francesa. De forma retrospectiva foram analisadas 982 amostras de soro e plasma de duas tribos indígenas da região Amazônica, sendo 664 de índios da tribo Tiriyo e 332 da tribo Waiampi. Essas amostras foram coletadas em abril de 1997, mediante solicitação do Ministério da Saúde para pesquisa soropidemiológica do HIV nessa região. Foram coletados 5 mL de sangue total em tubos contendo EDTA (extração de DNA) e 5 mL em tubos sem anticoagulantes (obtenção do soro), sendo encaminhadas para o Laboratório Avançado em Saúde Pública (LASP), CPqGM, Fiocruz para pesquisa do HIV, sendo posteriormente estocadas a -20°C. Na tribo Tiriyo a média de idade foi de 21 anos (0-81 anos), com 332 indivíduos de cada sexo. Na tribo Waiampi a média de idade também foi de 21 anos (0-67 anos), com 169 indivíduos do sexo masculino e 154 do sexo feminino. Foi possível avaliar a prevalência do HHV-8 em 148 famílias pertencentes a tribo Tiriyo.

No estudo molecular foram analisadas 241 amostras de DNA extraído de sangue periférico de índios de ambas as tribos, sendo 167 amostras de índios da tribo Tiriyo e 74 de índios da tribo Waiampi. Também foram analisadas 70 amostras de DNA extraído de sangue periférico de índios da tribo Parakanã proveniente de um banco de DNA do Hemocentro da Unicamp, sendo 34 (48,6%) do sexo masculino e 36 (51,4%) do sexo feminino. Foram excluídas do estudo amostras de DNA e plasma insuficientes para a análise de detecção molecular do HHV-8. Como critério de inclusão, para garantir a qualidade do DNA, apenas as amostras que amplificaram para um fragmento específico do gene da  $\beta$ -globina humana foram utilizadas no estudo molecular.

### **3.2. *Doadores de sangue***

Foi realizado um estudo retrospectivo, no qual amostras de soro de 319 doadores de sangue provenientes do Hemocentro da Unicamp, a média de idade foi de 34,9 anos, variando de 20 a 64 anos, sendo 233 do sexo masculino e 86 do sexo feminino. Essas amostras foram coletadas ao acaso, sem distinção de sexo, raça, idade ou qualquer outro fator. Não foi aplicado nenhum critério de exclusão no grupo de doadores de sangue. O critério de inclusão nesse grupo foi ser um potencial doador de sangue, sendo a bolsa de sangue coletada e encaminhada para triagem sorológica de rotina aplicada pelo Hemocentro da Unicamp.

### **3.3. *Pacientes com Sarcoma de Kaposi***

Foram estudadas amostras de DNA e soro de 11 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de sarcoma de Kaposi (SK) provenientes do Hospital de Clínicas da Unicamp. As amostras foram coletadas no desenvolvimento da minha dissertação de mestrado, no período de junho de 1999 a março de 2001. A média de idade foi de 37 anos, variando de 27 a 79 anos e todos pertenceram ao sexo masculino. Dando prosseguimento a análise dessas amostras, foi realizada amplificação da região hipervariável ORF-K1 do HHV-8, para estudo de genotipagem viral. O projeto de Mestrado foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em 1998 e todos os pacientes incluídos no presente estudo assinaram termo de consentimento.

### ***3.4. Pacientes HIV positivos da Cidade de Salvador***

Foram estudadas amostras de DNA de 251 pacientes HIV positivos acompanhados no Hospital de Clínicas Professor Edgar Santos (HUPES), Salvador, Bahia. Essas amostras foram coletadas para estudos moleculares de detecção do HIV e estudos de co-infecção. A média de idade geral foi de 37,5 anos (01-67), sendo 56,2% do sexo masculino (141/251) e 43,8% do sexo feminino (110/251). Para análise molecular dessas amostras, foi realizada amplificação da região ORF-26 para triagem. Os casos positivos foram submetidos à amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da região hipervariável ORF-K1 do HHV-8, para estudo de genotipagem viral.

#### **Avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Esse estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, mediante autorização do Comitê de Ética Nacional (CONEP). Os pareceres das referidas instituições encontram-se em anexo.

## 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 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), a 0,144 M, 5 vezes o volume de células e bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 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;  $\text{MgCl}_2$  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;  $\text{MgCl}_2$  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 com 1,0 mL de álcool 70% gelado e, a seguir, foi centrifugado à 2500 rpm, por um minuto. Descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH<sub>2</sub>O). 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 a fresco**

##### **4.2.1- Digestão das amostras**

Uma secção de 3 a 7 mm de tecido não fixado, já macerado, foi colocado em tubo estéril de 1,5 mL. Adicionou-se ao tecido 190 µL de uma solução contendo 0,1 M de Tris – HCl, Ph igual a 7,5, 1% de SDS e 10 µL de proteinase K (10 mg/mL). Incubou-se o material em banho-maria á 55°C, por 3 horas ou durante 12 horas (“overnight”).

##### **4.2.2-Extração com Fenol – Clorofórmio**

Após a etapa de digestão foram adicionados 200 µl de fenol, sendo a agitação feita com auxílio do vórtex. Em seguida foram adicionados 200 µl de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), com agitação feita no vórtex. Em seguida realizou-se a centrifugação (14.000 rpm), por um minuto. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi acrescentado novamente 200 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), com agitação no vórtex e centrifugação a 14.000 rpm, por um minuto.

#### 4.2.3- Precipitação do DNA

O sobrenadante foi transferido para um outro tubo, onde foi adicionado 25 µL de acetato de sódio 3M e 900 µL de etanol 100% gelado (- 20°C). Foi feita homogeneização e posterior incubação a - 70 °C por 30 minutos. Após incubação o material foi submetido à centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (“pellet”) foi dissolvido em água estéril.

#### *4.3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção da região ORF-26 do HHV-8:*

##### 4.3.1 Condições da reação:

Para cada reação de amplificação, utilizou-se 300ng de DNA, 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 2,0 pmol de cada “primer” KS 4 e KS 5, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase para um volume total de 30,0 µl de reação.

Na “Nested-PCR”, as condições da reação de amplificação foram às mesmas no primeiro e segundo “round”. Entretanto, na segunda reação de amplificação foi adicionada uma alíquota de 1,0 µl do produto amplificado na primeira etapa, sendo utilizado os “primers” (KS-1 e KS-2), que flanqueiam uma região de 233pb, um fragmento interno ao amplificado na primeira reação (tabela 01). Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene).

**Tabela 01:** Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção da região ORF-26 do HHV-8.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Local	Sentido	Região ORF-26
KS 4	gACTCTTCgCTgATgAACTgg	nt:673-692	Direto	“primer” externo
KS 5	AgCACTCGCAgggCAgTACg	nt:1224-1243	Reverso	“primer” externo
KS 1	AgCCgAAAggATTCCACCAT	nt:989-1009	Direto	“primer” interno
KS 2	TCCgTgTTgTCTACgTCCA	nt: 1200-1220	Reverso	“primer” interno

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

Os ciclos de amplificação compreenderam: 94°C - 1 minuto (desnaturação); 58°C - 1 minuto (pareamento); 72°C - 1 minuto (extensão). 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.

#### 4.3.2 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. Como controle negativo, uma amostra de DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo não pertencente a nenhum grupo de risco, com sorologia e PCR negativos para o HHV-8 e um branco da reação contendo os reagentes utilizados no preparo do “máster”, acrescido de água pura.

#### **4.4. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção dos fragmentos VR1 e VR2 da região ORF-K1 do HHV-8:**

##### **4.4.1 Condições da reação:**

Para amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1 do HHV-8 foi realizada a “Nested PCR”, que compreende duas etapas de amplificação. Na primeira reação de amplificação utilizou-se 500ng do DNA (2,0 a 5,0 µl), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 2,0 pmol de cada “primer”, 200 mM de DNTPs (desoxirribonucleotídeo/ dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1U de *Taq* DNA polimerase para um volume final de 50,0 µl de reação. Na primeira PCR para amplificação do fragmento VR1 foram utilizados os primers VR1A e K1N, para o fragmento VR2 os “primers” VR2A e VR2B.

As condições da segunda reação de amplificação do fragmento VR1 e VR2 foram às mesmas utilizadas na primeira etapa de amplificação. Entretanto, para a segunda reação de amplificação do fragmento VR1, uma alíquota de 5 µl do produto da primeira reação foi reamplificada com os “primers” (VR1C e K1N), que flanqueiam uma região de 309 pb, ou com os “primers” (K1-1 e K1N), que flanqueiam um fragmento de 246 pb, ambos fragmentos internos ao amplificado na primeira reação (tabela 02). Para a segunda reação de amplificação do fragmento VR2, uma alíquota de 5µl do produto da primeira reação foi reamplificada com os “primers” (VR2A e VR2C), que flanqueiam uma região de 757pb, ou com os primers (K1C1 e VR2C), que flanqueiam um fragmento de 679pb, ambos fragmentos internos ao amplificado na primeira reação (tabela 03).

Trinta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Na primeira reação para amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 os ciclos de amplificação empregados compreenderam: 94°C - 1 minuto (desnaturação); 58°C - 1 minuto

(pareamento); 72°C - 1 minuto (extensão). 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 segunda reação de amplificação houve alteração apenas na temperatura de anelamento dos “primer`s”. Para o conjunto (K1C1 + VR2C), utilizados para amplificação do fragmento VR2, houve uma redução da temperatura de anelamento para 56°C. Para o conjunto de “primer`s” (K1-1 + K1-N), para amplificação do fragmento VR1, foi necessário um aumento da temperatura de anelamento para 60°C.

#### **4.4.2 Detecção:**

Cerca de 5,0µl do produto da segunda reação de amplificação, 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 para o fragmento VR1, observou-se um fragmento de 309pb (VR1C + K1N) ou 246pb (K1-1 + K1N), ao passo que nas amostras negativas não houve fragmento amplificado. Nas amostras positivas para o fragmento VR2, observou-se um fragmento de 757pb (VRA +VR2C ) ou 679pb ( K1C1+VR2C ). 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, como controle negativo, uma amostra de DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo sadio, sem grupo de risco e com sorologia negativa para o HHV-8 e um branco da reação contendo os reagentes utilizados acrescido de água pura.

**Tabela 02:** Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção do fragmento VR1 da região ORF-K1 do Herpesvírus Humano Tipo 8.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Local	Sentido	Tipo (“primer”)
VR1A	5'-gtctttcagacctgttg-3'	nt: 68-86	Direto	externo
VR1C	5'-tggeggtttgcttcgag-3'	nt: 130-147	Direto	interno
K1-1	5'-gagtattcaacgccttac-3'	nt: 193-212	Direto	interno
K1N	5'-tgctgaccacaagtgactgt-3'	nt:420-439	Reverso	externo e interno

Seqüências dos “primers” descritos por COOK *et al.*, 1999., ZONG *et al*, 1999.

**Tabela 03:** Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção do fragmento VR2 da região ORF-K1 do Herpesvírus Humano Tipo 8.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Local	Sentido	Tipo (“primer”)
VR2A	5'-ccgtgtcacaactaaatac-3'	nt: 511-530	Direto	externo e interno
VR2B	5'-catgttgctgttatattgcg-3'	nt: 1344-1325	Reverso	externo
K1C1	5'-cgtctcgcctgtcaaatc-3'	nt: 589- 606	Direto	interno
VR2C	5'-tgtcaccgtcacgagacat-3'	nt: 1268-1250	Reverso	interno

Seqüências dos “primers” descritos por COOK *et al*, 1999.

#### 4.5. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para a $\beta$ -globina humana.

A amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -globina humana seguiu a metodologia descrita por SAIKI *et al.* (1985), com algumas modificações. O fragmento obtido na Nested-PCR foi de 365 pb. As amostras positivas indicaram que o DNA extraído era de boa qualidade e que não houve inibição da reação de amplificação, resultado indispensável para um diagnóstico seguro.

As condições de reação utilizadas para a amplificação do gene da globina  $\beta$  humana foram às mesmas aplicadas para a detecção da região ORF-26 do HHV-8, variando apenas a temperatura de pareamento dos primer's para 56°C. Os "primers" utilizados na primeira reação foram P3 e P5 e na segunda reação P3 e 109 (tabela 04).

**Tabela 04:** Seqüência dos "primers" utilizados para amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Sentido	Tipo
<b>P3*</b>	AgACAgAgAAgACTCTTg	Direto	"primer" externo e interno
<b>P5</b>	TCATTCgTCTgTTTCCCATTC	Reverso	"primer" externo
<b>109</b>	CCCTTCCTATgACATgAACTTAACCAT	Reverso	"primer" interno

Seqüências 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). O ciclo de amplificação padronizado para as duas etapas de amplificação compreendeu: 94°C - 1 minuto (desnaturação); 55°C - 1 minuto (pareamento); 72°C - 1 minuto (extensão). 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 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. Foram observadas bandas com 365pb nas amostras positivas.

#### **4.6 Sequenciamento do DNA**

O sequenciamento automatizado foi realizado no seqüenciador ABI 377. Para tal, os produtos da “Nested-PCR” para os fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1 do HHV-8 foram selecionados. Somente os produtos amplificados com bandas bem definidas, sem excesso de dímeros de “primer” foram submetidos às etapas subseqüentes, apresentadas a seguir.

##### **4.6.1. Purificação:**

As amostras de DNA amplificadas por “Nested-PCR” provenientes dos pacientes infectados pelo HHV-8 foram purificadas utilizando-se o “*Kit Concert Rapid PCR purification system*” (Gibco BRL®, Life Technologies TM, Gaithersburg, MD), conforme as recomendações do fabricante.

##### **4.6.2. Quantificação do Produto Purificado:**

Antes da etapa de sequenciamento, os produtos da "Nested-PCR" purificados, foram quantificados utilizando-se um marcador de massa molecular (Load mass - Gibco-BRL®, Life Technologies). Para isso, foi aplicada uma mistura contendo 2 $\mu$ L do produto amplificado mais 2 $\mu$ L do azul de bromofenol, a corrida foi feita 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.

#### **4.6.3. Reação de Sequenciamento:**

Os produtos da “Nested-PCR” foram submetidos ao sequenciamento direto. Para isso, 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 (“sense ou antisense”) 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.

#### **4.6.4. Análise das Seqüências de DNA:**

Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados no seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*, Boston, MA), usando gel de poliacrilamida 4%, com 6M de uréia. A eletroforese foi conduzida a 1200 V por um período de 6 horas. Para cada amostra foram obtidas seqüências de DNA do HHV-8 utilizando-se os “primer’s” direto (“sense”) e reverso (“antisense”). Foram obtidos eletroferogramas correspondentes as seqüências de DNA dos fragmentos internos (VR1 e VR2) da região ORF-K1 do HHV-8.

Em seguida, os eletroferogramas das seqüências obtidas foram conferidos com o auxílio do programa CHROMAS 2.1, sendo possível comparar as seqüências “sense” e “antisense” da cada amostra. Após a análise dos eletroferogramas correspondentes as seqüências “sense” e “antisense” foi realizado o alinhamento de ambas as seqüências no programa CULSTA X, com a finalidade de obter a seqüência consenso referente a cada amostra. As seqüências consensos foram salvas no formato FASTA e arquivadas, sendo posteriormente utilizadas nos programas de Bioinformática para genotipagem viral.

#### 4.7 Genotipagem

Para genotipagem das seqüências obtidas foram selecionados protótipos cujas seqüências pertencem a região ORF-K1 do HHV-8. Para isso, foi feita uma pesquisa no banco de dados *NCBI/Nucleotide Sequence Database* (“GenBank”/EUA), onde foram selecionados protótipos correspondentes aos cinco subtipos do HHV-8. Em seguida, foi realizado o alinhamento dos protótipos com as seqüências em estudo, utilizando-se o programa “CLUSTAL X”, versão 1.83. Após o alinhamento múltiplo das seqüências, foi feita a edição no programa “GENEDOC” versão 2.6. A escolha do modelo evolutivo foi feita no programa “MODELTEST03-6”, sendo indicado o modelo “FELSENSTEIN 81 mais distribuição Gama” (F81+G). Esse modelo leva em consideração que a freqüência dos quatro nucleotídeos (G, A, T, C) nem sempre é similar, e utiliza a distribuição Gama. O programa PAUP versão 4.0 foi executado com o modelo evolutivo recomendado, sendo geradas as árvores filogenéticas “Neighbour-joining” (NJ) e “Maximum-likelihood” (ML). A sustentação dos grupos monofiléticos na árvore NJ foi avaliada pela análise de 1.000 repetições (Bootstrap). A construção da árvore ML foi baseada na busca heurística, com reconstrução de sub-árvores, havendo permuta de ramos e braços, com resultados validados estatisticamente. Para sustentação dos ramos na árvore ML, valores de  $P < 0,001$  indicaram resultados altamente significantes (\*\*) e  $P < 0,005$  resultados significantes(\*). Os valores de Bootstrap e de ML foram adicionados à árvore de NJ. A construção das árvores filogenéticas possibilitou a classificação dos subtipos do HHV-8. A árvore de NJ gerada no PAUP foi enraizada com protótipos do subtipo D do HHV-8 e visualizada no programa “TreeView” versão 1.4. O número de acesso dos protótipos utilizados pode ser verificado na tabela 18.

