

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ASSUCENA LUÍS GUISSVE

**DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E DE
EXPRESSÃO DO HHV-8 EM PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI
ATENDIDOS NO SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL CENTRAL DE
MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

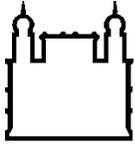
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Biologia Molecular.

Orientadores: Prof^ª. Doutora Carla Carrilho (Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo)

Prof. Doutor Hernan Cabello (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz - Brasil)

Maputo

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ASSUCENA LUÍS GUISSVE

**DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E DE
EXPRESSÃO DO HHV-8 EM PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI
ATENDIDOS NO SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL CENTRAL DE
MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

ORIENTADORES: Prof^a. Doutora Carla Carrilho (Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo)

Prof. Doutor Hernan Cabello (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz - Brasil)

Aprovado em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Maputo, 26 de Outubro de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

G967 Guisseve, Assucena Luís

Descrição das características clínico-patológicas e de expressão do HHV-8 em pacientes com sarcoma de kaposi atendidos no serviço de dermatologia do Hospital Central de Maputo, Moçambique / Assucena Luís Guisseve. – Maputo, 2013.

ix, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 45-50

1. LANA. 2. HHV-8. 3. Sarcoma de kaposi. 4. Imunohistoquímica. I.
Título

CDD 616.9792

Dedicatória

Dedico este trabalho:

À minha Mãe pelo exemplo de força e coragem.

Ao meu marido Jorge e meus filhos Mayara, Nharay e Pery pela alegria e felicidade.

À todos os pacientes com Sarcoma de Kaposi, que aceitaram participar no estudo.

AGRADECIMENTOS

Mais do que cumprir com o ritual, pretendo aqui agradecer a todos que me apoiaram na elaboração desta dissertação.

Um agradecimento especial à Prof.^a Doutora Carla Carrilho, que como orientadora, acreditou neste projecto e ajudou a tornar-lo viável na medida do possível, com todo o seu apoio e sugestões precisas em todas as etapas, desde a sua concepção até a fase final;

Ao Prof. Doutor Pedro Hernan Cabelo, pela orientação competente e apoio na realização do meu estágio no Laboratório de Genética Humana do Instituto Osvaldo Cruz (IOC-Brasil);

À Dra. Fabíola Fernandes Médica, Patologista pela dedicação e contribuição valiosa no diagnóstico das biópsias;

Ao Dr. Orvalho Augusto pelo apoio na análise estatística e conselhos úteis no momento da redacção;

Ao Prof. Doutor Mamudo Rafik Ismail pela revisão do texto e contribuições valiosas;

Aos membros do Laboratório de Genética Humana do IOC do Brasil, Giselda, Sérgio, Laiza, Raisa, Verônica, Ana Carolina e Viviane que de forma aberta receberam-me em seu Laboratório e prestaram todo apoio necessário;

A Tatiane Cozendey e Danielle Voight pelo aprendizado, atenção, paciência, conselhos úteis, apoio mora, técnico e convívio durante a minha estadia no Brasil;

Aos médicos Dermatologistas do HCM, Prof. Dr. Rui Bastos e Prof.^a Dra Rolanda Manuel por terem aceite colaborar neste projecto;

Agradeço especialmente à Dra. Albertina Sing Sang pela amizade e apoio prestado na selecção dos pacientes com Sarcoma de Kaposi e colheita das biópsias;

As enfermeiras do Serviço de Dermatologia do HCM, enfermeiras Gilda, Lígia e Irene pela colaboração na colheita e acondicionamento das amostras;

A todos os colegas do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) por compartilharem comigo este momento especial em especial, a dra. Rosita, dr. Leonel e a Técnica Nilda;

À todos os colegas da segunda turma do mestrado pelo companheirismo, em especial ao Nédio pelo apoio incondicional no processamento das amostras;

Ao Laboratório de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique (INS/MISAU/MZ) pelo apoio no processamento das amostras, em especial a dra. Nádia Siteo e ao Técnico Matola;

Ao Laboratório Clínico do Hospital Central do Maputo (HCM) pelo apoio no processamento das amostras, em especial ao dr. Filipe Majuta;

Ao meu marido Jorge Massaruge, que em todos os momentos difíceis permaneceu ao meu lado, dando-me forças para superar os inúmeros obstáculos que apareceram durante o desenrolar do projecto;

A minha sogra Esperança Papaceco que aceitou cuidar dos meus filhos durante a minha estadia no Brasil;

A minha Mãe, Olinda e meus irmãos Graciano, Cleta e Suzana por todo apoio prestado, o meu Muito Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa- aminoácido

b-FGF- Factor de crescimento de fibroblasto básico

Cél- células

Cóp- Cópias

CR- região central

DAB- Diaminobenzidina

DNA- ácido desoxirribonucleico

ELAM- 1- Molécula de adesão de leucócito endotelial

HCM- Hospital Central de Maputo

HHV-8 - Herpesvirus humano tipo 8

HIV- Vírus de Imunodeficiência Humana

HVS- Herpesvirus saimiri

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular

IL-1 - Interleucina 1

IL-6- Interleucina 6

INS- Instituto Nacional de Saúde

Kb- quilobase

KDa- kilodalton

KSHV- Herpesvirus associado ao SK

LANA- *latency- associated nuclear antigen*, antígeno nuclear associado a latência

LTR- *Long Terminal Region*, região terminal longa

LUR- *Long Unique Region*, região de cadeia longa codificante

MISAU- Ministério da Saúde

Mm3- milímetro cúbico

ORF- *Open reading Frame*, Sequência aberta de leitura

Pb- Pares de base

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

PCR- Reacção em cadeia de polimerase

PDGF- Factor de crescimento derivado das plaquetas

RDP- *Representational difference analysis*, Método de análise representativa diferencial

SAP- Serviço de Anatomia Patológica

SIDA- Síndrome de Imunodeficiência adquirida

SK- Sarcoma de Kaposi

Tat- *Trans- Activator of Transcription*

TARV- Terapia AntiRetro Viral

TNF α - Factor de necrose tumoral

v- Ciclina - Ciclina viral

VCAM- Molécula de adesão celular vascular

VEGF- Factor de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Foto representativa de lesões cutâneas de SK clínico e histológico nas formas de mácula, placa e nódulo

Figura 1.2 Representação esquemática da estrutura do HHV-8

Figura 1.3 Estrutura linear do genoma do HHV-8

Figura 1.4 Representação estrutural da proteína LANA

Figura 1.5 Distribuição geográfica da seroprevalência do HHV-8

Figura 3.6 Distribuição dos casos de SK de acordo com a serologia do HIV

Figura 3.7 Distribuição dos casos SK/HIV + de acordo com o tratamento antiretroviral

Figura 3.8 Distribuição das frequências das lesões cutâneas do SK de acordo com a localização anatômica

Figura 3.9 Frequência do número de lesões distribuídas pelo corpo

Figura 3.10 Aspecto histológico da lesão de Sarcoma de Kaposi

Figura 3.11 Frequência dos estágios histológicos das lesões de SK diagnosticados

Figura 3.12 Associação entre o Nível de células T CD4+ e o tipo histológico de SK

Figura 3.13 Imagem histológica do estágio de placa e nódulo com expressão nuclear do antígeno LANA/HHV-8

Figura 3.14 Associação do número de células T CD4+ e expressão do HHV-8

Figura 3.15 Associação da carga viral do HIV e expressão do HHV-8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Distribuição dos herpesvirus que infectam humanos de acordo com a subfamília

Tabela3. 2 Dados demográficos de pacientes com SK

Tabela 3.3 Associação dos resultados do HIV e TARV dos doentes SK em relação ao sexo

Tabela3.4 Resultados do nível das células T CD4+ periférico dos doentes SK

Tabela3.5 Resultados da carga viral plasmática do HIV dos doentes SK

Tabela 3.6 Associação do nível do CD4, Tempo de aparecimento das lesões com o número de lesões distribuídas pelo corpo

Tabela3.7 Detecção Imunohistoquímica do HHV-8 em diferentes estágios do SK

Tabela 3.8 Análise semi - quantitativa da imuno - expressão do LANA/HHV-8

Tabela 3.9 Associação da expressão semi-quantitativa do HHV-8 com o número de lesões

Resumo

O Sarcoma de Kaposi (SK) é um tumor vascular de baixo grau do sangue e dos vasos linfáticos, com evolução clínica muito variável, que frequentemente se apresenta na forma de lesões cutâneas; Histologicamente caracteriza-se por proliferação de vasos sanguíneos, de células fusiformes, inflamação e edema. A incidência deste tumor está aumentada em indivíduos HIV positivos. Nestes doentes, o HIV tem mudado a forma de apresentação do SK, tornando numa doença agressiva que se caracteriza por disseminação, mudanças de apresentação histológicas das lesões, aumento da carga viral do HHV-8 e progressão rápida. Com a descoberta do HHV-8, o genoma viral tem sido detectado em todas as formas de SK. O antígeno associado a latência (LANA) é usada como marcador de infecção pelo HHV-8, e a sua presença é demonstrada nas biópsias das lesões do SK. No nosso estudo utilizamos a técnica de imuno - histoquímica para caracterizar e quantificar o HHV-8 nas lesões, de forma a caracterizar a agressividade clínica e morfológica do SK. Os doentes incluídos no estudo apresentaram na sua maioria Sarcoma de Kaposi associado ao HIV (n=109; 94,8%) e sem TARV (n=88; 80.7%), apesar de estarem imunologicamente comprometidos. A imunodeficiência verificada foi caracterizada pela diminuição no número de células TCD4⁺ (mediana - 284.5 células/mm³) e carga viral do HIV (mediana - 7741.73cópias /ml). As lesões de SK foram maioritariamente observadas nos membros inferiores (n=105; 91.3%) e com disseminação múltipla pelo corpo. O diagnóstico histológico foi marcado pelos estágios precoces, com maior representação de lesões em placa (n=56; 48.7%). A expressão imunohistoquímica do LANA/HHV-8 nestas lesões foi aumentada nos estágios tumorais (nódulo), quando comparadas com outros estágios. No entanto, a expressão do HHV-8 não se correlacionou com estado de imunodeficiência, mas está inversamente relacionada com a agressividade clínica observada, o que sugere que uma pequena quantidade de vírus no tecido possa ser suficiente para fazer com que o SK tome características agressivas em indivíduos co - infectados com HIV e com grau de imunodeficiência grave. O nosso estudo mostra que apesar da agressividade clínica dada pelo número de lesões do SK se relacionar com a menor densidade do vírus no tecido com lesão, esta está associada com o tempo de aparecimento das lesões em relação ao tempo de diagnóstico ou inclusão no estudo.

Palavras chave – LANA, HHV-8, Sarcoma de Kaposi (SK), Imunohistoquímica

Abstract

Kaposi's sarcoma (KS) is a vascular tumor of low grade blood and lymphatic vessels, with highly variable clinical course, also presenting skin lesions; histologically it is characterized by proliferation of blood vessels, spindle cells, inflammation and edema. The incidence of this tumor is high in people affected with HIV. In these patients, HIV has changed the format of the SK, becoming an aggressive disease that is characterized by spreading and changes in the histological appearance of the lesions, increased viral load of HHV-8 and rapid progression. With the discovery of HHV-8, this viral genome has been detected in all forms of SK. The latency-associated antigen (LANA) is used as a marker of infection with HHV-8, and its presence is demonstrated in biopsies of KS lesions. In our study, we used Immunohistochemistry to characterize and quantify HHV-8 in the lesions in order to characterize the morphological and clinical aggressiveness of KS. Most of the patients enrolled in this study presents Kaposi's sarcoma associated with HIV (n = 109, 94.8%) and without antiretroviral therapy (n = 88, 80.7%), although they are immunologically compromised. The verified immunodeficiency was characterized by reduction in the number of CD4 + level (median - 284.5 cells/mm³) and HIV viral load (median - 7741.73cop/ ml). The KS lesions were mostly seen in the lower limbs (n = 105, 91.3%) and multiple spreads over the body. The histological diagnostic was scored by the early stages, with higher representation of lesions in plaque (n=56,48.7%). The Immunohistochemical expression of LANA/HHV-8 in these lesions was high in tumor stage (node), when compared with other stages. However, the expression of HHV-8 did not correlate with immunodeficiency state, but is inversely related to the observed clinical aggressiveness, suggesting that a small amount of virus in tissue can be sufficient for SK to present aggressive characteristics in individuals co - infected with HIV and severe degree of immunodeficiency. This study shows that despite the clinical aggressiveness given by the number of KS lesions be related to the lower density of the virus in tissue with injury, this is associated with the time of lesions appearance in relation to the time of diagnosis or enrollment.

Keywords - LANA, HHV-8, Kaposi's sarcoma (KS), Immunohistochemistry

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Sarcoma de Kaposi.....	1
1.2 Apresentação Clínica do Sarcoma de Kaposi	2
1.3 Características histológicas do Sarcoma de Kaposi	2
1.4 Sarcoma de Kaposi e HIV.....	4
1.5. Herpes vírus Humano tipo- 8 e Sarcoma de Kaposi	5
1.5.1. Agente etiológico e sua descoberta	5
1.5.2 Taxonomia viral.....	6
1.5.3 Estrutura Viral	7
1.5.4 Infecção pelo HHV-8.....	9
1.5.6 Antígeno associado a Latência (LANA ou LAN-1).....	10
1.5.7 Epidemiologia do HHV-8.....	11
1.5.8 Epidemiologia molecular do HHV-8.....	14
1.6 Patogénese do Sarcoma de Kaposi.....	15
1.7 Diagnóstico do Sarcoma de Kaposi - agressividade histológica.....	17
2. OBJECTIVOS.....	19
2.1 Objectivo geral	19
2.2 Objectivos específicos.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1 População e local de estudo	20
3.2 Aspectos éticos.....	20
3.3 Anamnese	20
3.4 Exame físico.....	20
3.5 Colheita de sangue e biopsia de pele.....	21
3.6 Testes realizados na amostra de sangue	21
3.6.1. Serologia do HIV.....	21
3.6.2 Contagem de linfócitos T CD4+.....	22
3.6.3 Determinação da carga viral do HIV	22
3.7 Testes realizados nas amostras de biópsias	22
3.7.1 Processamento das biópsias.....	22
3.7.2 Avaliação histopatológica das lesões	22
3.7.3 Processamento do material para estudo imunohistoquímico.....	23

3.7.4 Demonstração imunohistoquímica da infecção pelo HHV-8	23
3.8 Análise Estatística	25
3. RESULTADOS.....	26
3.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES COM SK.....	26
3.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA DOS PACIENTES COM SK	27
3.2.1 Caracterização clínica.....	27
3.2.1.1 Serologia do HIV e TARV	27
3.2.1.2 Contagem dos linfócitos T CD4+	29
3.2.1.3 Carga Viral Plasmática do HIV	29
3.2.1.4 Localização das lesões de SK.....	30
3.2.1.5 Número de lesões disseminadas pelo corpo	30
3.2.1.6 Tempo de aparecimento das lesões (tempo de progressão de SK).....	31
3.2.2 Caracterização histopatológica	32
3.2.3 Caracterização Imunohistoquímica das lesões de Sarcoma de Kaposi	33
4.DISSCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES	43
6. LIMITAÇÕES E RECOMENDAÇÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
Anexo 1: Aprovação de Comité de Bioética.....	52
Anexo 2: Consentimento informado.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Sarcoma de Kaposi

O Sarcoma de Kaposi foi descrito pela primeira vez em 1872 pelo dermatologista Austro-húngaro Moritz Kaposi (1837-1902), como “sarcoma pigmentado idiopático da pele”, e ganhou importância como problema de saúde pública com o aparecimento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) no início da década de 1980 e com o advento de transplante de órgãos (Mesri *et al.*, 2010).

O Sarcoma de Kaposi (SK) é um tumor vascular de baixo grau do sangue e dos vasos linfáticos, com evolução clínica muito variável. O SK frequentemente apresenta-se na forma de lesões cutâneas, podendo também ocasionar comprometimento de nódulos linfáticos e outros órgãos viscerais (Hengee *et al.*, 2002; Radu & Pantanowitz, 2013). Neste último caso, as lesões disseminadas estão quase sempre acompanhadas também por lesões cutâneas.

Existem quatro formas clínico-epidemiológicas distintas do SK:

SK Clássico – que se refere à forma descrita por Moritz, mais frequente em homens idosos (40-70 anos), particularmente do Sul da Europa, descendentes judeus e povos da região do Mar Mediterrâneo. É uma doença rara de evolução lenta e curso benigno. As lesões geralmente são indolores e mais frequentes na pele dos membros inferiores (Radu & Pantanowitz, 2013).

SK endêmico ou Africano - foi descrito no início dos anos 60 e ocorre em quase toda África Equatorial, particularmente a Sub-Sahariana. Esta forma, pode estar ou não associada ao Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV), constituindo a forma mais agressiva em adultos jovens e crianças, com envolvimento dos órgãos viscerais e linfáticos (Radu & Pantanowitz, 2013).

SK iatrogênico ou associado ao transplante - foi observada na década de 70 com o início de transplante de órgãos. Ocorre em pacientes transplantados, que usam drogas imunossupressoras e tratamentos quimioterápicos. Esta forma de SK apresenta-se frequentemente como lesões cutâneas localizadas (Radu & Pantanowitz, 2013).

SK epidêmico ou associado ao HIV - documentada na década de 80 como a forma mais agressiva de SK, associada ao HIV, descrita frequentemente entre adultos jovens, do sexo

masculino homossexuais ou bissexuais, mas, actualmente afecta igualmente as mulheres e crianças. Esta forma progride rapidamente, com múltiplas lesões disseminadas com envolvimento da pele, vísceras e gânglios linfáticos (Mesri *et al.*, 2010; Radu & Pantanowitz, 2013).

1.2 Apresentação Clínica do Sarcoma de Kaposi

Nas quatro diferentes formas clínicas - epidemiológicas do SK, há maior envolvimento cutâneo (Hengee *et al.*, 2002). As manifestações do SK na pele são caracterizadas por lesões de aspecto rosado, vermelhas ou acastanhadas, contudo em indivíduos da raça negra, as lesões são bem escuras, quase negras.

As lesões mucocutâneas caracterizam - se por formação de máculas e placas (lesões iniciais) enquanto a doença avançada se caracteriza pela formação de nódulos ou tumores (lesões tardias) (Hengee *et al.*, 2002; Grayson & Pantanowitz, 2008). Algumas vezes, estas lesões podem coexistir num mesmo indivíduo no mesmo período de tempo (Radu & Pantanowitz, 2013).

De uma forma geral, as lesões localizam-se nas extremidades do corpo, membros superiores e inferiores e podem surgir em outras localizações como face, pescoço, genitais e tronco. Associado a localização das lesões, observa-se com muita frequência edema nos membros inferiores, periorbital e de genitália externa. Estas, podem variar em número e dimensões, desde lesões isoladas pequenas até centenas de lesões disseminadas pelo corpo inteiro, na forma mais grave da doença (Hengee *et al.*, 2002).

A história natural do SK demonstra heterogeneidade de evolução, há indivíduos que apresentam regressão espontânea e outros que ocorre progressão fatal da doença (Whelan & Scadden, 2000). Contudo, as diferentes formas de SK têm características fenotípicas semelhantes.

1.3 Características histológicas do Sarcoma de Kaposi

Histologicamente, o SK é um tumor caracterizado por proliferação de células de origem endotelial fusiformes, presença de infiltrado inflamatório linfo-mononuclear e edema (Ensoli *et al.*, 2001). Nas lesões da pele, o tumor envolve a maior parte da derme e às vezes a região subcutânea.

No estágio de mácula, a histologia revela vasos dilatados e aumentados em número, que alteram a estrutura habitual da derme, com células endoteliais hipertróficas podendo fazer protusão no lúmen vascular e formar novos vasos sanguíneos próximos à superfície e ao redor dos anexos da derme, produzindo o chamado sinal de promontório. Este sinal não é patognomónico de SK, podendo ser encontrado em outras lesões vasculares incluindo lesões benignas e angiosarcomas (Ackeeman,1979 e Radu & Pantanowitz, 2013). Nesta fase a proliferação vascular é discreta e acompanhada de infiltrado inflamatório perivascular e/ou difuso, composto de linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Contudo, estas alterações são inconspícuas e facilmente se perdem na biópsia (Radu & Pantanowitz, 2013).

No estágio de placa observa-se lesão saliente que histologicamente é caracterizado por proliferação dos vasos e células endoteliais. Frequentemente se observa a presença de agrupamento de células neoplásicas confluyente e aumento do grau de vascularização, envolvendo toda a espessura da derme. Alguns vasos são representados por fendas e espaços vasculares com quadro de proliferação de células fusiformes dispersas também na derme reticular, podendo ser observado também o extravasamento de hemácias, acúmulo de hemossiderina no tumor e considerável aumento de infiltrado inflamatório (Douglas *et al.*, 2012; Radu & Pantanowitz, 2013).

No estágio de nódulo observa-se um aumento de células fusiformes dispostas em feixes que permeam os vasos e assumem carácter infiltrativo passando a lesão macroscópica de aspecto nodular. Neste estágio, observa-se também vasos irregulares, angulados, em formas de fendas, congestos, revestidos ou não por endotélio reconhecível, podendo ser comum a presença de eosinófilos e glóbulos hialinos (Radu & Pantanowitz, 2013).

A apresentação ou histologia das lesões nos diferentes estágios é essencialmente idêntica nas várias formas clínico-epidemiológicas apesar de apresentarem diferentes componentes imunológicos e ambientais (Douglas *et al.*, 2012). No entanto, alguns estudos documentaram diferenças histopatológicas menores nos estágios iniciais, entre SK - SIDA e os casos de SK não associados ao HIV (Radu & Pantanowitz, 2013).

Forma de apresentação das lesões

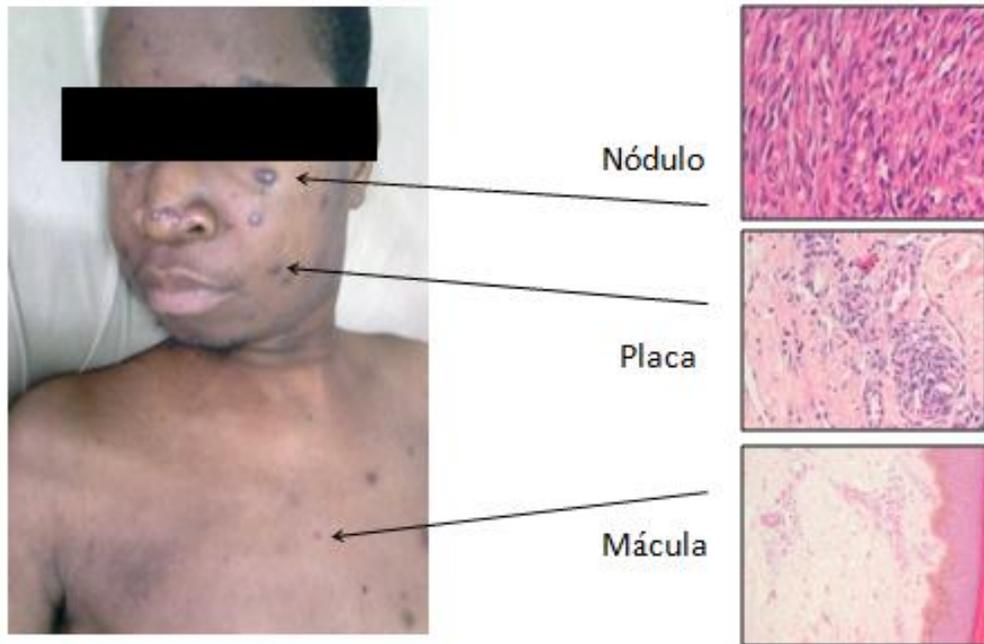


Figura 1.1 Foto representativa de lesões cutâneas de SK clínico e histológico nas formas de mácula, placa e nódulo

As lesões iniciais do SK podem ser confundidas com outras patologias e diagnosticadas como dermatites inflamatórias ou angiodermatite (Blumenfeld *et al.*, 1985). Lesões mais avançadas podem se confundir com um granuloma piogénico ou angiomatose bacilar (Teplemton, 1981).

1.4 Sarcoma de Kaposi e HIV

A síndrome de imunodeficiência adquirida causada pelo HIV, provoca uma imunodeficiência profunda que conduz a infecções oportunistas, manifestações neurológicas e neoplasias secundárias. Em pacientes com HIV, o SK é a neoplasia maligna mais associada ao SIDA, sendo por isso conhecido como uma doença definidora de SIDA (Communicable Disease Center-CDC)

Alguns estudos mostram que o aumento do risco dos indivíduos infectados com HIV desenvolverem SK se associa a um declínio dos linfócitos CD4+, aumento da carga viral e o aparecimento de infecções oportunistas (Stebbing *et al.*, 2006). Outra possibilidade para este

aumento do risco parece estar relacionado com o aumento da esperança de vida dos pacientes HIV em TARV, que torna mais frequente o aparecimento de manifestações decorrentes de coinfeções.

O HIV não é um co-factor para o aparecimento do SK, mas ele aumenta a replicação do vírus associado ao SK (Mercader *et al.*, 2000). Nestes doentes, o HIV tem mudado a forma do SK, tornando numa doença agressiva que se caracteriza por disseminação das lesões no corpo, lesões orais exofíticas, linfedema facial, aumento da carga viral do HHV-8 e progressão rápida, podendo muitas vezes ser fatal (Nsubuga *et al.*, 2008). Actualmente, cerca de 20% de pacientes com HIV e SIDA morrem no mundo devido a complicações do SK (Santucci *et al.*, 1988 & Antman e Chang, 2000).

Embora, o desenvolvimento de SK esteja relacionado com a infeção com HIV, estudos mostram que somente o HIV -1 está envolvido na progressão da doença, particularmente na agressividade invulgar verificada. No entanto, ainda não está completamente esclarecido se o HIV-1 desempenha um papel passivo (Imunossupressão) ou um papel mais directo na patogénese da doença. Contudo, foi proposta a participação indirecta do HIV na produção de citocinas e envolvimento da proteína Tat do HIV-1 (Mercader *et al.*, 2000; Foreman, 2001).

Desde que se constatou o comportamento biológico fatal do SK, vários estudos vem sendo conduzidos para determinar os factores que intervêm na agressividade daquele tumor. Segundo, Boralevi e seus colaboradores, o maior grau de agressividade e patogenicidade do SK está relacionado ao vírus associado ao Kaposi (KSVH) subtipo A, ocorrendo com maior frequência em associação com lesões nas mucosas e vísceras. (Boralevi *et al.*, 1988).

1.5. Herpes vírus Humano tipo- 8 e Sarcoma de Kaposi

1.5.1. Agente etiológico e sua descoberta

O agente etiológico do SK foi identificado por Chang e seus colaboradores (1994), em amostras de DNA extraído de biópsia cutânea das lesões de SK de pacientes HIV positivos, usando a metodologia RDA (*Representational Difference Analysis*), um PCR baseado no método de hibridização, para identificar sequências de vírus. O agente identificado foi chamado de Vírus

Associado ao Sarcoma de Kaposi (KSVH), actualmente conhecido como HHV-8 (Chang *et al.*, 1994).

O HHV-8 é etiologicamente associado a todas formas clínico - epidemiológicas do Sarcoma de Kaposi e outras doenças associadas ao SIDA como o Linfoma de Efusão Primária (PEL) caracterizado por derrames massivos nas cavidades corporais e a Doença de Castleman Multicêntrica (MCD). Actualmente, o HHV-8 tem sido associado aos Linfomas de Hodgkin e Linfomas Não Hodgkin, contudo os resultados são ainda controversos (Lazzi *et al.*, 2006).

1.5.2 Taxonomia viral

Os herpesvírus são classificados pelo Comité Internacional dos Vírus em três subfamílias: alfa (α), Beta (β) e gama (γ) de acordo com as propriedades biológicas. Actualmente, estão descritos cerca de 100 herpesvírus com ampla distribuição na natureza, dos quais 8 distribuídos pelas 3 subfamílias, infectam humanos, incluindo o HHV-8 (Tabela 1.1).

O HHV-8 pertence a família herpesviridae, subfamília Gamaherpesvirinae e género Rhadnovirus, sendo o único do género a infectar o homem. Possui uma estrutura comum aos herpesvirus, apresentando regiões de DNA similares a dois Gamaherpesvirus, *Epstein-Barr* (EBV) e o *Herpesvirus saimiri* (HVS), ambos com elevado potencial oncogénico (Jenner & Boschof, 2002).

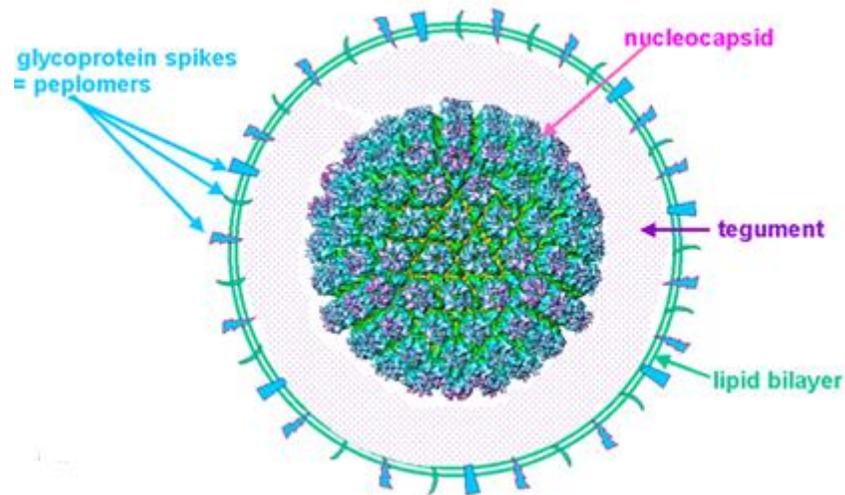
Tabela 1.1 Distribuição dos herpesvirus que infectam humanos de acordo com a subfamília

SUBFAMÍLIA	VIRUS
Alphaherpesvirinae	Herpes vírus simples Tipo 1 (HSV-1)
	Herpes vírus simples Tipo 2 (HSV-2)
	Herpes vírus simples Tipo 3 ou Varicela zoster (HSV-3)
Betaherpesvirinae	Herpes vírus humano Tipo 5 ou Citomegalovirus (HHV-5 ou CMV)
	Herpes vírus humano Tipo 6 (HHV-6)
	Herpes vírus humano Tipo 7 (HHV-7)
Gamaherpesvirinae	Herpes vírus humano Tipo 4 ou Virus Epstein Barr (HHV-4 ou EBV))
	Herpes Vírus Humano Tipo 8 ou vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (HHV-8)

1.5.3 Estrutura Viral

O HHV-8 possui uma estrutura bastante complexa e compartilha várias características em comum com outros herpesvirus. Apresentam-se como partículas de dimensões grandes que variam entre 120 -200 nm, constituídas por quatro (4) componentes estruturais: O **núcleo**

central, onde está localizado o material genético; o **nucleocapsídeo icosaédrico** composto por capsómeros que envolvem o núcleo; o **envelope** que contém numerosas espículas glicoproteicas em sua superfície, e o **tegumento**, localizado entre o capsídeo e o envelope. (**Figura 1.2**)



Fonte: Murray *et al.*, 2006

Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura do HHV-8.