Todos os programas utilizados neste trabalho encontram-se disponíveis na “*homepage*”:

<http://lasp.cpqgm.fiocruz.br>

#### **4.8 Imunofluorescência Indireta (“In house” – ANLS)**

Esse experimento foi realizado no Serviço de cultivo de tecidos, departamento de virologia, Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosa (ANLIS), padronizado pela Dra. Celeste Perez em Buenos Aires, Argentina.

As linhagens celulares utilizadas no ensaio de IFI (BCBL-1), positivas para o HHV-8 e negativas para o EBV, foram fornecidas pelo programa “AIDS Research and Reference Reagents Program” (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Realizou-se a detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica e latente do HHV-8 (IFI-LANA+Lítico). Nesse experimento, parte das células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 são induzidas à fase lítica. Com isso, observa-se a expressão de antígenos virais de fase lítica e latente em uma mesma lâmina. As amostras foram consideradas soro-positivas para o HHV-8 quando detectada fluorescência verde na membrana e pontilhado no núcleo, na diluição de 1:40. As amostras negativas não apresentaram fluorescência padrão, sendo observadas células avermelhadas em todo campo. As Lâminas foram lidas em microscópio de fluorescência (aumento 400X), imediatamente e por profissionais habilitados.

#### **4.8 Imunofluorescência Indireta (“In house” – Instituto Adolfo Lutz/ São Paulo)**

Realizou-se a detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica (IFI-Lítico) e de fase latente (IFI-LANA) do HHV-8 em amostras de soro ou plasma provenientes de índios da região Amazônica. Técnica padronizada “in house” na Sessão de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, coordenada pela Dra. Adele Caterino-de-Araújo (CARBONE *et al*, 2002).

Foram utilizadas as células BCBL-1 infectadas pelo HHV-8, EBV negativas. Esta substância promove a passagem de partículas virais presentes nas células BCBL-1 da fase latente para fase lítica. Com a replicação viral, acontece a expressão de antígenos de fase lítica. As células BCBL-1

latentemente infectadas pelo HHV-8 ou estimuladas com forbol éster foram utilizadas na confecção de lâminas para execução dos testes de IFI-LANA e IFI-Lítico. A diluição utilizada para triagem dos soros foi de 1:50, sendo realizada diluições seriadas em algumas amostras positivas. As lâminas foram lidas em microscópio de fluorescência (aumento 400X), imediatamente e por três pessoas habilitadas. As amostras foram consideradas positivas no IFI-LANA quando observada fluorescência verde intensa, com padrão nuclear pontilhado em mais de 90% das células BCBL-1. Nas lâminas negativas, as células BCBL-1 apresentam uma coloração avermelhada, não havendo emissão de fluorescência verde. Na IFI-Lítica foram consideradas positivas as lâminas contendo padrão de fluorescência verde maçã intenso na membrana nuclear e externa e difuso em aproximadamente 5% das células BCBL-1. Nas lâminas negativas foi observado um padrão similar ao da IFI-LANA, coloração avermelhada em todas as células BCBL-1.

#### ***4.8 Análise Estatística***

Os resultados foram expressos em percentagem e proporção (número de amostras positivas/total de amostras testadas). A prevalência de anticorpos anti-HHV-8 foi expressa em percentagem com intervalo de confiança de 95%b (Cis), sendo calculadas com o auxílio do programa MS-excel do windows®. Foram utilizadas tabelas de freqüências para as variáveis categóricas e estatísticas descritivas para a variável contínua. Para verificar a presença de associação (diferença) entre os grupos com relação às variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher. Foi utilizado o teste Qui-quadrado para avaliar a associação entre a soroprevalência do HHV-8 com o gênero e faixas etárias entre as tribos. Como a distribuição da idade não apresentou uma curva normal, para comparar a média entre as tribos foi usando o teste de “Mann-Whitney“. O programa computacional utilizado foi o SPSS, versão 10.0. Resultados foram definidos como estatisticamente significantes quando o valor de  $P \leq 0.05$ .

## 5 Resultados:

### 5.1 Soroprevalência do HHV-8 em doadores de sangue da cidade de Campinas.

#### 5.1.1 Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-HHV-8.

Foram analisadas amostras de soro de 319 candidatos a doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp, sendo 233 do sexo masculino e 86 do sexo feminino. Aplicando-se o teste de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica e latente foi verificada sorologia positiva em 2,8% dos casos (9/319).

Através da análise de dados básicos como: sexo, idade, domicílio atual, grupo sanguíneo foi possível realizar algumas correlações. Com relação ao gênero verificou-se que 3,8% dos doadores do sexo masculino (9/233) apresentaram sorologia positiva para o HHV-8, não sendo detectado sorologia positiva entre os doadores do sexo feminino (0/86). Dividindo o grupo dos doadores em quatro faixas etárias constatou-se uma maior frequência do HHV-8 nas faixas etárias de 31 a 40 anos (4,6%) e de 41 a 50 anos (7,1%), não sendo verificada a presença de anticorpos nas outras faixas etárias de 20 a 30 e > de 50 anos. A média de idade geral dos doadores de sangue foi de 34,9 anos, variando de 20 a 64 anos e a média de idade nos indivíduos com sorologia positiva para o HHV-8 foi de 40,5 anos, variando de 31 a 50 anos (Tabela 05).

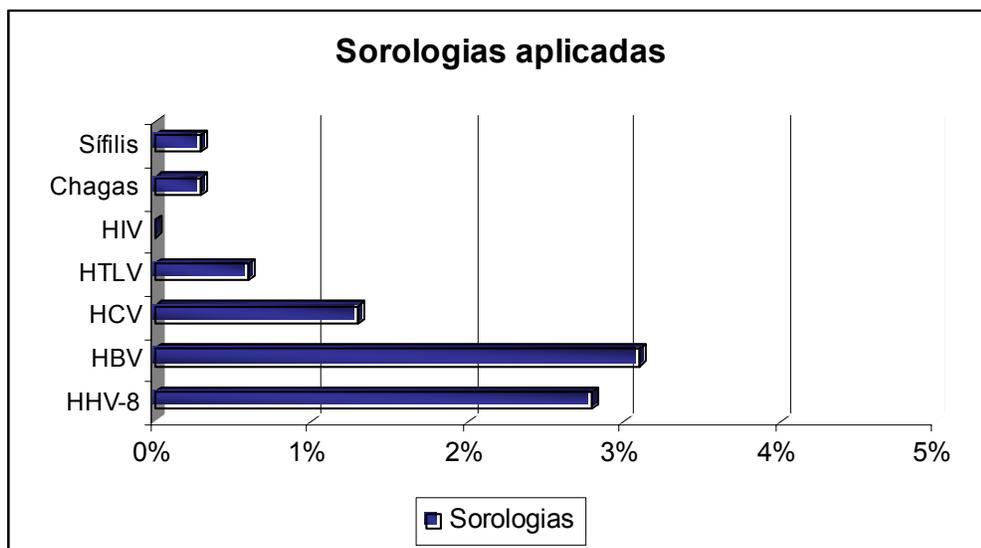
**Tabela 05:** Soroprevalência do HHV-8 em doadores de sangue de Campinas de acordo com a faixa etária.

<b>Faixa Etária (anos)</b>	<b>20 – 30</b>	<b>31 - 40</b>	<b>41 - 50</b>	<b>&gt; 50</b>	<b>Total</b>
<b>Nº Pos/ Nº testado</b>	0/123	5/108	4/56	0/30	9/319
<b>Sorologia Pos (%)</b>	0%	<b>4,6%</b>	<b>7,1%</b>	0%	<b>2,8%</b>

Nota: Nº Pos/ Nº testado – Número de casos positivos e número de casos testados. Sorologia Pos (%) – Sorologia positiva para o HHV-8 (IFI) em porcentagem (%).

### 5.1.2 *Triagem sorológica aplicada no Banco de Sangue do Hemocentro da Unicamp associada à sorologia para o HHV-8.*

A triagem sorológica aplicada no Hemocentro da Unicamp (HEMOCAMP) inclui testes sorológicos para diagnóstico dos vírus HIV, HBV, HCV, HTLV e de doenças como Chagas e sífilis. Avaliando o resultado dos testes constatou-se que 3,1% dos doadores de sangue apresentaram sorologia positiva ou inconclusiva para HBV (10/319); 1,3% com sorologia positiva ou inconclusiva para HCV; 0,6% com sorologia positiva ou inconclusiva para HTLV; 0% com sorologia positiva ou inconclusiva para HIV; 0,3% com sorologia positiva ou inconclusiva para sífilis e 0,3% com sorologia positiva para a doença de Chagas. Correlacionando os testes de triagem aplicados com a sorologia realizada no presente estudo, verificamos que os nove doadores de sangue com sorologia positiva para o HHV-8 (9/ 319) tiveram sorologias negativas para HBV, HCV, HTLV, HIV, Sífilis e Chagas (Gráfico 01).



**Gráfico 01:** Representação gráfica do resultado dos testes sorológicos aplicados.

### **5.1.3 Soroprevalência do HHV-8 X Domicílio dos doadores de sangue do Hemocentro**

O Hemocentro e o Hospital de Clínicas da Unicamp são centros de referências em saúde localizados na cidade de Campinas, prestando assistência médica aos moradores de Campinas de cidades vizinhas. Por isso, o Hemocamp frequentemente recebe doadores de sangue com domicílio em Campinas e região. Observou-se que a cerca de 50 % dos doadores de sangue do Hemocentro residem em Campinas (150/319), seguido das cidades de Sumaré (38/319), Hortolândia (30/319), Americana (12/319), Paulínia (9/319), Cosmópolis (6/319) e de outras cidades como Limeira, Jundiaí, Valinhos, Pedreira etc... Constatou-se que os doadores de sangue do Hemocentro com sorologia positiva para o HHV-8 residiam nas cidades de Campinas (3/9), Hortolândia (2/9), Cosmópolis (2/9), Carapiariba (1/9) e Poços de Caldas (1/9).

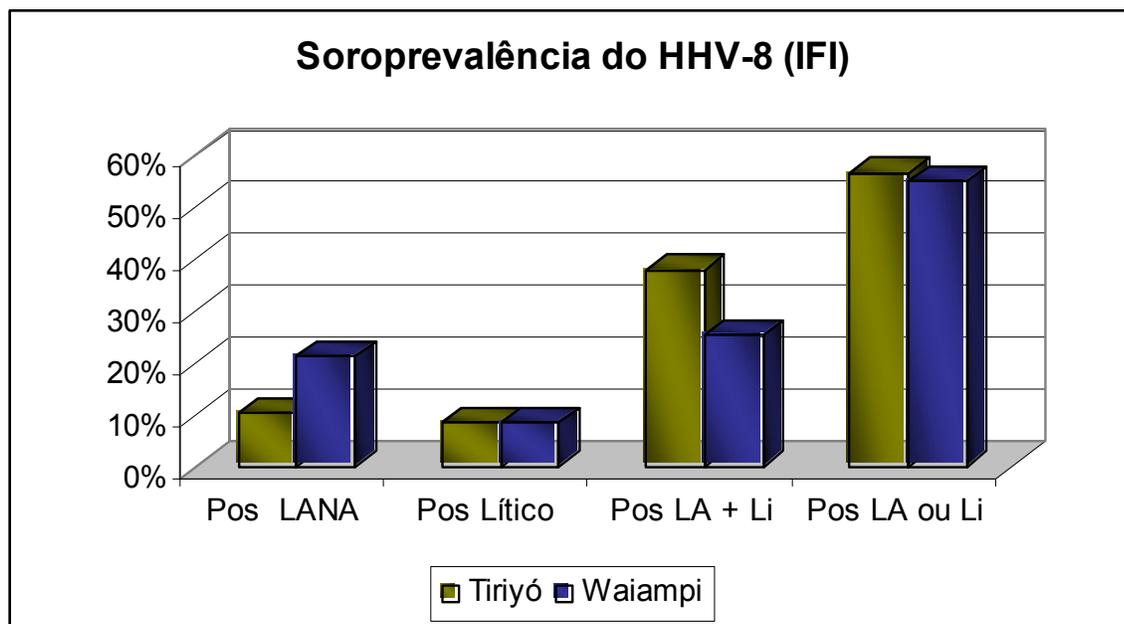
## **5.2 Soroprevalência do HHV-8 em índios da região Amazônica.**

### **5.2.1 Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-HHV-8.**

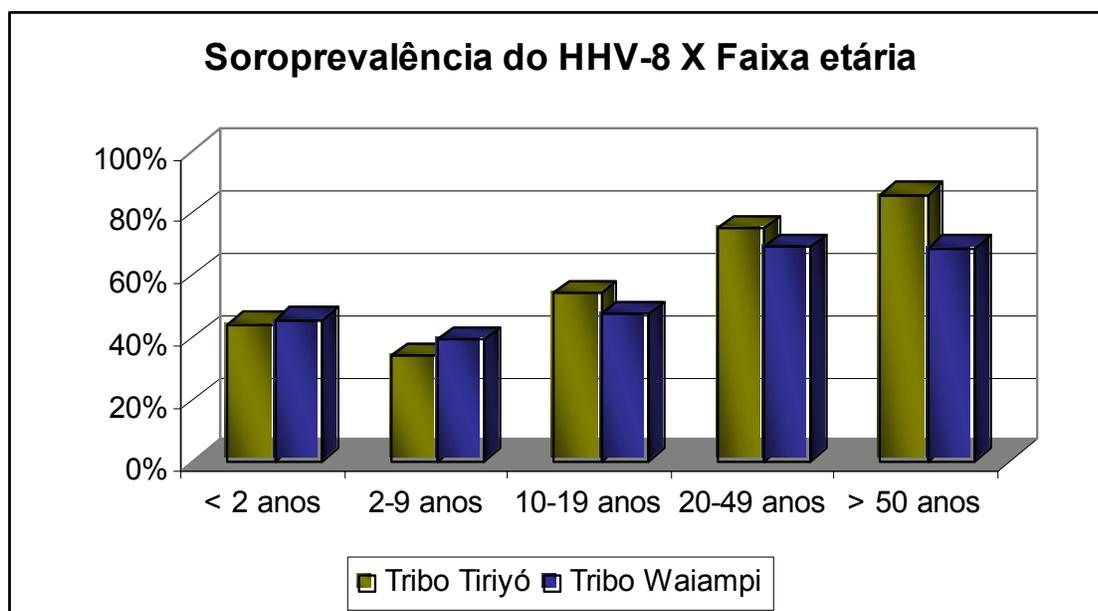
Utilizou-se o ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica e de fase latente (Figura 08). Foram analisadas amostras de soro de 88% dos índios da tribo Tiriyo e 70% da tribo Waiampi que vivem na floresta Amazônica brasileira (Tabela 09), (Figura 09). Foram detectados anticorpos anti-HHV-8 em 56,8% dos índios da tribo Tiriyo e 55,3% dos índios da tribo Waiampi. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa relacionado à prevalência entre as duas tribos, sendo detectado casos positivos em ambos os sexos (Tabela 07). Avaliando as prevalências de acordo com as faixas etárias foi observado um aumento de casos positivos com o aumento da idade, variando de 35% em crianças até 82,3% em adultos com idade superior a 50 anos (Tabelas 07 e 08), (Gráfico 03). Também não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as duas tribos. Surpreendentemente, verificou-se uma prevalência de 43,2% em crianças com menos de dois anos de idade (Tabela 07).

Avaliando as 148 famílias pertencentes à tribo Tiriyo, verificamos que 94% das famílias tinham pelo menos um membro apresentando sorologia positiva para o HHV-8. Também foi observado que mais de 70% das famílias possuíam cerca de metade dos indivíduos infectados pelo HHV-8. Nessa tribo a maioria dos índios apresentaram resultados positivos no IFI-LANA e IFI-Lítico (38% dos casos), sendo 10,3% positivo apenas no IFI-LANA e 8,4% no IFI-Lítico. Avaliando os casos positivos em pelo menos uma das sorologias aplicadas encontramos uma prevalência de 56,8%. Realizando titulação de 50 soros positivos, usando séries de diluições, verificamos altos títulos de anticorpos, variando de 100 a 3.200.

Em relação às amostras dos índios da tribo Waiampi, 25,5% dos casos foram positivos nos testes IFI-LANA e IFI-Lítico, sendo 21,3% positivo apenas no teste IFI-LANA e 8,5% no IFI-Lítico, com 55,3% dos casos positivos em pelo menos uma das sorologias realizadas (Gráfico 02).



**Gráfico 02: Resultados dos testes de Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase latente (LANA) e de fase lítica em índios das tribos Tiriyo e Waiampi.** Pos LANA – sorologia positiva apenas no teste LANA; Pos Lítico – sorologia positiva apenas no lítico; Pos LA + Li – sorologia positiva no LANA e no Lítico; Pos LA ou Li – sorologia positiva em pelo menos um dos testes aplicados.



**Gráfico 03: Soroprevalência do HHV-8 em diferentes faixas etárias nas tribos Tiriyo (cor verde) e Waiampi (cor azul).**

**Tabela 06: Prevalência de anticorpos anti-HHV-8 em índios da região Amazônica de acordo com o sexo e tribo.**

**Número de soros positivos / número de soros tetados (%)**

Tribes	Sexo Masculino	Sexo Feminino	Total	IC 95%*
Tiriyo	193/ 332 (58,1%)	188/ 332 (56,6%)	381/ 664 (57,4%)	53.6 – 61.1
Waiampi	89/ 164 (54,3%)	88/ 154 (57,1%)	177/ 318 (55,7%)	50.2 – 61.1
Total	282/ 496 (56,8%)	276/ 486 (56,8%)	558/ 982 (56,8%)	53.7 – 59.9

Nota: Os ensaios sorológicos (IFA Lana e IFA Lítico) foram conduzidos de acordo com o descrito no material e métodos.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada entre as tribos, com relação ao gênero. (p = 0.695 para tribo Tiriyo e p = 0.606 para tribo Waiampi).

\* Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

**Tabela 07 – Prevalência de anticorpos anti-HHV-8 em tribos indígenas de acordo com a faixa etária.**

Tribes	Número de soros positivos/ número de soros				
	Faixa etária				
	< 2	2-9	10-19	20-49	>50
Tiriyó	11/ 25 (44.0 %)	65/ 191 (34.0 %)	91/ 168 (54.2 %)	154/ 205 (75.1%)	54/ 63 (85.7 %)
<i>Waiampi</i>	5/ 11 (45.4 %)	18/ 46 (39.1 %)	58/ 122 (47.5%)	85/ 123 (69.1%)	11/ 16 (68.7 %)
Total*	16/ 36 (44.4 %)	83/ 237 (35.0 %)	149/ 290 (51.4%)	239/ 328 (72.9%)	65/ 79 (82.3 %)
p valor**	0.936	0.515	0.265	0.235	0.113

\*Diferença estatisticamente significante foi verificada nas diferentes faixas etárias ( $P < 0.001$ ,  $\chi^2 = 106.9843$ ).

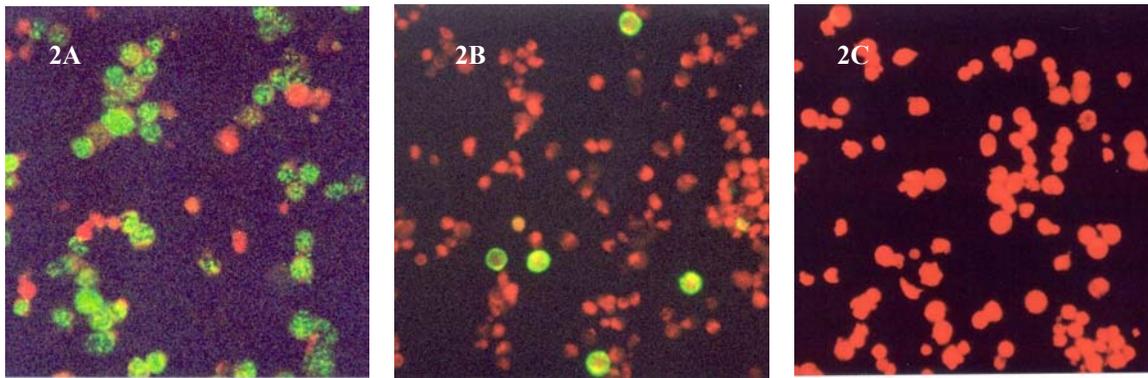
\*\*Nenhuma diferença estatisticamente significante foi verificada nas diferentes faixas etárias comparando-se ambas as tribos.

**Tabela 08.** Aumento da detecção de anticorpos anti-HHV-8 em índios da região Amazônica com o aumento da idade.

<i>Idade (anos)</i>	<i>N testado</i>	<i>N positivos (%)</i>	<i>Razão PR*</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Valor de P</i>
<b>2-9</b>	<b>237</b>	<b>83 (35.0 %)</b>	<b>1,00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>10-19</b>	<b>290</b>	<b>149 (51.4 %)</b>	<b>1,47</b>	<b>1.19 – 1.80</b>	<b>P &lt; 0.001</b>
<b>20-49</b>	<b>328</b>	<b>239 (72.9 %)</b>	<b>2.08</b>	<b>1.73 – 2.50</b>	<b>P &lt; 0.001</b>
<b>&gt; 50</b>	<b>65</b>	<b>79 (82.3 %)</b>	<b>2.35</b>	<b>1.92 – 2.87</b>	<b>P &lt; 0.001</b>

Diferença estatisticamente significante foi verificada entre as diferentes faixas etárias usando o intervalo de confiança de 95% (IC).

\*Foi utilizada a faixa etária de 2-9 anos para comparação.



**Figura 08:** Fotografias obtidas dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase latente (IFI LANA/ 2A) e de fase lítica (IFI Lítica/ 2B) e soro negativo (2C) (400x).

2A- Lâmina positiva com típica fluorescência nuclear de cor verde, indicando a presença de anticorpos anti-HHV-8 de fase latente no soro analisado.

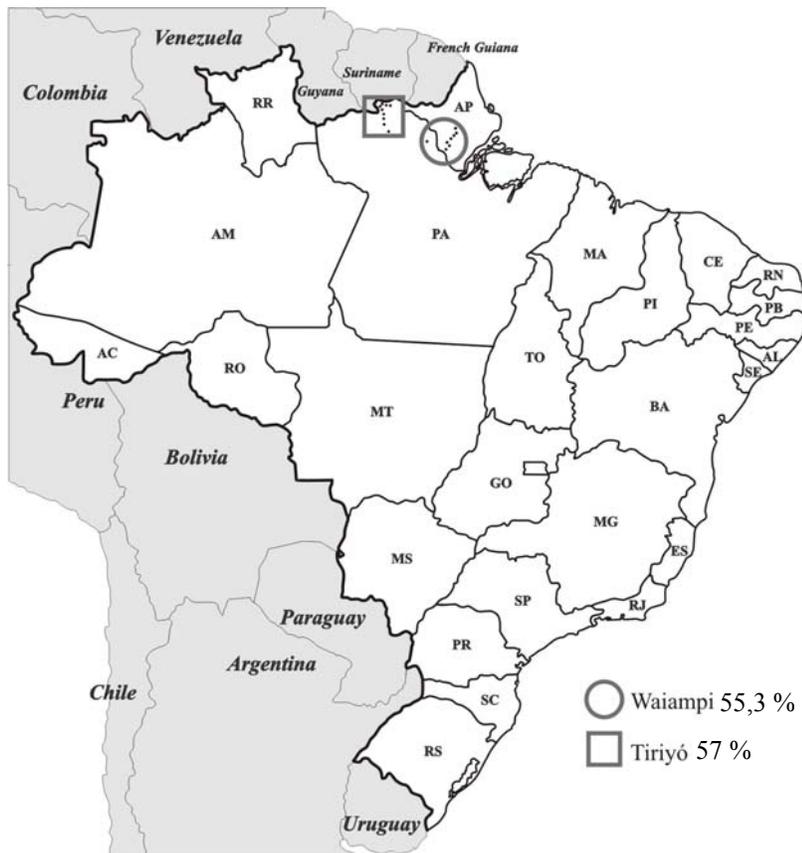
2B- Lâmina positiva com típica fluorescência citoplasmática de cor verde, indicando a presença de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, replicação viral.

2C- Soro controle negativo.

**Tabela 09:** Informações gerais sobre as Tribos indígenas avaliadas em nosso estudo:

NOME	OUTROS NOMES OU GRAFIAS	FAMÍLIA/ LÍNGUA	UF - BRASIL PAÍSES LIMÍTROFES	POPULAÇÃO/ CENSO-ESTIMATIVA	ANO
Parakanã	ParaKanã Apterewa	Tupi Guarani	PA	746	1999
waiampi	Wayampi, Oyampi, Wayãpy, wajãpi	Waiãpi da família Tupi Guarani	AP Guiana Francesa	735 376	1998 1974
Tiriyó (Subgrupos Tsi Kuyana e Kah'yana)	Trio, Taroma, Yawi, Pianokoto	Karib	PA Suriname	735 376	1998 1974

**Nota:** Informações obtidas do Instituto Sócio-ambiental - Povos indígenas (<http://www.socioambiental.org>), dados atualizados em Setembro de 2003.

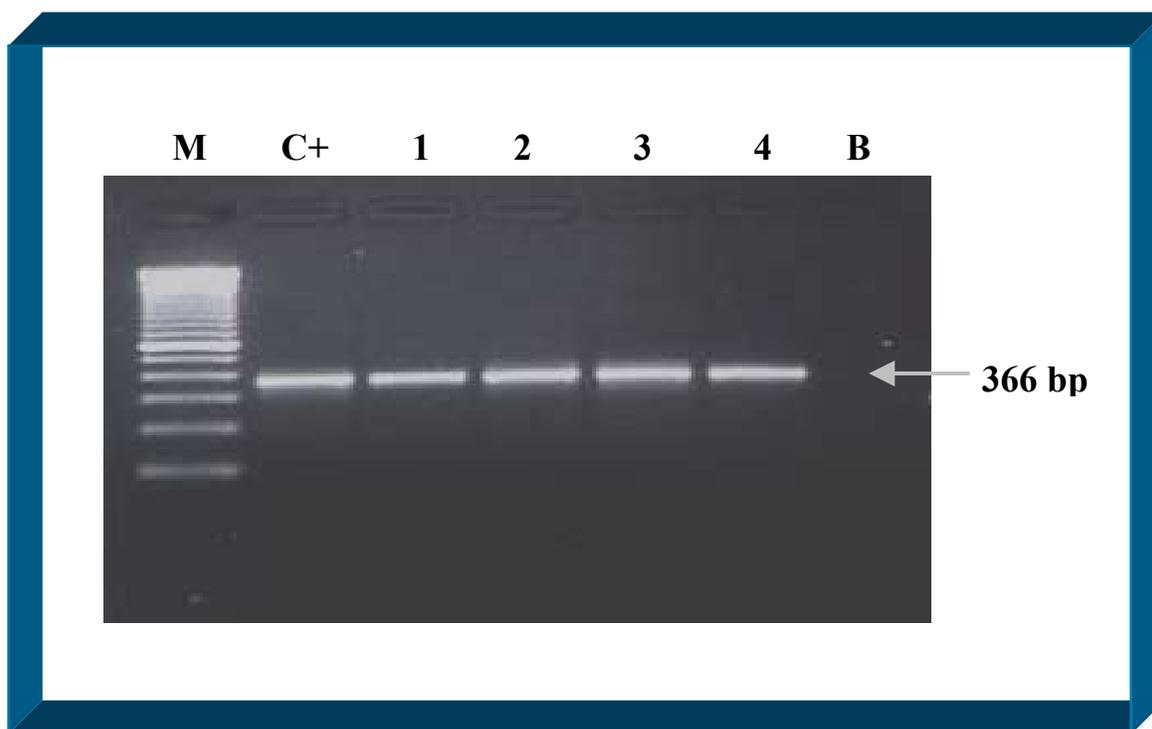


**Figure 09:** Localização geográfica e soroprevalência para o HHV-8 nas tribos Tiriyó e Waiampi, região Amazônica.

### 5.3 Epidemiologia Molecular do HHV-8

#### 5.3.1 Amplificação do gene da $\beta$ -globina humana

Como controle interno da reação de amplificação, todas as amostras foram submetidas à técnica de Nested-PCR destinada à amplificação de uma região específica do gene da  $\beta$ -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 para o gene da  $\beta$ -globina humana foram incluídas no presente estudo (Figura 10).



**Figura 10** – Amplificação de 366 pb da  $\beta$ -globina humana (Nested PCR). **M** – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo para reação); **1, 2, 3, 4** (PCRs positivos indicando DNA de boa qualidade); **B** (Branco da reação, H<sub>2</sub>O).

### **5.3.2 Detecção molecular de seqüências de DNA da região ORF-26 do HHV-8.**

A região ORF-26 foi selecionada para triagem e diagnóstico molecular do HHV-8 pôr ser pouco variável e de fácil amplificação. Foram amplificados dois fragmentos, sendo um externo na primeira amplificação e outro interno (Nested-PCR), com 233pb (Figura 11). Essa técnica foi padronizada no Mestrado no Laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas (Unicamp), seguindo os critérios de Chang et al, 1994 com algumas modificações. No doutorado, realizamos uma parte experimental dessa tese no LASP/CPqGM/Fiocruz, onde foi possível implantar a técnica no Laboratório Avançado em Saúde Pública (LASP/ Fiocruz).

Optou-se pela aplicação da Nested-PCR 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).

A Nested-PCR foi aplicada para pesquisa e detecção de seqüências de DNA do HHV-8 em índios da região Amazônica, pacientes HIV positivos da cidade de Salvador e em pacientes com sarcoma de Kaposi da cidade de Campinas.

A seguir, os resultados serão apresentados de acordo com a população estudada.

#### **5.3.2 A- Amostras de DNA de índios da região Amazônica**

Na triagem molecular foram analisadas 315 amostras de DNA extraídos de sangue periférico de índios da região Amazônica pertencente às tribos Tiriyo, Waiampi e Parakanã. Realizou-se inicialmente amplificação de um fragmento relativamente conservado da região ORF-26 do HHV-8 (Figura 11).

Foram analisadas 167 amostras de DNA de índios pertencentes à Tribo Tiriyo, sendo detectados fragmentos de DNA do HHV-8 (ORF-26) em 3 % dos casos (5/167). Dos cinco casos

com PCR positivo, quatro pertencem ao sexo feminino e um caso do sexo masculino. A triagem molecular (ORF-26) foi realizada antes da triagem sorológica para o HHV-8. Por isso, as amostras de DNA foram testadas ao acaso, sem de fato saber quais dessas amostras apresentava teste sorológico positivo para o HHV-8. Após a realização do teste sorológico observou-se que todos os casos positivos na PCR tiveram teste sorológico positivo, resultados concordantes. Calculando-se o percentual de amostras com PCR positivo considerando-se apenas os índios infectados pelo HHV-8 (sorologia positiva) foi constatado um aumento da frequência de amplificação para 5,68% (5/88). Com relação aos testes sorológicos aplicados, observou-se que 80% dos casos com PCR positivo foram positivos nos teste de IFI-LANA e IFI-Lítico, apenas um caso foi positivo somente no IFI-Lítico. Na fase de replicação viral, o indivíduo infectado sintetiza anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, sendo mais fácil a detecção molecular desse agente. A média de idade no grupo com PCR e sorologia positiva para o HHV-8 foi de 26,8 anos (1-53 anos), sendo a maioria pertencente ao sexo feminino (4/5), apenas um caso do sexo masculino (1/5).

Na Tribo Waiampi foram analisadas 78 amostras de DNA de índios e detectaram-se seqüências de DNA do HHV-8 (ORF-26) em apenas um caso, 1,28% (1/78). Nessa tribo, as amostras também foram testadas antes do resultado da sorologia para o HHV-8. Após a realização do teste sorológico foi observado que todos os casos positivos na PCR tiveram teste sorológico positivo. Calculando-se o percentual de amostras com PCR positivo considerando-se apenas os índios com sorologia positiva também foi constatado um aumento da frequência de amplificação para 1,92 % (1/52). O caso positivo foi uma índia, com 20 anos de idade e sorologia positiva apenas no IFI-LANA.

Foram analisadas 70 amostras de DNA de índios da tribo Parakanã, sendo 34 (48,6%) do sexo masculino e 36 (51,4%) do sexo feminino. Detectou-se DNA do HHV-8 (região ORF-26) em 8,6% dos casos (6/70). Dos casos positivos, 83,3% pertencem ao sexo masculino (5/6) e 16,7%

ao sexo feminino (1/6). Separando as amostras por aldeias foram verificados casos positivos nas aldeias Paratinga (04 amostras) e Aldeia Rio Xingu (02 amostras). Não foram observados casos positivos nas aldeias Apiterewa (Igarapé Bom Jardim) e aldeia Maroxewara. Não foi realizado teste sorológico, pois não havia amostras de soro disponíveis para análise.

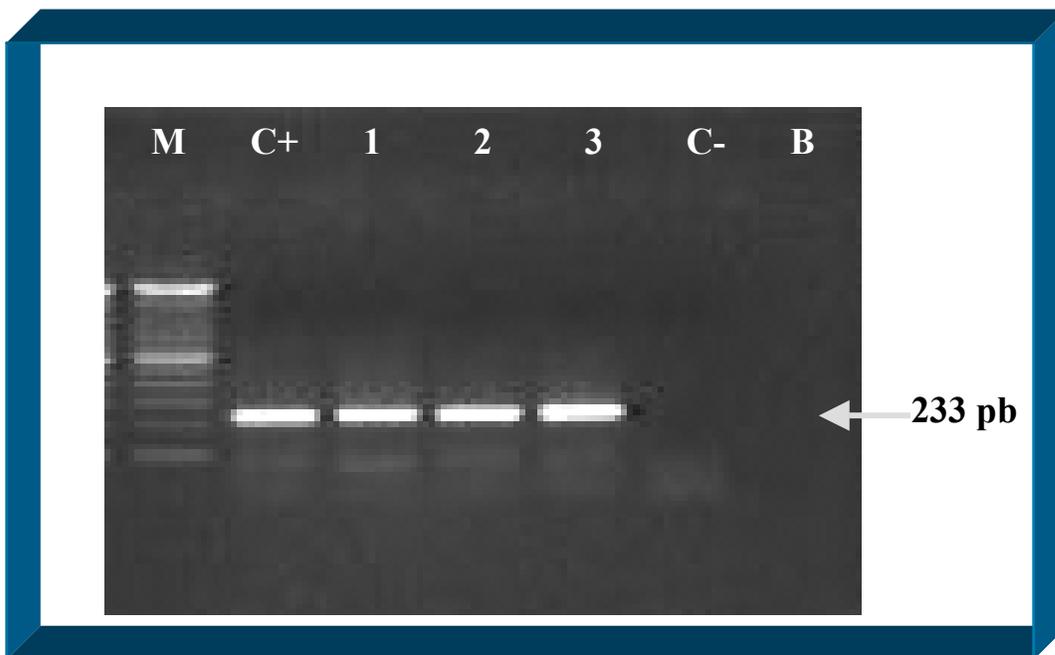
### **5.3.2 B - Amostras de DNA de pacientes HIV positivos da cidade de Salvador**

Foram analisadas amostras de DNA extraídas de sangue periférico de 251 pacientes HIV positivos da cidade de Salvador, sendo 56,2% do sexo masculino (141/252) e 43,8% do sexo feminino (110/251). Foram detectadas seqüências de DNA da região ORF-26 do HHV-8 (triagem molecular) em aproximadamente 4% dos casos (10/251). Com relação ao sexo foram amplificadas seqüências de DNA do HHV-8 em 6,4% dos pacientes do sexo masculino (9/141) e em apenas 0,9% do sexo feminino (1/110). Avaliando apenas os casos positivos, verificou-se que 90% são do sexo masculino (9/10) e apenas 10% do sexo feminino (1/10). A média de idade geral foi de 37,6 anos, já a média dos casos positivos foi de 34,4 anos, variando de 1 a 47 anos. Considerando que houve apenas um caso de criança infectada pelo HHV-8 nesse grupo de pacientes, excluindo-se a criança da avaliação da média de idade verificou-se um aumento da média para 40 anos de idade, variando de 31 a 47 anos. A presença de seqüências de DNA do HHV-8 em uma criança HIV positiva com apenas 1 ano de idade reforça a hipótese da existência de outras vias de transmissão do HHV-8 além, da via sexual.