A estrutura genômica do HHV-8 consiste de uma molécula de DNA linear, de cadeia dupla longa, com aproximadamente 170 kb e cerca de pelo menos 85 sequências abertas de leitura (ORF's - *Open Reading Frames*) identificadas. As ORF's homólogas aos *Herpesvirus saimiri* foram numeradas de 1 a 75, e algumas delas são homólogas aos genes celulares humanos (Jenner e Boschof, 2002; Moore e Chang, 2001). As restantes ORF's são únicas do HHV-8 e foram designadas com o prefixo K (K1 a K15) (Russo *et al.*, 1996). Posteriormente foram incluídas mais quatro ORF's denominadas K4.1, K4.2, K8.1e K10.1 (Neippel *et al.*, 1997) (**Figura 1.3**)

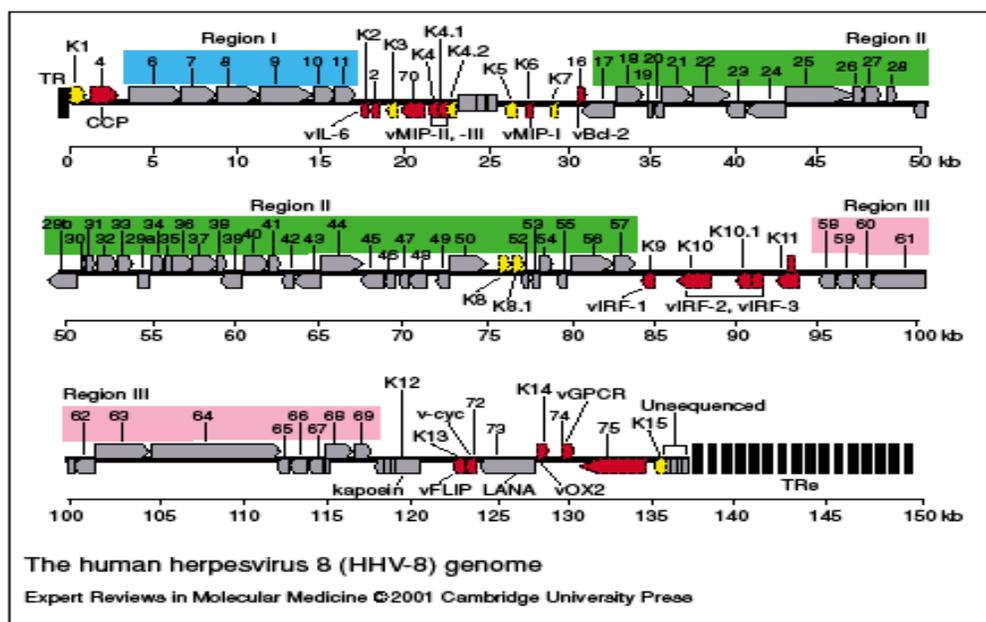


Figura 1.3 Estrutura linear do genoma do HHV-8 (Foreman, 2001)

O genoma do HHV-8 apresenta uma região de cadeia longa codificante (LUR - *Long Unique Region*) altamente conservada e flanqueada por 2 sequências terminais (LTR - *Long Terminal Region*). A LUR é composta por baixas concentrações de G+C (53.5%) e a LTR possui 801 Pb, altas concentrações de G+C (84.5%) (Russo *et al.*, 1996).

1.5.4 Infecção pelo HHV-8

As principais células alvo da infecção pelo HHV-8 são os linfócitos B e células do endotélio vascular (Neippel *et al.*, 1998). A infecção inicia com a ligação de glicoproteínas do envelope na superfície da célula hospedeira, e a penetração pode ocorrer por fusão do envelope viral com a membrana plasmática.

Todos os herpesvirus incluindo o HHV-8 possuem a capacidade de estabelecer infecção latente em suas células hospedeiras, e em caso de imunossupressão iniciam a sua expressão. Durante a infecção, na fase de latência o genoma do vírus se encontra na forma de epissoma - circular fechada e na fase lítica apresenta-se de forma linear (**Figura 1.3**).

Na fase de reativação ou fase lítica, as células infectadas expressam uma variedade de genes e produzem uma progênie viral que termina com a destruição da célula hospedeira. Nesta fase

ocorre a expressão de genes virais das fases imediata, intermediária e tardia. Experiências *in vitro* demonstram a participação de três principais ORF's envolvidas no processo de indução da angiogénese do SK, proliferação das células fusiformes e na disseminação do HHV-8 para os tecidos: ORF-K1, ORF-K9 e ORF-74 (Jenner & Boshoff, 2002).

Durante a fase latente, o genoma viral persiste fora do cromossoma como um epissoma circular. Esta fase de latência do HHV-8 nas células fusiformes do SK é caracterizada por grande restrição da expressão génica, e apenas uma quantidade mínima de genes é expressa, nomeadamente LANA (ORF) 73, Kaposina (ORF-K12), v-ciclina (ORF-72) e v-FLIP (ORF K13), diminuindo desta forma o número de epítomos virais que são apresentados pelas células infectadas aos linfócitos T citolíticos (T CD8+) (Jenner & Boschhoff, 2002).

Estes quatro genes, considerados genes da fase latente, são expressos em praticamente todas as células fusiformes desde a fase inicial até ao estágio nodular. Somente poucas células expressam genes da replicação lítica, o que faz com que o SK seja conhecido como doença da fase latente. Dentre os 4 genes expressos durante a latência, a proteína LANA codificada pela ORF 73 é usada como marcador de infecção pelo HHV-8, e a sua presença é demonstrada nas biópsias das lesões do SK por diversas metodologias como PCR, Hibridização *in situ*, Imunohistoquímica e Imunofluorescência (Boschof *et al.*, 1995; Katano *et al.*, 1999; Shultz, 2000; De Moraes *et al.*, 2009).

Embora os alvos primários sejam os linfócitos B CD19+ e células do endotélio vascular, outras células mononucleares do sangue, células epiteliais e células da mucosa oral podem se infectar com o HHV-8 (Katano *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 2007).

1.5.6 Antígeno associado a Latência (LANA ou LAN-1)

A LANA é uma proteína multifuncional que possui 1162 aminoácidos (aa) e um tamanho estimado de 135KDa (Russo *et al.*, 1996). A proteína LANA é dividida em 3 regiões: Amino terminal, carboxi - terminal e uma região de repetição central (CR) (**Figura 1.4**). Esta última é composta por três sub-regiões: CR1/DED (321-428aa), região de repetição de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E), CR2/QED (430- 768aa), região rica em glutamina (Q), ácido

glutâmico, ácido aspártico, e CR3 (769-937aa), que comporta um domínio de zíper de leucina (Russo *et al.*,1996; Renne *et al.*, 2001).

A LANA exerce um papel fundamental na manutenção da forma epissomal do vírus, mantendo o estado de latência viral e modula a expressão de genes celulares e virais. É responsável pela sobrevivência da célula infectada, pela interação na região de zíper leucina com P53 (proteína supressora tumoral), inibe a sua actividade transcricional dificultando a expressão de genes relacionados a reparação do DNA e deflagração de apoptose. É também importante para expressão de genes regulatórios em células infectadas pelo HHV-8 (Verma *et al.*, 2007). Desempenha igualmente um papel importante na distribuição de genomas virais para células filhas durante o processo de replicação celular.

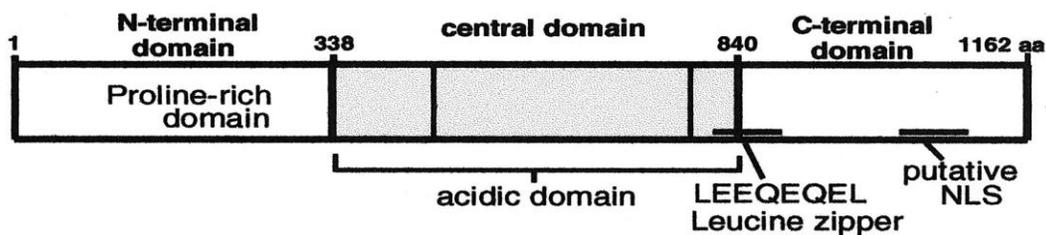


Figura 1.4 Representação estrutural da proteína LANA (Fonte: Renne *et al.*, 2001)

1.5.7 Epidemiologia do HHV-8

Desde a descoberta do HHV-8 como agente etiológico de todas as formas de SK vários estudos vêm fornecendo dados que demonstram ampla distribuição do HHV-8 na população em geral. A epidemiologia de infecção por HHV-8 é baseada em dados sorológicos gerados por testes diagnósticos onde o seu desempenho pode variar e resultar em um subdiagnóstico (De Paoli, 2004).

Esta abordagem possibilitou o estudo da distribuição do HHV-8 entre diferentes grupos de risco para a transmissão do HIV, tendo-se notado que a distribuição dos anticorpos do HHV-8 é distinta, mas semelhante na distribuição do SK (Duckers e Rezza, 2003).

Entre as categorias de exposição ao HIV estudadas, notou-se que nos países ocidentais, as taxas de seroprevalência do HHV-8 é alta entre homens homossexuais (20-40%) e geralmente mais baixa (5-10%) em indivíduos infectados com HIV usuários de drogas injectáveis, mulheres e

doentes hemofílicos. Na década de 80 a taxa de SIDA e Sarcoma de Kaposi entre indivíduos infectados com HIV nos países ocidentais estavam na escala similar, estes estudos sugeriram que homens homossexuais infectados com HHV-8 e HIV acabariam por desenvolver SK (Shultz *et al.*, 2002).

Em contraste, na Europa, indivíduos com SIDA e infectados com HHV-8 raramente estavam associados com o desenvolvimento de SK. Vários países do sul da Europa, Itália e Grécia bem como Israel, tem maior taxa de seroprevalência na população em geral, mas apenas uma pequena porção de indivíduos desenvolve o SK (Shultz *et al.*, 2002).

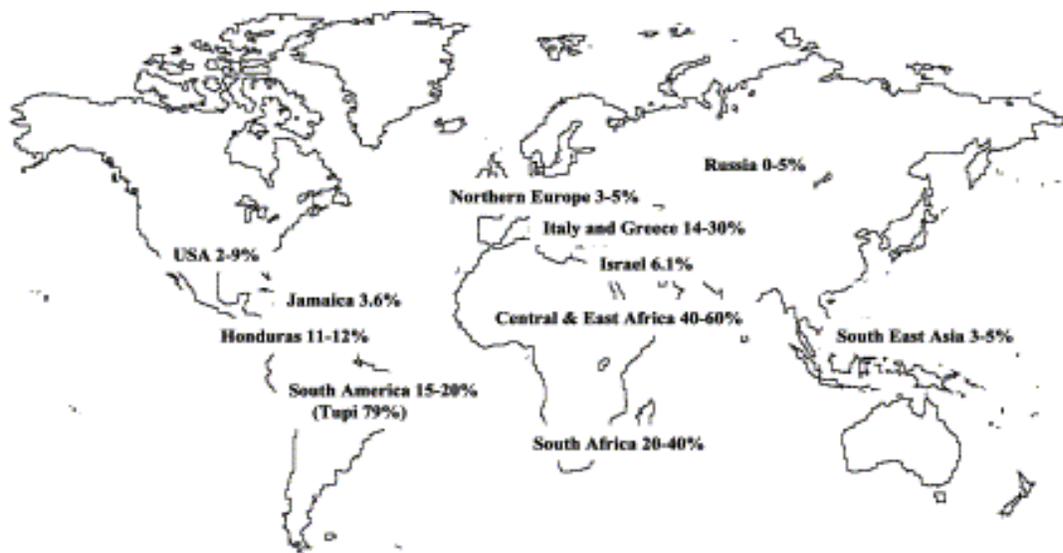
Algumas regiões da Itália e África com elevada seroprevalência para o HHV-8 possuem um número elevado de SK, enquanto que outras como por exemplo o Egipto, país africano com elevada seroprevalência tem poucos casos de SK (Andreoni *et al.*, 1999). Curiosamente em tribos indígenas do Amazónia onde o HHV-8 é endémico, não há relatos de ocorrência de SK (Biggar *et al.*, 2000).

Apesar da distribuição mundial da infecção pelo HHV-8 não estar totalmente definida, observa-se na figura 1.4, que nos Estados Unidos, Norte e Oeste da Europa Central, a prevalência do HHV-8 varia entre 3-10 % com diferenças entre algumas regiões, sendo mais frequente nos países do Mediterrâneo como Itália e Grécia com prevalência de 14-30 % (Schultz *et al.*, 2002).

No continente Africano as seroprevalências de HHV-8 são mais altas do que em qualquer parte do mundo, sendo detectado em mais de 50 % da população em geral dos Países da África Sub-Sahariana (Schultz *et al.*, 2002). A prevalência também difere entre os países Africanos. Na África do Sul a prevalência varia entre 20-40%, no Ghana 38.7 %, no Uganda 37.5 %, e na Zâmbia 41.9 %. As taxas mais elevadas são reportadas em países como Congo e Botswana, 76 e 86 % respectivamente (Duckers e Rezza, 2003).

Até ao momento, foram realizados poucos estudos sobre seroprevalência de HHV-8 em Moçambique. Um estudo de seroprevalência conduzido em pacientes HIV positivos e negativos, respectivamente, revelou uma seroprevalência global de HHV8 de 51,1 % (Ceffa *et al.*, 2007). Outro estudo mais recente sobre a seroprevalência na população em geral realizado por Caterino de Araújo e seus colaboradores nas três regiões do país, norte, centro e sul numa amostra total de

752 pacientes, mostrou uma distribuição de HHV-8 diferente, tendo se encontrado uma taxa de 21,4 %, sem diferenças significativas entre as 3 regiões:18.7% no Norte, 24.3 % no Centro e 21.4 % no Sul (P=0.305) (Caterino de Araujo *et al.*, 2010).



Fonte: Shultz et al., 2002

Figura 1.5 Distribuição geográfica da seroprevalência do HHV-8.

Epidemiologia do SK

Com a epidemia do HIV, o SK de forma atípica tornou-se mais frequente em várias partes do Mundo. Nos Estados unidos a taxa de incidência de SK é em média, mais alta nos estados da Califórnia, Nova Iorque e Geórgia (Mesri *et al.*, 2010).

O continente Africano, principalmente África sub-sahariana, possui as maiores taxas de incidência de SK do mundo (Mesri *et al.*, 2010). Em 2008, estima-se que foram diagnosticados nesta região, 22000 casos no sexo masculino e 12000 casos no sexo feminino. As taxas de incidência padronizada por idades foram estimadas em 8.1 e 3.6 por 100 000 habitantes respectivamente, com as maiores taxas ocorrendo nos países do leste como a Etiópia, Ruanda, Uganda, Zâmbia e Zimbábwe. (Jemal *et al.*, 2011).

Dados do Registo de Cancro de base hospitalar no SAP (Serviço de Anatomia Patológica) do HCM (Hospital Central de Maputo), referentes a Cidade de Maputo relativo ao período de 1991 – 2008 mostram que o SK é o 2º cancro mais frequentemente diagnosticado nos homens, representando 15,6 % de todos os cancros neste sexo. No sexo feminino é o 3º cancro mais frequente e constitui 7 % dos cancros neste sexo (Lorenzoni, 2010).

O estudo do Registo do Cancro realizado no SAP nos últimos quinze anos (1993- 2008) mostra uma tendência para um aumento do SK em 9 vezes no sexo masculino e 22 vezes no sexo feminino provavelmente em relação com a epidemia de HIV/SIDA (Lorenzoni, 2010).

Outro estudo recente do mesmo Registo no SAP referentes ao período de 2009-2010 indicam que o SK passou a ser o primeiro cancro mais frequentemente diagnosticado nos homens, seguidos do cancro da próstata e fígado e continua sendo o 3º cancro mais frequente nas mulheres precedido do cancro do colo do útero e cancro da mama (Sultane *et al.*, 2012).

O papel da detecção serológica do HHV- 8 como detector de casos de risco para o desenvolvimento de SK não está ainda totalmente esclarecido.

1.5.8 Epidemiologia molecular do HHV-8

Entre os genes virais expressos durante a fase de replicação do HHV-8, destaca-se a ORF K1 que codifica uma glicoproteína transmembranar altamente variável. Estudos epidemiológicos mostram que a variação verificada neste gene faz dele um ótimo marcador para subtipagem do HHV-8 (Shultz *et al.*, 2002). Baseado nas variações da região da ORF K1, (Zong *et al.*, 1999) classificaram o HHV-8 em quatro subtipos nomeadamente, A, B, C e D, em amostras de distribuição geográfica diferentes.

Apesar do SK ser uma doença definidora do SIDA, os subtipos virais do HHV-8 foram descritos antes da epidemia do SIDA e Sarcoma de Kaposi endémico africano (Dukers e Rezza, 2003). Actualmente, foram descritos mais dois subtipos classificados como E e F que se juntam aos descritos por Zong *et al* em 1999 (Biggar *et al.*, 2000; Kajambula *et al.*, 2006).

Em relação à distribuição geográfica, o subtipo B foi identificado na África e seria o precursor dos restantes, enquanto, que o subtipo A e C circulam na Europa e nos Estados Unidos; o subtipo

D, ocorre de forma rara, e foi detectado apenas na Austrália, Nova Zelândia e Taiwan em pacientes com Sarcoma de Kaposi clássico (Zong *et al.*, 1999).

Teoricamente o subtipo E foi descrito de forma exclusiva nas populações indígenas brasileiras (Biggar *et al.*, 2000). Kajambula e seus colaboradores classificaram também, um novo subtipo viral em um indivíduo membro de tribo Bantu Ganda, proveniente de Uganda que chamaram como o subtipo F (Kajambula *et al.*, 2006).

1.6 Patogénese do Sarcoma de Kaposi

Está bem estabelecido, que o HHV-8 é necessário mas insuficiente para o desenvolvimento de Sarcoma de Kaposi. A lesão de SK inicia com o desequilíbrio imune caracterizado por ativação dos linfócitos TCD8+ e TCD4+, macrófagos, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e do tipo TH1 (IL-1 β , IL-6, TNF alfa e interferon gama (Ensoli *et al.*, 2001).

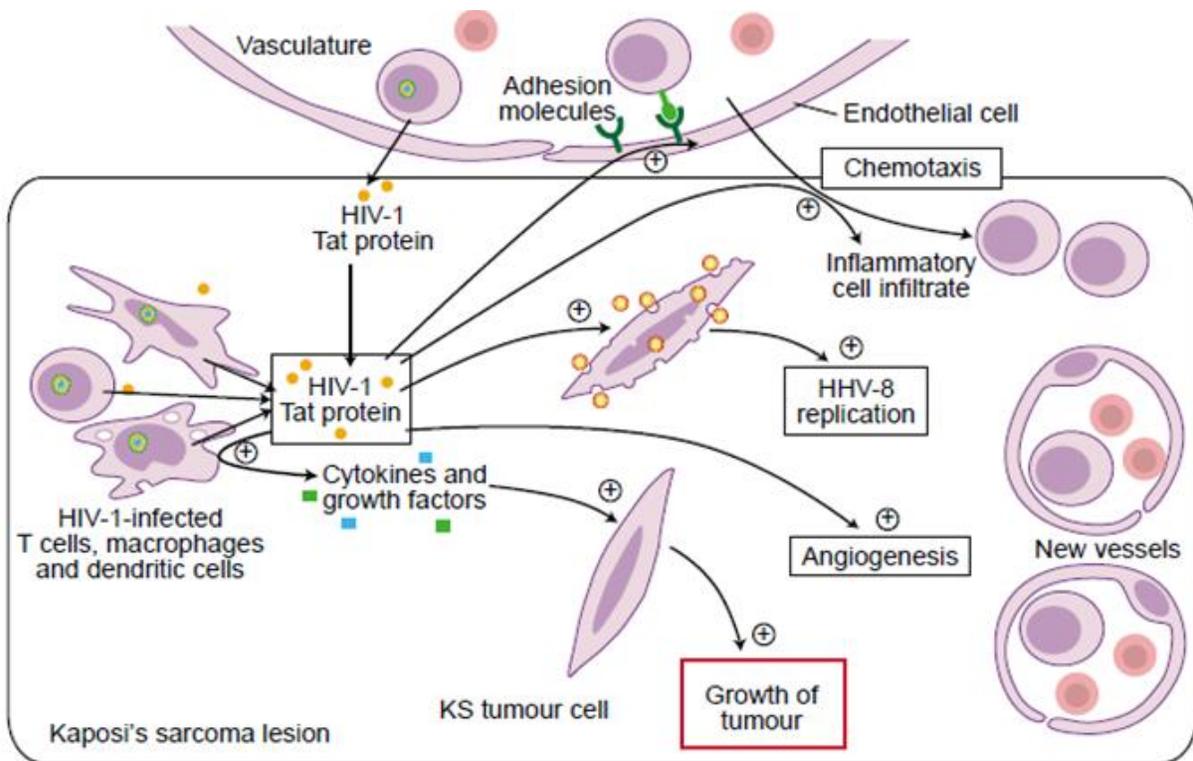
Em indivíduos infectados pelo HIV, este pode afectar indirectamente o curso de HIV/SK por perpetuação de imunossupressão e imuno desregulação, caracterizado pelo aumento das citocinas que sustentam o SK (Krown, 2003). A expressão do gene Tat do HIV é o maior factor implicado na patogénese do SK/HIV. Segundo o modelo e a figura 1.6 proposta por Foreman (2001), as células infectadas pelo HIV (incluindo células T, monócitos macrófagos e células dendríticas) podem produzir e libertar a proteína Tat do HIV, que participa na estimulação e intensifica a produção das citocinas estimuladoras de células endoteliais, tais como IL-6 e IL-1, factor de necrose tumoral (TNF- α) e oncostatina M (Foreman, 2001; Mercader *et al.*, 2000). A sinergia entre a proteína Tat e as citocinas promovem e aumentam as lesões de SK promovendo angiogénese e progressão de SK/HIV (Feller e Lemmer, 2008). Tais eventos acontecem devido a níveis elevados de citocinas que induzem o recrutamento de células circulantes para os tecidos, incluindo as células infectadas pelo HIV, através das moléculas quimiotáticas e de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), ELAM-1 (molécula de adesão de leucócito endotelial-1) e VCAM (molécula de adesão celular vascular) (Feller e Lemmer, 2008).

Este recrutamento das células através dos vasos e a proteína Tat se disponível, leva a produção de factores angiogénicos incluindo os factores de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), de crescimento derivado das plaquetas (PDGF A e B), de crescimento endotelial vascular (VEGF),

de crescimento de transformação β (TGF- β), de permeabilidade vascular (VPF) e factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Feller e Lemmer, 2008).

Estes factores tem o seu papel na mediação da angiogénese, edema e indução da mudança do fenótipo de células endoteliais para células fusiformes que levam ao inicio e desenvolvimento de SK/HIV (Ensoli *et al.*, 2001).

Nestes indivíduos co-infectados, as citocinas inflamatórias tem a capacidade de reactivar o HHV-8 que se encontra na fase latente, resultando num aumento da carga viral no plasma e distribuicao no tecido e promover a replicação do HIV, conduzindo a uma produção adicional da proteína **Tat** (Mercader *et al.*, 2000; Foreman, 2001; Feller e Lemmer, 2008).



Fonte: Foreman, 2001

Figura1.6 Modelo do mecanismo da patogénese do Sarcoma de Kaposi associado ao HIV

1.7 Diagnóstico do Sarcoma de Kaposi - agressividade histológica

Em regiões endêmicas de HIV/SIDA, como a África subsaariana, o SK é a neoplasia maligna mais prevalente. Nestas regiões, lesões violáceas ou purpúreas devem ser suspeitas de SK. Porém, o quadro clínico pode ser similar a uma variedade de lesões diferente das lesões de SK. Por esta razão, é importante que os clínicos e patologistas possam reconhecer o SK na sua fase inicial e suas manifestações contemporâneas.

Actualmente, tem ocorrido mudanças na compreensão do SK, incluindo a epidemiologia, patogénese, novas apresentações clínicas, descrições de novas variantes histológicas e surgimento de biomarcadores úteis para diagnóstico (Grayson e Pantanowitz, 2008; Robin *et al.*, 2004).

O diagnóstico correcto da doença é crucial para a instituição de uma terapêutica atempada de modo a diminuir o índice de mortalidade por esta doença em pacientes com infecção por HIV. O diagnóstico de SK baseia-se nas apresentações clínicas suspeitas e confirmadas por análises histológicas, mas o HIV e o TARV tem mudado a forma de apresentação de SK levando a muitos problemas de diagnóstico diferencial com outras lesões vasculares (Grayson & Pantanowitz, 2008).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para confirmação e detecção do vírus associado ao SK nestas lesões, incluindo PCR, imunohistoquímica (IHQ) e hibridação *in situ* (HIS) (De Moraes *et al.*, 2009; Kamiyama *et al.*, 2004). A técnica de IHC é útil para localizar o vírus nos tecidos infectados, e constitui uma ferramenta de diagnóstico para os patologistas por ser a mais barata e de fácil execução.

O anticorpo comercial usado actualmente, para o diagnóstico de SK é a proteína LANA ou LAN-1 do HHV-8, considerado marcador de diagnóstico do HHV-8 em lesões suspeitas e também serológico. Esta proteína, tem sido considerada útil para diferenciar o SK de outros tumores vasculares não SK, e serve também para avaliar o desenvolvimento e progressão da doença.

Pela técnica de IHC, foi provado também, que a LAN-1 do HHV-8 oferece sensibilidade e especificidade altas comparadas a técnica do PCR em tempo real, na avaliação de lesões de SK (Pereira *et al.*, 2013; Hammock *et al.*, 2005 e Patel *et al.*, 2004). Contudo, os resultados são

ainda controversos, alguns estudos referem que o HHV-8 não está somente relacionado ao SK, sendo detectado também em angiossarcomas, hemangiomas e dermatofibromas (Pantanowitz, et al., 2010).

A proteína LANA é detectada através de IHC em biópsias fixadas em formol e impregnadas em parafina. A sua presença é expressa inicialmente por todas as células fusiformes em todos estágios da lesão de todas as formas de SK, revelada por pontilhado acastanhado no núcleo de células infectadas (Robin *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2013)

Prefere-se o uso da proteína LANA-1 em relação ao PCR na detecção do HHV-8 porque as células inflamatórias mononucleares podem abrigar o vírus, principalmente em pacientes HIV positivos. Apesar da técnica de PCR demonstrar que a carga viral do HHV-8 está relacionada com a agressão da doença, vários estudos também mostram aumento da expressão do LANA/HHV-8 durante a progressão da lesão do SK, permitindo a quantificação e fenotipagem destas células no Sarcoma de Kaposi (Pyakurel *et al.*, 2004 e 2006).

Desconhecemos estudos que demonstram a expressão quantitativa do vírus no microambiente da lesão do SK epidémico com a agressividade clínica. Acreditamos que o uso da técnica de Imunohistoquímica poderia ajudar os patologistas na caracterização das lesões ao mesmo tempo que seria de grande utilidade como marcador de agressividade patológica e clínica do SK

2. OBJECTIVOS

2.1 Objectivo geral

- Descrever as características clínicas, patológicas e de expressão do HHV-8 nos pacientes com Sarcoma de Kaposi atendidos no Serviço de Dermatologia do HCM

2.2 Objectivos específicos

- Descrever os aspectos clínico-patológicos e morfológicos do SK nos doentes atendidos no Serviço de Dermatologia do HCM

- Determinar a prevalência serológica do HIV em doentes com SK

- Avaliar se os marcadores imunológicos (níveis de células de CD4+) e virológicos (Carga viral do HIV) se associam a forma de apresentação clínico-patológica de SK

- Descrever o perfil de expressão imunohistoquímico de HHV- 8 nas lesões de SK

- Avaliar se o perfil imunohistoquímico de HHV- 8 nas lesões de SK serve como marcador de utilidade diagnóstica e de agressividade clínico - histológica do Sarcoma de Kaposi

3. METODOLOGIA

3.1 População e local de estudo

Trata-se de um estudo transversal realizado entre Novembro de 2011 e Agosto de 2012 no Hospital Central de Maputo (HCM), unidade sanitária de nível quaternário e de referência Nacional, e envolveu o Serviço de Dermatologia que faz atendimento de doentes com diversas patologias da pele e Serviço de Anatomia Patológica (SAP), único Laboratório que faz os diagnósticos anatomopatológicos incluindo os histopatológicos em toda região sul do país,

Durante as consultas de dermatologia, foram convidados a participar do presente estudo doentes consecutivamente observados com lesões cutâneas suspeitas de SK e com idade superior a 18 anos. Estes doentes foram submetidos a um inquérito clínico usado na rotina para os doentes de SK, colhidos uma amostra de sangue e biópsia de pele da área com lesão suspeita de SK.

3.2 Aspectos éticos

O presente projecto para a obtenção do grau de mestrado foi aprovado pela Comissão Nacional de Bioética para a Saúde do MISAU (Ministério da Saúde) em 2011/com a referência – Ref.310/CNBS/11 (**Anexo 1**). Todos os pacientes incluídos no presente estudo foram informados e esclarecidos sobre o estudo e assinaram um Termo de consentimento (**Anexo 2**). A base de dados gerada com os dados produzidos contém apenas os códigos dos participantes como identificação.

3.3 Anamnese

A avaliação clínica foi feita por um médico residente de Dermatologia, em ficha própria já usada rotineiramente para todos os doentes com SK que se apresentam naquele serviço. Apenas se adicionou à ficha já existente, a residência do paciente e o número de lesões cutâneas.

Os dados colhidos na ficha de SK, foram codificados e digitalizados numa base de dados electrónica, e incluíram as características sócio-demográficas, características clínicas associadas as lesões de SK, início das primeiras lesões, o actual estado do HIV e a linha de tratamento.

3.4 Exame físico

A todos os pacientes foi realizada uma única biópsia para fins de confirmação diagnóstica. Foram registados dados de avaliação do estado geral das lesões, localização, forma clínica e o

número de lesões no corpo. Usamos a contagem simples das lesões no corpo para classificar o SK como moderado quando as lesões eram menos de 20 (< 20) e severo ou agressivo quando as lesões eram superiores ou igual a 20. Segundo Nsubuga e colaboradores (2008), esta classificação pode ser usada quando não existe um padrão unificado das lesões de SK.

3.5 Colheita de sangue e biopsia de pele

As amostras de sangue foram colhidas nas enfermarias de Dermatologia por profissionais daquele Serviço, seguindo a rotina local, e enviados ao Laboratório de Análises Clínicas do HCM e de Anatomia Patológica. De cada paciente obteve-se 10 ml de sangue, colhido em 2 tubos com EDTA destinados a exames hematológicos, contagem das células CD4 e 1 tubo sem anticoagulante para exames bioquímicos de rotina e determinação sorológica do HIV.

Para o SAP foi enviado apenas um dos tubos com EDTA, onde de imediato separou-se 500 μ l do sangue total destinados a contagem de células T CD4 e centrifugou-se o restante sangue para posterior separação do plasma destinado a determinação da carga viral do HIV. Estes dois testes foram realizados no Instituto Nacional de Saúde (INS).

As biópsias de pele obtidas foram colhidas por médicos especialistas e residentes no Serviço de Dermatologia segundo os procedimentos habituais de rotina, preservadas na solução de formol tamponado a 10 % e finalmente enviados ao SAP devidamente identificados, acompanhados da ficha clínica de Sarcoma de Kaposi e requisição do exame para diagnóstico anatómopatológico, estudo Imunohistoquímico e extração de ADN.

3.6 Testes realizados na amostra de sangue

3.6.1. Serologia do HIV

A testagem do HIV foi feita somente para doentes que não tinham conhecimento do seu estado sorológico. Estes foram testados usando o algoritmo nacional que é constituído por dois testes imunocromatográficos rápidos. As amostras primariamente foram testadas com o teste Determine HIV 1-2 (Abbott Laboratories, Japan) e todas amostras reactivas foram novamente testadas usando um teste rápido confirmativo, Uni-Gold HIV 1-2 (Trinity Biotech, Ireland). A reactividade em ambos testes foi considerada como um teste positivo.

3.6.2 Contagem de linfócitos T CD4+

A todos pacientes com serologia positiva para HIV foi efectuada a imunofenotipagem para a determinação das sub-populações linfocitárias T CD4+, para determinar a contagem dessas células, as amostras de sangue total foram submetidas a técnica de Citómetro de Fluxo, considerada mais confiável para realização deste exame. A técnica consiste em permitir simultâneas medidas de características físicas múltiplas de uma única célula, tais como seu tamanho relativo, a granulosidade e a intensidade de fluorescência, permitindo a identificação das células. A técnica foi feita usando o FACSCalibur™ (Becton Dickinson, USA) e anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis: CD3FITC/CD8 PE/CD45^{PerCP}/CD4^{APC}. (Becton, Dickinson, USA).

3.6.3 Determinação da carga viral do HIV

A carga viral do HIV foi determinada na amostra de plasma de 30 indivíduos selecionados por conveniência. A quantificação da carga viral foi feita através de uma técnica baseada na amplificação sequencial de ácidos nucleicos, usando o KITcobas Ampliprep/cobas TaqMan HIV 1 Test, V2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) com limite de detecção de 20 cópias.

3.7 Testes realizados nas amostras de biópsias

3.7.1 Processamento das biópsias

As amostras de pele foram submetidas ao processamento histológico automático, de acordo com os procedimentos de rotina, obedecendo as etapas de desidratação em banhos sucessivos de álcool etílico de menor graduação até ao álcool etílico absoluto, diafanizados com banhos sucessivos de xilol, impregnados e incluídos em parafina para obtenção dos blocos de tecido em parafina. Após a obtenção dos blocos, estes foram submetidos a cortes num micrótomo na espessura de 3-4 µm e corados com coloração universal de tecidos Hematoxilina – Eosina.