Não foi realizado diagnóstico sorológico para o HHV-8 nesse grupo de pacientes. Realizou-se o diagnóstico molecular, genotipagem e análise filogenética.

### 5.3.2 C - Amostras de DNA de pacientes com sarcoma de Kaposi de Campinas

Foram analisadas amostras de DNA extraído de biópsia e sangue periférico de onze pacientes com SK confirmados por exame anatomopatológico estudados no Mestrado. Detectaram-se seqüências de DNA do HHV-8 em todas as amostras de DNA de biópsia (11/11) e em 45,5% das amostras de DNA de sangue periférico (5/11) dos pacientes com SK através da Nested-PCR para ORF-26 do HHV-8. Após a triagem molecular (ORF-26), as amostras foram submetidas a amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da região ORF-K1 do HHV-8. Todos os casos de SK foram confirmados por exame anatomopatológico e apresentaram sorologia positiva para o HHV-8 (IFI- Kit da Biotrim). A maioria apresentou o SK associado a AIDS (10/11), havendo apenas um caso da forma clássica da doença.



**Figura 11** – Amplificação de 233 pb da região ORF-26 do HHV-8. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. **M** (Marcador de peso molecular, Ladder 100 pb, Gibico-BRL, USA); **C+** (Controle positivo); **1 e 2** (PCR positivo para amostras de pacientes HIV positivos); **3** (PCR positivo para amostras de índios da região Amazônica); **C<sup>-</sup>** (Controle negativo) e **B** (Branco da reação, H<sub>2</sub>O).

### **5.3.3 Padronização e amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da região ORF-K1 do HHV-8.**

A padronização inicial foi realizada seguindo as condições sugeridas por COOK et al 1999, sendo feito no decorrer da padronização várias modificações visando à obtenção de uma banda nítida, de boa intensidade, sem bandas inespecíficas ou excesso de reagentes. A aplicação da “Nested-PCR” teve como finalidade aumentar a especificidade e sensibilidade da detecção molecular.

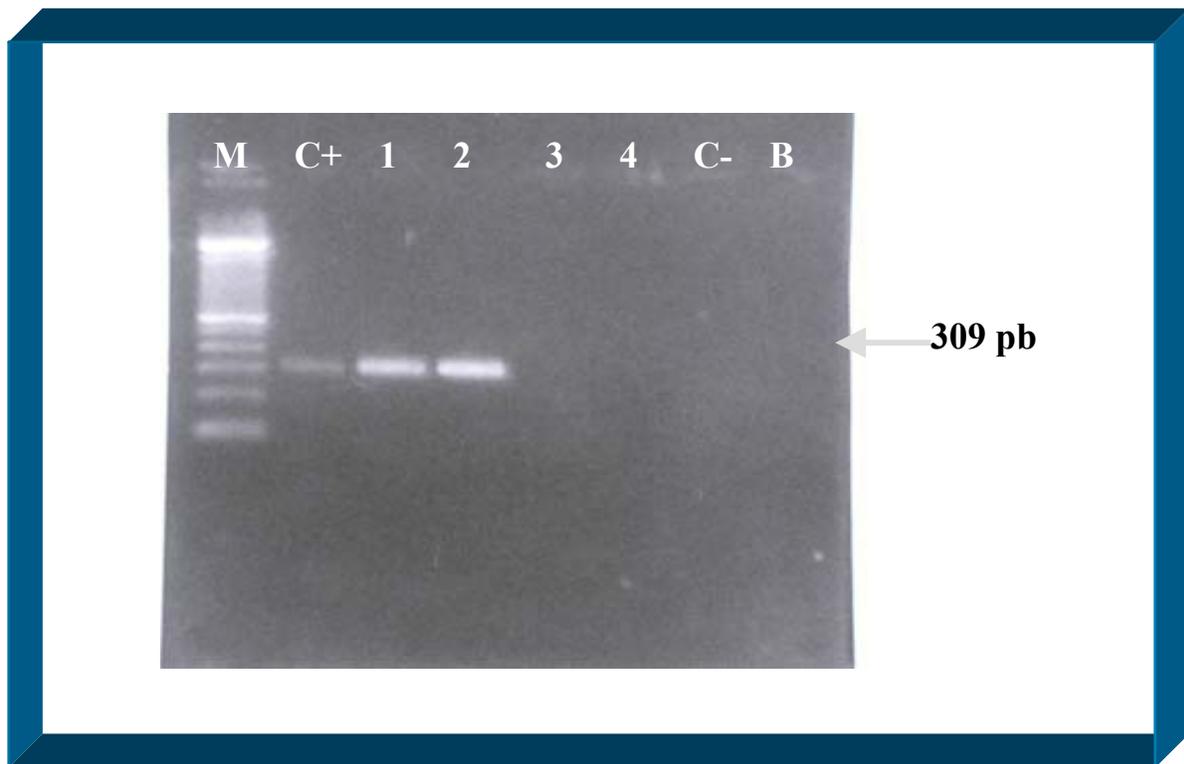
Todas as amostras de DNA que amplificaram na triagem molecular, correspondente a amplificação de um fragmento da região ORF-26 foram submetidas amplificação para os fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1. Foram obtidas 33 amostras de DNA de indivíduos infectados pelo HHV-8 com amplificação positiva para a região ORF-26. Destas, 11 amostras de pacientes com sarcoma de Kaposi, 10 amostras de pacientes HIV positivos e 12 amostras de índios da região Amazônica. Por ser muito variável, a região ORF-K1 foi muito difícil de ser padronizada, sendo necessária à utilização de várias modificações metodológicas para obtenção de um produto amplificado de boa qualidade. Em alguns casos, a amplificação resultou em bandas fracas, não sendo possível realizar o sequenciamento dessas amostras. A dificuldade de se obter fragmentos de DNA da região hipervariável (ORF-K1) do HHV-8 vem sendo referida por diversos autores (BIGGAR et al, 2000., ZONG et al, 1999, COOK et al, 1999). Também tem sido relatada a necessidade de se realizar clonagem da região ORF-K1, principalmente do fragmento VR1, para obtenção de seqüências nucleotídicas passíveis de análise (ZONG et al, 1999).

Foram amplificados dois fragmentos da região hipervariável ORF-K1, denominados VR1 e VR2, sendo o produto da Nested-PCR da VR1 constituída de uma seqüência nucleotídica de 309 pb ou de 247 pb e o da VR2 de 757pb ou de 661pb, a depender do conjunto de “primer’s” utilizados na “Nested-PCR”. Foram obtidos dois fragmentos de tamanhos variados na Nested da VR1 e VR2 como uma das alternativas utilizadas para conseguir amplificar fragmentos da região ORF-K1 de

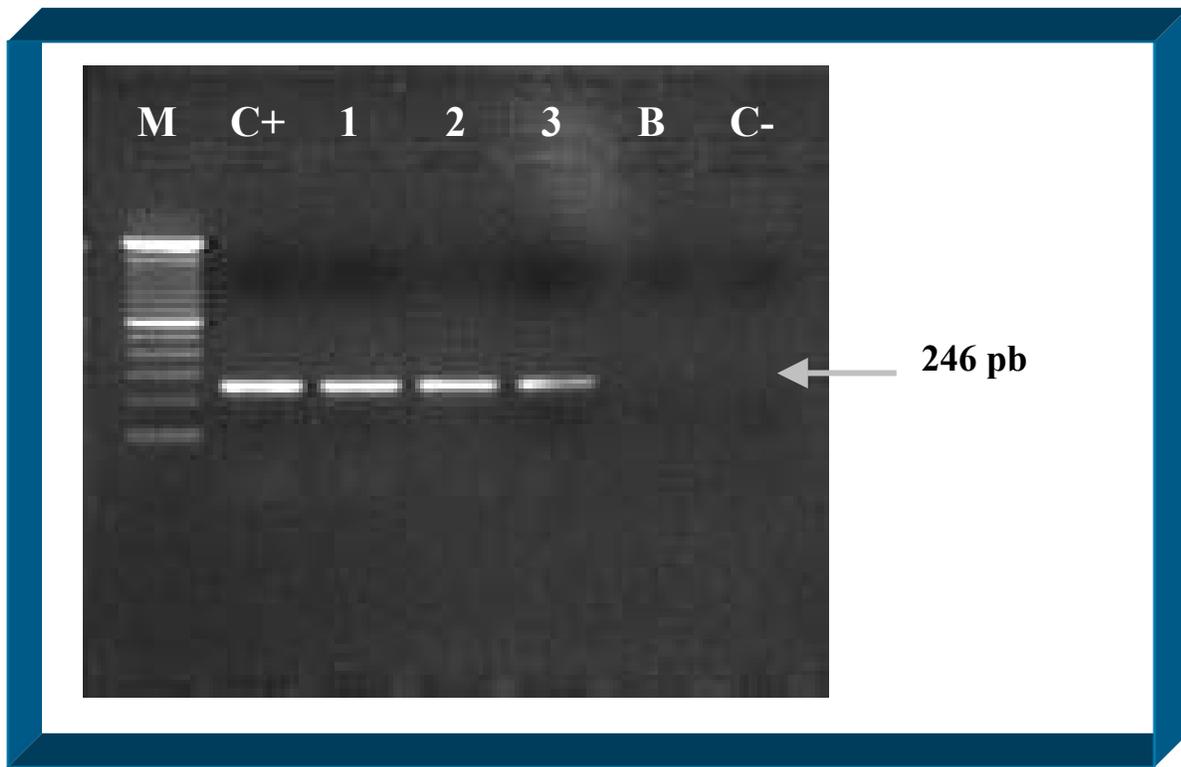
um maior número de amostras. Inicialmente foram amplificados produtos da Neste-PCR do fragmento VR2 de 757pb, contudo algumas amostras que haviam amplificado na ORF-26 não foram amplificadas para VR2, com a finalidade de otimizar a reação de amplificação mandamos sintetizar novos “primer’s” que resultaram na amplificação de um fragmento menor, contendo 661pb. Com isso, foi possível amplificar várias amostras que não haviam amplificado anteriormente. O mesmo foi feito para otimizar a amplificação de fragmentos da VR1. No início utilizamos primers que resultavam na amplificação de um fragmento de 309 pb, posteriormente passamos a utilizar primers que flanqueiam uma região menor, com 247 pb. Com isso, verificamos que amostras que não amplificaram inicialmente, foram amplificadas quando submetidas a Nested com os primers que flanqueiam um fragmento menor do fragmento VR1. Contudo, nem todas as amostras amplificadas resultaram com banda de qualidade para serem seqüenciadas.

Dos 33 casos com amplificação positiva para a região ORF-26, foram obtidos fragmentos da VR1 em 48,5% dos casos (16/33) e VR2 em 81,8% (27/33). Essas amostras foram submetidas às etapas de purificação e sequenciamento gênico. Separando por grupos, detectaram-se os fragmentos VR1 e VR2 em quase 100% dos casos de sarcoma de Kaposi, não sendo obtida seqüência de VR1 em apenas uma das 11 amostras positivas. Em amostras de pacientes HIV positivos foram detectados fragmentos de VR1 em apenas 2 casos (2/10) e de VR2 em 9 casos (9/10). Em amostras de índios da região Amazônica foram detectados fragmentos de VR1 em 4 casos (4/12) e de VR2 em 7 casos (7/12). Contudo, houve alguns casos que depois da purificação a banda ficou muito fraca, sendo a amostra rejeitada na etapa de quantificação que precede ao sequenciamento. Verificamos que as amostras de DNA provenientes dos pacientes com SK amplificaram com mais facilidade para os fragmentos da ORF-K1 quando comparado com as amostras dos índios e pacientes HIV positivos de Salvador. Provavelmente devido a uma maior carga viral presente nos pacientes sintomáticos (SK positivos). Infelizmente não podemos confirmar essa hipótese por não

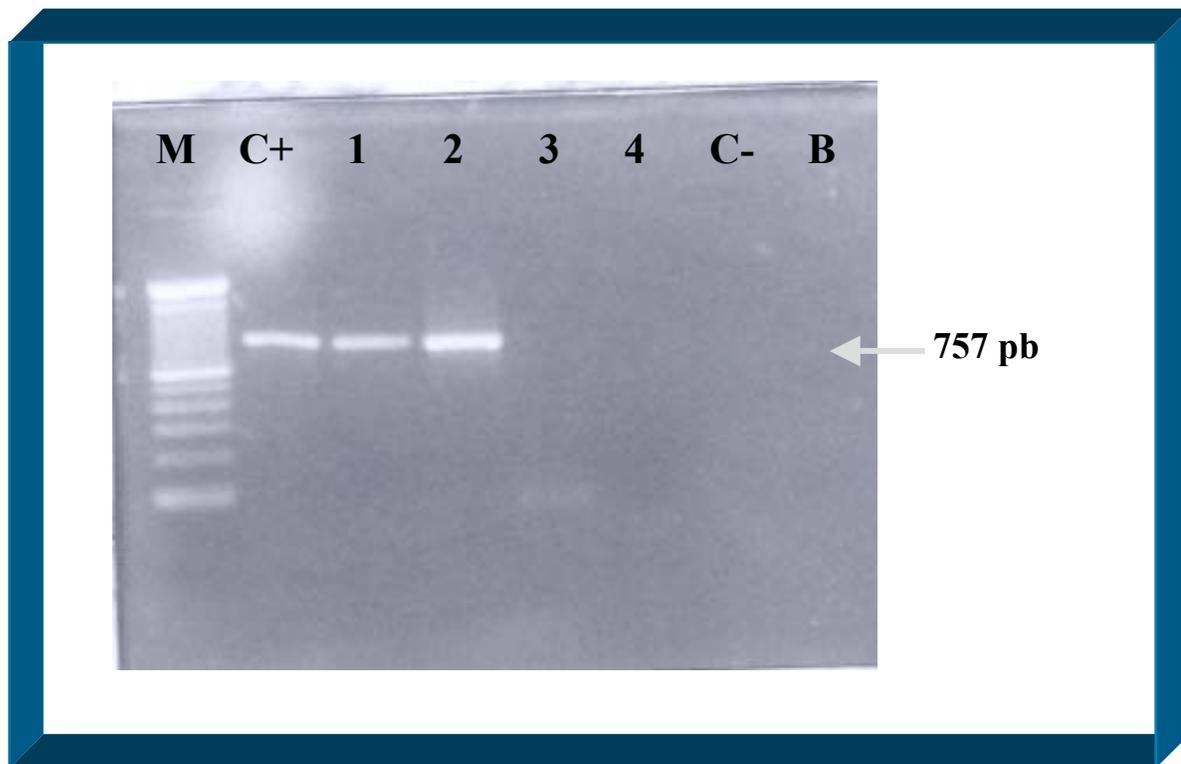
ter realizado carga viral nessas amostras. Foi feita a opção de realizar o sequenciamento direto das amostras para a ORF-K1. É importante ressaltar que vários trabalhos têm relatado problemas no decorrer do sequenciamento direto, recomendando que seja feita a clonagem antes do sequenciamento (BIGGAR et al, 2000., ZONG et al, 1999). Fizemos a opção pelo sequenciamento direto por ser mais simples, de fácil execução, mais barato, com risco reduzido de contaminação quando com parado com a clonagem pré-sequenciamento.



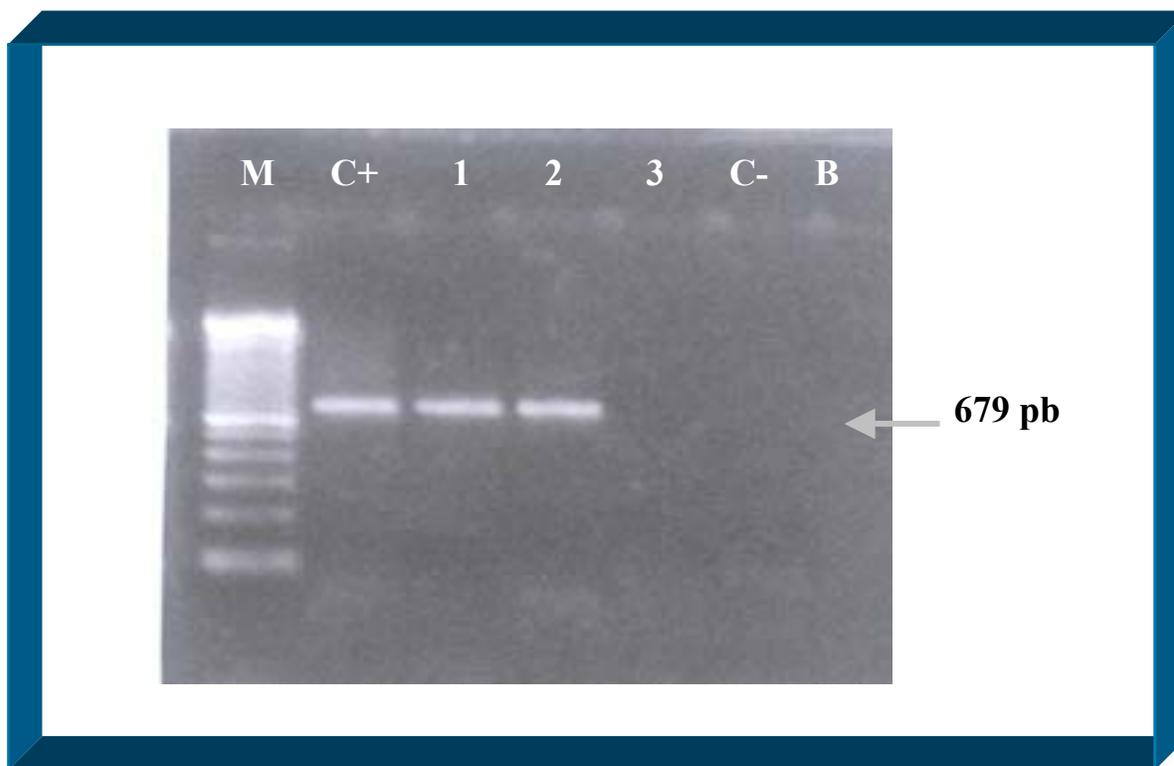
**Figura 12** – Amplificação de 309 pb do fragmento VR1 da região ORF-K1 do HHV-8 (Nested-PCR - “primers” VR1-C e K1N). Eletroforese em gel de agarose 2 % corado pelo brometo de etídio. **M** (Marcador de peso molecular, Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo para reação); **C<sup>-</sup>** (Controle negativo para presença de DNA do vírus); **1, 2** (Nested-PCR positivos: 1- DNA de índios, 2- DNA de paciente HIV+; **3, 4** (Nested-PCR negativos; **B** (Branco da reação, H<sub>2</sub>O).



**Figura 13** – Amplificação de 246 pb do fragmento VR1 da região ORF-K1 do HHV-8 (Nested-PCR - “primers” K1-1 e K1N). Eletroforese em gel de agarose 2 % corado pelo brometo de etídio. **M** (Marcador de peso molecular, Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo para reação); **C<sup>-</sup>** (Controle negativo para presença de DNA do vírus); **1, 2, 3, 4 e 5** (Nested-PCR de amostras positivas).



**Figura 14** – Amplificação de 757 pb do fragmento VR2 da região ORF-K1 do HHV-8 (Nested-PCR - “primers” K1C1 e VR2-C). Eletroforese em gel de agarose 2 % corado pelo brometo de etídio. **M** (Marcador de peso molecular, Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo para reação; **C<sup>-</sup>** (Controle negativo para presença de DNA do vírus); **1, 2** (Nested-PCR de amostras positivos); **3, 4** (Nested-PCR negativos); **B** (Branco da reação/ H<sub>2</sub>O).



**Figura 15** – Amplificação de 679 pb do fragmento VR2 da região ORF-K1 do HHV-8 (Nested-PCR - “primers” K1C1 e VR2-C”). Eletroforese em gel de agarose 2 % corado pelo brometo de etídio. **M** (Marcador de peso molecular, Ladder 100 pb, Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo para reação); **C<sup>-</sup>** (Controle negativo para presença de DNA do HHV-8); **1, 2** (Nested-PCR positivos); **3** (Nested-PCR negativos); **B** (Branco da reação, H<sub>2</sub>O).

#### 5.3.4 *Classificação Genotípica:*

As seqüências referentes aos fragmentos VR1 e VR2 da região hipervariável ORF-K1 do HHV-8 foram utilizadas para genotipagem viral. A partir do “Genbank” foram selecionados protótipos da região alvo do estudo (ORF-K1) com a finalidade de construir um banco de dados (“DATASET”) (Tabela 10). Selecionamos protótipos correspondentes aos cinco subtipos descritos, provenientes de regiões geográficas distintas. A maioria dos protótipos selecionados contém uma

seqüência completa da ORF-K1 e foram utilizados no alinhamento de ambos fragmentos (VR1 e VR2).

A partir dos dados do alinhamento múltiplo de 155 nucleotídeos (nt) do fragmento VR1 e de 215 nt do fragmento VR2 da ORF-K1 foram reconstruídas árvores filogenéticas. O programa PAUP versão 4.0 foi executado com o modelo de substituição nucleotídica “FELSENSTEIN 81 mais distribuição Gama”, com valores de  $\alpha=0,4256$  para análise do fragmento VR1 (Figura 16) e  $\alpha=0,7184$  para análise do fragmento VR2 (Figura 17), sendo geradas as árvores filogenéticas “Neighbour-joining” (NJ) e “Maximum-likelihood” (ML). Foram realizadas as análises NJ e a partir da primeira árvore de NJ foi feita a análise de ML. Nas figuras 16 (VR1) e 17 (VR2) podem ser observadas as árvores geradas por NJ com valores de “bootstrap” consideráveis (acima de 70%) e valores de ML estatisticamente significantes quando  $P<0,005$  (\*) e altamente significantes quando  $P<0,001$  (\*\*). Verificamos na árvore VR1 e VR2 a formação de “clusters” correspondentes aos cinco subtipos do HHV-8, o que permitiu a classificação genotípica das seqüências. Observamos que todos os protótipos utilizados em nossa análise foram classificados com o mesmo subtipo descrito no “GenBank” (artigo de referência) na análise de ambos fragmentos (VR1 e VR2).

As seqüências analisadas no presente trabalho foram renomeadas e podem ser localizadas nas árvores correspondentes aos fragmentos VR1 (Figura 16) e VR2 (Figura 17). Para facilitar a identificação das seqüências analisadas e inseridas nas árvores filogenéticas segue abaixo uma lista contendo um código para cada seqüência, seguido do fragmento amplificado (VR1 ou VR2), origem da amostra de DNA (B-extraído de biópsia e SP-extraído de sangue periférico) e subtipo do HHV-8.

BR1CP01 - VR1 – Paciente SK-07 de Campinas – DNA (B) – Subtipo A.

BR1CP02 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo A.

BR1CP03 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.

BR1CP04 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.

BR1CP05 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo A.  
BR1CP06 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo B.  
BR1CP07 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR1CP11 - VR1 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR1AM01 - VR1 – Índio 01 da Tribo Waiampi – DNA (SP) – Subtipo A.  
BR1AM04 - VR1 – Índio 04 da Tribo Parakanã – DNA (SP) – Subtipo E.  
BR1SSA01 - VR1 – Paciente 059 HIV+ / SSA – DNA (SP) – Subtipo B.  
BR2CP01 – VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo A.  
BR2CP02 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo B.  
BR2CP03 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR2CP04 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR2CP06 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo B.  
BR2CP07 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo A/C.  
BR2CP08 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR2CP09 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo B.  
BR2CP10 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR2CP11 - VR2 – Paciente SK de Campinas – DNA (B) – Subtipo C.  
BR2AM01 – VR2 – Índio 01 /Tribo Waiampi – DNA (SP) – Subtipo A.  
BR2AM02 – VR2 – Índio 02 /Tribo Tiriyo – DNA (SP) – Subtipo E.  
BR2AM03 – VR2 – Índio 03 / Tribo Parakanã – DNA (SP) – Subtipo E.  
BR2SSA01 –VR2 – Paciente 059 HIV+ / SSA – DNA (SP) – Subtipo B.

A árvore correspondente ao fragmento VR1 apresentou elevados valores de “bootstrap” (60-100%), com valores de ML altamente significantes ( $p < 0,001$ ). Esses dados consolidam as inferências filogenéticas baseadas nessa topologia (Figura 16). Foram utilizados os protótipos do subtipo D (TKS10 **D1**/China e ZKS3 **D2**/Nova Zelândia) para enraizar a referida árvore. O cluster correspondente ao subtipo E do HHV-8 apresentou apenas um grupo monofilético contendo o protótipo Tupi 1 e o isolado BR1AM04, com 98% de “bootstrap” e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Os isolados BR1SSA01 e BR1CP06 foram inseridos no cluster

correspondente ao subtipo B, com 97% de bootstrap e resultados de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). O ramo correspondente ao ancestral comum dos subtipos A e C apresentou 99% de bootstrap, com valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ), consolidando a distinção entre os “clusters” referentes aos subtipos A e C. Analisando o cluster referente ao subtipo A verificamos um valor de “bootstrap” de 89%. Os isolados BR1CP02, BR1CP01, BR1AM01 e BR1CP05 formaram um grupo monofilético com o protótipo BCBL-B, subtipo A, variante A4, apresentando 73% de “bootstrap”. Os isolados BR1CP07, BR1CP04, BR1CP11 e BR1CP01 foram inseridos no “cluster” correspondente ao subtipo C, juntamente com os protótipos do referido subtipo (Ukma3, K124Cra, Ukma8, Ukma1, Ukb22, GK18 e GK17), apresentando 97% de “bootstrap” e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ).

A árvore VR2 apresentou valores de “bootstrap” variando de 53 a 100%, com valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ), consolidando as inferências filogenéticas baseadas nessa topologia (Figura 17). A árvore foi enraizada com o protótipo do subtipo D (TKS10 **D1**/China). O isolado BR2AM02 formou um grupo monofilético com o protótipo Tupi 1 (subtipo E), com 69% de “bootstrap”. O isolado BR2AM03 foi incluído no cluster correspondente ao subtipo E. Os isolados BR2CP02, BR2CP09, BR2CP06 e BRSSA01 fazem parte do “cluster” onde estão inseridos os protótipos correspondentes ao subtipo B (Ukma24, T2cloneV, UgD2, UgD1, G51, G71, MP1 e G91), com bootstrap de 100% e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Os subtipos A e C possuem um ancestral comum e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Analisando o “cluster” referente ao subtipo A verificamos que o ramo onde está localizado o ancestral comum do subtipo A apresentou valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Os isolados BR2CP01 e BR2AM01 pertencem ao “cluster” formado pelos protótipos BCBL-B, BCBL-R e Ema7, subtipo A, com 98% de “bootstrap” e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Analisando o cluster referente ao subtipo C verificamos que o isolado BR2CP07 formou um grupo monofilético com o

protótipo Ukma8, subtipo C, com “bootstrap” de 90%. O isolado BR2CP03 formou um grupo monofilético com o protótipo ASM72 (subtipo C). O isolado BR2CP04 pertence ao mesmo cluster dos protótipos Ukma3, Ukma1 e GK18, classificados como subtipo C, com 82% de “bootstrap” e valores de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ). Os isolados BR2CP10 e BR2CP11 fazem parte do cluster onde estão inseridos os protótipos Ukma8 e ASM72 (subtipo C), apresentando “bootstrap” de 62%. Os valores de “bootstrap” ( $> 50\%$  c/ 1000 repetições) e de ML altamente significantes ( $P < 0,001$ ) ou significantes ( $P < 0,005$ ) conferem suporte estatístico as inferências baseadas nas árvores filogenéticas. Os dados referentes a localização geográfica e o número de acesso dos protótipos utilizados podem ser verificados na tabela 10.

Todas as amostras que continham seqüências nucleotídicas para os fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1 apresentaram o mesmo subtipo em ambas as regiões, exceto a mostra do paciente 02 com sarcoma de Kaposi associado a AIDS (Campinas). As seqüências provenientes desse paciente foram classificadas como “subtipo A” (BR1CP02) na análise do fragmento VR1 e como “subtipo B” (BR2CP02) na análise do fragmento VR2 da ORF K1 (Figuras 16 e 17). Foram analisadas duas seqüências obtidas de PCR distintos para cada fragmento, confirmando o resultado. Pode se tratar de uma dupla infecção ou de cepa recombinante, para confirmar será necessário realizar clonagem e análise de alguns clones.

Não foi possível realizar a genotipagem de três amostras de pacientes HIV positivos da cidade de Salvador, sendo classificados como subtipo indeterminado. As seqüências nucleotídicas correspondente ao fragmento VR2 da ORF-K1 dessas amostras não alinharam com os protótipos utilizados em nosso “dataset” (Verificar alinhamento em anexo). Realizamos um “BLAST” dessas seqüências e verificamos que elas apresentaram uma similaridade de cerca de 95 a 96% com seqüências correspondentes a região ORF-K1 do HHV-8. Isto pode ter ocorrido devido a um erro da Taq DNA Polimerase, que pode ter inserido alguns nucleotídeos em local errado na etapa de

extensão. Também pode ser resultado de uma contaminação ocorrida na etapa de preparo da reação de amplificação. Outra possibilidade é que pode se tratar de um novo subtipo do HHV-8 ou de uma cepa recombinante. Para elucidarmos este caso será preciso repetir o PCR, sequenciamento e genotipagem.

A seqüência BR2CP08 apresentou um comportamento mais divergente quando comparada com as outras seqüências analisadas. Não foi possível determinar se esse isolado pertence ao subtipo A ou C do HHV-8. Como os subtipos A e C apresentam um ancestral comum pode ser que esse isolado tenha divergido do ancestral comum, resultando em uma nova variante. Será necessário obter novas seqüências nucleotídicas para reavaliar os dados obtidos.

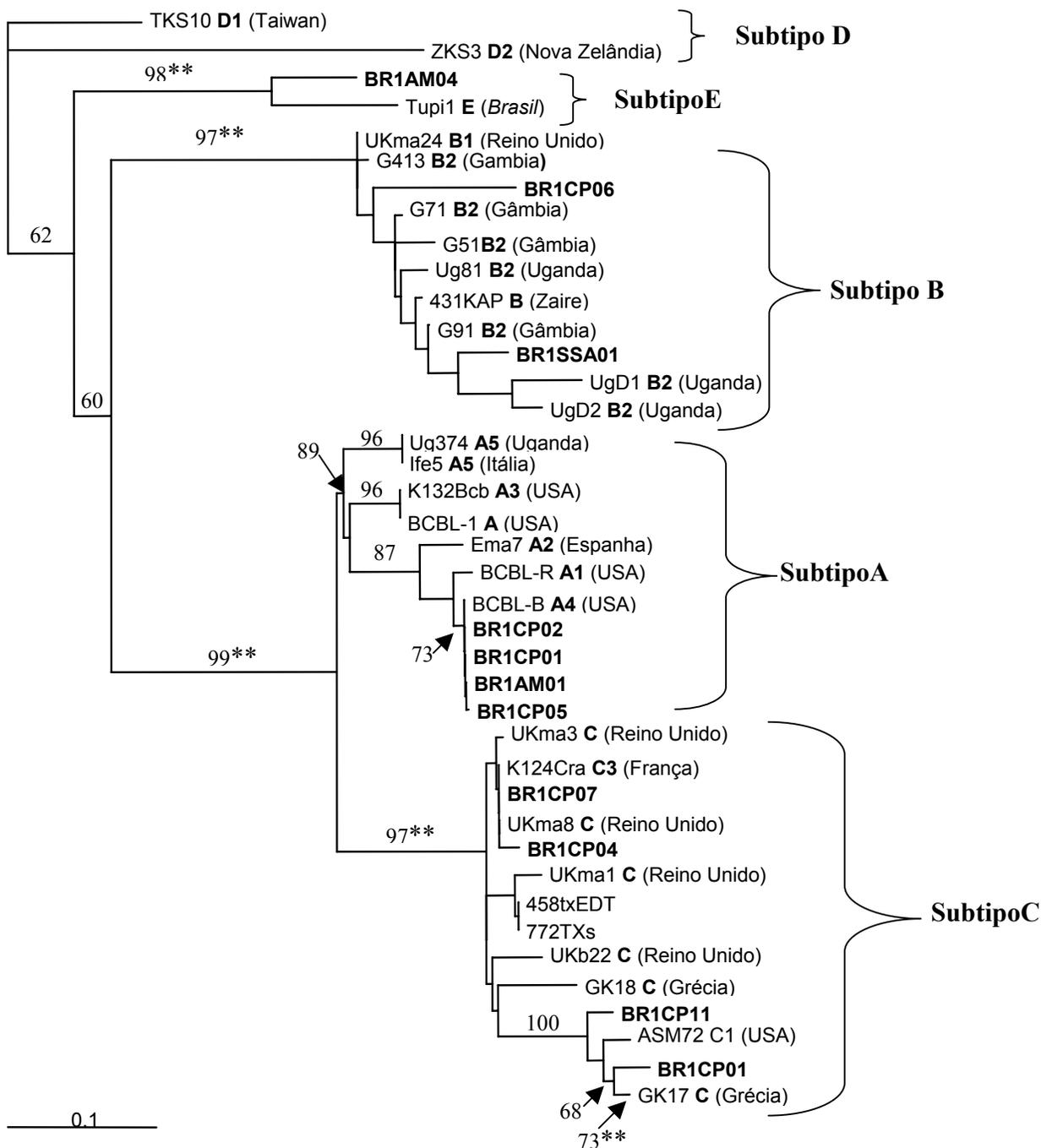
Através da genotipagem do HHV-8 foi possível verificar a presença dos subtipos A, B e C do HHV-8 nas amostras provenientes dos pacientes com SK da cidade de Campinas, dos subtipos B e indeterminado no grupo dos pacientes HIV positivos da cidade de Salvador e dos subtipos A e E entre os índios da região Amazônica.