3.7.2 Avaliação histopatológica das lesões

Os cortes corados foram observados no microscópio óptico por dois patologistas em separado. Foi efectuada a avaliação histopatológica das lesões e classificados morfologicamente em 3 estágios: mácula, placa e nódulo. Na derme, foram analisados de forma semiquantitativa os seguintes elementos:

- proliferação de células fusiformes
- pigmento de hemossiderina
- plasmócitos
- glóbulos hialinos
- vasos bem formados
- índice mitótico nas células fusiformes
- sideroblastos
- apoptose
- eritrócitos extravasados

A avaliação semi-quantitativo dos elementos histológicos considerou o seguinte: ausente (0), Raros (<5 %), + (5-25%), ++(25-75%), +++(> 75%), (os resultados não foram apresentados neste trabalho).

3.7.3 Processamento do material para estudo imunohistoquímico

A partir dos blocos de parafina com as lesões foram obtidos cortes de 3µm e colhidas em lâminas previamente adesivadas com solução de gelatina (BDH chemicals. England) e alúmen crômico (Kcr (SO₄).12H₂O). A seguir os cortes foram deixados a aderir às lâminas durante 24 horas a 37° Celcius em uma estufa e foram submetidos a dois banhos sucessivos de xilol durante 15 minutos para desparafinação e posteriormente hidratados com banhos sucessivos de etanol absoluto, 95% e 70 % e água corrente durante 10 minutos.

3.7.4 Demonstração imunohistoquímica da infecção pelo HHV-8

Foi utilizado o método imuno-histoquímico de peroxidase (DAKO REAL™ EnVision™, Detection System, peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Denmark) segundo as recomendações do fabricante.

Depois da desparafinação e hidratação dos cortes, fez-se a exposição antigénica em banho-maria (calor húmido) com tampão citrato 10 x (Thermo Scientific, USA), durante 20 minutos após o aquecimento do tampão entre 95 a 98°C. De seguida as lâminas foram retiradas do banho, e

mantidas no mesmo tampão a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguidos de duas lavagens de cinco minutos cada em Phosphate buffer saline (PBS) 25 x (Labvision Corporation, USA).

Após a exposição antigénica, a actividade da peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada, incubando as lâminas durante quinze minutos em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3 % em metanol. Seguidos de duas lavagens de 5 minutos cada em PBS.

A seguir as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente com o anticorpo primário anti HHV-8/LANA (NCL-HHV-8-LNA, NovocastraTM, United Kingdom) na concentração de 1:25, durante 60 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas 2 vezes em banhos de 5 minutos cada no tampão PBS.

Logo depois das lavagens procedeu-se a incubação das lâminas com anticorpo secundário polimerizado - HRP Rabbit/mouse (DAKO RealTM, Denmark), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Os cortes assim processados foram lavados novamente em PBS e os sítios de ligação foram reveladas pela solução cromogénica de diaminobezendina (DAB, DAKO RealTM, Denmark) e posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos.

Após a revelação procedeu-se a contra coloração com hematoxilina de Harris (CDH, New Delhi) durante 30 segundos, lavagem em água corrente, desidratação em álcool, diafanização em xilol e no final a montagem com resina sintética DPX (BDH, England) para análise em microscópico óptico.

A reacção foi acompanhada de controle positivo (tecido com Sarcoma de Kaposi) e negativo (tecido com Sarcoma de Kaposi, colocado no lugar do anticorpo primário o PBS). A Positividade foi revelada pela presença de pontilhado intranuclear de cor castanha escuro.

A avaliação da imunoexpressão do HHV-8 foi considerada negativa (-), quando não houve expressão da proteína LANA no núcleo das células fusiformes e positiva com graduação quantitativa de (+) quando a expressão da proteína se restringiu a 1-25 % das células fusiformes,

(++) 26-50 % de células marcadas, (+++) 51-75% de células marcadas, e (++++) quando foi observada expressão em 76-100% das células fusiformes.

A padronização e realização da reação imunohistoquímica para detecção do HHV-8 foi feita no Laboratório de Anatomia Patológica do HCM.

3.8 Análise Estatística

Os dados deste trabalho, foram digitados em Microsoft Excell, e Epidata versão 3.1, e posteriormente exportadas para o formato STATA. A análise foi feita em STATA12.1. Para as variáveis estudadas usou-se o método de análise univariada (frequências, média, desvio padrão, mediana, quartis, mínimos e máximos).

Para as variáveis que não respeitaram a normalidade (testado por Shapiro Wilks) usou-se uma transformação quadrática (CD4 absoluto) ou Logarítmica (carga viral do HIV). Para verificar a associação de duas variáveis empregou-se o teste QUI-Quadrado de Pearson. Se a variável envolvida na avaliação de ambos fosse ordinal usou-se alternativamente o teste de Qui-Quadrado para tendência. Todos os testes estatísticos foram avaliados a um nível de significância de 5 %.

3. RESULTADOS

3.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES COM SK

Foram incluídos no estudo um total de 115 pacientes observados no Serviço de Dermatologia e com diagnóstico confirmado histologicamente de SK, sendo 54 do sexo feminino e 61 do sexo masculino. A idade mediana destes doentes foi de 34 anos, sendo que a maior frequência (n=50; 43.5 %) correspondiam a indivíduos com idades compreendidas entre 25-34 anos de idade sem diferenças estatísticas significativas (p=0.057) entre homens e mulheres. A população do estudo era maioritariamente composta por indivíduos de raça negra (n=114; 99.1%) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Dados demográficos dos pacientes com Sarcoma de Kaposi

	Masculino		Feminino		Total		p-valor
IDADE (anos)							
média (±SD)	37.9 (±11.64)		34.9 (±11.31)		36.5 (±11.53)		
mediana (IQR)	34.0 (29.0 - 41.0)		33.5 (26.0 - 40.0)		34.0 (29.0 - 41.0)		0.2438
Min - Max	18 - 76		18 - 69		18 - 76		
FAIXA ETÁRIA	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
18 - 24	1	1.6	9	16.7	10	8.7	
25 - 34	30	49.2	20	37.0	50	43.5	
35 - 44	18	29.5	17	31.5	35	30.4	0.057
45 - 59	8	13.1	5	9.3	13	11.3	
60 - ++	4	6.6	3	5.6	7	6.1	
RAÇA	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Negra	61	100.0	53	98.1	114	99.1	
Mista	0	0.0	1	1.9	1	0.9	0.47
Total	61		54		115		

3.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA DOS PACIENTES COM SARCOMA DE KAPOSI

3.2.1 Caracterização clínica

3.2.1.1 Serologia do HIV e TARV

Dos 115 pacientes com Sarcoma de Kaposi, 109 (94,8%) tiveram o resultado de HIV positivo, 5 (4,3%) foram negativos e 1 não se definiu o resultado, devido ao não preenchimento deste item na ficha do Sarcoma de Kaposi usada (Figura 3.6).

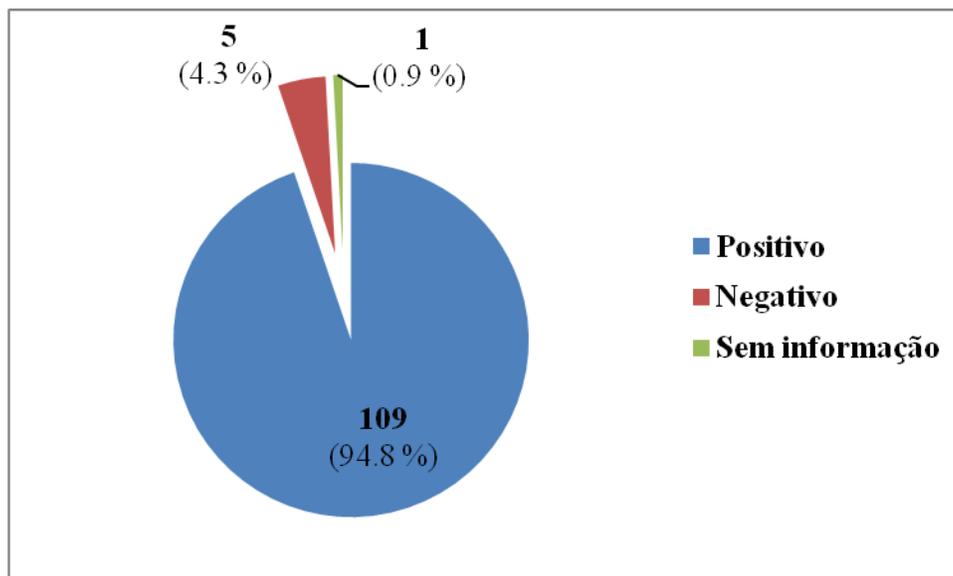


Figura 3.6 Distribuição dos casos de SK de acordo com a serologia do HIV

No momento de inclusão dos doentes no estudo, dos 109 pacientes com resultado de HIV positivo (+) somente 19 (17,4%) estavam a fazer o tratamento antiretroviral, 88 (80,7%) não estavam e 2 (1,8%) não tinham esta informação na ficha (Figura 3.7).

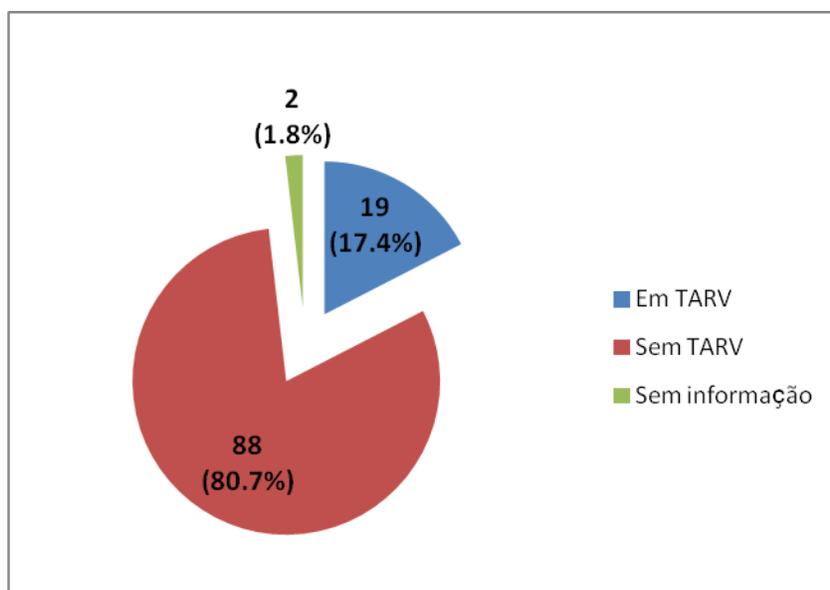


Figura 3.7 Distribuição dos casos SK/HIV + de acordo com o tratamento antiretroviral

Segundo a Tabela 3.3, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto a infecção pelo HIV ($P=0.059$) e TARV ($p=0.518$) no sexo masculino e feminino, embora todos com serologia negativa são do sexo masculino.

Tabela 3.3 Associação dos resultados do HIV e TARV dos doentes com SK em relação ao sexo

	Masculino		Feminino		Total		p
	N	%	N	%	N	%	
N	61		54		115	100	-
HIV							
positivo	55	90.2	54	100	109	94.8	0.059
Negativo	5	8.2	0	0.0	5	4.3	
SI	1	1.6	0	0.0	1	0.9	
TARV							
Sim	10	18.2	9	16.7	19	17.4	0.518
Não	44	80	44	81.5	88	80.7	
SI	1	1.8	1	1.9	2	1.8	

SI- sem informação

3.2.1.2 Contagem dos linfócitos T CD4+

Uma vez que o Sarcoma de Kaposi ocorreu em indivíduos HIV positivos, para este grupo foi avaliado o nível de linfócitos TCD4+ no sangue periférico conforme ilustra a Tabela 3.4. Estes indivíduos apresentaram a contagem mediana dos linfócitos TCD4+ igual a 284.5 cél/mm³ (148.0-412.0) e 12 não foi possível determinar o número de células TCD4+. Observou-se que entre homens e mulheres não havia diferença estatística significativa (p=0.656) entre os níveis de CD4+ no sangue periférico.

Tabela3.4 Resultados do nível das células T CD4+ periférico dos doentes SK

	Masculino (n= 55)	Feminino (n=54)	Total (n=109)	P
CD4 Absoluto (cél/mm³)				
Média (SD)	263.0 (37.74)	316.8 (68.9)	285.6 (51.24)	
Mediana (IQR)	285.0 (148.0 - 394.0)	275.5 (149.5 - 450.5)	284.5 (148.0 - 412.0)	0.6557
Min - Max	5 - 1007	7 - 1393	5 - 1393	

3.2.1.3 Carga Viral Plasmática do HIV

Dos 115 pacientes incluídos no estudo, somente 32 foram submetidos a determinação da carga viral do HIV. Segundo a tabela 3.5 a carga viral mediana do HIV foi de 7741.73 cóp/ml, e indetectável em 2 indivíduos. Tendo sido observado que a carga viral do HIV foi 10 x maior no sexo masculino em relação ao sexo feminino.

Tabela3.5 Resultados da Carga Viral Plasmática do HIV

	Masculino (n=21)	Feminino (n=11)	Total
Carga viral do HIV (nºcóp/ml)			
Média (SD)	12151.64 (23.73)	4194 (44.59)	8429.89 (29.20)
Mediana (IQR)	12110.00 (1218.00 - 206891.19)	1181.00 (173.00 - 233607.08)	7741.73 (808.67- 208204.93)
Min - Max	20 - 1376603.91	20 - 600991.04	20 - 1376603.91

3.2.1.4 Localização das lesões de SK

A figura 3.8 mostra em análise gráfica a localização das lesões cutâneas encontradas no grupo de pacientes estudados. As frequências maiores foram observadas nas extremidades, 105 (91.3%) nos membros inferiores e 53 (46.1%) membros superiores. Outras localizações correspondem a face (n = 33; 28.7%), tronco (n = 23; 20.0%), genitais (n = 17; 14.8%), região peri auricular (n = 3; 2.6%), e região cervical (3; 2.6%).

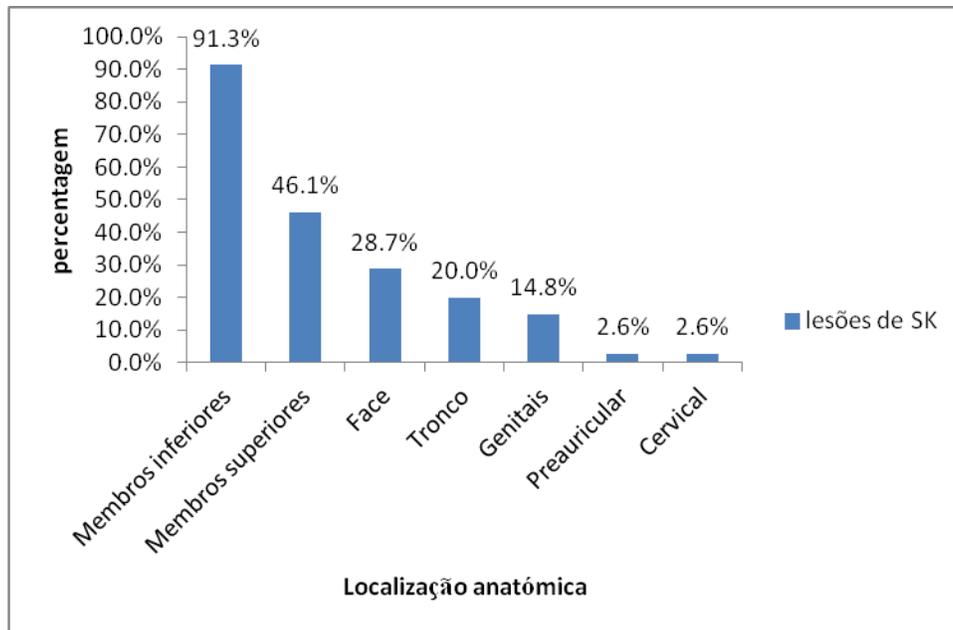


Figura 3.8 Distribuição das frequências das lesões cutâneas do SK de acordo com a localização anatômica

3.2.1.5 Número de lesões disseminadas pelo corpo

A progressão verificada pela quantidade de lesões cutâneas distribuídas pelo corpo foi agrupada em dois grupos representados por menor que 20 lesões e maior ou igual a 20 lesões (< 20 ou ≥ 20 lesões). Observou-se que 69 (63,3%) dos doentes apresentavam-se com SK severo, com mais do que 20 lesões no corpo e 40 (36.7%) com menos que 20 lesões e 6 doentes não tinham esta informação na ficha de recolha de dados (Figura 3.9).

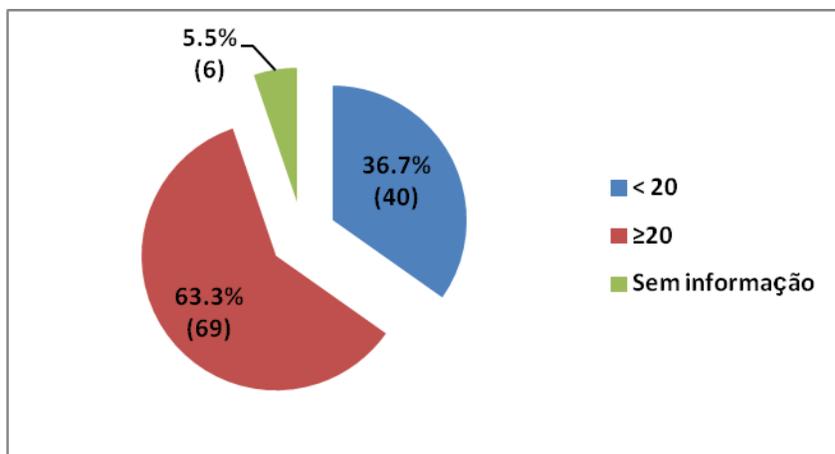


Figura 3.9 Frequência do número de lesões de SK distribuídas pelo corpo

3.2.1.6 Tempo de aparecimento das lesões (tempo de progressão de SK)

Uma vez que se pretendia avaliar a progressão do SK nestes indivíduos, foi referida a aparição das primeiras lesões observadas, medida pelo tempo (meses) em que apareceram as lesões. Observamos que metade dos doentes identificou as primeiras lesões 9 meses antes da consulta (IQR 4-12 meses).

O número de lesões distribuídas pelo corpo foi maior quanto maior foi o tempo de aparecimento das lesões ($P=0.028$) (Tabela 3.6). Não se observam associação significativa entre o número de lesões e os valores de CD4 absoluto ($p=0.787$) (Tabela 3.5), de serologia do HIV ($P=1$), carga viral do HIV ($p=0.963$) e TARV 3.5 ($P=0.073$) (resultados não apresentados).

Tabela 3.6 Associação do nível de células TCD4+ e intervalo de aparecimento das lesões com o número de lesões de SK distribuídas pelo corpo

	< 20 lesões	≥ 20 lesões	Total	P valor
	Mediana (IQR)			
Nível de células TCD4+ (Cél/mm ³)	266 (139 - 431)	289 (174 - 398)	284.5 (148.0 - 412.0)	0.7867
Intervalo de aparecimento das lesões antes do diagnóstico (meses)	6.0 (4.0 - 12.0)	12.0 (5.0 - 12.0)	9.0 (4.0 - 12.0)	0.0284

3.2.2 Caracterização histopatológica

O quadro histopatológico das lesões de SK se caracterizou pela proliferação de espaços vasculares, sendo observados vasos e fendas vasculares irregulares, e extravasamento de hemácias no interstício. As células fusiformes por vezes estavam dispostas em feixes com localização difusa, o infiltrado plasmocitário e o pigmento de hemossiderina estiveram localizados na periferia da derme ou ao redor do plexo vascular profundo (figura 3.10).

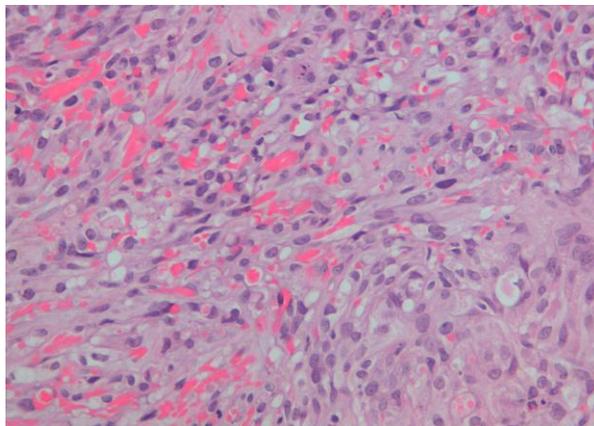


Figura 3.10 Aspecto histológico da lesão de Sarcoma de Kaposi (HE,400x)

As lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi foram classificadas histologicamente em três estágios patológicos. O estágio mais frequentemente diagnosticado foi o estágio de placa (n=56 ; 48.7%), seguido de nódulo (n=43; 37.4%) e de mácula (n=16; 13.9%) (figura 3.11).

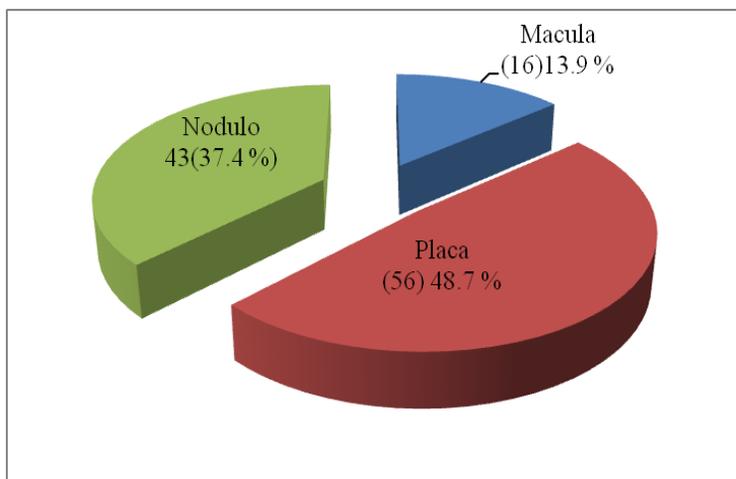


Figura3.11 Frequência dos estágios histológicos das lesões de SK diagnosticados

Ao analisarmos a relação entre o estágio ou tipo histológico da doença e o nível de linfócitos T CD4+, observou-se que não havia diferenças significativas ($p=0.8994$) (Figura 3.12).

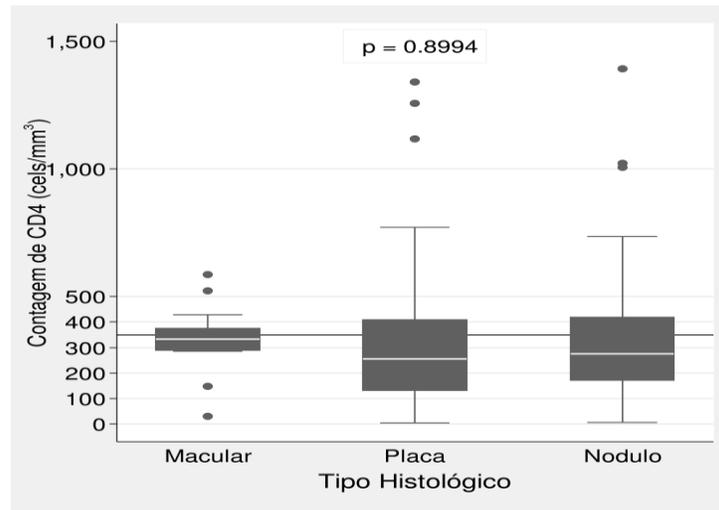


Figura 3.12 Associação entre o nível de células T CD4+ e o tipo histológico de SK

3.2.3 Caracterização Imunohistoquímica das lesões de Sarcoma de Kaposi

As células com expressão do HHV-8/LANA apresentaram na sua maioria morfologia fusiforme, havendo também marcação de outras células do tipo endoteliais. O padrão de imuno - marcação foi nuclear, puntiforme e por vezes homogéneo em algumas células (Figura 3.13)

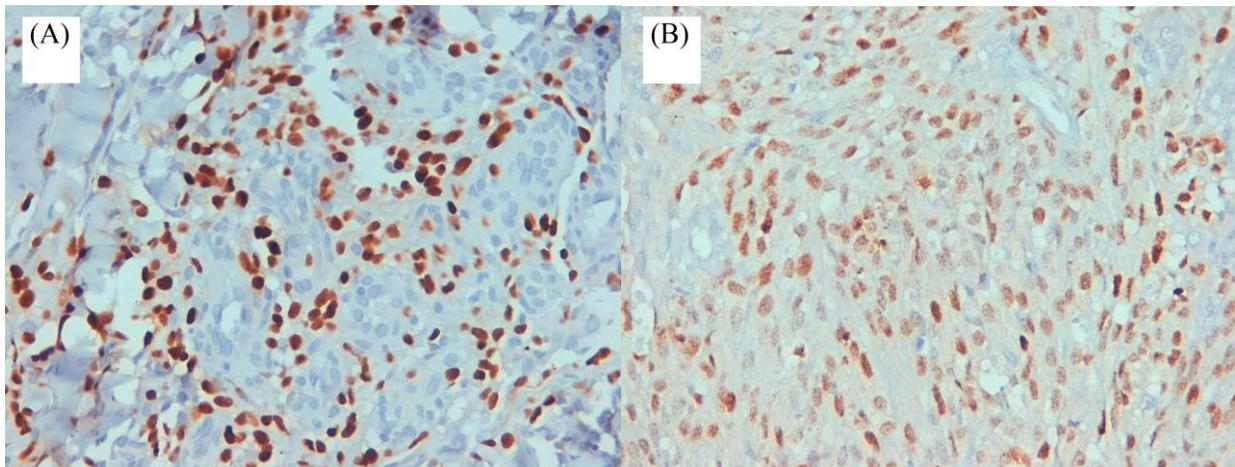


Figura3.13 Imagem histológica do estágio de placa (A) e nódulo (B), com expressão nuclear do antígeno LANA/HHV-8 (Imunoperoxidase, HHV-8, 200X)

De um total de 113 casos de SK testados para o antígeno LANA do HHV-8, houve expressão do antígeno em 107 (94.69 %) e não houve expressão para o antígeno HHV-8/LANA em apenas 6 (5.31 %). Nos outros dois (2), não foi possível fazer o estudo imunohistoquímico por escassez de material (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Detecção Imunohistoquímica do HHV-8 em diferentes estágios do SK

Tipo Histológico	Nº de casos	Imunodeteção do HHV-8	
		Positivo	Negativo
Mácula	16	15(93.75%)	1(6.25%)
Placa	55	50(90.91%)	5(9.09%)
Nódulo	42	42(100%)	0(0%)
TOTAL	113	107(94.69%)	6(5.31%)

Do total de 107 casos com expressão de HHV-8 foi observada a seguinte distribuição: 49 casos apresentavam 25 % das células positivas (+); 19 casos foram positivos em 26-50 % de células (++); 27 mostraram positividade em 51-75% das células (+++); Em 12 casos a expressão de HHV-8 foi difusa em mais ¾ da lesão (++++) (Tabela 3.8). A expressão de HHV-8 foi fortemente associada ao tipo histológico (p = 0.0). A maior expressão de células HHV-8/LANA+ ocorria nas células fusiformes no estágio nodular.

Tabela 3.8 Análise semi - quantitativa da imuno - expressão do LANA/HHV-8

Estágio de SK	Análise semi - quantitativa do LANA/HHV-8				Total
	+	++	+++	++++	
Mácula	12 (24.49%)	1 (5.26%)	2 (7.41%)	0 (0 %)	15
Placa	28 (57.14%)	9 (47.37%)	12 (44.44%)	1 (8.33%)	50
Nódulo	9 (18.37%)	9 (47.37%)	13 (48.15%)	11 (91.67%)	42
Total	49	19	27	12	107

O nível de expressão do HHV-8 foi inversamente associada ao número de lesões de SK apresentadas pelos pacientes (P=0.012), A expressão foi maior em pacientes com menos de 20 lesões (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 Associação da expressão semi - quantitativa do HHV-8 com o número de lesões

Expressão do HHV-8	Número de lesões		Total
	< 20 lesões	≥ 20 lesões	
1-2+	18 (27.69%)	47 (72.31%)	65(100%)
3-4+	19 (52.78%)	17(47.22%)	36(100%)
Total	37 (36.63%)	64 (63.37%)	101(100%)

P=0.012

Observou-se uma tendência para maior expressão de HHV-8 em doentes com menores níveis de linfócitos CD4 apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (P=0.0602) (Figura 3.14).

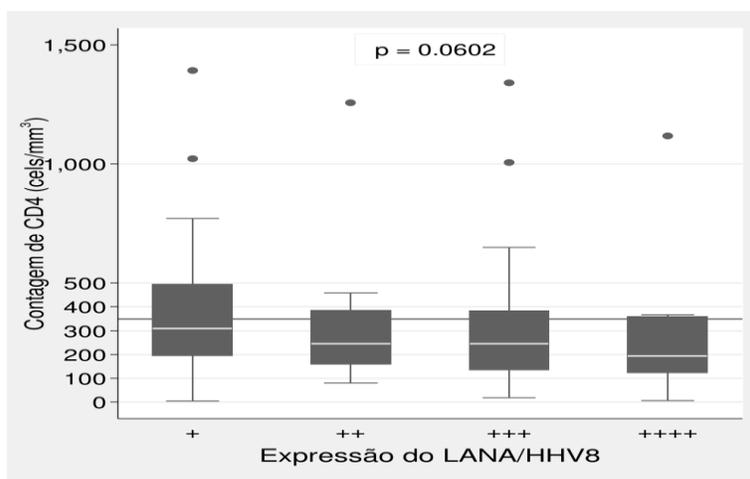


Figura3.14 Associação do número de células TCD4+ e expressão do HHV-8

O mesmo se observa em relação a expressão do HHV-8 e carga viral do HIV. Há uma tendência dos pacientes com elevada expressão do HHV-8 terem valores elevados de carga viral plasmática do HIV (P=0.0704) (Figura 3.15).

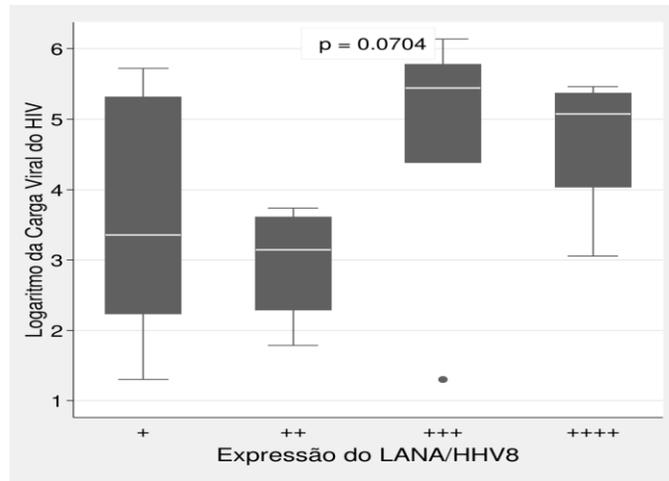


Figura 3.15 Associação da carga viral do HIV e expressão do HHV-8 no tecido

4.DISCUSSÃO

O SK é a neoplasia mais frequente nos países Africanos localizados na região subsaariana e com maior prevalência do HIV (Mesri *et al.*, 2010). Segundo relatório do INSIDA, estima-se que 11,5 % da População moçambicana adulta dos 15-49 anos de idade vive com o HIV (MISAU, 2009). O presente estudo relata de forma única a caracterização clínica e histopatológica de 115 doentes com Sarcoma de Kaposi epidémico ou associado ao HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique. Ao caracterizarmos a população do estudo, observamos que os pacientes apresentavam-se entre outras manifestações, com SK cutâneo, eram maioritariamente negros 99.1% (114) do sexo masculino (61), com uma mediana de idades de 34 anos IQR (29-41). Estes resultados são similares aos encontrados por Nsubuga e seus colaboradores em 2008 em Uganda, um país Africano com taxas elevadas de SK associado ao HIV/SIDA e com maior população de raça negra (Nsubuga *et al.*, 2008).

Neste estudo, confirmamos que o SK que ocorre em Moçambique está altamente associado a infecção pelo HIV. Constatamos, que na altura da inclusão no estudo, a maioria dos participantes 109 (94.8%) estavam infectados por este vírus e somente uma minoria (17.4%) beneficiavam de tratamento antiretroviral (TARV), acreditamos que este facto pode ser provavelmente, devido a fraca aderência dos pacientes ao TARV após um resultado de HIV positivo ou as políticas de testagem do HIV e início do tratamento.

Estudos publicados em portadores do HIV, em países desenvolvidos, assim como países Africanos mostram que a introdução do TARV para além de controlar o HIV melhora ou reduz a incidência do SK, aumenta o nível de células TCD4 e a sobrevivência dos pacientes (Mocrofty, *et al.*, 2004; Engels *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2013).

Um dos objectivos do trabalho foi descrever os aspectos clínico-patológicos e morfológicos do SK. Ao avaliarmos o perfil imunológico dos pacientes do nosso estudo constatamos que a contagem mediana de células T CD4+ foi baixo (284.5 células /mm³, IQR 148-412). Este achado sugere claramente que estes doentes que desenvolveram o Sarcoma Kaposi deveriam estar em tratamento antirretroviral. De acordo com WHO (2009) e directrizes do MISAU publicados em 2009, o TARV é introduzido quando a contagem dos linfócitos TCD4+ for menor ou igual a 350 cél/mm³ ou no estágio clínico III e IV do HIV (WHO, 2009; MISAU, 2009).

É importante ressaltar que o aparecimento das manifestações ou lesões de SK em pacientes infectados pelo HIV do nosso estudo (n=109; 94.8%) deve-se em conjunto a redução de células TCD4+ e ausência da introdução do TARV (n= 88; 80.7%), apesar dos benefícios clínicos da reconstituição imunológica e remissão completa das lesões já estarem bem estabelecidos, e demonstrados com introdução do TARV em pacientes com SK associado ao SIDA (Cattelan *et al.*, 2001 Murdaca *et al.*, 2002; Bihl *et al.*, 2007).

Este resultado está em concordância com os outros estudos de pacientes com SK-SIDA realizados no Uganda, sugerindo que no decurso da infecção pelo HIV há uma perda de substancial de linfócitos TCD4+ no sangue periférico, a qual é responsável pela deficiência imunológica grave dos pacientes, uma vez que o CD4 está relacionado com a imunocompetência celular (Nsubuga *et al.*, 2008).

Um facto interessante é que os participantes do estudo apresentavam-se dentre outras manifestações, com múltiplas lesões características de SK. Observamos que cerca de 69 (63.3%) pacientes apresentaram-se com mais do que 20 lesões a nível da pele. Entretanto, ao averiguarmos se havia associação entre a progressão das lesões em relação a imunodepressão verificada pela população de células TCD4+ no sangue periférico, constatamos que esta associação não ocorria (p=0.787). Estes resultados estão em concordância com um estudo prévio realizado por Nsuguba e seus colaboradores (2008), onde foi observado em uma análise estratificada de CD4+, que na progressão do SK relacionado ao SIDA, não ocorria associação (p=0.32) entre o número de lesões de SK e o nível de células TCD4+ (Nsuguba *et al.*, 2008).

No nosso estudo constatamos também, que esta progressão e disseminação das lesões na pele foi independente do estado do HIV (p=1), da carga viral do HIV no plasma (p=0.963) e da presença ou ausência do TARV (p=0.073). Tal observação é semelhante ao observado num estudo de Cohort realizado por Hong e Lee (2002) de SK em pacientes com HIV e sem HIV que mostra que o estado de HIV não é o factor mais importante para ocorrência de múltiplas lesões de SK (Hong e Lee, 2002). Por outro lado as observações de um estudo conduzido nos Estados unidos por Laney e colaboradores reportaram que o responsável pelo surgimento e disseminação de novas lesões era a presença de carga viral elevada de HHV-8 no sangue periférico decorrente do aumento da replicação. [ref](#)

Além disso, os nossos resultados mostram que o número de lesões eram maior quanto maior fosse o tempo de aparecimento das lesões ($p= 0.028$) ou de evolução da doença. O facto de esta agressividade se associar com o tempo de aparecimento ou evolução das lesões pode estar provavelmente relacionado com a procura de cuidados médicos na altura em que a doença já está disseminada, uma vez que as lesões aparecem de forma isolada. Podemos ainda colocar a hipótese de que estes pacientes talvez pudessem beneficiar da redução do número de lesões se iniciassem com o TARV.

Em regiões endémicas de SK, esta manifesta-se como uma doença multifacetada em termos de sinais, sintomas clínicos e localização anatómica das lesões. Nestes participantes as lesões foram observadas em várias partes do corpo, mas com maior frequência nas extremidades, sendo 105 (91.3%) nos membros inferiores e 53 (46.1%) membros superiores. Estes resultados corroboram com o descrito na literatura sobre o SK (Friedman-Birnbaum *et al.*, 1993).

Com base no diagnóstico histopatológico o estágio morfológico mais frequentemente diagnosticado nas lesões cutâneas biopsadas foi o de placa ($n=56$; 48.7%), seguido de nódulo ($n=43$; 37.4%) e de mácula ($n=16$; 13.9%). Este achado é similar ao encontrado por Hong e Lee, quando estudavam a morfologia de SK associado ou não ao HIV, onde verificaram que o Sarcoma de Kaposi associado ao HIV é diagnosticado em estágios mais iniciais quando comparado com o grupo de SK sem HIV (clássico). (Hong e Lee, 2002). Contudo, os aspectos histológicos (vasos dessecados, mitoses, apoptose, anaplasia) nos dois grupos são diferentes.

Podemos observar que no nosso estudo identificou-se somente 13.9 % de pacientes com lesões muito iniciais de SK quando comparado com outras lesões intermédias (placa) e tardias (nódulo). Isto pode levar nos a deduzir que vários casos de SK na fase inicial podem sofrer um subdiagnóstico. Vários são os estudos que afirmam que a distinção do SK de outros tumores ou lesões benignas, bem como algumas condições inflamatórias pode ser difícil devido a sobreposição de alterações clínicas e histológicas, gerando diagnósticos duvidosos (Hammock *et al.*, 2005). A presença do HHV-8 como factor de risco para o desenvolvimento de SK e sua relação com todas as formas de SK, tornam o HHV-8 uma ferramenta útil de diagnóstico de SK em relação a outras lesões vasculares e precoces (Pereira *et al.*, 2013; Robin *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004).

Um dos objectivos centrais do estudo era de descrever o perfil de expressão do HHV-8 nas lesões de SK. No presente estudo, usamos a detecção imunohistoquímica do HHV-8 para confirmar o diagnóstico morfológico de SK juntamente com as colorações de H& E. Esta técnica é considerada o método histológico mais sensível para pesquisa deste vírus, e é usada com sucesso em amostras de biópsias de SK fixadas com formol e impregnadas em parafina. Foi usada a proteína LANA ou LAN -1, que constitui um auxiliar para reconhecimento de células tumorais infectadas pelo HHV-8.

Após a observação dos tecidos, identificamos as células infectadas pelo HHV-8 através do padrão de coloração acastanhado de aspecto puntiforme e as vezes homogéneos em células fusiformes neoplásicas e endotélias atípicas. Estes aspectos foram observados por outros pesquisadores que encontraram um padrão similar em células tumorais infectadas pelo HHV-8 (Pereira *et al.*, 2013; Robin *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004).

Dos 113 casos de SK caracterizados histologicamente no nosso estudo, o HHV-8 foi confirmado em 94.7 % (n=107) das lesões estudadas, e em 5.3 % (n=6) foram negativos. Do ponto de vista imunohistoquímico, os seis casos negativos podem estar relacionados com a fixação inadequada do tecido. A fixação com recurso ao uso do formol, pode levar ao mascaramento antigénico. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de exiguidade de material ou escassez de células infectadas pelo HHV-8 na amostra estudada ou a ausência verdadeira do vírus nas lesões. Outra explicação para tal facto pode ser encontrada nos resultados de Ciufu e seus colaboradores (2001) que verificaram que algumas células infectadas de forma latente podem entrar em ciclo lítico e deixarem de expressar esta proteína (Ciufu *et al.*, 2001).

No actual estudo, notamos que apesar da infecção do HHV-8 estar relacionado com o SK, não há correlação estaticamente significativa entre o grau ou perfil de imuno-expressão do HHV-8 e aspectos clínico-patológicos, presença ou ausência de infecção pelo HIV ($p=0.0704$) e a quantidade de células T CD4+. No entanto, os resultados por nós encontrados nas lesões de SK não estão em concordância com o estudo realizado na amostra de sangue por Tedeschi e seus colaboradores (2001), este grupo encontrou associação entre a carga viral do HHV-8 e contagem de células TCD4 com a carga viral do HIV (Tedeshi *et al.*, 2001).

Foi interessante notar no nosso estudo que 93.75% (15/16) das lesões no estágio inicial de mácula também mostram a presença do HHV-8/LANA. Este achado suporta o que tinha sido observado por outros autores que a técnica de imunohistoquímica é um método de diagnóstico útil para diagnosticar o SK na fase inicial por diferenciar de outras lesões vasculares e de prováveis simuladores de SK (Hammock *et al.*, 2005 Hong *et al.*, 2003).

No nosso estudo observamos que o perfil de expressão do HHV-8 nas lesões tecidulares está fortemente associada a agressividade morfológica do tumor. Estes achados confirmam os resultados obtidos por outros autores, que notaram que o número de células infectadas pelo HHV-8 e a expressão da proteína LANA aumentam progressivamente, dos estágios iniciais para os estágios tardios ou nodulares (Pyakurel *et al.*, 2004; Pak *et al.*, 2005; Pak *et al.*, 2007).

Estas observações sustentam o facto de que a proliferação tumoral que ocorre no SK deve-se ao teor ou quantidade do HHV-8 na lesão. Entretanto, Pak e seus colaboradores (2005), observaram, que os resultados da carga viral do HHV-8 no sangue pelo método de PCR correlacionava-se com a progressão dos estágios de SK, apoiando o facto de que, em lesões avançadas o HHV-8 está presente na maior parte do tumor (Pak *et al.*, 2005). Outros autores fizeram uma análise da densidade de expressão das células infectadas pelo HHV-8 para comprovarem esta observação. Por exemplo no estudo realizado na França por Long e seus colaboradores (2009) em pacientes HIV-positivos, foi constatado também, que a densidade de expressão nuclear do LANA/ HHV-8 era maior nas lesões cutâneas no estágio nodular em relação aos estágios de mácula e placa. Contudo os autores verificaram que esta foi mais dramática no SK visceral quando comparado com lesões da mucosa superficial (Long *et al.*, 2009). Um outro estudo de SK oral, realizado na Tanzania também comprovou que a maior densidade de expressão do HHV-8 também ocorre no estágio nodular (Mwakigonja *et al.*, 2007).

Um resultado surpreendente do nosso estudo foi de que o nível de expressão do HHV-8 nas lesões de SK foi inversamente associado ao número de lesões, com uma expressão em maior número de células em pacientes que apresentaram menos de 20 lesões ($p = 0.012$). Com este achado podemos supor que vários factores intrínsecos do doente podem contribuir para replicação do HHV-8 e desenvolvimento da doença. Porém a nossa investigação foi feita somente em uma amostra da lesão do SK dentre várias que o paciente apresentava na evolução

da doença. É possível que estudos posteriores comparando a expressão do HHV-8 nas três formas evolutivas da lesão poderiam fundamentar este achado.

Constatamos igualmente, que apesar de não ocorrer associação, verifica-se uma tendência para maior expressão tecidual do HHV-8 em doentes com menores níveis de linfócitos TCD4+ ($p=0.060$) e com uma elevada carga viral do HIV ($p=0.0704$). Vários estudos sustentam o facto de que, em indivíduos co-infectados com HIV, a proteína TAT do HIV pode interagir directamente com o HHV-8 resultando no aumento da replicação do HHV-8 no tecido com tumor (Mercader *et al.*, 2000;Foreman 2001).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o grau de imuno expressão do HHV-8 em tecidos de SK em relação ao número de lesões encontradas. Os poucos estudos existentes avaliam o número de lesões com a carga viral do HHV-8 no sangue periférico ou simplesmente avaliam a expressão do vírus no tecido, sem associar com o aparecimento e número de lesões dispersas pelo corpo do paciente.

Poderíamos sugerir também, que uma pequena quantidade de vírus no tecido poderia ser suficiente para fazer com que o SK tome características agressivas em indivíduos co-infectados com HIV e com grau de imunodeficiência grave. O nosso estudo mostra que apesar da agressividade clínica verificada com a disseminação de lesões se relacionar com a menor quantidade do vírus no tecido com lesão, esta se associou com o tempo de aparecimento das primeiras lesões no momento do diagnóstico inicial de SK ou inclusão no estudo.

Outros estudos demonstraram que o nível de expressão HHV-8 nas células mononucleares do sangue periférico correlaciona-se com a progressão das lesões e com o grau de imunodepressão que os pacientes apresentam. Estes autores sugerem que a alta carga viral do HHV-8 seria decorrente da diminuição da imunovigilância (Pellet *et al.*, 2001; Pellet *al al.*, 2002). De forma consistente, alguns estudos realizados em pacientes com SIDA sugerem que o aparecimento de novas lesões de SK está relacionado com a carga viral do HHV-8 no sangue periférico (Laney *et al.*, 2007; Nsubuga *et al.*, 2008). Em nosso estudo não foi possível efectuar a carga viral do HHV-8 no sangue de forma a relacionar com a disseminação de lesões nestes pacientes. Contudo o estudo realizado no tecido fornece informações úteis para avaliação da progressão de SK.

5. CONCLUSÕES

- No nosso estudo o Sarcoma de Kaposi foi frequentemente diagnosticado em adultos jovens do sexo masculino e cerca de 94.8% dos pacientes estavam infectados pelo HIV;
- Os pacientes com Sarcoma de Kaposi e HIV apresentavam-se com um grau de imunodepressão importante. A contagem mediana dos linfócitos TCD4+ nestes pacientes foi de 284.5 cél/mm³.
- O Sarcoma de Kaposi que ocorre nos pacientes co-infectados com HIV tende a associar-se a maior carga viral do HIV no plasma e a maior grau de imunodepressão;
- O Sarcoma de Kaposi está fortemente associada a infecção pelo HHV-8 e a sua imuno expressão está associado ao tipo histológico, sendo mais agressivas nas formas morfológicas cutâneas nodulares.
- No nosso estudo observamos que 63,3% dos pacientes apresentavam-se com mais do que 20 lesões características de SK. Este comportamento clínico e agressivo verificado nestes pacientes está associada ao tempo de aparecimento das lesões em relação ao seu diagnóstico, e inversamente associada ao grau de expressão do HHV-8 nas lesões histológicas.
- O HHV-8 (antígeno associado a Latencia-LANA) mostrou-se como marcador de utilidade no diagnóstico de SK, já que teve imuno - expressão em 93.75% de lesões muito iniciais (fase de macula) que põem dificuldades de diagnóstico morfológico correcto;

6. LIMITAÇÕES E RECOMENDAÇÕES

- Uma das limitações do nosso estudo foi uma análise de amostra ou biopsia de conveniência e não de todos os estágios da lesão que o paciente apresentava. No entanto esta limitação não diminui a importância dos resultados obtidos com este estudo, visto que, o SK na sua forma evolutiva passa pelos 3 estágios.
- Neste trabalho não foi possível fazer a determinação da carga viral do HIV em todos doentes, somente em 26 % dos doentes, porém esta limitação não influenciou nos resultados obtidos.
- Para entender melhor o “desfecho” dos doentes seria necessário fazer um estudo prospectivo de forma a avaliar a cinética do CD4, carga viral do HIV/HHV-8 com as lesões de SK;
- Para os casos de lesões de SK que não marcaram para o antígeno nuclear associado a Latência (LANA) seria necessário relacionar os resultados obtidos pela técnica de Imunohistoquímica com a técnica de PCR;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman A B. Subtle Clues to diagnosis by conventional microscopy: The patch stage of kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol.* 1979; 1(2): 165-172
- Agaba PA, Sule HM, Ojoh RO, Hassan Z, Muazu MA, Badung B, Agbaji OO, Idoko JÁ, Kanki P. presentation and survival of patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma in Jos, Nigeria. *Int. Journ. Of STD & AIDS.* 2009;110(6) 410-413
- Andreoni M, El-Sawaf G, Rezza G, Ensoli B, Nicastrì E, Ventura L, Ercoli L, Sarmati L, Rocchi G. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in Egyptian Children: Evidence of nonsexual Transmission. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:465-469
- Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *The New England Journal of Medicine.* 2000;342(14): 1027-1038
- Bihl F, Mosam A, Henry LN, Chisholm JV3rd, Dollard S, Gumbi P, Cassol E, Page T, Mueller N, Kiepiela P, Martin JN, Coovadia HM, Scadden DT, Brander C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific immune reconstitution and antiviral effect of combined HAART/chemotherapy in HIV clade C-infected individuals with Kaposi's sarcoma. *AIDS* 2007; Jun 19; 21(10):1245-1252
- Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *Infect dis* 2000; 181:1562-8
- Boralevi F, Masquellier B, Denayrolles M, Dupon M, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Fleury HJ. Study of human herpesvirus 8 (HHV-8) variants from Kaposi's sarcoma in France: is HHV-8 subtype A responsible for more aggressive tumors? *J Infect Dis.* 1998; 178(5): 1546-1547
- Caterino de Araújo A, Manuel RCR, Bianco RD, Santos –Fortuna E, Magri MC, Silva JMK, Bastos R. Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 infection in individuals from Health care center in Mozambique: Potencial for endemic and epidemic Kaposi sarcoma. *J. Med. Virol.* 2010; 82: 1216- 1223
- Cattelan AM, Calabro ML, Gasperini P, Aversa SM, Zanchetta M, Menegheti F, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's

sarcoma regression after highly active antiretroviral therapy: biologic correlates of clinical outcome. *J Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2001; (28)44-49

- Ceffa S, Buonomo E, Altan AM, Erbc F, Germano P, Guidiotti G, Liotta G, Magnano San Lio M, Scarcella P, Palombi L, Marazzi MC. Seroprevalence of HHV-8 in a cohort of HIV-negative and HIV positive patients in Mozambique. *Ann Ig.* 2007; 19:519–523.(abstract)
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of Herpesvirus like DNA sequences in AIDS associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994; 266: 1865-1869
- Cheuk W, Wong CSC, Dinkel JE, Ben-Dor D, Chan JKC. Immunostaining for Human Herpesvirus 8 Latent NuclearAntigen-1 Helps Distinguish Kaposi Sarcoma From Its Mimickers. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121: 335-342
- Ciufu DM, Cannon JS, Poole LJ, Wu Fy, Murray P, Ambinder RF, Hayward GS. Spindle cell conversion by Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus: Formation of colonies and plaques with mixed lytic and latent gene expression in infected primary dermal microvascular endothelial cell cultures. *J Virol.* 2001;75(12):5614-5626
- De Moraes M, De Carvalho CHP, Miguel MCC, Freitas RA, De Sousa LB, Costa ALL. Técnicas utilizadas no diagnóstico da infecção pelo herpesvirus humano tipo 8 em pacientes com Sarcoma de Kaposi: Revisão da Literatura. *Brasília Med.* 2009; 46 (4): 362-370.
- De Paoli P. Human herpesvirus 8: an update. *Microbes infect.* 2004;6:328-35
- Douglas JL, Gustin JK, Moses AV, Dezube BJ, Pantanowitz L. Kaposi sarcoma Pathogenesis: A triad of viral infection, oncogenesis and chronic inflammation. *Transl Biomed.* 2012; 1(2):1-29
- Duker N H T M e Rezza G. Human herpesvirus 8 epidemiology: What we do know. *AIDS:* 17:1717-1730
- Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, sirianni M, Sturzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer.* 2001;37 (10):1251-1269

- Feller L, Lemmer J. Insights into pathogenic events of HIV-associated Kaposi sarcoma and immune reconstitution Syndrome related Kaposi sarcoma. *Infectious Agent and cancer*. 2008; 3:1-9
- Foreman, KE. Kaposi's Sarcoma: The role of HHV-8 and HIV-1 in Pathogenesis. *Expert reviews in Molecular Medicine*, Cambridge University Press. 2001;1-17.
- Friedman-Birnbaum R, Bergman R, Bitterman-Deutsch O, Weltfriend S, Lichtig C. Classic and Iatrogenic Kaposi's sarcoma. Histopathological patterns as related to clinical course. *Am J Dermatopathol*. 1993; 15:523-527
- Grayson W, Pantanowitz L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Am j Dermatopathol*. 2010; 32(3):244-250
- Grayson W, Pantanowitz L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagnostic Pathology* 2008; 3(31):1-11
- Guiguet M, Boué F, Cadranet J, Lang JM, Rosenthal E, Costagliola D. Clinical Epidemiology group of the FHDH-ANRS CO4 cohort. Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. *Lancet oncol*. 2009;10(12): 1152-9
- Hammock L, Reisenauer A, Wang W, Cohen C, Birdsong G, Folpe AL. Latency-associated nuclear antigen expression and human herpesvirus-8 polymerase chain reaction in the evaluation of Kaposi sarcoma and other vascular tumors in HIV-positive patients. *Mod Pathol*. 2005;18: 463-8.
- Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschken M, Roggendorff M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's Sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions clinical manifestacion, and therapy. *Lancet Infec Dis*. 2002; 2 (5): 281-292
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- Jenner RG, Boschoff C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1602(1):1-22
- Laney AS, Cannon MJ, Jaffe HW, Offermann MK, Ou CY, Radford KW, Patel MM, Spira TJ, Gunthel CJ, Pellet PE, Dollard SC. Human herpesvirus 8 presence and viral

load are associated with progression of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS*. 2007; 21 (12): 1541-5

- Lazzi S, Bellan C, Amato T, Palumbo N, Cardona C, D'Amuri A, De Luca F, Beyanga M, Facchetti F, Tosi P, Leoncini L. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus/human herpesvirus 8 infection in reactive lymphoid tissues: A model for KSHV/HHV-8 related lymphomas? 2006; 37(1):23-31
- Lorenzoni, C. Cancro no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo. Estudo retrospectivo de 18 anos (1991 – 2008). 2010. Dissertação do Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane. Maputo. 2010. 98p
- Mercader M, Taddeo B, Panella JR, Chandran B, Nickolof BJ, Foreman KE. Induction of HHV-8 lytic cycle replication by inflammatory cytokines produced by HIV-1-infected T cells. *Am J Pathol*. 2000; 156 (6): 1961-1971
- Mesri A E, Cesarman E, Boschoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 706-719
- Ministério de Saúde: Guia de tratamento antiretroviral e infecções oportunistas no adulto, adolescente e grávida.; 2009.
- Ministério da Saúde (MISAU), Instituto Nacional de Saúde (INS) e Instituto Nacional de estatística (INE). Inquérito Nacional de prevalência, riscos comportamentais e informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique (INSIDA); 2009.
- Murdaca G, Campelli A, Setti M, Indiveri F, Puppo F. Complete remission of AIDS/Kaposi's sarcoma after treatment with a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *AIDS* 2002; 16:304-5.
- Murray PR, RKS, Kobayashi. GS, Pfaller MA, *Microbiologia medica*. Guanabara. Koogan, 2006. 5ª edição.
- Mwakigonja AR, Pak F, Pyakurel P, Mosha IJ, Urassa WK, Kaaya EE, Biberfeld P. Oral Kaposi's sarcoma in Tanzania: Presentation, immunopathology and human herpesvirus 8 association. *Oncol Rep*. 2007; 17(6): 1291-1299
- Nelson CB, Borok MZ, Mhanga TO, Makadzange AT, Campbell TB. AIDS-Associated Kaposi Sarcoma: Outcomes after initiation of antiretroviral therapy at a university-

affiliated hospital in urban Zimbabwe. *Inter. Journ. Of infectious disease.* 2013(17): 902-906

- Nsubuga MM, Biggar RJ, Combs S, Marshall V, Mbisa G, Kambugu F, Mehta M, Biryahwaho B, Rabkin C, Whiby D, Mbulaiteye SM. Human herpesvirus 8 load and progression of AIDS- related kaposi sarcoma lesions. *Cancerr let.* 2008;263(2):182-188
- Pak F, Mwakigonja AR, Kokhaei P, Hosseinzadeh N, Pyakurel P, Kaaya E, Bogdanovic G, Selivanova G, Biberfeld P. Kaposi's sarcoma herpesvirus load in biopsies of cutaneous and oral kaposi's sarcoma lesions. *Eur J Cancer.* 2007; (43912):1877-1882
- Patel RM, Goldblum JR and Hsi ED. Immunohistochemical detection of human herpes virus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. *Mod Pathol* 2004; 17: 456-460
- Pereira PF, Cuzzi T, galhardo MCG. Imunohistochemical detection of the latent nuclear antigen-1of the human herpesvirus type 8 to differentiate cutaneous epidemic kaposi Sarcoma and its histological simulators. *An Bras Dermatol.*2013;88(2): 243-46
- Pyakurel P, Massambu C. Castanos-Velez E, Ericsson S, Kaaya E, Biberfeld P, Heiden T. Human herpesvirus 8/ Kaposi sarcoma herpesvirus cell association during evolution of kaposi sarcoma. *J Acquir immune Defic. Syndr.* 2004; 36(2): 678-683
- Pyakurel P,Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, herden T, Biberfeld P. Lymphatic and vascular origin of Kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development. *Int J cancer.* 2006; 119(6): 1262-1267
- Radu O, Pantanowitz L. Kaposi sarcoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137: 289-294
- Renne R, Barry C, dittmer D, Compitello N, Brown PO, Ganen D. Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J virol.* 2001; 75(1):458-468
- Robin Y M, Guillou L, Michels J J, Coindre J M. Human herpesvirus 8 immunostaining. A sensitive and specific method for diagnosing Kaposi sarcoma in paraffin embedded sections. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:330-334
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Perruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 14862-14867

- Schulz TF, Sheldon J, Greensill J. Kaposi's Sarcoma Associated herpesvirus (KSHV) or Human herpesvirus 8 (HHV-8). *Virus Res.* 2002;82(1-2):115-126
- Sultane T, Lorenzoni C, Ussene E, Carrilho C. Frequência de Cancro na Cidade de Maputo. Estudo retrospectivo do Serviço de Anatomia patológica (SAP) do Hospital Central de Maputo (HCM), no período de 2009 a 2010. *MISAU. Boletim epidemiológico* Nº 2/2011. Janeiro-Junho/2011.
- Tedeschi R, Enbom M, Bidolli E, Linde A, De paoli P, Dillner J. Viral Load of Human Herpes vírus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency vírus-infected patients with Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(12): 4269-4273
- Verma SC, Lan K, Robertson E. Structure and function of Latency- Associated Nuclear Antigen. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 312:101-136
- Whelan P, Scadden DT. New developments in the etiopathogenesis and treatment of HIV related Kaposi's sarcoma. *Clin Dermatol.* 2000; 18:469-477
- World Health Organization: Rapid advice Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents.; 2009.

Anexos

Anexo 1: Aprovação de Comité de Bioética



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657

Exma Senhora
Dr.^a Assucena Guisseve
HCM

Ref: 310/CNBS/11

Data 14 de Outubro de 2011

Assunto: *aprovação do protocolo " Detecção e caracterização molecular de HHV-8 em pacientes com Sarcoma de Kaposi diagnosticados no Hospital Central de Maputo."*

Reunido no dia 13 de Outubro de 2011, o Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou o protocolo intitulado: "*Detecção e caracterização molecular de HHV-8 em pacientes com Sarcoma de Kaposi diagnosticados no Hospital Central de Maputo.*" Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo recomenda que os investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.



Dr. João Manuel de Carvalho Fumane

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Anexo 2: Consentimento informado

Senhor/Senhora,

Tem a possibilidade de participar num estudo. Leia com atenção a folha de informação do estudo antes de tomar a sua decisão.

O estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde de Moçambique.

Não hesite em colocar ao seu médico qualquer questão.

1. Título do estudo: Detecção e caracterização molecular de HHV-8 em pacientes com Sarcoma de Kaposi do Serviço de dermatologia do Hospital Central de Maputo, Moçambique
2. Objectivo do Estudo: Detectar e caracterizar o HHV-8 em pacientes com Sarcoma de Kaposi (SK) e verificar se existe relação entre o vírus HHV-8 e o Sarcoma de Kaposi agressivo
3. Porquê participar neste estudo:
 - a. Informação de base:
 - i. O sarcoma de Kaposi aparece frequentemente quando existe uma infecção anterior por um vírus - o Herpes vírus Humano 8 (HHV-8). Isto ocorre frequentemente quando existe uma coinfeção com HIV. Em Moçambique até hoje nenhum estudo foi efectuado para caracterizar os subtipos do HHV-8 em doentes com SK e para avaliar a relação entre o grau de expressão desse vírus e a forma clínica da doença.
 - ii. Esta informação pode ser importante para prever logo na altura do diagnóstico, quais serão os casos que vão evoluir de forma mais agressiva. Graças a sua participação, se conseguirmos mostrar essa relação, podemos contribuir para colocar um tratamento mais eficaz precocemente, para cada situação, de modo a controlar o SK
4. Seleccção dos participantes:
 - a. Para ser incluído no estudo terá de cumprir os seguintes critérios, terá de ser:
 - i. 18 ou mais anos de idade

- ii. Portador de Sarcoma de Kaposi
- b. Um total de 100 pacientes será incluído no estudo

5. Procedimentos do estudo:

- a. Após o diagnóstico de Sarcoma de Kaposi com os procedimentos de rotina, será efectuado o preenchimento da ficha clínica de rotina que é usada para todos os doentes com SK. Será realizada uma biopsia de uma das lesões para confirmação do diagnóstico de SK, para caracterizar o aspecto patológico das lesões e para avaliar a expressão morfológica de HHV-8. Será efectuada colheita de sangue para testar se está infectado pelos vírus HIV e HHV-8.
- b. Serão realizadas colheitas de sangue num total de 10 ml, para os seguintes testes laboratoriais: diagnóstico sorológico de HHV-8 e HIV, carga viral de HIV e determinação de células CD4+. Os resultados dos testes realizados serão explicados e arquivados no seu processo clínico.
- c. Uma parte das amostras cujos testes não são realizados em Moçambique serão enviadas para instituições de pesquisa fora de Moçambique (Fiocruz Brazil). Esta instituição colabora com o INS.
- d. A sua amostra será guardada para estudos posteriores nesta área, se for necessário retestar para algum resultado duvidoso ou para esclarecer algum aspecto adicional que permita avançar na melhor compreensão desta doença. No caso de estudo adicional, o protocolo será novamente submetido para aprovação do Comité de Bioética, antes da sua implementação.
- e. É importante referir que todos estes procedimentos, nomeadamente, a ficha clínica, a biopsia, os testes de HIV e contagem de CD4 são feitos por rotina em todos os pacientes com SK. Apenas a pesquisa de HHV-8 será introduzida no âmbito deste estudo.

6. Vantagem em participar no estudo:

- a. O seu seguimento médico será mais próximo.

7. Riscos associados à sua participação

Não prevemos nenhum risco com a sua participação uma vez que não utilizaremos nenhuma medida não rotineira nos pacientes incluídos.

8. Os seus direitos durante o estudo e confidencialidade

- a. Os registos relativos à sua participação serão usados apenas para efeitos deste estudo.
- b. O seu nome não será usado em formulários, rótulos de amostras laboratoriais ou em qualquer relatório resultante deste estudo.

No início do estudo ser-lhe-á dado um número de identificação, que será usado em todos os formulários e espécimes laboratoriais. Apenas membros do estudo, do comité de ética e a pessoa encarregada da monitorização do estudo terão acesso a informação ligando o seu nome com o seu número do estudo. Os dados recolhidos serão tornados anónimos antes de introdução em qualquer computador.

- c. Poderá ter acesso à sua informação em qualquer altura e o seu direito a rectificá-la ou opôr-se a ela é garantido durante o estudo. Este direito pode ser exercido mediante o intermediário do coordenador local do estudo ou do seu clínico, cujos nomes são mencionados abaixo.
- d. A sua participação no estudo é voluntária e não lhe custará nada. Os testes e medicamentos administrados durante o seguimento serão gratuitos. Após a conclusão do estudo terá acesso aos tratamentos de forma gratuita no HCM, em outros hospitais da cidade ou província de Maputo para o SK e infecções virais diagnosticadas no decurso do estudo.
- e. Pode retirar-se do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os seus cuidados médicos. O clínico pode também decidir retirá-lo do estudo por razões médicas.

9. Quem pode contactar em caso de problemas?

Qualquer pessoal do estudo se tiver problemas ou questões sobre a pesquisa, ou o seu clínico no local de estudo