As seqüências obtidas no presente trabalho provem de indivíduos infectados pelo HHV-8 de origens geográficas distintas, distribuídas em três regiões brasileiras: Nordeste (Salvador), Sudeste (Campinas) e Norte (Região Amazônica). Contudo, foram detectados quatro dos cinco subtipos virais descritos na literatura (Figuras 16 e 17). Todas as seqüências nucleotídicas dos fragmentos VR1 e VR2 do HHV-8 analisadas neste estudo serão depositadas no “GenBank”, contribuindo com dados referentes a população brasileira. O conhecimento de técnicas sorológicas e moleculares aplicado no presente estudo poderá ser utilizado pelos Laboratórios de Biologia Molecular da Unicamp e LASP/CPqGM/Fiocruz, possibilitando a implantação de técnicas para o diagnóstico e genotipagem do HHV-8 nos referidos centros.

**Tabela 10: Protótipos da região ORF-K1 do HHV-8 utilizados na construção das árvores filogenéticas.**

PROTÓTIPOS	SUBTIPO	ACESSO	ORIGEM	DNA/DÇ (HIV)	NT ORF-K1	REFERÊNCIA
431KAP	B	AF133040	Zaire	KS Africano	1020 pb	Nicholas, 1998
ASM72	C1	AF133041	USA	Biópsia/KS AIDS (+)	completa	Lacoste, 2000
BCBL-1	A	U86667	USA	Linhagem cel AIDS/PEL	2034 pb	Lagunoff, 1997
BCBL-B	A4	AF133039	USA	AIDS/PEL (+)	1008 pb	Nicholas, 1998
BCBL-R	A1	AF133038	USA	AIDS/PEL (+)	1020 pb	Nicholas, 1998
Ema7	A2	AF130305	Espanha	PBMC/SK AIDS (+)	870 pb	Cook, 1999
G413	B2	AF130262	Gâmbia	PBMC/SK neg (+)	844 pb	Cook, 1999
G51	B2	AF130264	Gâmbia	PBMC/SK neg (-)	1082 pb	Cook, 1999
G71	B2	AF130265	Gâmbia	PBMC/SK AIDS (+)	1163 pb	Cook, 1999
G91	B2	AF130266	Gâmbia	PBMC/SK AIDS (+)	1163 pb	Cook, 1999
GK17	C"	AF130267	Grécia	Biópsia/SK clássico (-)	855 pb	Cook, 1999
GK18	C'	AF130268	Grécia	Biópsia/SK clássico (-)	1133 pb	Cook, 1999
Ife1	A5	AF130282	Itália	Banco semem (-)	824 pb	Cook, 1999
Ife5	A5	AF130284	Itália	Banco semem (-)	821 pb	Cook, 1999
K1-24/CRA	C3	AF178793	França	Linhagem cel PEL	855 pb	Lacoste, 2000
K1-32/BCB	A3	AF178799	USA	Linhagem cel PEL	870 pb	Lacoste, 2000
MP1	B2	AF387376	África	SK Africano (-)	448 pb	Treurnicht, 2002
T2 cloneV	B	AF451316	África		462 pb	Cook, 2002
TKS10	D1	AF133043	Taiwan	SK clássico (-)	1.020 pb	Nicholas, 1998
Tupi 1	E	AF220292	Brasil	PBMC	847 pb	Biggar, 2000
Ug374	A5	AF130289	Uganda	PBMC/SK neg (+)	843 pb	Cook, 1999
Ug81	B2	AF130291	Uganda	PBMC/SK AIDS (+)	775 pb	Cook, 1999
UgD1	B2	AF130292	Uganda	Biópsia/SK AIDS (+)	1063 pb	Cook, 1999
UgD2	B2	AF130293	Uganda	Biópsia/SK AIDS (+)	1163 pb	Cook, 1999
UKB22	C'	AF130298	UK	Biópsia/SK clássico (-)	855 pb	Cook, 1999
UKMa1	C'	AF130300	UK	PBMC/SK AIDS (+)	855 pb	Cook, 1999
UKMA24	B1	AF130301	UK	PBMC/ SK AIDS (+)	870 pb	Cook, 1999
UKMa3	C'	AF130302	UK	PBMC/ SK AIDS (+)	855 pb	Cook, 1999
UKMa8	C"	AF130304	UK	PBMC/ SK AIDS (+)	855 pb	Cook, 1999
ZKS3	D2	AF133044	NZ	SK clássico(-)	1.020 pb	Nicholas, 1998

Nota: Acesso: número de acesso da sequência nucleotídica contida no "GenBank"; Seq nt orf K1: tamanho da sequência nucleotídica em pares de base (pb); origem: localização geográfica, DNA/DÇ(HIV): DNAextraído/doença associada ao HHV-8 (-) teste de HIV negativo e (+) teste de HIV positivo, Referência: artigo onde a sequência foi publicada.



**Figura 16.** Árvore Filogenética correspondente ao fragmento VR1 da ORF-K1 do HHV-8 (155pb). Árvore de NJ enraizada com os protótipos TKS10 e ZKS3 (subtipo D), construída no programa PAUP 4.0. As seqüências analisadas no presente estudo encontram-se em negrito. Ao lado de cada protótipo está indicado em negrito o subtipo correspondente e entre parêntese a origem geográfica. Os valores de “bootstrap” em porcentagem (acima de 50% com 1000replicatas) estão representados na árvore NJ. Valores de ML altamente significantes estão indicados com dois asteriscos (\*\*) quando  $P < 0,001$ .



## 6. Discussão

Após a descoberta do Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) em amostras de biópsias de pacientes com sarcoma de Kaposi (SK) em 1994, vários estudos foram conduzidos confirmando esta associação (CHANG *et al*, 1994., CATHOMAS *et al*, 1996., HUDNALL *et al*, 1998). Posteriormente, o HHV-8 foi referido como agente etiológico de todas as formas de SK (CATHOMAS *et al*, 1996., HUDNALL *et al*, 1998., CATTANI, *et al*, 1999., CUNHA *et al*, 2000), do linfoma efusional primário (PEL) (SAID *et al*, 1996., KENNEDY *et al*, 1998<sup>a</sup>., BERTI *et al*, 1997., SPIRA *et al*, 2000) e da forma multicêntrica da doença de Castleman (MCD) (MEMAR *et al*, 1997., DUPIN *et al*, 2000).

O desenvolvimento de técnicas sorológicas e moleculares para detecção do HHV-8 permitiu a realização de estudos de soroprevalência e de epidemiologia molecular em regiões geográficas distintas, onde foram encontrados diferentes resultados de prevalências do HHV-8. Na África o HHV-8 é endêmico, sendo detectado em mais de 50% da população geral de Uganda e Nigéria (LENENETTE *et al*, 1996., MOORE *et al*, 2000). A soroprevalência para o HHV-8 tem sido baixa, menor que 5% em países da Ásia, norte da Europa, Austrália e EUA (SATOH *et al*, 2001., SCHULZ *et al*, 2002). Em países do mediterrâneo como Itália e Grécia a prevalência do HHV-8 tem variado de 4 - 35% (SCHULZ & MOORE, 1999., SANTARELLI *et al*, 2001). Na América do Sul, a soroprevalência para o HHV-8 foi de 3,8% em doadores de sangue (PEREZ *et al*, 2004). No Brasil a soroprevalência em doadores de sangue e na população geral do estado de São Paulo tem variado de 2,5% a 7,4% (CATERINO *et al*., 1999., ZAGO *et al*, 2000., CUNHA *et al*, 2004., PEREZ *et al*, 2004., SOUZA *et al*, 2004). Na população geral de Belém a soroprevalência foi de 16% (FREITAS *et al*, 2002) e em tribos indígenas da Amazônia de 53% (BIGGAR *et al*, 2000).

No presente estudo foi verificada uma baixa prevalência (2,8%) de anticorpos anti-HHV-8 em doadores de sangue do Hemocentro da cidade de Campinas e uma elevada prevalência (56,8%)

em tribos indígenas da região Amazônica. Nossos dados concordam com o descrito na literatura, a qual tem referido uma baixa prevalência do HHV-8 em doadores de sangue do sudeste do Brasil (CATERINO *et al.*, 1999., ZAGO *et al.*, 2000., PEREZ *et al.*, 2004) e uma elevada prevalência na população geral da região norte (BIGGAR *et al.*, 2000., FREITAS *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstraram que a soroprevalência para o HHV-8 foi similar entre homens e mulheres, tendendo a aumentar com a idade (CALABRO *et al.*, 1998., HUANG *et al.*, 2000., HUDNALL *et al.*, 2003). Nós analisamos 319 amostras de soros de potenciais doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp e detectamos anticorpos anti-HHV-8 em nove indivíduos. Todos os casos positivos pertenceram ao sexo masculino, sendo verificada uma maior soroprevalência na faixa etária de 41 a 50 anos (7,1 %), seguido da faixa etária de 31 a 40 anos (4,6%). Não foi verificada a presença de anticorpos anti-HHV-8 nas outras faixas etárias, inclusive em indivíduos com mais de 50 anos. Verificou-se que a média de idade no grupo dos doadores de sangue infectados pelo HHV-8 foi maior (40,5 anos) que a média de idade geral do grupo (34,9 anos). Nossos resultados diferem do descrito na literatura mundial, mas concordam com CATERINO *et al.*, 1999 que analisando amostras de um banco de sangue de São Paulo, também detectou anticorpos anti-HHV-8 somente em doadores de sangue do sexo masculino, com média de idade de 37,5 anos. Esses resultados podem representar um perfil epidemiológico na distribuição do HHV-8 no estado de São Paulo.

Uma questão de saúde pública a ser esclarecida é se o HHV-8 pode ser transmitido através da transfusão sanguínea. A triagem sorológica aplicada no Hemocentro da Unicamp (HEMOCAMP) inclui testes sorológicos para diagnóstico dos vírus HIV, HBV, HCV, HTLV e de doenças como Chagas e sífilis. Constatou-se que 3,1% dos doadores de sangue incluídos em nosso estudo apresentaram sorologia positiva ou inconclusiva para HBV; 1,3% para HCV; 0,6% para HTLV; 0,3% para Sífilis; 0,3% para Chagas e nenhum caso com sorologia positiva para HIV.

Verificamos que os nove doadores de sangue com sorologia positiva para o HHV-8 (9/319) não apresentaram reatividade para os testes sorológicos aplicados no referido centro, conseqüentemente estas bolsas podem ter sido aprovadas para doação. ENBOM *et al*, 2002 detectaram seqüências do HHV-8 em amostras de DNA extraído de sangue periférico de doadores de sangue que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, sugerindo que a transmissão do HHV-8 pode ocorrer através do contato com sangue contaminado. Em 2001 o nosso grupo avaliou amostras de DNA extraído de sangue periférico de 145 doadores de sangue da cidade de Campinas, utilizando a Nested-PCR para amplificar a região ORF-26 e observamos que não houve amplificação de seqüências de DNA do HHV-8 nas amostras analisadas (CUNHA *et al*, 2001). A via parenteral está sendo investigada como sendo uma das vias de transmissão do HHV-8, principalmente através da transfusão sanguínea e de hemoderivados. Como nenhum estudo conseguiu documentar a transmissão do HHV-8 através da transfusão sanguínea (ENGELS *et al*, 1997., HUDNALL *et al*, 2003), essa ainda é uma questão a ser esclarecida.

CATERINO *et al.*, (1999) encontraram uma soroprevalência 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). No grupo de pacientes com sarcoma de Kaposi avaliado em nosso estudo, todos pertenceram ao sexo masculino e a maioria referiu ser homossexual ou bissexual. Nossos resultados concordaram com pesquisas realizadas nos EUA e na Europa onde foi demonstrada uma elevada prevalência para o HHV-8 em homossexuais e bissexuais HIV positivos (LENNETTE *et al*, 1996., MARTIN *et al*, 1999).

Alguns autores encontraram altas taxas de infecção pelo HHV-8 em grupos de indivíduos promíscuos, exposto a risco de adquirir viroses e DST ou que vivem em condições precárias de higiene e saúde (SCHULZ *et al*, 1999., VERBEEK *et al*, 1999., REGAMEY *et al*, 1998). 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). 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 outra via de transmissão viral (MONINE *et al*, 1996., BIGGAR *et al*, 2000., PLANCOULAINÉ *et al*, 2000).

Alguns estudos têm indicado o transplante de órgão como sendo uma das vias de transmissão do HHV-8. Já foram relatados casos de soroconversão para o HHV-8 pós-transplantes em indivíduos submetidos a transplante cardíaco, renal e hepático (EDMOND *et al*, 2002; MILLIANCOURT *et al*, 2001). Também foram verificados casos de reativação viral pós-transplante tendo como consequência o desenvolvimento de doenças como o sarcoma de Kaposi, o linfoma de cavidades e rejeição do órgão implantado (JONES *et al*, 1998; KAPELUSHNIK *et al*, 2001; EDMOND *et al*, 2002; MARCELIN *et al*, 2004).

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 apenas os pacientes com sorologia positiva para o HHV-8 desenvolveram SK (WHITBY *et al*, 1995). Nós utilizamos o teste

de Imunofluorescência Indireta para a detecção de anticorpos anti-HHV-8 e detectamos anticorpos anti-HHV-8 em todas as amostras de soro dos pacientes com SK da cidade de Campinas (CUNHA *et al*, 2001).

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 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). Em nosso estudo, a presença de seqüências do HHV-8 (regiões ORF-26 e ORF-K1) em amostras de DNA extraído de PBMC de uma criança HIV positiva, com apenas um ano de idade, reforça a hipótese da existência de outras vias de transmissão do HHV-8 além, da via sexual.

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).

Regiões da África e Itália, com elevada soroprevalência para o HHV-8, possuem um número elevado de casos de SK, confirmando essa associação (Gao *et al*, 1996., WHITBY *et al*, 1998., REZZA *et al*, 1999., CATTANI *et al*, 2000., SCHULZ *et al*, 2002). O mesmo não ocorre no Egito, país Africano com elevada soroprevalência para o HHV-8 e poucos casos de SK (ANDREONI *et al*, 1999) e em tribos indígenas da região Amazônica, onde o HHV-8 é endêmico, sem relato de SK (BIGGAR *et al*, 2000). Uma das hipóteses é a presença de fatores genéticos nesses indivíduos que

confirmam resistência viral, ou a existência de cepas menos patogênicas do HHV-8 circulando nessas populações.

Nós realizamos análise sorológica para detecção de anticorpos anti-HHV-8 de fase latente (IFI-LANA) e de fase lítica (IFI-Lítico) do HHV-8 em mais de 70% dos índios das tribos Tiriyo e Waiampi que vivem em território brasileiro. Foram utilizados os ensaios sorológicos IFI-LANA e IFI-Lítico “in house” que apresentam sensibilidade de 75,1% e 90,9% e especificidade de 97,8% e 99,7% em detectar anticorpos de fase latente e lítica, respectivamente (CATERINO *et al*, 2003., CARBONE *et al*, 2003). No presente estudo foram analisadas 982 amostras de soro ou plasma de índios das tribos Tiriyo e Waiampi, onde foram detectados anticorpos anti-HHV-8 em 56,8% dos casos.

Um método tradicionalmente utilizado para avaliar se uma região é endêmica ou epidêmica para determinado agente infeccioso é averiguar a soroprevalência em diferentes faixas etárias, o que possibilita verificar a transmissão contínua em populações com elevada soroprevalência (OLSEN *et al*, 1998). Quando avaliamos a distribuição da soroprevalência de acordo com as faixas etárias (<2 anos, 2-9 anos, 10-19 anos, 20-49 anos e >50 anos) verificamos que o número de indivíduos infectados aumenta com a idade. Em crianças menores de dois anos foi observado um alto percentual de casos positivos (44,4%), ocorrendo uma redução após o segundo ano de vida (35%), continuando a aumentar em adolescentes (51,4%) e adultos (72,9%), sendo observado um aumento acentuado em adultos com mais de 50 anos (82,3%). Os resultados obtidos no presente estudo concordam com o verificado em populações endêmicas para o HHV-8.

A detecção de anticorpos anti-HHV-8 em 44,4% das crianças indígenas com menos de dois anos reforça a possibilidade da transmissão vertical do HHV-8 durante o primeiro ano de vida, através da passagem de anticorpos maternos pela placenta ou durante o aleitamento materno. Mattos *et al*, relatou que em índios da região Amazônica as mães costumam amamentar seus filhos por

períodos prolongados, no mínimo dois anos (MATTOS *et al*, 1999). Nós detectamos anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica e de fase latente e seqüências de DNA do HHV-8 (regiões ORF-26 e ORF-K1) em uma criança com apenas um ano de idade, membro da tribo Tiriyo. Também verificamos que aproximadamente um terço das crianças entre 2 e 9 anos de idade pertencentes as tribos Tiriyo e Waiampi, estão infectadas pelo HHV-8. Um estudo de soroprevalência para o HHV-8 em crianças, realizado na Itália, apresentou resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo. Eles detectaram teste sorológico positivo em crianças menores de 2 anos, com declínio da soroprevalência no grupo de crianças de 3-5 anos, sugerindo a passagem de anticorpos maternos em crianças menores e 2 anos (WHITBY *et al*, 2000). Outros pesquisadores também detectaram elevadas prevalências de anticorpos anti-HHV-8 em crianças indígenas da Amazônia, sugerindo a transmissão vertical nessa população (BIGGAR *et al*, 2000). Contudo, nossos resultados apóiam a existência de vias não-sexual de transmissão do HHV-8 em tribos indígenas da região amazônica.

Estudos conduzidos em populações endêmicas para o HHV-8 têm apresentado resultados variados quanto a soroprevalência para o HHV-8 em crianças. As principais vias de transmissão desse vírus em crianças, ainda deverão ser confirmadas. Alguns trabalhos encontraram baixas prevalências de anticorpos anti-HHV-8 em crianças nascidas em zonas endêmicas. Em Camarões, por exemplo, foram detectados anticorpos anti-HHV-8 em 13% das crianças com idade entre 7 meses e 2 anos (GESSAIN *et al*, 1999). Resultado semelhante foi observado na Guiana Francesa onde apenas 1,2% das crianças menores de cinco anos apresentaram sorologia positiva para o HHV-8. Em populações indígenas nós detectamos um alto percentual de anticorpos anti-HHV-8 (43,2%) em crianças com menos de dois anos, de 35% em crianças entre 2-9 anos, com aumento para 48,7% em adolescentes (10-19 anos). Esses dados sugerem a existência de diferentes vias de transmissão viral e da presença de fatores de risco e genéticos relacionados à transmissão do HHV-8 em áreas endêmicas. Um estudo realizado na Guiana Francesa, em indivíduos de origem Africana, verificou a

presença de um gene recessivo responsável em controlar susceptibilidade e resistência à infecção pelo HHV-8 (PLANCOULAINÉ *et al*, 2000).

Crianças nascidas em zonas endêmicas para o HHV-8 têm apresentado um aumento da soroprevalência para o HHV-8 com o aumento da idade, sugerindo que a transmissão do HHV-8 pode ocorrer por vias não sexual. Uma dessas vias seria através do contato com secreções contaminadas, como a saliva. A freqüente detecção de partículas virais do HHV-8 na saliva tem indicado que essa secreção deve exercer um papel importante na transmissão desse agente, principalmente em populações endêmicas. De fato, no Sub-Saara África e também no Brasil, mães costumam pré-mastigar alimentos para suas crianças e limpar suas faces com saliva. Esses hábitos podem expor as crianças à saliva de mães infectadas, sendo um dos prováveis meios de transmissão horizontal nas crianças dessas comunidades (MBULAITEYE *et al*, 2003., BIGGAR *et al*, 2000).

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, Europa e em tribos indígenas da Amazônia a elevada prevalência do HHV-8 em crianças e em indivíduos de uma mesma família, têm sugerido a existência de múltiplas vias de transmissão viral (MAYAMA *et al*, 1998., MOORE, 2000., PERNA *et al*, 2000., PLANCOULAINÉ *et al*, 2000., BIGGAR *et al*, 2000). A detecção de seqüências de DNA e de anticorpos anti-HHV-8 em crianças indicam a existência de vias de transmissão não sexual do HHV-8. Podendo ocorrer transmissão vertical ou através do contato com secreções infectadas pelo HHV-8 como a saliva e leite materno (BIGGAR *et al*, 2000). Nós detectamos seqüências de DNA das regiões ORF-26 e ORF-K1 do HHV-8 em amostras de DNA de duas crianças, ambas com um ano de idade. Nossos resultados apóiam a existência de vias não-sexual de transmissão do HHV-8.

No sul da África, um estudo avaliou a transmissão do HHV-8 da mãe para a criança usando a técnica de “Real-Time PCR” e confirmou que o contato com saliva e leite materno constitui potenciais rotas de transmissão do HHV-8 (DEDICOAT *et al*, 2004). Em contraste, um outro estudo realizado em Zâmbia, não detectou DNA do HHV-8 no leite materno, durante os primeiros seis meses de vida da criança (BRAYFIELD *et al*, 2004). Esses dados mostram a necessidade da realização de novos estudos para verificar se a amamentação constitui uma importante via de transmissão do HHV-8.

Avaliando a prevalência do HHV-8 em ambas as tribos (Tiriyó e Waiampi) de acordo com as faixas etárias, observamos uma maior soroprevalência (82,3%) em idosos, com idade superior a 50 anos. Contudo, avaliando a prevalência do HHV-8 em cada tribo e verificamos que na tribo Tiriyó a soroprevalência foi de 85,7% e na tribo Waiampi foi de 68,7%. Suspeitamos que esta diferença esteja relacionada com as variações existentes na distribuição de idade em ambas as tribos: a tribo Tiriyó teve média de idade de aproximadamente 21 anos (variando de 0-81 anos), na tribo Waiampi a média foi de 21,12 anos (0-67 anos). O aumento da soroprevalência para o HHV-8 com a idade pode estar relacionado com um maior tempo de exposição a fatores de risco e com um maior comprometimento do sistema imunológico em idosos, podendo ocorrer reativação, reinfecção ou infecção recente pelo HHV-8 nessa faixa etária.

Foi detectado um aumento de títulos de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica em indivíduos com mais de quarenta anos (PLANCOULAINÉ *et al*, 2002), e de DNA do HHV-8 em saliva de mulheres que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-HHV-8 (DEDICOAT *et al*, 2004). Nós detectamos um maior número de amostras com sorologia positiva para anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica em índios da tribo Tiriyó (42,4%) quando comparada com a tribo Waiampi (32,7%). Também verificamos que no diagnóstico molecular para detecção do HHV-8, houve um maior número de índios da tribo Tiriyó com PCR positivo para ORF-26 do HHV-8, sendo que 100% das

amostras com PCR positivo apresentaram sorologia positiva para anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, concordando com o exposto. Na tribo Waiampi, onde houve número menor de índios com sorologia positiva para anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica, houve apenas uma amostra com PCR positivo para ORF-26 do HHV-8.

A classificação dos subtipos do HHV-8 foi inicialmente proposta em 1997 por Di Albert e por Zong (DI ALBERT *et al*, 1997., ZONG *et al*, 1997). Di Albert, através da análise de variações nucleotídicas pontuais dentro de um fragmento de 233 pb da região ORF-26 detectou quatro subtipos virais (A, B, C e D). Zong, analisando seqüências nucleotídicas das regiões ORF-26 e ORF-75 de um fragmento de 2.500 pb classificaram três subtipos do HHV-8 (A, B e C). Estudos recentes apontam que a região ORF-26 não é indicada para genotipagem viral por conter um número muito pequeno de variações nucleotídicas e conseqüentemente não fornecer informações suficientes para genotipagem viral (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., LACOSTE *et al*, 2000). Por ser facilmente amplificada essa região está comumente sendo utilizada no diagnóstico molecular do HHV-8 (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., LACOSTE *et al*, 2000., WHITBY *et al*, 2004).

A detecção universal de seqüências de DNA do HHV-8, aplicando-se a técnica de “Nested-PCR” tem sido utilizada por vários pesquisadores em estudos de epidemiologia molecular do HHV-8 (HUDNALL, *et al*, 1998., CATTANI *et al*, 1999; CUNHA *et al*, 2000., BIGGAR *et al*, 2000). No presente estudo, verificou-se a presença de seqüências de DNA utilizando-se a “Nested-PCR” para amplificação das regiões ORF-26 e ORF-K1 do genoma viral. Observou-se que para o diagnóstico molecular do HHV-8 a amplificação da região ORF-26 foi mais sensível que a amplificação da região ORF-K1. Isto ocorreu devido à elevada variabilidade da região ORF-K1 em relação a ORF-26, também relatado por outros autores (BIGGAR *et al*, 2000., ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 2002).

Atualmente, a região mais utilizada para determinar os subtipos do HHV-8 é a região hipervariável ORF-K1. Essa região é subdividida em três fragmentos: a porção N-terminal, conservada, composta pelos aminoácidos (aa) 1 ao 19; uma porção central, hipervariável composta pelos aa 20 ao 226 e uma região C-terminal, relativamente conservada, composta pelos aa 227 ao 276. Dentro da região central da ORF-K1 existem dois fragmentos altamente variáveis denominados VR1 (aa 51 ao 92) e VR2 (aa 191 ao 231) (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999). Através do sequenciamento da região hipervariável ORF-K1 do HHV-8 foi realizada a caracterização dos diferentes subtipos virais e de suas variantes. Baseados no exposto foram descritos, cinco subtipos do HHV-8 denominados: A, B, C, D e E (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., BIGGAR *et al*, 2000., WHITBY *et al*, 2004). Por ser altamente variável a análise de seqüências de DNA dos fragmentos VR1 e VR2 da região ORF-K1 tem sido amplamente utilizada em estudos de genotipagem do HHV-8 (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., MENG *et al*, 1999., LACOSTE *et al*, 2000., CATERINO *et al*, 2003., WHITBY *et al*, 2004). Nós detectamos seqüências de DNA da região ORF-26 do HHV-8 em 33 amostras provenientes de indivíduos de Campinas, Salvador e região Amazônica. Conseguimos amplificar 20 amostras (20/33) para o fragmento VR1 e 27 amostras (27/33) para o fragmento VR2 da ORF-K1 do HHV-8. Assim como nós, vários autores têm referido dificuldade em amplificar a região ORF-K1 (COOK *et al*, 1999., BIGGAR *et al*, 2000., CATERINO *et al*, 2003).

A prevalência dos subtipos do HHV-8 tem variado a depender da região geográfica e de características étnicas. Nos EUA e Europa tem sido relatada uma maior prevalência dos subtipos A e C do HHV-8, na Ásia do subtipo C, na África dos subtipos B e A5 (ZONG *et al*, 1999., COOK *et al*, 1999., LACOSTE *et al*, 2000., COOK *et al*, 2002., BRAYFIELD *et al*, 1994). O subtipo D foi identificado em regiões da Austrália e Japão (ZONG *et al*, 1999., MENG *et al*, 2001). No Brasil foram relatados os subtipos A, B e C no estado de São Paulo (CATERINO-DE-ARAÚJO *et al*,

2003., NASCIMENTO *et al*, 2004) e o subtipo E na região Amazônica (BIGGAR *et al*, 2000). Nosso estudo foi o primeiro a realizar genotipagem em amostras de indivíduos das cidades de Campinas e Salvador. Avaliando amostras de DNA de pacientes com SK da cidade de Campinas, nós identificamos os subtipos A, B e C do HHV-8, com maior percentual dos subtipos C. Nossos resultados concordam com Caterino *et al* e Nascimento *et al* que encontraram uma maior prevalência dos subtipos A e C na cidade de São Paulo (CATERINO *et al*, 2003 e NASCIMENTO *et al*, 2004). Em pacientes HIV positivos da cidade de Salvador foram detectados os subtipos B e um subtipo indeterminado do HHV-8. As seqüências nucleotídicas correspondentes às amostras classificadas como subtipo indeterminado do HHV-8 não alinharam com os protótipos utilizados em nosso “Dataset”. O “BLAST” dessas seqüências mostrou uma similaridade de cerca de 95 a 96% com seqüências correspondentes a região ORF-K1 do HHV-8. Achamos improvável que tenha ocorrido contaminação, pois as três seqüências não são idênticas entre si e, além disso, no BLAST elas se agrupam com seqüências distintas correspondentes aos subtipos A e C do HHV-8. Acreditamos que pode se tratar de um novo subtipo do HHV-8, de uma dupla infecção ou de uma cepa recombinante A/C. Caterino *et al*, relatou ter encontrado prováveis cepas recombinantes A/C em pacientes com sarcoma de Kaposi associado a AIDS em São Paulo (CATERINO *et al*, 2003). Nós também não conseguimos genotipar uma seqüência proveniente de um paciente com sarcoma de Kaposi associado a AIDS da cidade de Campinas. A seqüência BR2CP08 (Fig.17), correspondente a esse paciente, apresentou um comportamento mais divergente quando comparada com as outras seqüências analisadas. Não foi possível determinar se esse isolado pertence ao subtipo A ou C do HHV-8. Como os subtipos A e C apresentam um ancestral comum pode ser que esse isolado tenha divergido do ancestral comum, resultando em uma nova variante. Será necessário obter novas seqüências nucleotídicas para reavaliar os dados obtidos.

Todas as amostras que continham seqüências nucleotídicas para os fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1 apresentaram o mesmo subtipo em ambas as regiões, exceto a mostra do paciente 02 com sarcoma de Kaposi associado a AIDS (Campinas). As seqüências provenientes desse paciente foram classificadas como “subtipo A” na análise do fragmento VR1 e como “subtipo B” na análise do fragmento VR2 da ORF K1. Foram analisadas duas seqüências obtidas de PCR distintos para cada fragmento, confirmando o resultado. Pode se tratar de uma dupla infecção com os subtipos A e B ou de cepa recombinante A/B, para esclarecer será necessário realizar clonagem e análise de alguns clones. Caterino *et al* relatou a presença de dois isolados classificados como subtipo A na análise do fragmento VR1 e subtipo C na análise do fragmento VR2, classificando como recombinante A/C (CATERINO *et al*, 2003).

Até o presente momento apenas o subtipo E do HHV-8 havia sido identificado em índios da região Amazônica (BIGGAR *et al*, 2000). Nós detectamos os subtipos A e E do HHV-8 em índios da região Amazônica, com maior percentual do subtipo E. O subtipo A é mais recente que o subtipo E, por isso é provável que o “subtipo A” tenha sido introduzido recentemente nessa região. Não há registro de sarcoma de Kaposi em índios da região Amazônica (BIGGAR *et al*, 2000), contudo não sabemos quais serão as conseqüências da introdução de subtipos mais recentes do HHV-8 em tribos indígenas dessa região. Visando proteger tribos indígenas da Amazônia, nós pretendemos continuar investigando fatores genéticos dos índios e características moleculares de cepas do HHV-8 circulantes nessa população.

A alta prevalência do HHV-8 na África e em alguns países do sul da Europa comparada a baixa freqüência na população geral de outros países tem demonstrado uma distribuição geográfica diferenciada do vírus, bem como dos diferentes subtipos descritos. A distribuição do HHV-8 no Brasil ainda não está completamente elucidada, sendo de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas de soroprevalência e de epidemiologia molecular a fim de se estudar os subtipos

circulantes, caracterizar os grupos de risco, determinar as vias de transmissão, bem como o verdadeiro papel desse vírus na patogênese das diversas doenças neoplásicas, às quais vem sendo associado.

## **7 Conclusões:**

7.1 Verificou-se uma baixa frequência de anticorpos anti-HHV-8 em doadores de sangue da cidade de Campinas. Todos os casos com sorologia positiva para o HHV-8 pertenceram ao sexo masculino e faixa etária de 31 a 50 anos.

7.2 Foi verificada uma elevada frequência de anticorpos anti-HHV-8 nos índios das tribos Tiriyo e Waiampi, em ambos os sexos e em diferentes faixas etárias. O alto percentual de indivíduos reagentes em todas as faixas etárias mostra que o HHV-8 é endêmico nessa região geográfica. A elevada soroprevalência para o HHV-8 em crianças sugere a existência de outras vias de transmissão viral, além da via sexual na região Amazônica.

7.3 Nas amostras de pacientes com sarcoma de Kaposi da cidade de Campinas foram detectados os subtipos A, B e C do HHV-8, dentre os cinco subtipos virais já descritos, com maior percentual do subtipo C. Os dados obtidos apóiam que o HHV-8 seja o agente etiológico do sarcoma de Kaposi.

7.4 A detecção de seqüências de DNA do HHV-8 entre os pacientes HIV positivos da cidade de Salvador revelou que o HHV-8 está presente nessa população. Este é o primeiro trabalho de triagem molecular do HHV-8 realizado no estado da Bahia. Uma das amostras positivas para o HHV-8 foi

de uma criança, com apenas um ano de idade. Este dado indica a existência de vias de transmissão não sexual do HHV-8 na população estudada.

7.5 Os subtipos do HHV-8 circulantes entre os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em Salvador, foram os subtipos B e um subtipo indeterminado.

7.6 Foram detectadas seqüências do HHV-8 em amostras de DNA extraído de sangue periférico de índios das tribos Tiriyo, Waiampi e Parakanã. Através da genotipagem viral verificou-se a presença dos subtipos A e E do HHV-8.

7.7 A detecção do subtipo A do HHV-8 em índios da região Amazônica sugere a introdução de um subtipo mais recente que o subtipo comumente detectado nessa população. Não sabemos quais serão as conseqüências da disseminação de subtipos mais recentes em populações indígenas dessa região.

7.8 Nossos dados indicam que no Brasil o subtipo A está circulando no norte (região Amazônica) e no sudeste (Campinas). O subtipo B foi detectado em Campinas e Salvador. O subtipo E foi detectado apenas em amostras de índios, sendo um dos subtipos mais basais do HHV-8.

7.9 O depósito das seqüências nucleotídicas da região ORF-K1 do HHV-8 obtidas no presente estudo no “GenBank” irá contribuir com dados epidemiológicos referentes à população brasileira.

## 8. 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., COLLER, B. S., KIPPS, T. J. - *Williams Hematology*, 5<sup>th</sup>, 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? *Journal of Infectious Diseases*; **178**:1546-7, 1998
- BRAYFIELD BP, KANKASA C, WEST JT et al. Distribution of Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 in maternal saliva and breast milk in Zambia: implications for transmission. *J Infect Dis*; **189**:2260-70., 2004.
- 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.
- CARBONE PH. Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2003.
- CATERINO-DE-ARAÚJO, 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.

- CATERINO-DE-ARAUJO, A, BEZ, C., TEO,C. – Diversity of Human herpesvirus 8 (HHV-8) strains circulating in São Paulo, Brazil: the use of sequence analysis of the hipervariable region 2 (VR2) of the ORF-K1 gene as confirmatory and complementary for HHV-8 VR1 subtyping. *Virus Reviews and Research*; **8(1)**: 128-129, 2003a.
- CATERINO-DE-ARAUJO A. and MOREIRA, A.A. – Presentation of a new HHV-8 subtyping method based on the search of restriction enzymatic sites in the hipervariable region 1 (VR1) of the ORF-K1 gene; *Virus Reviews and Research*; **8(1)**: 129, 2003b.
- 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.
- COOK, P.M., WHITBY, D., CALABRO, M.L., LUPPI, M., KAKOOLA, D.N., HJALGRIM, H., ARIYOSHI, K., ENSOLI, B., DAVISON, A.J. AND SCHULZ, T.F.- Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group. *AIDS*, **13 (10)**: 1165-1176, 1999.
- COOK RD., MOLYNEUX EM., BORGSTEIN E., PORTER SR., TEO CG. - Tracking familial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using restriction fragment length polymorphism analysis of latent nuclear antigen. *J Virol Methods*, Sep;**105**(2):297-303, 2002.
- COOK RD., MOLYNEUX EM., BORGSTEIN E., PORTER SR., TEO CG. - Mixed patterns of transmission of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families. *J Gen Viro.*, 2002 Jul; **83** (7): 1613-9, 2002.

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.

CUNHA, A. M. G – Detecção do Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) em pacientes com sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo e em doadores de sangue. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2001.

CUNHA, AMG; COSTA, SCB; PEREZ, C., TOUS, M; COSTA, FF. - Baixa frequência de anticorpos anti-hhv-8 em doadores de sangue da cidade de Campinas - *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Aracajú /SE, V37, SUPLEMENTO 1, P.398, 2004.

CUNHA, AMG; CATERINO-DE-ARAÚJO, A; COSTA, SCB; SANTOS-FORTUNA, E; AKUNE, N; GONÇALVES, MS; COSTA, FF; GALVÃO-CASTRO, B - Alta frequência de anticorpos anti-hhv-8 em índios da tribo tiriyo, região amazônica, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Aracajú /SE, V37, SUPLEMENTO 1, P.70-71, 2004.

CUNHA, AMG; CATERINO-DE-ARAÚJO, A; COSTA, SCB; SANTOS-FORTUNA, E; AKUNE, N; GONÇALVES, MS; COSTA, FF; GALVÃO-CASTRO, B - Detecção de anticorpos e de seqüências de dna do HHV-8 em índios da tribo waiampi, região amazônica, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Aracajú /SE, V37, SUPLEMENTO 1, P.401, 2004.

DAVIDOVICI B, KARAKIS I, BOURBOULIA D et al. - Seroepidemiology and molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among Jewish population groups in Israel. *J Natl Cancer Inst*; **93**:194-202, 2001.

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. – *J Infect Dis*, **175**: 1071-9, 1996.

DEDICOAT M, NEWTON R, ALKHARSAH KR et al. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J Infect Dis*; **190**:1068-75, 2004.

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. *J. Infect. Dis.* **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., BOSHOF, 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., HURAU, M., LEIBOWITZ, 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.

ENBOM M., URASSA W., MASSAMBU C., THORSTENSSON R., MAHALU F., LINDE A. – Detection of human herpesvirus 8 DNA in serum from blood donors with HHV-8 antibodies indicates possible bloodborne virus transmission. *J Med Virol*, **68**: 264-267.

ENGELS EA., EASTMAN H., ABLASHI DV., WILKS RJ., BRAHAM J., MANNIS A. – Risk of transfusion-associated transmission of human herpesvirus 8. *J Natl Cancer Inst.*, **91**: 1173-1175, 1999.

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, 2<sup>a</sup> 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.
- FREITAS RB, FREITAS M R, LINHARES AC. Prevalence of human herpesvirus 8 antibodies in the population of Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*; **44**: 309-13, 2002.
- 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.
- GERAMINEJAD, P.; MEMAR, O.; ARONSON, I.; RADY, P. L.; HENGEE, U.; TYRING, S. K. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Chicago, **47**: 641-655, 2002.
- GESSAIN A, MAUCLÈRE P, VAN BEVEREN M et al. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer*; **81**: 189-92, 2002.

- 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.
- GUTTMAN-YASSKY E, COHEN A, KRA-OZ Z et al. - Familial clustering of classic Kaposi sarcoma. ***J Infect Dis***; **189**:2023-6, 2004.
- HENGEE UR, RUZICKA TR, TYRING SK et al. - Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. ***Lancet Infect Dis***; **2**:344-52, 2002a.
- HUDNALL SD et al. - Human Herpesvirus 8 Activation in Renal transplant Recipients. - The ***Journal of Infectious Diseases*** **178**: 1791-1794, 1988.
- HUDNALL SD, CHEN T., RADY P., TYRING., ALLISON P. - Human Herpesvirus 8 seroprevalence and viral load in health adult blood donors. ***Transfusion*** **43**: 85-90, 2003.
- 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.

LAGUNOFF, M. AND GANEM, D.- The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* **236 (1)**: 147-154, 1997.

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.
- MATTOS A, MORAIS MB, RODRIGUES DA, BARUZZI RG. Nutritional Status and Dietary Habits of Indian Children from Alto Xingu (Central Brazil) According to Age. *J Am Col Nutr*; **18**: 88-94, 1999.

- MBULAITEYE SM, PFEIFFER RM, WHITBY D, BRUBAKER GR, SHAO J, BIGGAR RJ. - Human herpesvirus 8 infection within families in rural Tanzania. *J Infect Dis*; **187**:1780-5, 2003.
- 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 pemphigus. *Arch Dermatol*, **133**: 1247-1251, 1997.
- MENG YX, SPIRA TJ, BHAT GJ, BIRCH CJ, DRUCE JD, EDLIN BR, EDWARDS R, GUNTHEL C, NEWTON R, STAMEY FR, WOOD C, PELLETT PE. - Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology*, **15**;261(1):106-19, 1999.
- MENG YX, SATA T, STAMEY FR, VOEVODIN A, KATANO H, KOIZUMI H, DELEON M, DE CRISTOFANO MA, GALIMBERTI R, PELLETT PE. - Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait. *J Gen Virol*, **82**(3):499-506, 2001.
- 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.
- NASCIMENTO, MC., WILDERC, N., PANNUTI, CS., WEISSB, HA., PHILIPPE MAYAUDB. - Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in São Paulo, Brazil. - *Journal of Clinical Virology.* , - **33(1)**: 52-59, 2005.
- NEIPEL, F., FLECKENSTEIN, B. – The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma. – *Seminars in Cancer Biology*, **9**: 151-164, 1999.
- NICASTRI E, SARMATI L, ANDREONI M. - Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: Does vertical transmission play a role? *J Infect Dis*; **182**: 1574, 2000.
- NICHOLAS, J., ZONG J.C., ALCENDOR, D.J., CIUFO, D.M., POOLE, L.J., SARISKY, R.T., CHIOU, C.J., ZHANG, X., WAN, X., GUO, H.G., REITZ, M.S. AND HAYWARD, G.S.- Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs*; **23**: 79-88, 1998.

- 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.
- OLSEN SJ, CHANG Y, MOORE PS, BIGGAR RJ, MELBYE M. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. *AIDS*, **12**: 1921-5, 1998.
- PARRAVICINI C, OLSEN SJ, CAPRA M, POLI F, SIRCHIA G, GAO SJ, BERTI E, NOCERA A, ROSSI E, BESTETTI G, PIZZUTO M, GALLI M, MORONI M, MOORE PS, CORBELLINO M. - Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood*. **90(7)**: 2826-9, 1997.
- 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., VILAFRATE, M. R., PRESTILEO, T., MANCUSO, S., GOEDERT, J. J., ROMANO, N. *Int. j. Epidemiol* **29(1)**: 175-179, 2000.

PÉREZ C, TOUS M, GALLEGOS S et al. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in blood donors from different geographical regions of Argentina, Brazil and Chile. *J Med Virol*, **72**: 661-7, 2004.

PLANCOULAINES, 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.

PLANCOULAINES S, ABEL L, VAN BEVEREN M, GESSAIN A. High titers of anti-human herpesvirus 8 antibodies in elderly males in an endemic population. *J Natl Cancer Inst*; **94**: 1333-5, 2002.

PLANCOULAINES S, GESSAIN A, VAN BEVEREN M, TORTEVOYE P, ABEL L. Evidence for recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis*; **187**:1944-50, 2003.

Programa Nacional de Controle de DST/ AIDS, Ministério da Saúde: *Relatório de Viagens à Terra Indígena Tumucumaque, Brasília – Brazil, May, 1997.*

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*, 1<sup>a</sup> 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  $\beta$ -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.
- SANTARELLI R., DE MARCO R., MASALA MV., ANGELONI A., UCCINI S., PACCHIAROTTI R., MONTESU MA., SATTÀ R., CERIMELE D., FAGGIONI A., COTTONI F. – Direct correlation between human herpesvirus 8 seroprevalence and classic Kaposi's sarcoma incidence in Northern Sardinia. *J Med Virol*, **65**: 368-372, 2001.
- SANTOS, N. S. O. et al, – Viroses oncogênicas. In: SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V., WIGG, M. D. Introdução a virologia humana, editora Guanabara Koogan, Cap. **5**: 215-219, 2002.

- SARID, R., FLORE, O., BOHENZKY, R. <sup>a</sup>, 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.
- SATOH M., TOMA H., SATO Y., FUTENMA C., KIYUNA KS., SHIROMA Y., KOKAZE A., SAKURADA S., SATA T., KATANO H. – Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *J infect Dis.*, **54**:125-126, 2001.
- 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 TF. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *J Gen Virol*; **79**:1573-91, 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.
- SHARP, T. V. & BOSHOFF, C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: From cell biology to pathogenesis. *IUBMB Life*, London, **49**:97-104, 2000.
- SHINDO N, ALCANTARA LCJ, VAN DOOREN S et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Human Retrov*; **18**:71-7, 2002.

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.

SOUZA VA, SUMITA LM, FREIRE W et al. Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in São Paulo State. *Braz J Med Biol Res*; **37**:123-7, 2004.

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.

TREURNICHT, F.K., ENGELBRECHT, S., TAYLOR, M.B., SCHNEIDER, J.W. AND VAN RENSBURG, E.J.- HHV-8 subtypes in South Africa: identification of a case suggesting a novel B variant. *Med. Virol.*, **66** (2): 235-240, 2002.

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., GEORGIIHEMMING, 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.

WHITBY D, LUPPI M, SABIN C, et al. Detection of antibodies to human herpes virus 8 in Italian children: evidence for horizontal transmission. *Br J Cancer*; **82**:702-4, 2000.

WHITBY D, MARSHALL VA, BAGNI RK, WANG CD, GAMACHE CJ, GUZMAN JR, KRON M, EBBESEN P, BIGGAR RJ.- Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol.*, **85(1)**:155-63. 2004.

ZAGO A., BOURBOULIA K., VIANA MC., COLLANDRE H., DIETZE R., BOSHOFF C., KELLER R. – Seroprevalence of human herpesvirus 8 and its association with Kaposi sarcoma in Brasil. *Sex Transm Dis*, **27**:468-472, 2000.

ZONG, J. C.; METROKA, C.; REITZ, M. S.; NICHOLAS, J.; HAYWARD, G. S. Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: Evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J. Virol.*, **71(3)**:2505-2511, 1997.

ZONG, J. C.; CIUFO, D. M.; ALCENDOR, D. J.; WAN, X.; NICHOLAS, J.; BROWNING, P. J.; RADY, P. L.; TYRING, S. K.; ORENSTEIN, J. M.; RABKIN, C. S.; SU, I. J.; POWELL, K. F.; CROXSON, M.; FOREMAN, K. E.; NICKOLOFF, B. J.; ALKAN, S.; HAYWARD, G. S. - High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol.*, **73 (5)**:4156-4170, 1999.

ZONG, J. C.; CIUFO, D. M.; VISCIDI, R.; ALAGIOZOGLOU, L.; TYRING, S.; RADY, P.; ORENSTEIN, J.; BOTO, W.; KALUMBUJA, H.; ROMANO, N.; MELBYE, M.; KANG, G. H.; BOSHOFF, C.; HAYWARD, G. S. - Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J. Clin. Virol*, **23**:119-148, 2002.

**SITES REFERIDOS:**

[www.unicamp.br](http://www.unicamp.br)

[www.lasp.cpqgm.fiocruz.br](http://www.lasp.cpqgm.fiocruz.br)

[www.usp.br](http://www.usp.br)

[www.portal.capes.com.br](http://www.portal.capes.com.br)

[www.google.com.br](http://www.google.com.br)

[www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm](http://www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

<http://www.evolution.genetics.washington.edu>

<http://www.biotrin.com>

**Apoio Financeiro: CNPq**

**9. Apêndice:**

7725

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

CEP  
02. 80 mm  
VALOR

SIPAR - Ministério da Saúde  
Registro Número:  
2800-047187/2003-97  
22/05/03

**PARECER Nº 30/2003**

**Protocolo: 115**

**Projeto de Pesquisa: "Detecção Sorológica e Molecular das Principais Regiões do HHV-8 em Populações Variadas."**

**Pesquisador Responsável: Doutoranda Andréa Mendonça Gusmão Cunha**

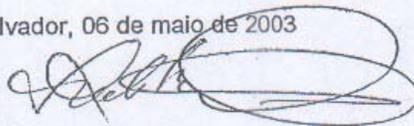
**Instituição ou Departamento: FIOCRUZ/CPqGM/LPBM**

**Considerações:**

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 06 de maio de 2003



Dr. Ítalo A. Sherlock  
Coordenador do  
CEP-CPqGM/FIOCRUZ

Ítalo  
Gusmão

---

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia, CEP 40295-001, Brasil  
Tel: (71) 356-0129 Fax: (71) 356-2155  
e-mail: sherlock@cpqgm.fiocruz.br



**MINISTÉRIO DA SAÚDE**  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**CARTA Nº 555 CONEP/ CNS/ MS**

Brasília, 08 de Julho de 2003

Senhor Coordenador,

Acusamos o recebimento do protocolo de pesquisa : **"Detecção sorológica e molecular das principais regiões do hlv-8 em populações variadas."** – Expediente MS nº 25000.047187/2003-97 , Registro CONEP nº 7725.

Esclarecemos , no entanto, que não se tratando de projeto do grupo I mas sim do grupo III, não se enquadra em genética humana e não necessita apreciação na CONEP ( ver fluxograma ). Nesse caso, a aprovação ética é delegada ao Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

Diante do exposto, devolvemos o protocolo em questão, devendo ser seguido o procedimento para projetos do grupo III, conforme o fluxograma constante no verso da folha de rosto padrão ( versão outubro / 99 ) e no site : <http://conselho.saude.gov.br> .

Atenciosamente ,

**CORINA BONTEMPO DUCA DE FREITAS**  
Secretária Executiva da  
**COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

*A Sua Senhoria*

**Sr. Italo R. de Araujo Sherlock**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA  
CPqGMFIOCRUZ – Rua Waldemar Falcão 121  
Brotas Salvador – BA  
CEP: 40925-001

Esplanada dos Ministérios, Bloco "G", Ministério da Saúde - Edifício Anexo, Ala "B" - 1º andar - Sala 145 - CEP 70058-900 - Brasília / DF  
Telefones : (61) 315.2951/226.6453 Fax : (61) 226.6453 - E-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br) - homepage : <http://conselho.saude.gov.br>



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 20/07/04.  
(Grupo I)

**PARECER PROJETO: N° 301/2004**

### **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: "DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DAS PRINCIPAIS REGIÕES DO HHV-8 EM POPULAÇÕES VARIADAS"**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Andréa Mendonça Gusmão Cunha

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro-UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 22/06/2004

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 20/01/05 e 20/07/05

### **II - OBJETIVOS**

Padronizar e aplicar a técnica sorológica de Imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos anti-HHV-8 e técnicas moleculares para detecção de sequências de DNA e genotipagem do HHV-8.

### **III - SUMÁRIO**

Serão avaliados 320 doadores de sangue da cidade de Campinas e 320 doadores do Banco de sangue do Hospital São Rafael em Salvador. Serão avaliados também aproximadamente 1000 índios da região Amazônica e 11 pacientes com sarcoma de Kaposi do HC/UNICAMP. Serão realizados testes sorológicos e moleculares para a detecção do vírus HHV-8.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Trata-se de um protocolo que irá utilizar amostras de doadores e de índios basicamente. O material a ser utilizado de índios consta em um banco da FIOCRUZ/Salvador. Consta uma carta da coordenação nacional de DST e AIDS autorizando o uso das amostras estocadas no presente projeto. Segundo informação dada pela CONEP a autorização da FUNAI seria necessária para a coleta das amostras, mas não para o uso do material estocado. Sendo assim, recomendo a aprovação e envio ao CONEP como grupo I-população indígena.

### **V - PARECER DO CEP**

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 complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de julho de 2004.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP