

LAURA MASAMI SUMITA

**Infecção pelo herpesvírus 8 humano (HHV-8) em
populações indígenas
e não indígenas da Amazônia brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Shiguekatsu (in memoriam) e Fumiko.

À minha família: Guilherme, Gustavo, Yuji e Cláudio que, por amor e sacrifício, me possibilitaram chegar até este momento, tão importante na minha vida.

Aos meus queridos amigos:

Cris, Cynthia, Jussara e Wilton

Carlos

Jaila

Artur, Mônica e Paschoal

Obrigada por tudo!!!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A concretização deste trabalho tem, para mim, valor inestimável. Não somente por todas as experiências vividas e partilhadas mas, principalmente, pelo conhecimento obtido, pela luta e, sobretudo, pelas amizades conquistadas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti que, como orientador, acreditou neste projeto e ajudou a torná-lo viável, com seu apoio irrestrito e sugestões precisas em todas as etapas.

Aos colaboradores Adriana Tateno, Juliane Oliveira, Maria Cláudia Nascimento, Mariana Quiroga, Mellissa Mascheretti, Vanda Veda e Wilton Santos Freire, pelo inestimável empenho e dedicação de cada um para a realização deste projeto.

A Profa. Dra. Vanda Akico Veda, pesquisadora dedicada e amiga, pela oportunidade de partilhar seu inestimável saber.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, pelo incentivo à realização deste trabalho. Seus conselhos e auxílios foram muito valiosos.

A Lucy Santos Vilas Bôas, pela dedicação, competência e profissionalismo na orientação em meu estágio de graduação e contribuição na minha formação profissional.

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr. Adauto Castelo Filho, Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado e Prof. Dr. Expedito José de Albuquerque Luna, pelas importantes e pertinentes sugestões para a elaboração desta dissertação.

Ao Artur Trancoso Lopo de Queiróz e Cristina Oliveira, por compartilharem seus conhecimentos na realização da análise filogenética.

Ao Luciano Monteiro da Silva, pela gentileza e disponibilidade para me ajudar nas inúmeras dificuldades.

A Sônia Pedroso, bibliotecária do IMT-SP, pela atenção e disponibilidade para me atender nas pesquisas bibliográficas.

A Valéria Vilhena, bibliotecária da FMUSP, pela gentileza e profissionalismo em me auxiliar nas referências bibliográficas e ficha catalográfica.

A Roseli Antonia, Vania Regina e Rosemeire, secretárias da Pós-graduação do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pelas constantes demonstrações de amizade e carinho. Profissionais competentes, dedicadas, eficientes e, acima de tudo, importantes para nós.

Aos caríssimos amigos do Laboratório de Virologia, pela convivência e por compartilharem comigo este momento especial na vida.

A Miriam e Elsa, pela amizade e apoio durante a realização deste projeto.

Aos integrantes da Aldeia Mapuera e da Comunidade de Cachoeira Porteira, por terem gentilmente doado as amostras analisadas neste estudo.

Enfim, a todas as pessoas que, embora não mencionadas, estiveram ao meu lado em algum momento, colaborando de uma forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Confiaram em minha pessoa, em meu trabalho e ajudaram a atingir o meu objetivo, tornando esta uma vitória “nossa”. Obrigada a todos !!!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Herpesvírus 8 humano	4
1.2	Morfologia e estrutura do HHV-8.....	5
1.2.1	Diversidade genética.....	8
1.3	Infecção pelo HHV-8.....	11
1.3.1	Penetração do HHV-8 na célula hospedeira.....	11
1.3.2	Infecção latente pelo HHV-8.....	11
1.3.2.1	Antígeno associado à latência (LANA).....	12
1.3.2.2	Antígeno associado ao ciclo lítico.....	12
1.4	Diagnóstico da infecção pelo HHV-8.....	13
1.4.1	Métodos para detecção de anticorpos.....	14
1.4.2	Métodos moleculares.....	15
1.5	Epidemiologia do SK e da infecção pelo HHV-8.....	16
1.5.1	Epidemiologia do SK.....	16
1.5.2	Epidemiologia da infecção pelo HHV-8.....	18
1.5.2.1	Prevalência.....	18
1.5.2.2	Modo de transmissão	24
2	OBJETIVOS.....	37
3	MÉTODOS.....	39
3.1	Fluxogramas metodológicos.....	39
3.2	Local e populações do estudo.....	43

3.3	Aspectos éticos.....	45
3.4	Delineamento do estudo e amostragem.....	45
3.5	Coleta de sangue e saliva.....	46
3.6	Testes sorológicos.....	47
3.6.1	Teste sorológico para o diagnóstico da infecção pelo HHV-8.....	47
3.6.2	Reação de Imunofluorescência Indireta (IFA).....	47
3.6.3	Testes sorológicos para o diagnóstico de outras infecções.....	49
3.7	Diagnóstico molecular.....	50
3.7.1	Extração de DNA.....	50
3.7.2	Reação em cadeia por polimerase (PCR).....	50
3.8	Sequenciamento nucleotídico de amostras do DNA viral de HHV-8	52
3.8.1	Análise das sequências nucleotídicas.....	55
3.8.2	Edição e alinhamento das sequências.....	55
3.8.3	Análise Filogenética.....	57
3.9	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS.....	61
4.1	Características da população.....	61
4.2	Prevalência da infecção pelo HHV 8.....	62
4.3	Excreção do HHV-8 pela saliva na população indígena.....	69
4.4	Prevalência de anticorpos para outros agentes infecciosos com mecanismo de transmissão conhecidos.....	73
4.5	Caracterização molecular.....	74
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES.....	96
7	ANEXOS	99
8	REFERÊNCIAS	101

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

aa	aminoácido
aids	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> , síndrome da imunodeficiência adquirida
AL	tampão de lise
BCBL-1	linhagens celulares de linfomas de células B de cavidade
bp	pares de base
CaPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatos
EBV	vírus de Epstein-Barr
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i> - ensaio imunoenzimático
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
G	distribuição gama
gp	glicoproteína
HHVs	herpesvírus humanos
HHV-6, HHV-7, HHV-8	<i>human herpesvirus 6, 7, 8</i> , herpesvírus 6, 7, 8 humanos
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , vírus da imunodeficiência humana
HSH	homens que fazem sexo com homens
HVS	herpesvírus saimiri
IFA	reação de imunofluorescência indireta
JC	Jukes e Cantor
Kb	kilobase
kDA	kiloDalton

KSHV	herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi
K80	Kimura 2 parâmetros
LANA	<i>latency-associated nuclear antigen</i> , antígeno nuclear associado à latência
LUR	<i>long unique region</i> , região de cadeia longa codificante
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	mililitro
min.	minutos
mM	milimolar
nm	nanômetro
ORF	<i>open reading frame</i> , sequência aberta de leitura
PA	Pará
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia por polimerase
Primer	oligonucleotídeo iniciador
RDP	<i>representational difference analysis</i> , método de análise representativa diferencial
SK	Sarcoma de Kaposi
TAE	Tampão tris-acetato
TPA	Acetato de o-tetradecainol forbol
TR	Regiões terminais
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite
VR1	Região variável 1
VR2	Região variável 2
µl	microlitro
µM	micromolar
U	unidade

FIGURAS

Figura 1 –	Árvore filogenética dos Herpesvírus.....	5
Figura 2 –	Partícula viral do HHV-8.....	6
Figura 3 –	HHV-8 na sua forma epissomal, com as respectivas ORFs.....	7
Figura 4 –	Distribuição geográfica dos 5 subtipos predominantes de HHV-8, baseada na variabilidade do gene K1.....	10
Figura 5 –	Distribuição da soroprevalência do HHV-8 na América do Sul.....	23
Figura 6 –	Localização geográfica das populações estudada.....	44
Figura 7 –	Reação de imunofluorescência indireta positiva para anticorpos contra antígenos da fase latente (LANA) do HHV-8 em células BCBL-1 (aumento de 400X).....	63
Figura 8 –	Reação de imunofluorescência indireta positiva para anticorpos contra antígenos da fase lítica do HHV-8 em células BCBL-1 tratadas com TPA (aumento de 400X).....	63
Figura 9 –	Gel de agarose corado com brometo de etídio. Reação de PCR da ORF26.....	69
Figura 10A –	Árvore filogenética não enraizada de sequências de DNA ORF-K1/VR1 do HHV-8 obtidas na Aldeia Mapuera-PA.....	80
Figura 10B –	Árvore filogenética não enraizada de sequências de DNA ORF-K1/VR2 do HHV-8 obtidas na Aldeia Mapuera-PA.....	81

GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Percentuais de positividade anti-LANA e anti-lítico (IFA) distribuídos por idade, seus respectivos intervalos com 95% de confiança, em amostras de população indígena, Pará-2003..... 65
- Gráfico 2** – Percentuais de positividade anti-LANA e anti-lítico, segundo faixa etária e os respectivos intervalos com 95% de confiança, em amostras de população não indígena, Pará-2003..... 66
- Gráfico 3** – Percentuais de positividade anti-LANA ou anti-lítico, nas populações segundo faixa etária e os respectivos intervalos com 95% de confiança, Pará-2003..... 68

TABELAS

Tabela 1A – Número de acesso das sequências do GenBank utilizadas como referência para subtipar o HHV-8 pela região VR1 da ORF-K1.....	56
Tabela 1B – Número de acesso das sequências do <i>GenBank</i> utilizadas como referências para subtipar o HHV-8 pela região VR2 da ORF-K1.....	57
Tabela 2 – Distribuição da amostra populacional estudada, segundo sexo e faixa etária, PA-2003.....	62
Tabela 3 – Descrição da prevalência de anticorpos anti- HHV-8 na população indígena e não indígena, Pará-2003.....	64
Tabela 4 – Soroprevalência de anticorpos anti-LANA ou anti-lítico segundo idade nas duas populações indígena e não indígena, Pará-2003.....	67
Tabela 5 – Descrição do DNA do HHV-8 na saliva da população indígena, de acordo com a faixa etária e sorologia positiva para anti-LANA ou anti-lítico, Aldeia Mapuera, Pará-2003.....	70
Tabela 6 – Descrição da positividade de anti-LANA ou anti-LÍTICO segundo excreção do HHV-8 na saliva, Aldeia Mapuera, PA-2003.....	71
Tabela 7 – Detecção do DNA do HHV-8 na saliva de indígenas, de acordo com o sexo e faixa etária, Aldeia Mapuera, PA-2003.....	72
Tabela 8 – Soroprevalência de anticorpos dos agentes infecciosos com mecanismos de transmissão conhecidos na população indígena e não indígena, PA-2003.....	74
Tabela 9 – Resultados de testes moleculares realizados no presente estudo, Pará-2003.....	75
Tabela 10 – Listagem das amostras determinadas no presente estudo e os respectivos números de acesso no <i>GenBank</i> , para VR1, Aldeia Mapuera,PA-2003.....	78
Tabela 11 – Listagem das amostras determinadas no presente estudo e os respectivos números de acesso no <i>GenBank</i> , para VR2, Aldeia Mapuera,PA-2003.....	79

RESUMO

Sumita LM. *Infeção pelo herpesvírus 8 humano (HHV-8) em populações indígenas e não indígenas da Amazônia brasileira* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 130p.

O Herpesvírus 8 humano (HHV-8) é hiperendêmico na população indígena, mas os seus mecanismos de transmissão ainda são desconhecidos. **Método:** Os anticorpos contra o antígeno LANA e lítico do HHV-8 foram detectados por imunofluorescência, em 339 indígenas e 181 não-indígenas da Amazônia brasileira. Marcadores sorológicos de transmissão oro-fecal (hepatite A), parenteral (hepatites B e C) e sexual (herpes simples 2 e sífilis) foram detectados por Elisa específicos. O DNA do HHV-8, extraído da saliva, foi detectado por *nested*-PCR e sequenciado. **Resultados:** Os anticorpos contra o antígeno LANA ou lítico foram detectados em 79,1% nos indígenas e 6,1% nos não-indígenas. A soroprevalência do HHV-8 aumentou com a idade entre os indígenas sendo que as crianças já apresentavam alta prevalência, mas não houve diferença com relação ao sexo em nenhuma das populações. As populações indígenas e não-indígenas não apresentaram diferenças na soroprevalência para os marcadores de transmissão oro-fecal e parenteral, entretanto a soroprevalência de marcadores de transmissão sexual foi menor entre os indígenas. O DNA do HHV-8 na saliva foi detectado em 23 % dos indígenas soropositivos. A detecção de DNA do HHV-8 diminuiu com a idade e foi mais comum em homens. As amostras positivas foram sequenciadas e agrupadas como subtipo E. **Conclusão:** Os dados sugerem a hipótese de transmissão horizontal e precoce, via saliva, do subtipo E do HHV-8 na população indígena.

Descritores: 1.Herpesvírus humano 8 2.Estudos soroepidemiológicos 3.Reação em cadeia da polimerase 4.Transmissão horizontal de doença 5.Análise de sequência de DNA 6.População indígena 7.População não indígena

SUMMARY

Sumita LM. *Human Herpesvirus-8 Infection in Amerindian and Non-Amerindian Populations in the Brazilian Amazon Region* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 130p.

Human herpes virus type 8 (HHV-8) is hyperendemic in Amerindian populations, but its modes of transmission are unknown. **Objectives:** 1. Study the Human Herpesvirus-8 Infection and Oral Shedding in Amerindian and Non-Amerindian Populations in the Brazilian Amazon Region. 2. **Methods:** Antibodies against either HHV-8 latency-associated nuclear antigen (LANA) or HHV-8 lytic antigen were detected, by immunofluorescence assays, in 339 Amerindians and 181 non-Amerindians from the Brazilian Amazon. Serological markers of oro-fecal (hepatitis A), parenteral (hepatitis B and C), and sexual (herpes simplex virus type 2 and syphilis) transmission were measured by specific ELISA. Salivary HHV-8 DNA was detected by use of a nested polymerase chain reaction assay and was sequenced. **Results:** Antibodies against either LANA antigen or lytic were detected in 79.1% of Amerindians and in 6.1% of non-Amerindians. HHV-8 seroprevalence increased with age among Amerindians and already had high prevalence in childhood but was not sex specific in either population. The 2 populations did not differ in seroprevalence of oro-fecal or parenteral markers, but seroprevalence of markers of sexual transmission was lower among Amerindians. HHV-8 DNA in saliva was detected in 23 % of HHV-8 seropositive Amerindians. Detection of HHV-8 decreased with age and was more common in men. HHV-8 DNA samples were sequenced, and all clustered as subtype E. **Conclusion:** The data support the hypothesis of early acquisition and horizontal transmission, via saliva, of HHV-8 subtype E in Amerindian populations.

Descriptors: 1.Herpesvirus8,human 2.Seroepidemiologic studies 3.Polymerase Chain 4.Disease transmission, horizontal 5.Sequence analysis,DNA 6.Indigenous populations 7. Non-amerindian population

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A maioria das infecções causadas pelos herpesvírus humanos é ubíqua na população. Uma exceção a esta regra, devido à sua distribuição desigual e limitada, é o herpesvírus 8 humano (HHV-8), também chamado herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) (Ablashi et al., 2002).

Até o início da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), o sarcoma de Kaposi (SK) era considerado uma neoplasia rara na maior parte do mundo. Com a introdução do vírus da imunodeficiência humana (HIV) na população verifica-se um aumento significativo das taxas de incidências dessa neoplasia, sugerindo a possibilidade de participação de um agente infeccioso em sua etiologia (Beral et al., 1990).

Em 1994, o HHV-8 é descrito por Chang et al. por meio de técnica molecular a partir de tecido de SK de indivíduos com aids. O método de análise representativa diferencial (RDP) possibilita a identificação e comparação das diferenças genômicas entre tecidos de lesões de SK e tecido normal, do mesmo indivíduo com SK-aids. São descobertas duas sequências de DNA, homólogas aos genes codificadores da proteína do capsídeo e do tegumento dos gamaherpesvírus (vírus Epstein-Barr (EBV) e o herpesvírus saimiri (HVS)) – a Bam KS330 e Bam KS 631. Ao se amplificar a região KS 330, em amostras de DNA extraídas de tecidos de pacientes com SK-aids,

observa-se que 93% destas amostras apresentam as referidas sequências, comparadas com apenas 15% de amostras de linfonodos e linfomas de paciente com aids, porém sem SK, sugerindo assim que o HHV-8 é o agente causal do SK (Chang et al., 1994).

Desde seu relato, o novo membro da família herpesvírus é encontrado em todas as formas de SK, neoplasia vascular que apresenta quatro variantes clínicas, acometendo grupos populacionais diferentes, a saber:

- 1) SK clássico – predomina em homens idosos do Mediterrâneo e leste Europeu, com incidência mais alta na Itália, Grécia, Turquia e Israel;
- 2) SK endêmico – é a neoplasia mais comum em populações nativas da África sub saariana, com maior incidência em crianças e mulheres;
- 3) SK iatrogênico – ocorre em pacientes submetidos à terapia imunossupressiva, principalmente após transplante de órgãos;
- 4) SK epidêmico ou SK associado à aids – inicialmente descrito em homens que fazem sexo com homens (HSH), é a forma mais agressiva do SK (Antman e Chang, 2000; Moore, 2000; Hengge et al., 2002; Boshoff, 2003).

O papel patogênico do HHV-8 em outras enfermidades (tais como doença de Castleman multicêntrica e o linfoma de efusão primária) é novamente estabelecido com base em estudos moleculares, evidências soropidemiológicas e dados de biologia celular (Schulz, 2000; Du et al., 2007).

Estudos soropidemiológicos mostram altas taxas de prevalência de anticorpos de HHV-8 entre homens que fazem sexo com homens (HSH), crianças africanas, indivíduos idosos de certas regiões da Europa e indígenas brasileiros. No

entanto, ainda não existe uma teoria explicativa para esta distribuição, de como o vírus pode infectar tais grupos populacionais (Martin et al.,1998; Mayama et al., 1998; Blackbourn et al.,1999; Biggar et al., 2000; Perna et al., 2000; Rezza et al., 2000; Vitale et al., 2000).

Desde os relatos iniciais da infecção pelo HHV-8 até hoje, inúmeros trabalhos têm sido publicados, no que diz respeito à transmissão desse agente, conforme estudo revisado por Pica e Volpi (2007). Muitos desses estudos têm sido realizados para identificar o verdadeiro modo de transmissão, que, todavia, ainda não está totalmente elucidado.

1.1 Herpesvírus 8 humano

O HHV-8, classificado por análise filogenética, como o primeiro membro do gênero *Rhadinovírus* dos gamaherpesvírus (subfamília *Gammaherpesvirinae*) a ser reconhecido como capaz de infectar o homem. Sequências de DNA do HHV-8 apresentam homologia entre esse vírus e outros membros da subfamília dos gamaherpesvírus, particularmente com o HVS, o qual não causa doença em humanos, e o EBV, agente da mononucleose infecciosa associada ao linfoma de Burkitt e a outras formas de cânceres em humanos (Edelman DC, 2005). A Figura 1 ilustra esta classificação.

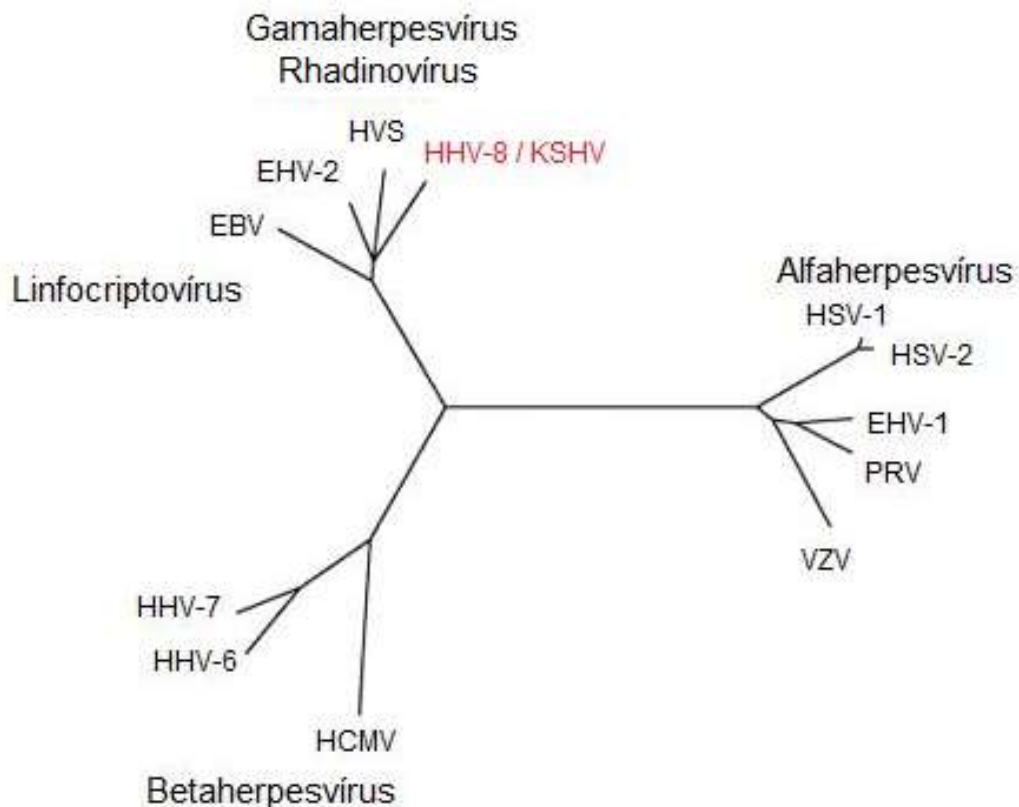


Figura 1 - Árvore filogenética dos Herpesvírus

Herpesvírus 8 humano, ou herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8 ou KSHV), é um membro da subfamília Gama herpesvírus, gênero *Rhadinovirus*. EBV- vírus Epstein Barr, EHV-2 herpesvírus equino tipo 2, HVS herpesvírus saimiri, HSV-1 herpesvírus simples tipo 1, HSV-2 herpesvírus simples tipo 2, EHV-1 herpesvírus equino tipo 1, PRV vírus pseudo- rábico, VZV vírus da varicela-zoster, HCMV citomegalovírus humano, HHV-6 herpesvírus 6 humano, e HHV-7 herpesvírus humano 7. Adaptado por Moore et al.,1996; com permissão para publicação e modificado

1.2 Morfologia e estrutura do HHV-8

O HHV-8 apresenta aspecto morfológico típico dos herpesvírus, como ilustra a Figura 2, ou seja, partículas com diâmetros de, aproximadamente, 100 a 150 nm contendo um envoltório ou envelope lipídico e um núcleo eletrodens central, onde se encontra o ácido nucléico, constituído de DNA de fita dupla, e as proteínas. O

DNA viral é circundado por um capsídeo icosaédrico com 110 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros hexagonais. O capsídeo é, por sua vez, circundado por um envoltório contendo glicoproteínas. O vírion maduro com a glicoproteína possui 140 nm de diâmetro. O espaço entre o envoltório e o capsídeo é denominado tegumento (Renne et al.,1996a; Said et al.,1997; Edelman DC , 2005).

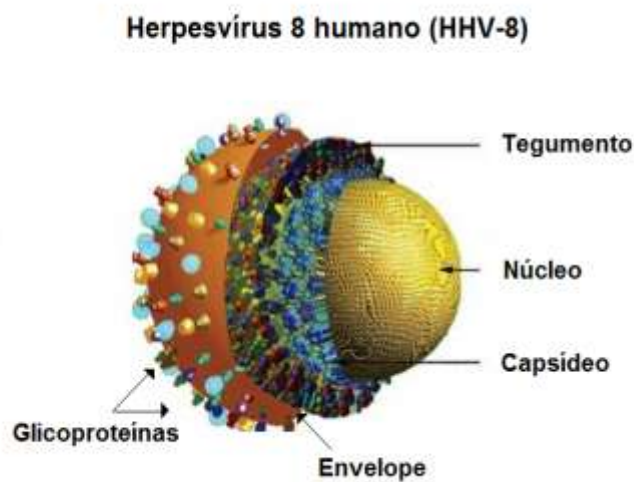


Figura 2 - Partícula viral do HHV-8

FONTE: <http://www.prn.org.ilustration-John/Henderson-2002>, modificado

A estrutura genômica do HHV-8 e o padrão de expressão gênica variam dependendo do seu estado de replicação. Os herpesvírus apresentam dois estados de replicação: latente ou lítico

O genoma do HHV-8 está inteiramente sequenciado, podendo ser analisado na sua forma epissomal extracromossômica, em seu estado de latência, como mostra a Figura 3, e possui, aproximadamente, 150 Kb. As sequências abertas de leitura

(ORFs), homólogas ao HVS, são enumeradas de 1 a 75, e algumas delas homólogas aos genes celulares humanos (Moore e Chang, 2001; Jenner e Boshoff, 2002). Outras ORFs identificadas no genoma do HHV-8 são únicas desse herpesvírus e são designadas com o prefixo K (K1 a K15) e outras designadas com valores decimais ligados ao prefixo K (K4.1, K4.2, K8.1 e K10) (Russo et al.,1996; Jenner e Boshoff, 2002).

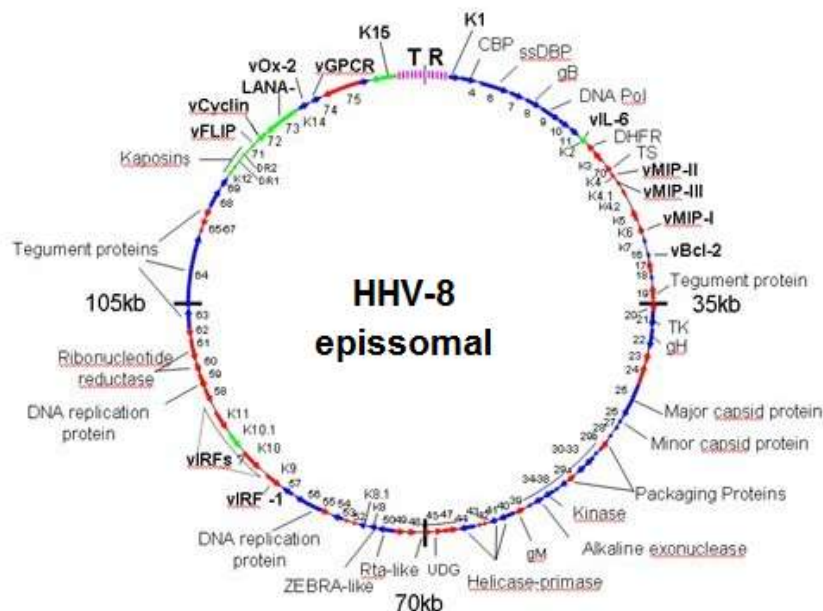


Figura 3 - HHV-8 na sua forma epissomal, com as respectivas ORFs
 FONTE: <http://www.bioscience.org>- Sharp e Boshoff -2000, modificado

O genoma do HHV-8 é dividido em blocos de genes estruturais altamente conservados, associados à replicação e semelhantes aos genes estruturais encontrados em outros herpesvírus. A porção central do genoma é flanqueada por genes que têm pouca ou nenhuma similaridade com outros herpesvírus. O genoma apresenta uma região de cadeia longa codificante (LUR- *long unique region*) altamente conservada, contendo baixas concentrações de G+C (53,5 %). Nessa região, denominada “L DNA”, encontram-se as ORFs. Em ambas as extremidades da “L DNA” estão

localizadas as regiões terminais (TR), contendo sítios reguladores com altas concentrações de G+C (84 %) e denominadas “H DNA” (Russo et al., 1996). Essas incluem uma série de genes celulares homólogos, que se supõem terem sido capturados do genoma humano durante a evolução (Jenner e Boshoff, 2002).

Durante o estado lítico, o genoma do HHV-8 é linear e o genoma viral inteiro é expresso.

1.2.1 Diversidade genética

Estudos epidemiológicos moleculares, ao explorar o gene K1 de alta variabilidade genética, identificam os seis principais subtipos do HHV-8 (nomeados de A-F), ao comparar amostras de sequências nucleotídicas de diferentes regiões geográficas e grupos étnicos (Meng et al., 1999; Biggar et al., 2000; Lacoste et al., 2000; Zong et al., 2002; Whitby et al., 2004; Kazanji et al., 2005; Kajumbula et al., 2006). Tais diferenças podem ser decorrência de migrações humanas, uma vez que o HHV-8 é um vírus humano relativamente antigo que durante a evolução migrou da África juntamente com os primeiros seres humanos (Hayward, 1999; Zong et al., 1999).

Primeiramente, a diversidade genética do HHV-8 foi baseada na pequena região do genoma viral, a ORF26, em pacientes com SK dos Estados Unidos (EUA) e Zaire. Esses resultados são confirmados utilizando a ORF75, originando o primeiro sistema de classificação que identifica três subtipos virais principais, denominados A, B e C (Zong et al., 1997). Porém, esta classificação inicial em uma região conservada do genoma viral, mostra-se inadequada para caracterizar a diversidade

genética do HHV-8 (Poole et al., 1999). Subsequentemente, Zong et al. (1999), ao analisar a região K1, que apresenta maior variabilidade no genoma do HHV-8, denominada de região variável VR1 e VR2, descrevem quatro diferentes subtipos em amostras de biópsias de pacientes com diferentes formas de SK procedentes dos EUA, África Central, Arábia Saudita, Taiwan e Nova Zelândia, tornando mais clara a distribuição geográfica dos subtipos de HHV-8. Assim, o subtipo A presente em amostras de SK de pacientes com aids dos EUA, o subtipo C em pacientes com SK iatrogênico pós-transplante renal da Arábia Saudita, o subtipo B em amostras de SK endêmico de pacientes africanos, e o subtipo D, presentes em três amostras de SK clássico, um paciente de Taiwan e em dois outros procedentes da Nova Zelândia.

O subtipo E, em contrapartida, encontra-se na região Amazônica do Brasil (Biggar et al., 2000; Ishak et al., 2007), no Equador (Whitby et al., 2004) e na Guiana Francesa (Kazanji et al., 2005) em populações indígenas. Em São Paulo, a análise a partir de fragmentos da ORF26 de pacientes com SK-aids em amostras de biópsias parafinadas encontra os subtipos B e C (Caterino-de-Araújo et al., 1998).

Em 2005, Nascimento et al. encontram em 33 pacientes com SK-aids, também de São Paulo, os subtipos A, B e C, incluindo dois pacientes infectados com o subtipo A5, sendo este o primeiro relato dessa ocorrência no país; um deles, procedente de Belém do Pará, é descendente de indígena (Nascimento et al., 2005).

Assim, resumidamente, podemos dizer que os subtipos A e C são predominantes na Europa e nos Estados Unidos, o subtipo B na África, o subtipo D nas ilhas do Pacífico e o subtipo E em indígenas da América do Sul, como ilustra a Figura 4.

Um novo subtipo é identificado em um membro da tribo Bantu Gisu (Uganda-África), que se agrupa aos clones K1-43 Berr da França e de San 2 de Botswana-Ecuador (Lacoste et al., 2000; Whitby et al., 2004; Kajumbula et al., 2006). Tais pesquisadores descrevem como subtipo F.



Figura 4 - Distribuição geográfica dos cinco subtipos predominantes de HHV-8, baseada na variabilidade do gene K1

1.3 Infecção pelo HHV-8

1.3.1 Penetração do HHV-8 na célula hospedeira

A infecção inicia-se com a ligação de glicoproteínas do envelope na superfície da célula hospedeira, sendo que a penetração pode ocorrer por fusão do envelope viral com a membrana plasmática. O HHV-8 infecta células B em divisão durante a mitose. No núcleo da célula hospedeira ocorrem a circularização do genoma viral, replicação e formação do capsídeo (Ablashi et al., 2002). Dessa forma, após a infecção primária, o HHV-8 replica ativamente por meio da maquinaria viral e novas partículas virais são produzidas e liberadas pela lise da célula hospedeira (Lacoste et al., 2004).

1.3.2 Infecção latente pelo HHV-8

O HHV-8, como outros membros da subfamília *Gamaherpesvirinae*, tem capacidade de estabelecer infecção latente após infecção primária. No caso do HHV-8, a latência ocorre predominantemente em linfócitos B e em células endoteliais. Embora o alvo primário da infecção viral por HHV-8 seja os linfócitos B CD19+, outras células mononucleares e fibroblastos são suscetíveis à infecção (Blasig et al., 1997). O HHV-8 expressa sete genes latentes com efeitos modulatórios demonstrados pelo crescimento da célula hospedeira e com participação na patogênese do SK. Em células endoteliais e linfócitos B com infecção persistente, o HHV-8 permanece como uma molécula de

DNA episomal, que expressa somente alguns genes virais, incluindo o LANA-1 e uma pequena proteína de membrana denominada kaposina (K-12) (Boshoff et al., 1995).

1.3.2.1 Antígeno associado à latência (LANA)

Entre os genes virais expressos durante a latência, a proteína LANA-1, codificada pela ORF73, está presente nos corpos intranucleares associados à heterocromatina em quase todas as células infectadas e culturas celulares. A proteína LANA-1 pode ser considerada como um marcador para infecção por HHV-8 (Parravicini et al., 1997; Dupin et al., 1999; Sarid et al., 1999). É uma proteína altamente expressa em todas as formas malignas associadas ao SK (Dupin et al., 1999). Tal proteína é importante para a manutenção do DNA episomal viral durante a latência e modula a expressão de genes celulares e virais. Tem, também, a capacidade de ancorar o DNA episomal em sítios específicos do cromossomo do hospedeiro, possibilitando, assim, sua transmissão para as células filhas durante o processo de replicação celular (Ballestas et al., 1999). Portanto, trata-se de uma proteína multifuncional essencial. A proteína LANA é igualmente importante para a expressão de genes regulatórios em células infectadas por HHV-8 (Verma e Robertson, 2003; Ganem, 2006).

1.3.2.2 Antígeno associado ao ciclo lítico

A replicação lítica, por sua vez, pode ocorrer naturalmente ou ser induzida por agentes químicos *in vitro*, como o acetato de o-tetradecanoil forbol (TPA), que ativa a replicação viral e a produção de diferentes antígenos virais citoplasmáticos

(Kedes et al., 1996). Entre os genes virais expressos durante a replicação lítica, a ORF-K1 codifica uma glicoproteína transmembrana 46-kDa altamente variável, semelhante à família de receptores de imunoglobulina, e é usada para a subtipagem de cepas virais de HHV-8. O gene lítico tardio K8.1 codifica duas glicoproteínas imunogênicas (gp K8.1A e gp K8.1B). A gp K8.1A contém uma região de 167aa idêntica à gp K8.1B e uma região única de 61aa (gp 35-37) que pela técnica de *Western blot*, é considerada o polipeptídeo mais frequente e intensamente reconhecido por anticorpos presentes no soro de pacientes com SK em antígenos de linhagem celular proveniente de linfoma de células B de cavidade, infectada de forma latente pelo HHV-8, (células BCBL) (Chandran et al., 1998b; Nicholas et al., 1998; Ganem, 2006). A ORF26 codifica a proteína do capsídeo de 34-kDa e a ORF65 codifica o gene da proteína menor do capsídeo, altamente antigênica, expressa, principalmente, durante a fase lítica da replicação viral em células BCBL (Lin et al., 1997).

1.4 Diagnóstico da infecção pelo HHV-8

Na ausência de um sistema de cultura celular para isolamento do HHV-8 (Bubman e Cesarman, 2003), o diagnóstico dessa infecção tem sido realizado utilizando-se ensaios sorológicos e técnicas moleculares. O primeiro método visa detectar anticorpos contra os antígenos de HHV-8 produzidos durante as fases latentes e líticas do ciclo de vida viral enquanto o segundo é utilizado para a detecção do genoma viral (Whitby et al., 1995; Pellett et al., 1999; Engels et al., 2000; Gambus et al., 2001).

1.4.1 Métodos para detecção de anticorpos

A partir do estabelecimento de linhagens celulares BCBL (Renne et al., 1996b), muitos ensaios têm sido considerados úteis para o diagnóstico desta infecção viral, desde os testes de imunofluorescência indireta (IFA), empregando antígenos da fase latente e lítica do vírus, até os ensaios imunoenzimáticos como ELISA e *Western blot*. No entanto, dependendo do tipo de antígeno e ensaio empregado, tais testes sorológicos exibem graus diferentes de sensibilidade e especificidade (Rabkin et al., 1998). Além disso, uma avaliação comparativa de testes sorológicos para HHV-8 é dificultada pela falta de um padrão ouro (*gold standard*).

Vários estudos têm utilizado como controle negativo soro de indivíduos com baixo risco de infecção, como por exemplo, heterossexuais com poucos parceiros, mulheres virgens, crianças e doadores de sangue saudáveis de áreas de baixa prevalência para infecção por HHV-8. Por outro lado, soros de pacientes com SK têm sido utilizados como controle positivo (Martin e Osmond, 2000; Spira et al., 2000; Pellett et al., 2003).

O ensaio de imunofluorescência, preparado em linhagens celulares BCBL para detecção de anticorpos contra antígeno nuclear de latência, (IFA-LANA) é considerado altamente específico, sendo também considerado um teste sorológico de referência para detectar a infecção por HHV-8 (Martin e Osmond, 2000; Nascimento et al., 2007). Esse teste resulta negativo em crianças (Chandran et al., 1998a; Souza et al., 2004), apresentando baixas taxas de positividade para doadores de sangue dos Estados Unidos, parte da Europa e no Brasil (Kedes et al., 1996; Martin et al., 1998

Rezza et al., 1998; Caterino-de-Araujo et al., 1999; Enbom et al., 2000; Zago et al., 2000; Nascimento et al., 2008).

Em pacientes com aids e SK, a sororreatividade aos antígenos latentes (LANA) depende do número de células CD4+, sendo menor naqueles indivíduos com imunodepressão mais acentuada (Souza et al., 2007).

Entretanto, tal ensaio exhibe positividade mais baixa quando comparado aos testes baseados em antígenos líticos (Camera Pierrotti et al., 2000). Os antígenos líticos são preparados pela indução do ciclo lítico do vírus nas linhagens celulares BCBL-1 com TPA e, podem ser detectados por IFA, por exibir um padrão de fluorescência citoplasmática, diferente do padrão pontilhado nuclear observado com os antígenos nucleares de fase latente (Lennette et al., 1996).

1.4.2 Métodos moleculares

Métodos de detecção do ácido nucleico desempenham papel importante no diagnóstico e pesquisas virais, sendo essenciais para a obtenção de informações quando a cultura e identificação virais não são possíveis. A reação em cadeia por polimerase (PCR) é particularmente útil para demonstrar a associação causal entre o HHV-8 e o SK, linfoma de efusão primária (PEL) e outras doenças associadas ao HHV-8, elucidar a forma de transmissão do HHV-8 e predizer o desenvolvimento de SK em indivíduos soropositivos para infecção por HIV (Tedeschi et al., 2002).

Os métodos moleculares permitem a detecção direta do DNA viral, com alto grau de sensibilidade, a partir de diferentes amostras biológicas, tais como fragmentos de biópsias, células mononucleares do sangue periférico e saliva.

Na detecção do DNA do HHV-8, *primers* que amplificam diferentes regiões do genoma viral têm sido utilizados. Uma das reações mais frequentemente empregadas amplifica um fragmento de 233 pares de bases (bp) da ORF26 (designado KS330₂₃₃), originalmente descrita por Chang et al., (1994). Os protocolos para a detecção do DNA do HHV-8, geralmente, empregam a técnica de *nested* PCR, baseados na reamplificação de produtos de PCR, apresentando maior sensibilidade e especificidade.

1.5 Epidemiologia do SK e da infecção pelo HHV-8

1.5.1 Epidemiologia do SK

A epidemia da aids altera dramaticamente a epidemiologia do SK no mundo inteiro. Nos EUA e no norte da Europa, o SK passa a ocorrer mais frequentemente em HSH infectados pelo HIV e, na região central do Saara, torna-se rapidamente a neoplasia mais comum e o principal problema de saúde pública (Whitby et al.,1995; Whitby et al.,1998; Sitas e Newton, 2001).

Sabe-se que vários fatores como idade, sexo, etnia, status imunológico, predisposição genética e meio ambiente estão relacionados com a epidemiologia da distribuição do SK no mundo (Freitas et al., 2002; Plancoulaine et al., 2002; Newton et al., 2003; Martro et al., 2004; Souza et al., 2004; Whitby et al., 2004; Whitby et al., 2006; He et al., 2007). Estudos epidemiológicos têm mostrado que a incidência da doença difere consideravelmente entre grupos populacionais. Além disso, as diferenças geográficas na incidência do SK clássico e de aids-SK, de acordo com os

diferentes grupos de risco do HIV, podem ser, parcialmente, explicadas pelas diferenças na prevalência da infecção por HHV-8 que é também geograficamente heterogênea (Tanzi et al., 2005; Whitby et al., 2006). Um exemplo dessa diferença pode ser observado na Itália, onde a incidência de SK é mais alta na região sul quando comparada ao norte do país (Angeloni et al., 1998; Calabrò et al., 1998).

O SK é reconhecido como um câncer importante tanto em crianças do sexo masculino quanto feminino na África mesmo antes da epidemia da aids e é agora um dos principais cânceres em crianças com HIV (Mayama et al., 1998).

Nos Estados Unidos e no norte da Europa, o SK é raramente visto em pacientes que adquiriram HIV por exposição a hemocomponentes ou a relações heterossexuais, mas é comum em HSH (Whitby et al., 2006).

Em indígenas do Brasil, Equador e Guiana Francesa, não há registros de casos de SK, embora a prevalência de infecção pelo HHV-8 seja alta. Possivelmente devido à falta de informações precisas, em virtude do acesso limitado a serviços de saúde e da baixa expectativa de vida dessas populações (Biggar et al., 2000; Kazanji et al., 2005; Whitby et al., 2006; Ishak et al., 2007). Porém, em 2004, Mohanna et al. descrevem o primeiro caso de HHV-8 encontrado em lesões de SK por técnica de imunohistoquímica em um paciente indígena de Quechua, no Peru (Mohanna et al., 2005). Dessa forma, ainda não sabemos como ocorre a infecção primária pelo HHV-8, ao contrário daquela causada por outros herpesvírus humanos.

No contexto da epidemia da aids nos EUA e Europa ocidental, a transmissão do HHV-8 parece ser especialmente sexual, porém em áreas de infecção endêmica, ela pode ser não sexual. Sabe-se apenas que vários cofatores estão associados ao

desenvolvimento do SK e que a maioria das infecções primárias parece ser assintomática (Ablashi et al., 2002).

1.5.2 Epidemiologia da infecção pelo HHV-8

1.5.2.1 Prevalência

Tanto os métodos imunológicos de primeira geração para detecção de anticorpos IFA-LANA e IFA-lítico, quanto os de segunda geração, como *Western blot* e ELISA, com antígenos de vírus total, recombinantes e peptídeos sintéticos são desenvolvidos para determinar a prevalência da infecção pelo vírus na população geral, correlacionar a presença de anticorpos com o diagnóstico de SK, além de pesquisar possíveis associações deste vírus com outras doenças (Chatlynne e Ablashi, 1999).

Os estudos de soroprevalência sugerem que o HHV-8 não é um vírus de distribuição universal na população, como a maioria dos herpesvírus humanos (Bigoni et al., 1996; Marchioli et al., 1996; Howard et al., 1997; Chatlynne e Ablashi, 1999; Ablashi et al., 2002). Além disso, os estudos epidemiológicos e clínicos mostram que em indivíduos saudáveis, há um controle imunológico da infecção pelo HHV-8 (Boshoff e Weiss, 2001).

Anticorpos contra o vírus estão presentes em praticamente 100% dos casos com SK, existindo consenso de que as taxas de soroprevalência de infecção por HHV-8 estão aumentadas em grupos de maior risco para desenvolver o sarcoma do que na população geral (Gao et al., 1996; Kedes et al., 1996; Lennette et al., 1996; Souza et al., 2004). Isto pode ser observado, por exemplo, em indivíduos idosos da

região do Mediterrâneo, indivíduos infectados pelo HIV, pacientes submetidos a tratamento prolongado com corticosteróides e receptores de transplantes de órgãos. Nos casos de SK, nos quais os títulos de anticorpos são acompanhados sequencialmente antes da identificação clínica de lesões de SK e após seu aparecimento, detecta-se que os títulos de anticorpos aumentam com a progressão da doença (Chatlynne e Ablashi, 1999).

A população residente ao sul da Itália, Sardenha e Sicília, apresenta uma soroprevalência de infecção pelo HHV-8 em torno de 30% com maior ocorrência de SK, quando comparadas com os 10% de prevalência observada no norte da Itália (Calabrò et al., 1998). Angeloni et al., (1998) em estudo de prevalência interfamílias da Sardenha também encontra taxas muito semelhantes entre indivíduos com SK clássico e seus parentes, taxas essas consideravelmente mais altas do que nos indivíduos da população geral.

Desde o início da epidemia da aids até a introdução da HAART, a incidência de SK aumentou muito e, por essa razão, a maioria dos estudos se concentraram em indivíduos infectados por HIV e HSH. Quando comparados à população geral, tais indivíduos apresentaram uma taxa de soroprevalência mais alta, e maior frequência de SK nos EUA e Europa (16% a 48%) (Simpson et al., 1996; Regamey et al., 1998; Preiser et al., 2001). Os estudos descrevem que aproximadamente 50% dos HSH infectados pelo HIV sem SK apresentam anticorpos para HHV-8, sendo a prevalência de 20% a 38% (Martin et al., 1998; Ablashi et al., 1999; O'Brien et al., 1999; Atkinson et al., 2003). A prevalência de anticorpos de HHV-8 varia de 30% a 60% na população africana adulta com altas taxas de SK (Olsen et al., 1998) e, também, em crianças sem SK (Mayama et al., 1998; Sitas et al., 1999).

O estudo de Sosa et al. (2001) relata que 17,4% dos indivíduos HIV positivos e usuários de drogas injetáveis na Argentina são soropositivos, enquanto na Itália, a prevalência registrada é de 8% (LANA) e 49% (lítico) (Rezza et al., 1998). No Japão a prevalência de 9,8% a 11,6% nos grupos HIV é considerada alta (Fujii et al., 1999).

Muitos estudos realizados na população geral indicam que a prevalência de anticorpos para HHV-8 tem uma grande variabilidade nas diferentes áreas geográficas do mundo. Na Ásia, a taxa de soropositividade na população geral é de 1,4% no Japão; 19,2% em indivíduos de 21-40 anos de Taiwan; na região de Xinjiang uma província da China a taxa de 46,6% é encontrada em indivíduos sem SK, porém com outras patologias. (Huang et al., 2000; Dilnur et al., 2001; Satoh et al., 2001). Na América do Norte registra-se prevalência de 0 a 8,6% (Gao et al., 1996; Martin et al., 1998; Engels et al., 2002) e na Europa de 12% a 13% (Engels et al., 2000; Perna et al., 2000).

Na Europa, a taxa de soroprevalência em doadores de sangue da Alemanha é semelhante àquela encontrada nos países do Leste Europeu em torno de 3% (Preiser et al., 2001). Entretanto, no sul da Itália, 24,1% dos doadores de sangue apresentam anticorpos para o HHV-8 (Calabrò et al., 1998) e na Espanha a prevalência é de 6,5% semelhante àquela encontrada no norte da Itália (Gambus et al., 2001). Estudos em doadores de sangue nos EUA registram desde baixas prevalências, com taxas entre 0% a 13% (Gao et al., 1996; Simpson et al., 1996; Ablashi et al., 1999; Chatlynne e Ablashi, 1999; Juhasz et al., 2001), até mais altas entre 15%-23% no Texas (Baillargeon et al., 2001; Hudnall et al., 2003).

As taxas de soroprevalência mais altas são relatadas em algumas regiões da África como Egito, Uganda e Camarões, sendo as mesmas superiores a 50%, tanto em adultos quanto em crianças. Observam-se taxas de soroprevalência de 47% em adolescentes entre 14 e 19 anos, e nota-se que essas aumentam com a idade, sem distinção de sexo (Ziegler e Katongole-Mbidde, 1996; Mayama et al., 1998; Olsen et al., 1998; Ablashi et al., 1999; Sitas et al., 1999; Rezza et al., 2000; Serraino et al., 2001). Além disso, tal taxa parece aumentar ao longo da infância (Gessain et al., 1999).

Ainda que a soroprevalência de HHV-8 não possa ser facilmente comparada entre diferentes estudos devido às variações entre os testes laboratoriais utilizados (Rabkin et al., 1998; Engels et al., 2000), algumas diferenças podem ser decorrentes de fatores socioeconômicos ou ambientais relacionados com o acesso à água ou a hábitos que visem compensar a grave falta desta. A soropositividade ao HHV-8 entre crianças de Uganda está associada à condição materna em relação ao HHV-8, à condição socioeconômica mais baixa e ao uso de água obtida a partir de fontes superficiais. O uso de tais fontes de água está associado a práticas precárias de higiene, que aumentam a transmissão de HHV-8 nas residências expostas a tal situação (Mbulaiteye et al., 2005).

Entre os países da América Latina, a soroprevalência em doadores de sangue por IFA-lítico varia de um país para outro. Enquanto no Peru é de 56,25% (Mohanna et al., 2007), na Argentina e no Chile, na cidade de Santiago, a taxa encontrada é de 4% e 3%, respectivamente (Pérez et al., 2004).

Whitby et al. (2004) relatam a soroprevalência do HHV-8 em duas tribos indígenas do Equador por meio de três diferentes testes sorológicos. Na tribo

Huaorani, observa-se alta prevalência (100%) por IFA-LANA, porém na tribo Siona, uma prevalência mais baixa (24%).

Em índios da Guiana Francesa, Kazanji et al., (2005) detectam soroprevalência total de 23,3% por IFA-lítico. Nesse estudo observa-se que índios residentes em áreas remotas apresentam maior prevalência, quando comparados àqueles da região costeira.

No Brasil, a infecção pelo HHV-8 segue um perfil de distribuição semelhante ao registrado na Europa e EUA, com baixa prevalência do vírus na população geral. Entretanto, alguns estudos sugerem que a soroprevalência pode variar de acordo com a região e a população estudada. Vários trabalhos detectam baixa soroprevalência de infecção pelo HHV-8 (2,4 - 7,4%) na região Sudeste, entre doadores de sangue e em adultos, adolescentes e crianças da população geral de várias cidades do estado de São Paulo (Caterino-de-Araújo et al., 1999; Zago et al., 2000; Perez et al., 2004; Souza et al., 2004; Cunha et al., 2005; Nascimento et al., 2008). Freitas et al. (2002), por outro lado, detectam soroprevalência total de 16% entre indivíduos saudáveis, incluindo crianças e adultos de área urbana de Belém do Pará.

Na população indígena brasileira, no primeiro estudo realizado, relata-se uma soroprevalência total de 53% de infecção pelo HHV-8 em diversas tribos indígenas da região Norte do país e inclusive nas crianças menores de 10 anos (41%), caracterizando tal população como endêmica para HHV-8, como demonstra Biggar et al., em 2000.

O estudo de Cunha et al., em 2005, também detecta alta soroprevalência de infecção pelo HHV-8 em duas tribos indígenas da região Amazônica brasileira, a

população total apresenta taxa de 56,8% e as crianças acima de 2 anos de idade, prevalência de 44%.

Ishak et al. (2007) também encontram prevalência de 29,9% em quatro populações indígenas da Amazônia brasileira.

Sendo assim, os dados confirmam a hiperendemicidade da infecção pelo HHV-8 nas populações indígenas da região Amazônica brasileira. A Figura 5 apresenta a soroprevalência do HHV-8 nos países da América do Sul.



Figura 5 - Distribuição da soroprevalência do HHV-8 na América do Sul
FONTE: International Journal of Infectious Diseases. 2005;9:244- modificado

1.5.2.2 Modo de transmissão

Desde a descoberta da infecção pelo HHV-8, apesar dos inúmeros estudos realizados e desenvolvidos, abordando aspectos genéticos e moleculares do vírus, para o nosso conhecimento, a identificação do exato modo de transmissão desse vírus ainda permanece indefinida.

A infecção pelo HHV-8 é restrita à população humana e todos os casos disponíveis resultam de transmissão inter-humana (Gnann et al., 2000), sendo a presença do HHV-8 uma condição necessária, mas insuficiente para causar o SK (Mbulaiteye et al., 2008).

Várias vias podem ser aventadas para a transmissão do HHV-8 e como tal vírus é encontrado em vários tecidos e fluídos corpóreos, múltiplas fontes de infecção são sugeridas: sangue, transplantes de órgãos, fezes, secreções vaginais e saliva. Contudo, as vias de transmissão parecem diferir, de acordo com fatores geográficos, socioeconômicos e comportamentais.

Em países industrializados do mundo ocidental, o HHV-8 parece ser transmitido, principalmente, por contato sexual (Martin et al., 1998) e sua prevalência é baixa em crianças (Blauvelt et al., 1997). Entretanto, vários estudos sugerem que, em países em desenvolvimento, a infecção possa ser adquirida precocemente por meio de outras vias, como por exemplo, mediante contato com fluídos corpóreos contendo o vírus, tais como secreções e saliva (Blackbourn et al., 1998).

Os estudos soropidemiológicos sugerem, portanto, que o HHV-8 é transmitido por duas vias principais: a sexual e a não sexual. A transmissão sexual

seria a via mais comum de infecção em regiões de baixa prevalência e a via não sexual, nas regiões onde a taxa de infecção para o HHV-8 é alta.

Transmissão sexual

O aumento significativo na taxa de SK, a partir do advento da aids, sugere a participação de um agente infeccioso na sua etiologia. Antes mesmo da descoberta do HHV-8 em 1994, epidemiologistas identificam o histórico de doenças sexualmente transmissíveis e o número de parceiros sexuais como fatores de risco para o desenvolvimento de SK associado à aids (Gnann et al., 2000). O estudo de Beral et al., investiga os fatores associados ao SK entre os primeiros casos de aids notificados nos EUA, observando que o risco para SK é, pelo menos, 20.000 vezes maior entre os pacientes com aids, em relação à população geral e 300 vezes maior entre os pacientes com aids, em relação a outras populações de pacientes imunocomprometidos. Tais achados levam os pesquisadores à conclusão de que o SK, em indivíduos com aids, pode ser causado por um agente infeccioso não identificado, transmitido, principalmente, por contato sexual (Beral et al., 1990).

Os estudos realizados desde a descoberta do vírus, como os de Gao et al. (1996), Kedes et al. (1996) e Grulich et al. (1997), continuam dando suporte à hipótese de que a transmissão do HHV-8 está ligada à atividade sexual.

Com o desenvolvimento de ensaios sorológicos para HHV-8, Blackbourn et al. (1999) demonstram correlação entre o número de parceiros sexuais, provável infecção por HHV-8 e o risco de desenvolvimento de SK.

Assim, nos estudos soroepidemiológicos o consenso é de que a transmissão do HHV-8 é sexual (Melbye et al., 1998; Dukers e Rezza, 2003). Estudos sobre os fatores

de risco em HSH demonstram associação entre a infecção pelo HHV-8 e marcadores de atividade sexual, inclusive o número de parceiros, práticas não seguras de sexo com parceiros HIV positivos, com SK e marcadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e também poderia estar relacionada às práticas sexuais específicas como contato oroanal (Martin et al., 1998; Smith et al., 1999; Tedeschi et al., 2000; Grulich et al., 2005; Martro et al., 2006).

As evidências para a transmissão de HHV-8 entre heterossexuais são menos convincentes. No Reino Unido e nos Estados Unidos, o HHV-8 é mais comum entre pacientes ambulatoriais de clínicas de doenças sexualmente transmissíveis do que entre doadores de sangue (Kedes et al., 1996; Simpson et al., 1996) e alguns grupos registram a associação entre infecção por HHV-8 e comportamentos sexuais de risco (Tedeschi et al., 2000; Cannon et al., 2001; Greenblatt et al., 2001). Como relata o estudo de Smith, realizado em indivíduos heterossexuais, para que a transmissão ocorra, é necessária exposição sexual frequente com um número elevado de parceiros ou com associação de alguma doença sexualmente transmissível (Smith et al., 1999). Dessa forma, o estudo de Eltom et al. (2002), realizado na Nigéria com adultos de alto e baixo risco para infecção por HIV, relata que parte dos indivíduos positivos para HHV-8 apresenta uma doença sexualmente transmissível, enquanto a pesquisa de Lavreys et al. (2003), demonstra alta soroprevalência para HHV-8 associada à infecção por sífilis e gonorréia. Já o estudo realizado por Klaskala et al. (2005), registra que a presença de verrugas genitais, em mulheres da Zâmbia, é um forte preditor de soropositividade para HHV-8. A associação de infecção por HHV-8 com verrugas genitais e coinfeção com HIV sugerem a possibilidade de transmissão heterossexual do HHV-8 (Klaskala et al., 2005).

Em estudo realizado por Souza et al. (2004) com um grupo de pacientes sob risco de doenças sexualmente transmissíveis, as taxas observadas de prevalência para os anticorpos de HHV-8 são notadamente mais elevadas, em relação ao grupo sem antecedentes de DST, variando entre 32,6%, no grupo de HSH, e 39,2%, no grupo de pacientes com aids sem SK, e 2,6% no grupo sem fatores de risco para DST (Souza et al., 2004).

Nos estudos realizados com amostras cervicovaginais, o DNA do HHV-8 é detectado em um número muito pequeno de mulheres com e sem HIV e soropositivas para o HHV-8. Mesmo com esta pequena amostragem, as autoras sugerem que a transmissão ocorre por via sexual (Calabrò et al., 1999; Whitby et al., 1995). Em outro estudo realizado em pacientes com SK de Zimbábue, 28% e 37% das amostras cervicais e vaginais apresentam o DNA do HHV-8, porém em nenhuma das mulheres sem SK, mesmo estas sendo soropositivas para HHV-8 (Lampinen et al., 2000).

A transmissão via sêmen embora possível, parece contribuir pouco para a endemicidade do HHV-8 (Teo CG, 2006). Os registros da presença do vírus em secreção genital masculina são conflitantes (Blackbourn et al., 1999). Por um lado existem relatos de detecção do HHV-8 no sêmen (91%) e tecidos prostáticos (44%) de doadores italianos (Monini et al., 1996) e em material obtido de biópsia prostática de homens HIV positivos, com e sem SK (Staskus et al., 1997; Diamond et al., 2001). Por outro lado, estudos realizados na América do Norte e no Reino Unido descrevem que o HHV-8 pode ser detectado intermitentemente no sêmen de pacientes com SK e, às vezes, em pacientes HIV-positivos sem SK, mas raramente em sêmen de doadores de sangue (Lin et al., 1995; Howard et al., 1997). Outros pesquisadores mostram baixa taxa de excreção do HHV-8 no sêmen, tanto de

indivíduos HIV-positivos quanto de indivíduos HIV-negativos (Whitby et al., 1995; Howard et al., 1997; Pauk et al., 2000).

Transmissão sanguínea

Diferentemente do HIV, o HHV-8 não parece ser facilmente transmitido pelo sangue (Beral et al., 1990). Isto é um tanto quanto surpreendente, dado que o vírus é detectado nos linfócitos circulantes de 30 a 50% dos pacientes com SK (Whitby et al., 1995; Engels et al., 1999; Camera Pierrotti et al., 2000; Cannon et al., 2001) e, em menor proporção, em pacientes infectados pelo HIV sem SK (Engels et al., 2003).

O estudo de Blackbourn et al. (1997) demonstra em células mononucleares periféricas de um doador de sangue saudável, resultados repetidamente positivos para partículas infecciosas do HHV-8, em amostras sequenciais de sangue.

A análise em doadores de sangue do centro de transfusões sanguíneas em Bangui, capital da República Centro Africana, relata PCR positiva para o HHV-8 em células mononucleares do sangue periférico de 20% dos doadores (Beléc et al., 1998). Enbom et al. (2002) encontram DNA do HHV-8 no soro de doadores de sangue na Tanzânia por meio da técnica de PCR em tempo real.

Por outro lado, nos EUA um estudo multicêntrico, envolvendo amostras de plasma de doadores de sangue, detecta anticorpos anti-HHV-8, porém nenhuma amostra é positiva para o DNA do vírus (Pellett et al., 2003). Na Itália, onde a soroprevalência é relativamente alta entre doadores de sangue, há poucas evidências de doença por HHV-8 entre os receptores (Whitby et al., 1998). Além disso, em grupos de usuários de drogas injetáveis ou hemofílicos, de maior risco à exposição a

vírus transmitidos pelo sangue, a soroprevalência de HHV-8 é mais baixa do que entre HSH (Beral et al., 1990). A infecção pelo HHV-8 entre usuários de drogas injetáveis sugere que a transmissão possa ocorrer por partilharem a mesma seringa, mas em taxas mais baixas do que outros vírus, tais como o vírus da hepatite C. (Atkinson et al., 2003). Portanto, é improvável que o sangue desempenhe um papel importante na cadeia epidemiológica de transmissão, tanto em regiões endêmicas como em regiões não endêmicas para SK (Teo CG, 2006).

Transmissão por transplantes de órgãos

A incidência de SK em receptores de transplante é mais alta do que na população geral. Estima-se que a mesma seja de 0,4% a 6% em receptores de transplante de órgão sólido. A terapia imunossupressora utilizada em receptores de transplante favorece o desenvolvimento do SK, e sua incidência nos pacientes transplantados é de 400 a 500 vezes mais alta do que na população geral. A maioria das infecções ocorre pós-transplante de células precursoras infectadas por HHV-8 junto com o órgão transplantado e, subsequentemente, ocorre o desenvolvimento de SK (Luppi et al, 2003). Outra hipótese é que talvez haja a reativação do vírus já presente antes do transplante (Moore PS, 2003).

Transmissão por saliva

Por outro lado, nos estudos que avaliam a transmissão do HHV-8 por via sexual, há evidências que a saliva, provavelmente, desempenha um papel importante na disseminação viral. A alta prevalência da infecção antes da adolescência em áreas

endêmicas e a maior frequência da detecção do HHV-8 na saliva, em comparação ao sêmen, fornece evidências indiretas de uma transmissão não sexual (Pauk et al., 2000). Tais fatos sugerem uma disseminação viral por meio de contato salivar envolvida na transmissão infantil em países endêmicos (Cattani et al., 1999). Sexo oral e número de parceiros sexuais parecem aumentar a probabilidade de transmissão, apontando a saliva como um fluido corpóreo altamente infectado (Casper et al., 2002).

Os indicadores de que o HHV-8 possa ter tropismo pela mucosa oral surgiram a partir de um estudo realizado por Di Albert et al. (1997), revelando a frequente amplificação por PCR do genoma viral em tecidos obtidos por biópsias orais de pacientes infectados por HIV (Di Alberti et al., 1997).

Os achados de Duus et al. (2004), fornecem evidências contundentes de que o HHV-8 é um patógeno oportunista que se replica nas células epiteliais orais. Os pesquisadores detectam o DNA do HHV-8 de amostras da orofaringe de indivíduos imunocompetentes saudáveis, inoculadas em células originárias de tecido gengival humano. Para a confirmação, utilizam-se técnicas de PCR em tempo real de diferentes regiões do genoma viral (ORF26, ORF73 e ORF-K8.1) e ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica, concluindo que o HHV-8 faz parte dos herpesvírus orais, assim como o CMV e o EBV. Por outro lado, o fato de o indivíduo saudável apresentar e excretar o vírus na cavidade oral não implica, necessariamente, no desenvolvimento de SK (Teo CG, 2006).

No estudo realizado em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV em São Paulo, Machado et al. (2005) demonstram que a infecção pelo HHV-8 possa ocorrer mais tardiamente na infância.

Koelle et al. (1997) relatam presença de HHV-8 na saliva de 75% de indivíduos HIV positivos com SK, 15% de pacientes HIV sem SK e em nenhuma das amostras controles de doadores de sangue. Vieira et al. (1997) demonstram em amostras de saliva inoculadas em culturas de células 293, que a viabilidade do vírus foi mantida mesmo após treze passagens. Quando essas são tratadas com TPA há um aumento da quantidade de DNA do HHV-8 nas células infectadas, sugerindo não somente que o vírus infeccioso está presente na saliva de indivíduo com história de SK, mas também que o vírus possa ser transmitido por ela (Vieira et al., 1997).

Estudo de LaDuca et al. (1998) pesquisa e quantifica o DNA do HHV-8 em diferentes amostras clínicas, encontrando o vírus na saliva de 37% de pacientes com SK (33.000 cópias/ug), nas células mononucleares de 46% (9.000 cópias/ug), em plasma de 7% (40 cópias/ug), em sêmen de 12% (300 cópias/ug) e em lesões de SK de 92% deles (64.000 cópias/ug). O alto número de cópias de DNA do HHV-8 na saliva demonstra seu potencial como fonte de transmissão do vírus (LaDuca et al., 1998; Cattani et al., 1999).

Os achados de Dukers et al. (2000), indicando a atividade sexual oral como a prática mais significativa associada à infecção por HHV-8, apontam para a saliva como um veículo de transmissão entre HSH. Subsequentemente, Pauk et al. (2000) avaliam, em HSH americanos soropositivos, a presença do vírus em amostras da orofaringe e do trato genital. O número de cópias de DNA do HHV-8 em amostras orais é de duas vezes mais alto do que em outros fluídos, demonstrando que a exposição à saliva deve ser considerada um fator de risco para infecção com HHV-8 (Pauk et al., 2000). A predominância da excreção oral entre HSH é confirmada por outros estudos (Gandhi et al., 2004, Marcelin et al., 2004).

De modo geral, em áreas de alta prevalência de infecção pelo HHV-8, ocorre um aumento linear da soroprevalência antes da puberdade (Andreoni et al., 1999; Plancoulaine et al., 2000), com aumento na fase adulta e associação da soropositividade entre crianças e seus familiares (Mbulaiteye et al., 2003), sugerindo uma via não sexual de transmissão, provavelmente pela saliva (Plancoulaine et al., 2000; Mbulaiteye et al., 2003).

Dados epidemiológicos e laboratoriais confirmam que a alta soroprevalência do HHV-8 em crianças da África e do Mediterrâneo é devida a uma forma de transmissão não sexual. Estudos de soroprevalência em populações da África indicam que a infecção pelo HHV-8 ocorre antes da puberdade, por meio de contato familiar e comunitário (Mayama et al., 1998; Gessain et al., 1999). Fatores ambientais podem igualmente influenciar na disseminação do HHV-8, principalmente em áreas próximas às regiões nas quais predominam higiene precária, nível socioeconômico baixo e fatores ambientais, tais como uma fonte de água em vez de água encanada e tratada (Mbulaiteye et al., 2005).

Estudo com crianças egípcias soropositivas para HHV-8 apresenta sequências de DNA do HHV-8 a partir da saliva em 30% delas, em comparação a 8% em amostras de plasma. Por outro lado, em crianças soronegativas, detecta-se o DNA do HHV-8 na saliva de 12% das amostras, em comparação a 4% no plasma (Andreoni et al., 2002). Um estudo realizado em Maláui, com familiares assintomáticos de pacientes com SK, encontra o DNA do HHV-8 em secreções orais de 27% dos indivíduos estudados, mas não em suas amostras de sangue (Cook et al., 2002). Estudos subsequentes realizados em outras comunidades africanas confirmam taxa relativamente alta de excreção de HHV-8 oral (Brayfield et al., 2004; Mbulaiteye et

al., 2004b, Taylor et al., 2004). Em áreas endêmicas, a transmissão do HHV-8 pode ocorrer de mãe para filho e, entre irmãos, por meio de contato próximo (Andreoni et al., 1999). A transmissão interpessoal do HHV-8 pode ser facilitada por condições residenciais em áreas habitadas por um grande número de pessoas (Mbulaiteye et al., 2004b). Isto também ocorre nos casos das brincadeiras entre as crianças, principalmente irmãos, e, até mesmo, ao compartilhar utensílios domésticos (Mbulaiteye et al., 2003).

Desse modo, diversos estudos similares evidenciam bem a transmissão horizontal, não sexual, seja em Camarões, na África Central (Gessain et al., 1999), na África do Sul (Bourbouli et al., 1998) e em crianças egípcias (Andreoni et al., 1999). Em estudo realizado em Uganda, seis pares de sequências da ORF-K1 são avaliados para verificar se mãe e filho apresentam as mesmas sequências e, assim, definir se ocorre a transmissão materno-infantil. Os resultados demonstram sequências nucleotídicas homólogas em dois dos seis pares, sequências altamente similares em três pares e uma infecção por genótipo diferente. Este estudo, entretanto, devido ao seu desenho (transversal), não é capaz de demonstrar esta via de transmissão (Mbulaiteye et al., 2006).

O estudo de Cattani et al. (2003), avalia em regiões do Mediterrâneo (Itália e Albânia) se a infecção pelo HHV-8 foi adquirida no início da vida e por via não sexual, como na África. Os resultados do estudo relatam um aumento na taxa de positividade com relação à idade. Observa-se uma taxa de 9,7% nas crianças menores de 14 anos, sugerindo que uma rota de transmissão não sexual esteja envolvida na disseminação do HHV-8, enquanto um aumento linear em adultos sugere uma via sexual de transmissão. Entretanto, duas crianças de 4 e 6 meses

apresentaram anticorpos anti-HHV-8, provavelmente de origem materna, e em outra de 10 meses, sugere ter ocorrido infecção perinatal, via de transmissão comumente observada na infecção causada por outros herpesvírus. O padrão epidemiológico da infecção pelo HHV-8 em diferentes regiões do Mediterrâneo sugere que em algumas áreas a transmissão seja, provavelmente, múltipla e contínua (Cattani et al., 2003).

Outro estudo de Chironna et al. (2006), encontra resultados bastante semelhante em populações da Albânia e de Kosovo. Os achados de aumento na soroprevalência de HHV-8 com relação à idade, antes da puberdade, são semelhantes aos encontrados em países endêmicos (Plancoulaine et al., 2000). Os resultados sugerem que a transmissão do HHV-8 também ocorre por meio de uma rota não sexual, por contato intrafamiliar. Além disso, há um aumento da soroprevalência em indivíduos com idade superior a 16 anos, indicando que a atividade sexual possa também participar na transmissão do HHV-8 (Chironna et al., 2006).

Ainda com relação ao papel da saliva na transmissão do HHV-8, Coluzzi et al. (2003) propuseram a hipótese chamada de “*promoter arthropod*”, na qual os autores sugerem que picadas de insetos podem aumentar o risco de infecção em crianças com hipersensibilidade, no caso de suas mães ou cuidadores serem soropositivos e excretando HHV-8 em sua saliva, em regiões nas quais existe o hábito de aplicar saliva para diminuir a irritação. O uso da saliva, quando o objetivo é aliviar as picadas de insetos sugadores de sangue, constitui um hábito ancestral que muitos pesquisadores, hoje em dia, supõem desempenhar papel fundamental na transmissão do HHV-8. Uma consideração importante a esse respeito é que a resposta imunológica local à picada de inseto resulta em reações cutâneas, tais como

inchaço ou coceira, que propiciam a aplicação de saliva contendo HHV-8 (quer seja ao sugar ou esfregar saliva sobre a picada de inseto) e que podem, posteriormente, infeccionar. Tal fato justifica-se por saber-se que o HHV-8 é capaz de infectar vários tipos de células envolvidas no processo inflamatório, como por exemplo, macrófagos, células B e células endoteliais. No entanto, esta teoria ainda é controversa para Mbulaiteye e Biggar (2004a) que acreditam na existência de outros cofatores associados à transmissão salivar.

Na população indígena da Amazônia brasileira, Biggar et al. (2000) relatam soroprevalência de 41% em crianças abaixo de 10 anos. Cunha et al. (2005), também registram prevalência alta de anticorpos anti-HHV-8 de 35% em crianças. Tais achados, segundo estes autores, indicam transmissão não sexual. Os estudos em indígenas, portanto, sugerem transmissão precoce do vírus por via não sexual, contudo, o mecanismo exato de transmissão ainda não é conhecido. Possíveis fatores peculiares à região da Amazônia brasileira, como meio ambiente, ocorrências de artrópodes e hábitos culturais, poderiam contribuir para a transmissão do vírus.

Nesse contexto, o presente estudo foi desenhado visando investigar o modo potencial de transmissão do HHV-8 entre a população indígena da Aldeia Mapuera - PA, que habita uma região remota da Amazônia brasileira.

OBJETIVOS

2 Objetivos

Geral

Estudar a infecção pelo HHV-8 em população indígena e não indígena da Amazônia brasileira, na tentativa de avaliar possíveis modos de transmissão do vírus.

Específicos

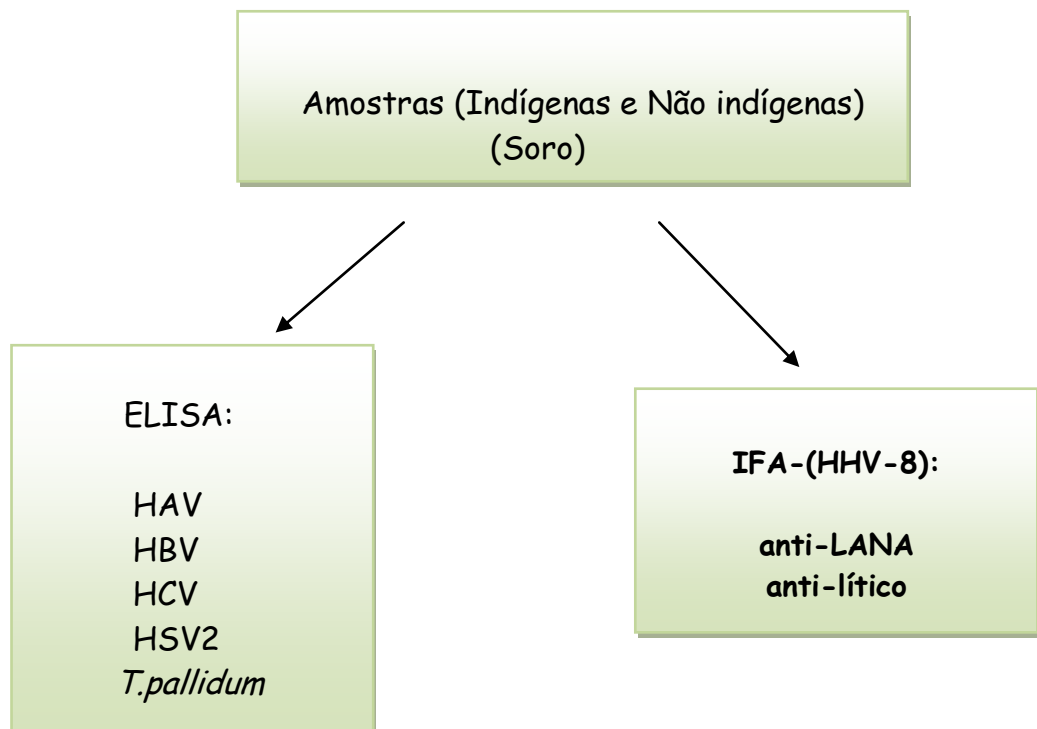
- 1 Estimar a prevalência de anticorpos contra o HHV-8 em índios da Aldeia Mapuera.
- 2 Estimar a prevalência de anticorpos contra o HHV-8 em população não indígena.
- 3 Avaliar a prevalência de excreção salivar do HHV-8 nos indivíduos soropositivos.
- 4 Estimar a prevalência de marcadores da infecção por outros agentes infecciosos que tenham mecanismos de transmissão conhecidos (fecal-oral, sexual e por sangue).
- 5 Realizar a caracterização molecular das amostras de HHV-8.

MÉTODOS

3 Métodos

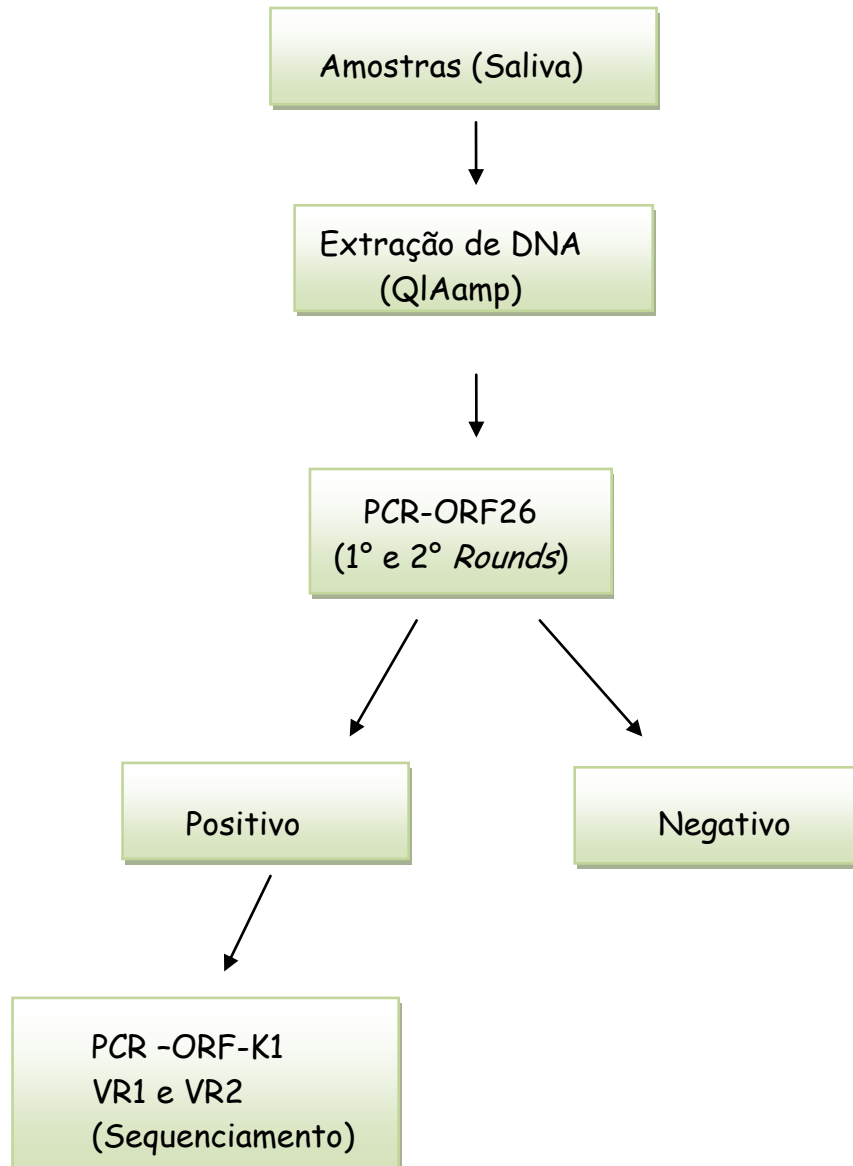
3.1 Fluxogramas metodológicos

(I) Sorologia

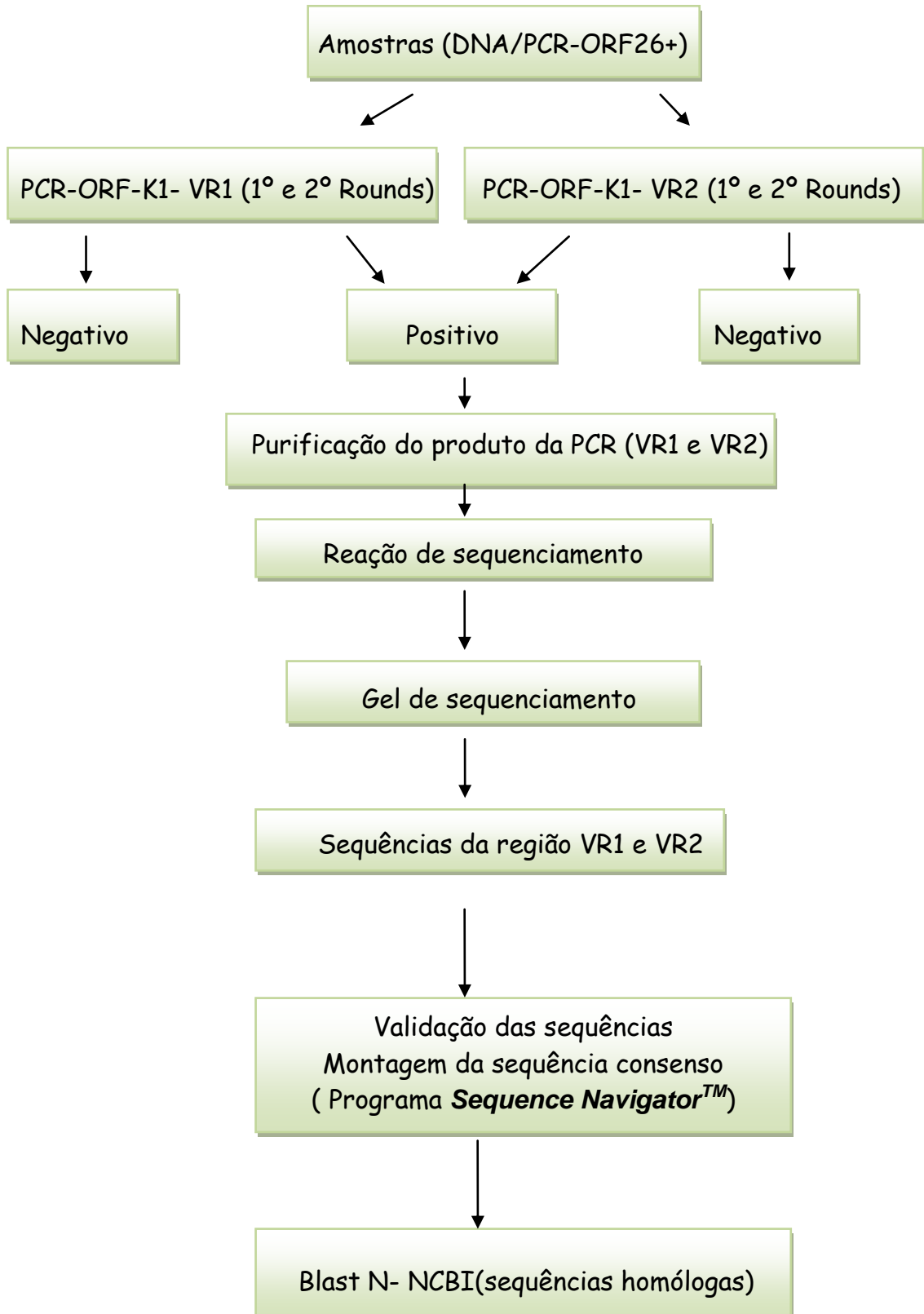


(II) Diagnóstico Molecular

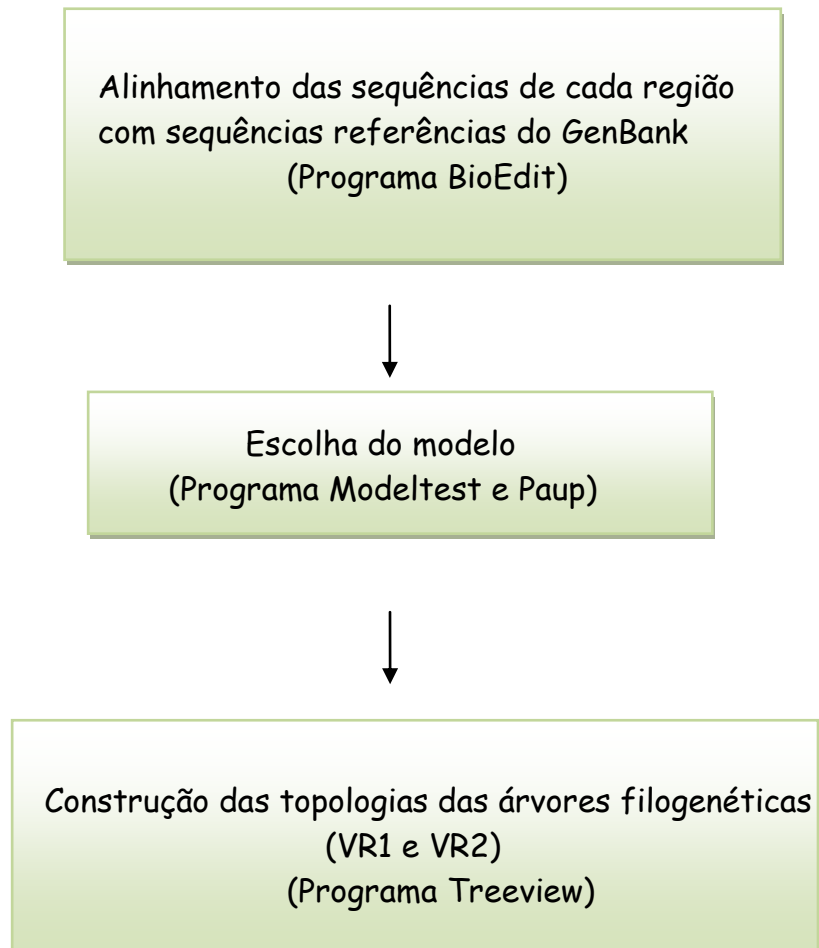
Extração e PCR-ORF26



(III) Sequenciamento



(IV) Análise Filogenética



3.2 Local e populações do estudo

O presente estudo foi realizado em populações indígenas residentes na aldeia Mapuera e em comunidades não indígenas na região do alto Rio Trombetas, ambas situadas no município de Oriximiná, no Oeste do estado do Pará. As populações indígenas estavam distribuídas em 10 aldeias, sendo que oito delas ao longo do Rio Mapuera (Bateria, Ponkurú, Tamiurú, Mapuera, Placa, Inajá, Kuanamarí e Tauaná), somando em torno de 1700 índios. Segundo os dados do último censo indígena (FUNAI 12/00), tais populações estavam distribuídas em várias etnias: Wai-Wai, Xerew, Mawayana, Katwena, Hixkaryana e Tirió. Por razões logísticas, só foram avaliados os índios residentes na Aldeia Mapuera, a maior delas, com aproximadamente 1200 índios distribuídos em aproximadamente 200 casas. A parte central da aldeia era beira-rio e não havia padronização de casas e ruas. A aldeia era atendida por agentes da saúde do município de Oriximiná (enfermeiros e um dentista) e o controle da malária era realizado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA)

Um grupo populacional não indígena etnicamente heterogêneo, na sua maioria, remanescente de quilombolas da comunidade Cachoeira Porteira, vivendo em região próxima à aldeia Mapuera, foi incluído no estudo para avaliar possíveis fatores ambientais eventualmente envolvidos na transmissão do HHV-8. Na comunidade de Cachoeira Porteira residiam, aproximadamente, 50 famílias distribuídas em casas cujas condições são precárias.

As características geográfico-ambientais e os hábitos de deslocamento da população não indígena eram semelhantes àqueles dos indígenas. A Figura 6 ilustra a

localização geográfica das duas populações estudadas. Foram recrutados todos os indivíduos de qualquer idade que concordaram, espontaneamente, em submeter-se à coleta de uma amostra de sangue e uma de saliva. A coleta de amostra das crianças foi feita mediante consentimento dos pais.

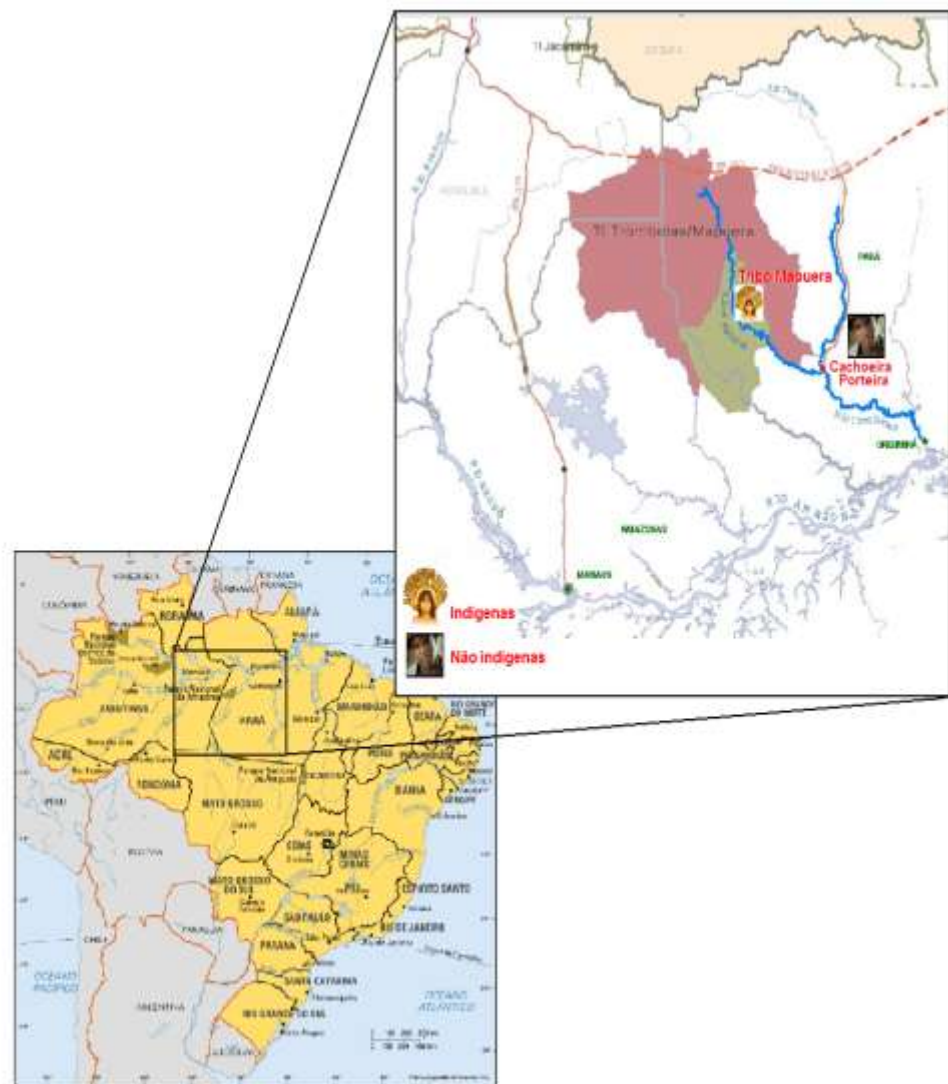


Figura 6 – Localização geográfica das populações estudadas

FONTE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - modificado

3.3 Aspectos éticos

O presente projeto faz parte do estudo intitulado “Prevalência de infecção por herpesvírus sexualmente transmissíveis (HSV-1 e HSV-2) em comunidades ribeirinhas do Rio Trombetas e indígenas da Aldeia Mapuera”, que tem como pesquisador responsável o Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti. O referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), em 20.11.02 (protocolo de pesquisa nº 577/02) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), registro 7043, Processo 25000.151422/2002-43 (Anexo A).

3.4 Delineamento do estudo e amostragem

O presente estudo foi de prevalência e ecológico, uma vez que a unidade de análise foi uma população ou um grupo de pessoas, que geralmente pertencia a uma área definida. Dessa maneira, o presente estudo avaliou a prevalência da infecção pelo HHV-8 na população indígena e não indígena da Amazônia brasileira.

A amostragem é dita de conveniência, uma vez que todos os indivíduos que se prontificaram a participar do estudo foram inclusos na avaliação. Por essa razão, não foi realizado um cálculo *a priori* para estimar o número de indivíduos necessários para o estudo. A população total estimada da tribo estudada foi de 1.200 índios, tendo participado do estudo todo o indivíduo que permitiu a coleta de amostras de sangue e saliva. Com relação à população não indígena, praticamente

foram coletadas amostras de todos os indivíduos pertencentes à comunidade Cachoeira Porteira.

3.5 Coleta de sangue e saliva

A coleta foi realizada em 2003 durante entrada na aldeia Mapuera realizada pela equipe do Programa de Malária e pelos médicos do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP. Em reunião com o cacique da tribo, foi apresentado o projeto e, após sua aprovação, o mesmo foi divulgado para todos os indivíduos que residiam em Mapuera.

As amostras de sangue e saliva foram coletadas de todos os indígenas que concordaram em participar do estudo e compareceram ao posto de coleta, sem seleção de etnia, sexo ou idade. Porém nem todo indivíduo que coletou amostra de sangue coletou amostra de saliva e vice-versa.

Com a população não indígena, de Cachoeira Porteira, foram realizadas reuniões com os líderes da comunidade e agentes de saúde para apresentação do projeto. Após concordância de ambas as partes, o projeto foi divulgado para todos os indivíduos que residiam em Cachoeira Porteira. A coleta de sangue foi realizada no posto de saúde da comunidade.

As amostras de sangue para sorologia foram obtidas por punção venosa (10 ml em tubo seco) e, após separação do coágulo, mantidas congeladas até o envio para o Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP). As amostras de saliva foram obtidas com *swab* de algodão estéril, esfregado gentilmente na mucosa bucal e depois colocado em meio de transporte (3 ml de

solução de Hanks, contendo 50 µg/ml de vancomicina, 500 µg/ml de imipenem e 2 µg/ml de anfotericina B (Fungizon®). O material foi mantido em botijão de nitrogênio líquido e transportado em gelo seco para o Laboratório de Virologia, onde as amostras foram processadas por meio de testes sorológicos e moleculares.

Em 2006, já havíamos realizado os testes sorológicos nas duas populações, e em virtude da entrada de nosso grupo na tribo Mapuera, para o presente estudo foi solicitada apenas a coleta de amostras de saliva dos indivíduos soropositivos para HHV-8 da população não indígena.

3.6 Testes sorológicos

3.6.1 Teste sorológico para o diagnóstico da infecção pelo HHV-8

Foram pesquisados anticorpos contra antígeno nuclear da fase latente (LANA) e da fase lítica do vírus, pela técnica de reação de imunofluorescência indireta.

3.6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFA)

Para a realização da técnica de IFA, os antígenos do HHV-8 foram obtidos a partir de células BCBL-1, uma linhagem celular proveniente de linfoma de células B de cavidade, infectada de forma latente pelo HHV-8, fornecidas gentilmente pelo Dr. Niel Constantine, do *Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore*, EUA.

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

Para a detecção dos anticorpos contra antígeno da fase lítica, as células foram mantidas em meio de cultura contendo 20 ng/ml de acetato de o-tetradecanoil forbol (TPA; Sigma, St. Louis, MO, USA) por 96 horas para indução da transcrição do genoma viral. As células não submetidas ao tratamento com TPA foram utilizadas para detecção de anticorpos anti-antígenos da fase latente (LANA) (Lennette et al., 1996; Pierrotti et al., 2005).

Preparo das lâminas de IFA

As células BCBL-1, tratadas e não com TPA (antígeno), foram lavadas duas vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) por meio de centrifugações a 800 g durante 10 minutos e ressuspensas em PBS, na concentração aproximada de 10 células/ml. A seguir, 10 µl do antígeno foi distribuído em cada área demarcada da lâmina, a qual foi deixada à temperatura ambiente para secagem e, então, fixada em acetona gelada durante 20 minutos. As lâminas preparadas foram armazenadas a -80°C para uso.

Reação de IFA

Após o descongelamento da lâmina, o antígeno foi hidratado, aplicando-se 30 µl de solução de leite desnatado (Molico) a 1 % em cada círculo, e incubando-se durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após aspiração do leite, 25 µl das amostras de soro dos pacientes, diluídas na proporção 1:100 (LANA) e 1:40 (lítico) em solução de leite a 1% foram colocadas na lâmina. A reação antígeno-anticorpo foi processada por incubação

em câmara úmida a temperatura ambiente durante 30 minutos. As lâminas foram, então, lavadas três vezes com PBS, com duração de 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foi adicionado 30 µl do conjugado anti-IgG humano com isotiocianato de fluoresceína (Sigma) diluído a 1:50 em solução de azul de Evans. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após mais três lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 9,2. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência Zeiss com aumento de 400 vezes.

Em todas as lâminas foram colocados controles negativos e positivos para anticorpos anti-HHV-8 e para cada reação foi testado um controle positivo em diluições seriadas de 1:50 a 1:12.500 para verificação da sensibilidade do teste. Como controle negativo foi utilizado soro de indivíduo normal, que repetidamente se mostrou negativo para infecção por HHV-8 em IFA. Como controle positivo foi empregado soro de um paciente com aids e SK com altos títulos de anticorpos contra antígenos da fase latente e lítica do HHV-8, repetidamente reconhecidos pela IFA.

3.6.3 Testes sorológicos para o diagnóstico de outras infecções

Os testes sorológicos para determinação da presença de marcadores de infecções transmitidas mediante diferentes mecanismos foram realizados empregando-se testes comerciais. Para o diagnóstico da hepatite A, utilizou-se o teste Bioelisa HAV (Biokit, Barcelona, Spain), que detecta anticorpos totais contra o VHA. Para detecção de anticorpos IgG contra o VHC empregou-se o teste Ortho HCV 3.0 ELISA; para a determinação de anticorpos contra o antígeno do *core* do vírus da hepatite B foi utilizado o teste Ortho HBc ELISA (ambos da Ortho

Diagnostic, Raritan, New Jersey, USA). Para o diagnóstico sorológico de sífilis e de infecção pelo herpesvírus simplex tipo 2, foram utilizados, respectivamente, Trepanostika ELISA (Biomérieux, Lyon, France) e HerpeSelect ELISA IgG (Focus Technologies, Cypress Hill, CA, USA).

3.7 Diagnóstico molecular

3.7.1 Extração de DNA

Foi utilizado o kit da Qiagen (*mini blood*) para células bucais. Em 200 µl da amostra de *swab* bucal foram adicionados 200 µl de tampão de lise (AL) e 20 µl de proteinase K. Essa mistura foi mantida por 10 min a temperatura de 56°C. Em seguida, foi transferida para a coluna e centrifugada, seguindo-se as instruções do fabricante. No final, a amostra foi eluída com o tampão em volume de 200 µl.

3.7.2 Reação em cadeia por polimerase (PCR)

A detecção do DNA viral presente nas amostras de *swab* bucal utilizou o protocolo de amplificação descrito por Chang et al. (1994), ou seja, uma *nested* PCR utilizando *primers* para amplificação da ORF26 do capsídeo menor do HHV-8 (Camera Pierrotti et al., 2000).

As sequências dos *primers* utilizados na primeira etapa da reação foram:

5' ATA GGG AGC GTA CTG CCG 3'

5' CAT CCT GGT GAT GTC ATC 3'

Na segunda etapa da amplificação, foram utilizados 5 µl do produto da primeira amplificação e *primers* internos, obtendo-se amplificação de fragmentos de DNA com 233 bp:

5' TCC GTG TTG TCT ACG TCC AG 3'

5' AGC CGA AAG GAT TCC ACC AT 3'

A sequência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 50µl, contendo 5 µl da amostra, tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH= 9.0), 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, e 2,5 U de *Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)*.

Ciclos: As condições de amplificação para a primeira e segunda etapa foram as mesmas. Os tubos de reação contendo as amostras e a mistura de reagentes foram submetidos à amplificação em termociclador –*MJ Research-PTC100*- com uma denaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 50 seg. a 94°C para denaturação do DNA, 50 seg. a 58°C para anelamento dos primers e 50 seg. a 72°C para extensão da sequência. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min.

Controle da reação

Foram utilizados, como controle positivo, amostras de DNA extraído de células BCBL-1 e, como controle negativo, água milliQ estéril. A presença de material genômico viável foi avaliada em todas as amostras submetidas a *nested PCR* pela amplificação do gene da beta globina humana (Saiki et al., 1985).

Para prevenir a contaminação da *nested* PCR, todas as precauções foram tomadas. Os reagentes e as amostras foram manuseados em capela de fluxo laminar. A retirada do cotonete de cada paciente foi realizada com o máximo cuidado, com trocas constantes de luvas para evitar contaminação entre as amostras. Foram utilizadas 3 áreas físicas distintas do laboratório para cada fase da realização da PCR: preparo da amostra na sala de extração, preparo dos reagentes na sala de pré-PCR, amplificação das amostras e a distribuição para a *nested* PCR e detecção dos produtos obtidos na sala de pós-PCR.

Revelação do produto de amplificação

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% diluído em tampão Tris Acetato (TAE) e contendo 0,5 µg de brometo de etídio. Após a eletroforese, o produto de amplificação resultante, no tamanho de 233 bp, foi visualizado por transiluminação do gel por raios ultravioleta e considerado positivo.

3.8 Sequenciamento nucleotídico de amostras do DNA viral de HHV-8

O sequenciamento foi realizado a partir da amplificação de dois fragmentos diferentes da região variável da ORF-K1, a VR1 (380 bp) e a VR2 (336 bp), utilizando-se os seguintes *primers* descritos por Cook et al., (1999) e utilizados por Nascimento et al., 2005.

Os *primers* utilizados na primeira etapa da VR1 foram:

5' GTT CTG CCA GGC ATA GTC 3'

5' GTA ACA TGC TGA CCA CAA G 3'

Na segunda etapa da amplificação, foram utilizados 5 µl do produto da primeira etapa e os *primers* internos foram:

5' CTG GCG GCC CTT GTG TAA AC 3'

5' GAC TGT GTT TGA TGG CTG TGC 3'

Para a região VR2 foram utilizados os seguintes *primers*:

5' CGT CTC GCC TGT CAA ATC 3'

5' ACT GGT TGC GTA TAG TCT TCC 3'

Na segunda etapa da amplificação, foram utilizados 5 µl do produto da primeira etapa e os *primers* internos foram:

5' GTA TAT GTT TTT GGG CGC GTT G3'

5' CCG TGC ACA AAT CGT GTA GGG 3'

A reação foi padronizada para um volume final de 50 µl, contendo 5 µl da amostra, tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH= 9.0), 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*TM *Life Technologies*, Carisbad, CA, USA).

Ciclo: Os tubos de reação contendo as amostras e a mistura de reagentes foram submetidos a amplificação em termociclador *Eppendorf Mastercycler* gradiente. Para VR1, realizou-se uma denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 seg a 94°C para denaturação do DNA, 45 seg a 61°C para anelamento do *primer* e 1 min a 72°C para extensão da sequência. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min.

Para a segunda etapa, 2,5 µl do produto de PCR da primeira etapa foram utilizados sob as mesmas condições de ciclagem. Quanto à ciclagem para VR2, esta variou na temperatura de anelamento de 56°C, na primeira etapa, para 59°C, na segunda etapa. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, diluído em tampão Tris Acetato (TAE) e contendo 0,5 µg de brometo de etídio. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes para VR1 e VR2, foram visualizados por transiluminação do gel por raios ultravioleta. As amostras positivas seguiram para a etapa de purificação para a realização da reação de sequenciamento.

Os amplicons foram purificados por meio do kit *Microcon Centrifugal Filter Devices* (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante e, quando da presença de bandas inespecíficas ou de difícil visualização, foi empregado um kit de purificação a partir do gel (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

A reação de amplificação para o sequenciamento foi realizada a partir do kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*, que utiliza didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e a análise das sequências (*forward* e *reverse*) foi feita no sequenciador de DNA ABI PRISM 377 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) de todos os produtos de PCR, para garantir uma melhor qualidade na caracterização dos nucleotídeos

3.8.1 Análise das sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram editadas no computador *Apple Macintosh* acoplado ao *ABI377 DNA Sequencer*. Foi utilizado o programa *Sequence Navigator™ Version 1.0.1-Applied Biosystems* e exportadas para um computador PC, para análises posteriores.

3.8.2 Edição e alinhamento das sequências

A análise comparativa entre as sequências nucleotídicas requer que as mesmas estejam perfeitamente alinhadas, considerando-se o pareamento de bases homólogas. Para tal, foi montado um banco de dados com as sequências geradas no presente estudo e sequências previamente descritas na literatura e disponíveis no *GenBank* dos diferentes subtipos do HHV-8, identificadas na Tabela 1A e 1B.

Tabela 1A – Número de acesso das sequências do *GenBank* utilizadas como referências para subtipar o HHV-8 pela região VR1 da ORF-K1.

Sequências dos diversos subtipos do HHV-8 do <i>GenBank</i>		
Isolados	Número de acesso	Subtipo
BCBLB	AF133039	A
BCBLR	AF133038	A
IER7	AF130280	A
K113/lov	AF171057	A
K132	AF178799	A
K140	AF178807	A
K146	AF171058	A
BRA/SP9	AY378004	A
BRA/SP65	AY377995	A
BRA/SP81	AY377998	A
BRA/SP84	AY377993	A
BRA/SP93	AY378006	A
G91	AF130266	B
G101	AF130259	B
Arg7	AF278836	C
ASM72	AF133041	C
BC2	AF133042	C
IER4	AF130278	C
ZKS3	AF133044	D
TKS10	AF133043	D
TUPI1	AF220292	E
TUPI2	AF220293	E
HUA1	AY329027	E
HUA2	AY329028	E
SIO1	AY329025	E
SIO2	AY329024	E

Tabela 1B – Número de acesso das sequências do *GenBank* utilizadas como referências para subtipar o HHV-8 pela região VR2 da ORF-K1.

Sequências dos diversos subtipos do HHV-8 do <i>GenBank</i>		
Isolados	Número de acesso	Subtipo
BCBLR	AF133038	A
K113/lov	AF171057	A
K132Bcb	AF178799	A
K140Bc1	AF178807	A
K146Na	AF171058	A
G71	AF130265	B
G91	AF130266	B
G101	AF130259	B
431KAP	AF133040	B
C3BC2US	AF133042	C
C3K118Hec	AF178787	C
ZKS3	AF133044	D
TKS10	AF133043	D
TUPI1	AF220292	E
TUPI2	AF220293	E
HUA1	AY329027	E
HUA2	AY329028	E
HUA3	AY329026	E
K143Berr	AF178810	F

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o programa Clustal-W (Thompson et al.,1997) e editadas com o programa Bioedit.

3.8.3 Análise Filogenética

A genotipagem pela região VR1 e VR2 da ORF K-1 foi realizada por meio da análise filogenética das sequências consenso de cada amostra.

Para a análise filogenética foi utilizado o programa PAUP 4.0b10 (Swofford et al., 1996). As análises foram realizadas utilizando os métodos de distância e máxima verossimilhança (VM). Para os dois métodos, o modelo de substituição foi estimado pelo teste de razão de verossimilhança com o auxílio do programa Modeltest versão 3.07 (Posada e Crandall, 1998).

No método de distância foi utilizado o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining, NJ*), fazendo referência à distância genética entre as amostras, agrupando-as de acordo com a maior similaridade (Saitou e Nei, 1987) para a reconstrução de topologias. O método estabeleceu, primeiramente, os cálculos para o percentual de divergências entre todos os pares de sequência, corrigindo estes valores para múltiplas substituições ao usar o modelo de Jukes e Cantor (JC).

Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (Felsenstein, 1985; Zharkikh e Li, 1995). Foram considerados valores de *bootstrap* significativos acima de 70 (McCormack e Clewley, 2002).

As sequências determinadas no presente estudo foram depositadas no “*The National Center for Biotechnology Information Database (NCBI)*”.

3.9 Análise estatística

Para a elaboração desse estudo foram observados indivíduos de uma população indígena (sangue e saliva) e de uma população não indígena (sangue), de acordo com sexo e idade.

Foram calculadas as prevalências de positividade (anti-LANA, anti-lítico ou ambos, e anticorpos dos agentes infecciosos) para cada população específica indígena e não indígena, bem como as razões de prevalência de soropositividade entre as duas populações com seus respectivos intervalos de 95% de confiança. Os dados referentes à soropositividade (anti-LANA, anti-lítico ou ambos) foram descritos segundo faixa etária por quinquênios com uso de frequências absolutas e relativas. Foi verificada a existência de associação entre a positividade para anti-LANA ou anti-lítico e DNA do HHV-8 na saliva, com relação à idade. Foi descrita a positividade de DNA do HHV-8 na saliva segundo faixa etária e verificada a existência de associação da positividade com o sexo em indígenas menores de 15 anos e com 15 anos ou mais, com o uso do teste qui-quadrado (Bussab e Morettin, 1987).

Para a população não indígena, por apresentar baixa prevalência de soropositividade o teste utilizado foi o teste exato de Fisher.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Os softwares utilizados foram: Excel 2003 e SPSS 15.0.

RESULTADOS

4 Resultados

No ano de 2003, a equipe médica do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP realizou a coleta de amostras em indígenas da Aldeia Mapuera e da população não indígena de Cachoeira Porteira.

Foram coletadas 339 amostras de sangue e 277 amostras de saliva por *swab* bucal dos indígenas. Para os indivíduos da população não indígena, foram coletadas 181 amostras de sangue.

No ano de 2006, a equipe do laboratório de Virologia-IMT coletou oito amostras de saliva de indivíduos soropositivos para HHV-8 da população não indígena.

4.1 Características da população

Dos 339 índios participantes do estudo, 57,5% (195) eram do sexo feminino e dos 181 participantes da população não indígena, 58,6% (106) eram do sexo feminino. A mediana das idades nas populações foi de 23 anos para a população indígena e 17 anos para a população não indígena. A distribuição dessas amostras, de acordo com sexo e a idade, está representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição da amostra populacional estudada, segundo sexo e faixa etária, PA-2003

Idade	Indígenas				Não indígenas			
	F		M		F		M	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0 a 4	5	2,6	3	2,1	6	5,7	8	10,7
5 a 9	14	7,2	21	14,6	23	21,7	14	18,7
10 a 14	36	18,5	22	15,3	17	16,0	12	16,0
15 a 19	37	19,0	17	11,8	8	7,5	11	14,7
20 a 24	21	10,8	16	11,1	10	9,4	2	2,7
25 a 29	15	7,7	9	6,3	8	7,5	1	1,3
30 a 34	14	7,2	10	6,9	8	7,5	7	9,3
35 a 39	14	7,2	12	8,3	7	6,6	3	4,0
40 ou mais	39	20,0	34	23,6	19	17,9	17	22,7
Total	195	100	144	100	106	100	75	100

4.2 Prevalência da infecção pelo HHV-8

Foram considerados infectados pelo HHV-8 os indivíduos que apresentaram anticorpos anti HHV-8 para qualquer um dos dois antígenos utilizados (da fase latente-LANA e da fase lítica).

Pela reação de IFA foram consideradas positivas para anticorpos anti-LANA as amostras que apresentaram fluorescência pontilhada no núcleo da célula, como podemos observar pela Figura 7, e para anticorpos anti-lítico, a fluorescência citoplasmática em cerca de 20 % das células tratadas com TPA, como mostra a Figura 8.

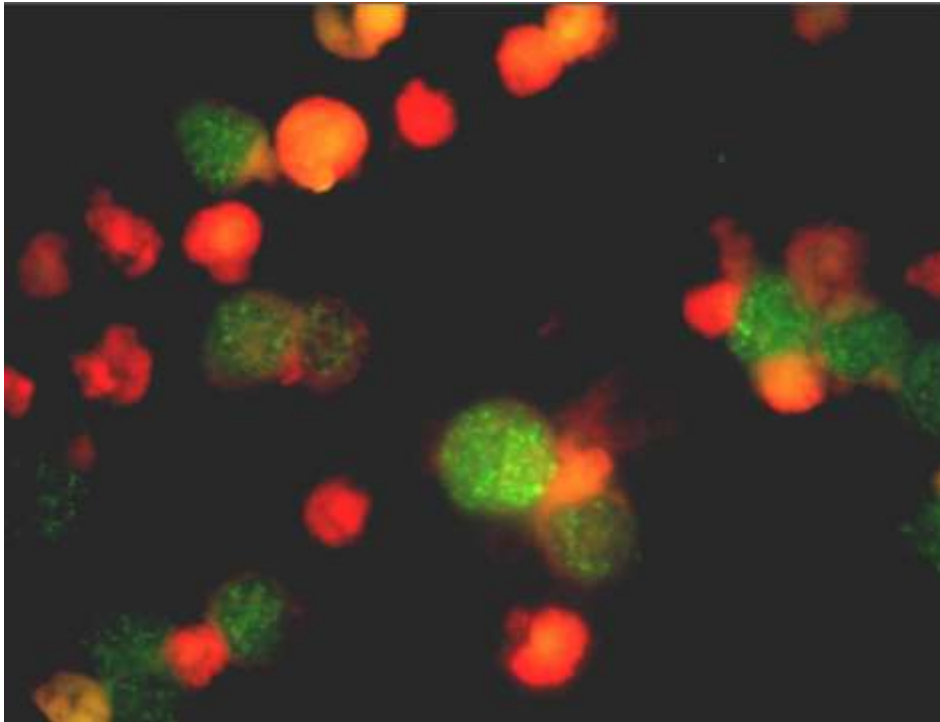


Figura 7 – Reação de imunofluorescência indireta positiva para anticorpos contra antígenos da fase latente (LANA) do HHV-8 em células BCBL-1 (aumento de 400X)

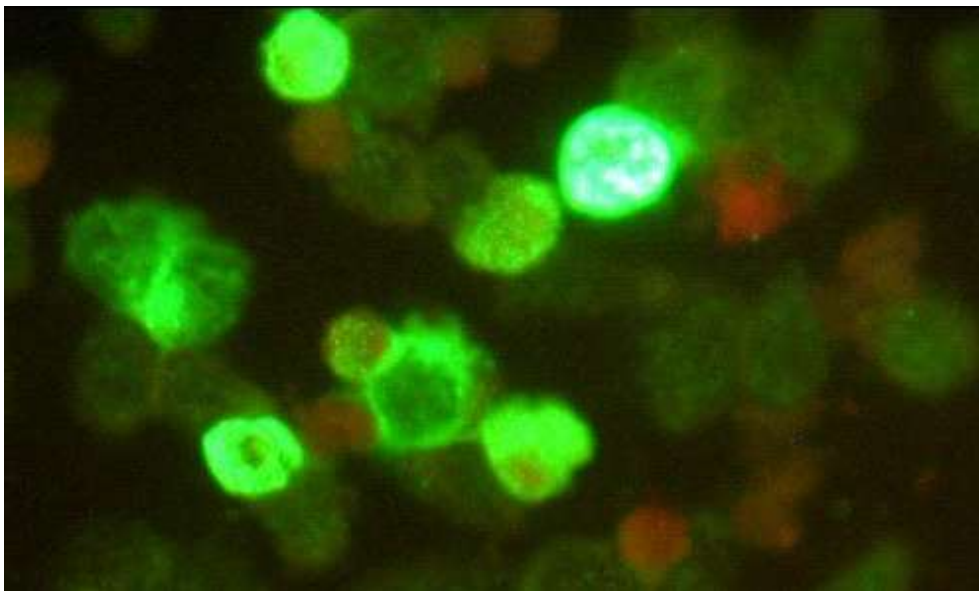


Figura 8 – Reação de imunofluorescência indireta positiva para anticorpos contra antígenos da fase lítica do HHV-8 em células BCBL-1 tratadas com TPA (aumento de 400X)

Detectou-se a prevalência total de anticorpos anti-HHV-8 (LANA ou lítico) de 79,1% (268/339) na população indígena, significativamente superior à prevalência encontrada na população não indígena, que foi de 6,1% (p<0,0001).

A prevalência de anticorpos anti-LANA na população indígena foi de 76,7% (260/339), significativamente superior à prevalência encontrada na população não indígena, que foi de 0,5% (p<0,0001).

A prevalência de anticorpos anti-lítico detectada na população indígena foi de 62,2% (221/339), também significativamente superior à prevalência da população não indígena de 6,1%(p<0,0001). Esses dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição da prevalência de anticorpos anti HHV-8 na população indígena e não indígena, PA-2003

	Indígenas	Não indígenas	Razão de Prevalência
Sororreatividade anti-HHV-8 (IFA)	N=339	N=181	
	n(%)	n(%)	(IC 95%)
anti-LANA ou anti-lítico	268 (79,1)	11 (6,1)	13,0 (6,3-23,1)
anti-LANA	260 (76,7)	1 (0,5)	138,8 (19,6-981,5)
anti-lítico	211 (62,2)	11 (6,1)	10,2 (5,7-18,3)

Prevalência de anticorpos anti-HHV-8 de acordo com a idade nas duas populações

Analisando-se os dados de acordo com a faixa etária, foi observada uma prevalência de anticorpos anti-LANA superior à prevalência de anticorpos anti-lítico entre os indivíduos da população indígena (Gráfico 1). Por outro lado, observou-se na população não indígena uma maior prevalência de anticorpos da fase lítica, como podemos inferir pelo Gráfico 2.

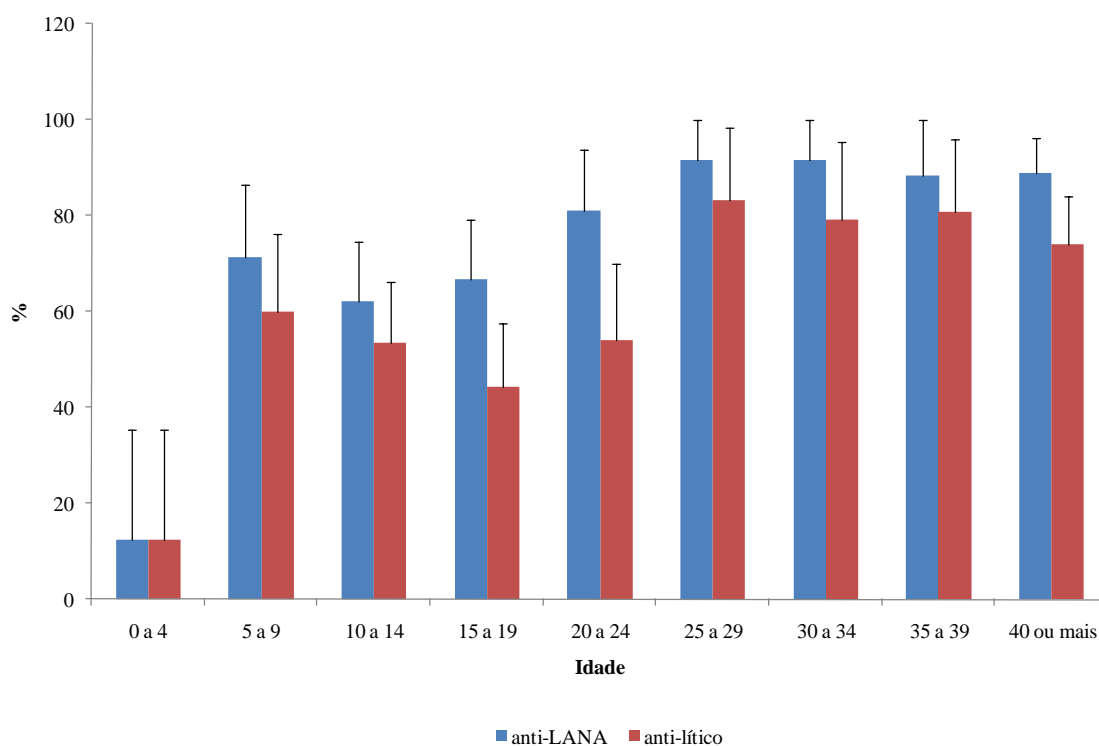


Gráfico 1 – Percentuais de positividade anti-LANA e anti-lítico (IFA) distribuídos por idade, seus respectivos intervalos com 95% de confiança, em amostras de população indígena, Pará-2003

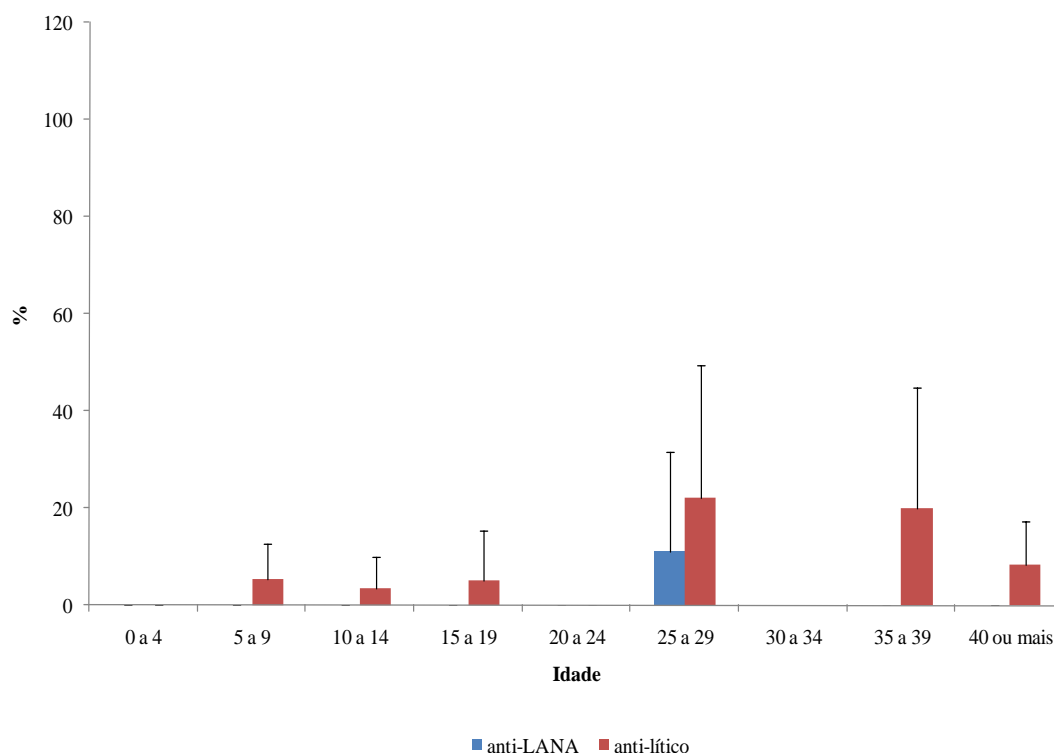


Gráfico 2 – Percentuais de positividade anti-LANA e anti-lítico, segundo faixa etária e os respectivos intervalos com 95% de confiança, em amostras de população não indígena, Pará-2003

Analisando-se os dados de acordo com a faixa etária, observamos que a positividade para prevalência de anti-LANA ou anti-lítico na população indígena em crianças abaixo de 15 anos foi de 66,3%, diferença estatisticamente significativa, quando comparadas aos indivíduos com 15 anos ou mais, de 84,5% ($p < 0,001$).

Na população não indígena, houve, em todas as faixas etárias, pouca infecção, sem diferença estatística entre as prevalências das crianças abaixo de 15 anos, de 3,8%, quando comparadas aos indivíduos com 15 anos ou mais, de 7,9% ($p=0,351$). A Tabela 4 apresenta esta análise.

Tabela 4 – Soroprevalência de anticorpos anti-LANA ou anti-lítico, segundo idade nas duas populações indígena e não indígena, Pará-2003

Idade	Indígenas					Não indígenas				
	anti-LANA ou anti- LÍTICO		IC(95%)		Total	anti-LANA ou anti- LÍTICO		IC(95%)		Total
	n	%	Inferior	Superior		n	%	Inferior	Superior	
0 a 4	1	12,5	0,0	35,4	8	0	0,0	0,0	0,0	14
5 a 9	27	77,1	63,2	91,1	35	2	5,4	0,0	12,7	37
10 a 14	39	67,2	55,2	79,3	58	1	3,4	0,0	10,1	29
subtotal	67	66,3	57,1	66,8	101	3	3,8	0,0	3,8	80
15 a 19	36	66,7	54,1	79,2	54	1	5,3	0,0	15,3	19
20 a 24	31	83,8	71,9	95,7	37	0	0,0	0,0	0,0	12
25 a 29	22	91,7	80,6	100,0	24	2	22,2	0,0	49,4	9
30 a 34	22	91,7	80,6	100,0	24	0	0,0	0,0	0,0	15
35 a 39	23	88,5	76,2	100,0	26	2	20,0	0,0	44,8	10
40 ou mais	67	91,8	85,5	98,1	73	3	8,3	0,0	17,4	36
subtotal	201	84,5	79,9	84,6	238	8	7,9	2,7	8,1	101
Total	268	79,1	74,7	83,4	339	11	6,1	2,6	9,6	181

A positividade de anti-LANA ou anti-lítico na população indígena foi maior do que na população não indígena, para todas as faixas etárias, como pode ser visto no Gráfico 3.

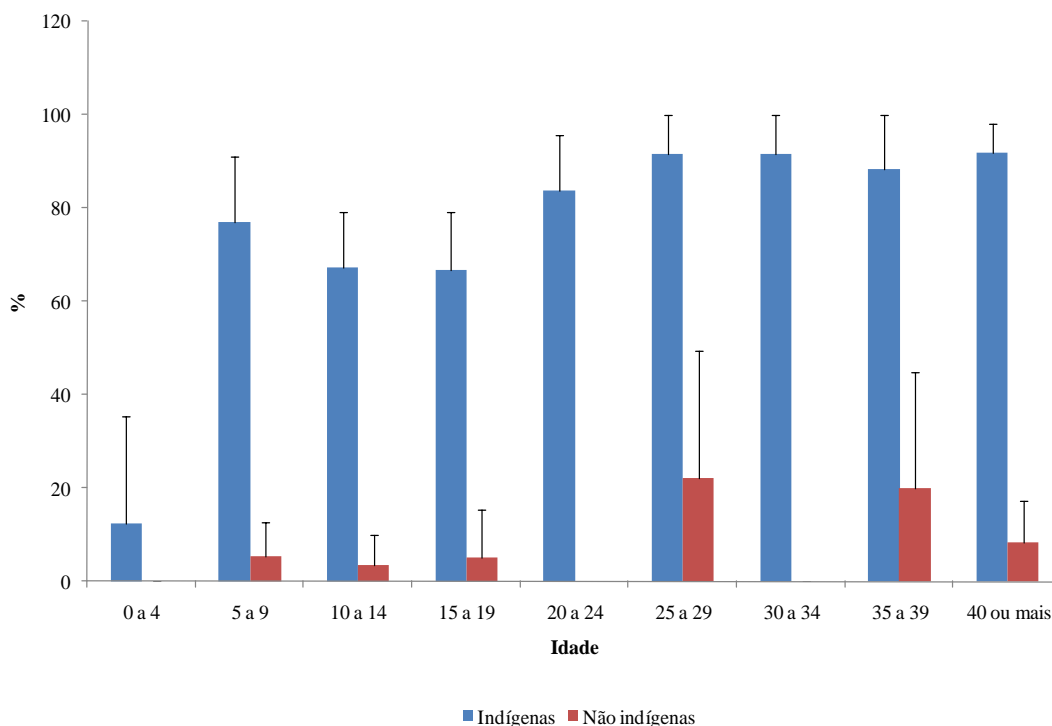


Gráfico 3 – Percentuais de positividade anti-LANA ou anti-lítico, nas populações, segundo faixa etária, e os respectivos intervalos com 95% de confiança, Pará-2003

Prevalência de anticorpos anti-HHV-8 de acordo com o sexo

A soroprevalência de anticorpos anti-LANA ou anti-lítico na população indígena foi de 77,8% em homens e 80,0% em mulheres e a análise estatística não mostrou diferença significativa ($p=0,619$). Para a população não indígena, a soroprevalência de anticorpos anti-LANA ou anti-lítico foi positiva para 4,0% dos homens (3/75) e para 7,5% das mulheres (8/106). Da mesma forma, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os sexos ($p=0,367$).

4.3 Excreção do HHV-8 pela saliva na população indígena

A extração de DNA foi realizada em todas as 277 amostras de saliva coletadas por *swab* bucal. Porém, seis amostras apresentaram resultados negativos tanto para a PCR do gene da beta globina quanto para a PCR da ORF26 do HHV-8, sendo, portanto, excluídas do estudo. Foi possível amplificar a região da ORF26 do HHV-8 de 51(19%) amostras extraídas, amplificando um fragmento de 233bp correspondente a esse gene, como podemos observar na Figura 9, de gel de agarose da reação correspondente.

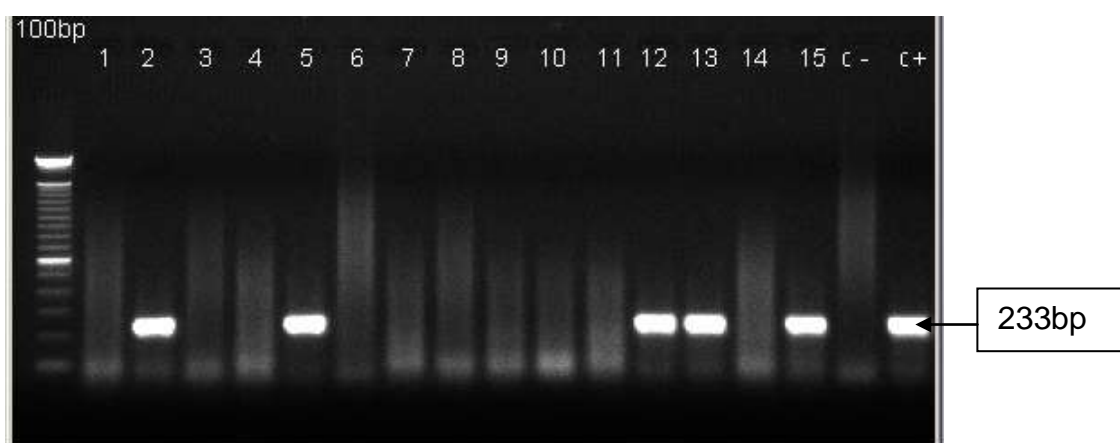


Figura 9 – Gel de agarose corado com brometo de etídio. Reação de PCR da ORF-26, sendo as amostras positivas: 2, 5, 12, 13, 15; e as amostras negativas: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14.

C-: controle negativo

C+: controle positivo.

100bp: peso molecular

O pareamento das amostras de saliva e soro ocorreu em 250 indivíduos (73,7%), uma vez que não houve pareamento em duas amostras das 51 positivas e 19 das 220 amostras negativas, dessa análise 21 amostras foram excluídas. Portanto, das 250 amostras, 203 tinham sorologias positivas (anti-LANA ou anti-lítico) e 47 sorologias negativas. A análise dos indivíduos que excretam o vírus pela saliva e a sorologia positiva para os anticorpos anti-LANA ou anti-lítico foi de 23,2%, resultados apresentados na Tabela 5 e distribuídos de acordo com a faixa etária.

Tabela 5 – Descrição do DNA do HHV-8 na saliva da população indígena, de acordo com a faixa etária e sorologia positiva para anti-LANA ou anti-lítico, Aldeia Mapuera, Pará-2003

Idade	PCR-saliva				Total
	Negativo		Positivo		
	n	%	n	%	
0 a 4	0	0,0	1	100,0	1
5 a 9	13	61,9	8	38,1	21
10 a 14	21	67,7	10	32,3	31
15 a 19	24	85,7	4	14,3	28
20 a 24	20	87,0	3	13,0	23
25 a 29	12	70,6	5	29,4	17
30 a 34	12	66,7	6	33,3	18
35 a 39	13	76,5	4	23,5	17
40 ou mais	41	87,2	6	12,8	47
Total	156	76,8	47	23,2	203

A probabilidade dos excretores terem sorologia positiva anti-LANA ou anti-lítico foi de 95,9% (47/49) e a dos não excretores de 77,6% (156/201). Além disso, 4,1 % (2/47) dos indivíduos soronegativos para anti-LANA ou anti-lítico excretam o vírus pela saliva. Dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Descrição da positividade de anti-LANA ou anti-lítico segundo excreção do HHV-8 na saliva, Aldeia Mapuera, PA – 2003

Excreção	anti-LANA ou anti-Lítico				Total	p
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%		
Sim	47	95,9	2	4,1	49	0,003
Não	156	77,6	45	22,4	201	
Total	203	81,2	47	18,8	250	

A Tabela 6 apresentou que o percentual de anti-LANA ou anti-lítico nos indígenas que excretam o vírus é estatisticamente maior do que nos indivíduos que não o excretam ($p=0,003$).

Todos os 47 indígenas, nos quais foi detectada a excreção do HHV-8 pela saliva apresentaram sorologia positiva para anti-LANA, mas somente 38 (80,8%) foram positivos para anti-lítico.

Entre os não excretadores, 73,6% (148/201) apresentaram sorologia positiva para anti-LANA e 60,1% (121/201) para anti-lítico.

A excreção oral pelo HHV-8 foi mais frequente entre o sexo masculino, 35,7%, quando comparado ao sexo feminino, 14,3%. O percentual de positivos para o sexo masculino foi estatisticamente maior do que para as mulheres nos indivíduos até 15 anos ($p < 0,001$). Por outro lado, para os indivíduos com 15 anos ou mais o percentual de positividade foi estatisticamente igual ($p=0,104$). Esses dados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Detecção do DNA do HHV-8 na saliva de indígenas, de acordo com o sexo e faixa etária, Aldeia Mapuera, PA-2003

Idade	Feminino			Masculino			p*
	PCR-saliva		Total	PCR-saliva		Total	
	n	%		n	%		
0 a 4	0	0,0	0	1	100,0	1	
5 a 9	2	20,0	10	6	54,5	11	
10 a 14	2	10,5	19	8	66,7	12	
Subtotal	4	13,8	29	15	62,5	24	<0,001
15 a 19	4	20,0	20	0	0,0	8	
20 a 24	2	15,4	13	1	10,0	10	
25 a 29	2	22,2	9	3	37,5	8	
30 a 34	4	33,3	12	2	33,3	6	
35 a 39	0	0,0	9	4	50,0	8	
40 ou mais	1	3,7	27	5	25,0	20	
Subtotal	13	14,4	90	15	25,0	60	0,104
Total	17	14,3	119	30	35,7	84	

* Resultado do teste qui-quadrado

Excreção do HHV-8 pela saliva na população não indígena

As oito amostras nas quais foi realizada a PCR da ORF26 foram negativas.

Todas as amostras foram positivas para o gene da beta globina.

4.4 Prevalência de anticorpos para outros agentes infecciosos com mecanismo de transmissão conhecidos

A determinação de prevalência de anticorpos contra diferentes agentes infecciosos com mecanismos de transmissão conhecidos foi proposta. O objetivo foi avaliar de forma indireta a existência de condições locais nas comunidades indígenas e não indígenas que predispuessem à infecção pelo HHV-8 por outro mecanismo de transmissão.

Assim, para avaliar a ocorrência de transmissão por sangue foi determinada a soroprevalência de infecção pelo vírus da hepatite C; para a transmissão sexual, da infecção por HSV-2 e *T.pallidum*; para fecal-oral, a do vírus da hepatite A, e para transmissão sexual e/ou sanguínea, a prevalência de anticorpos contra o antígeno do *core* do VHB.

A soroprevalência para o VHA, agente transmitido por mecanismo fecal-oral, foi superior a 90% para as duas populações, porém maior na população indígena. Não foram detectados anticorpos para o VHC, utilizados como marcadores de transmissão parenteral em nenhuma das duas populações. A soroprevalência de anticorpos anti-*core* do HBV, possível marcador de transmissão parenteral e sexual, foi maior na população não indígena. Anticorpos anti-HSV2 e anti-*Treponema pallidum*, utilizados como marcadores de transmissão sexual, também foram significativamente mais altos na população não indígena (Tabela 8).

Tabela 8 – Soroprevalência de anticorpos dos agentes infecciosos com mecanismos de transmissão conhecidos na população indígena e não indígena, PA-2003

Sorologia	Indígenas N=339	Não indígenas N=181	Razão de Prevalência (IC 95%)
	n(%)	n(%)	
HAV	333 (98,2)	165 (91,2)	1,07 (1,02-1,13)
HBV	23 (6,8)	31 (17,1)	0,39 (0,22-0,74)
HCV	-	-	Não se aplica
HSV-2	25 (7,4)	64 (35,4)	0,20 (0,13-0,31)
<i>T. pallidum</i>	-	10 (5,5)	- (0 ~ ∞)

4.5 Caracterização molecular

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos por método molecular, realizados nas 51 amostras positivas pela PCR da ORF26.

Tabela 9 – Resultados de todos os testes moleculares realizados no presente estudo, Pará-2003


Indío	PCR(ORF26)	VR-1	VR-2	Sequenc.VR-1	Sequenc.VR-2
5	pos	neg	neg		
9	pos	pos	pos	pos	pos
13	pos	pos	pos	pos	pos
24	pos	pos	pos	pos	pos
34	pos	pos	pos	pos	pos
35	pos	pos	pos	pos	pos
65	pos	pos	pos	pos	pos
68	pos	neg	pos		neg
89	pos	nt	nt	nt	nt
201	pos	pos	pos	pos	pos
202	pos	neg	pos		pos
216	pos	neg	pos		pos
222	pos	pos	pos	pos	pos
227	pos	neg	neg		
229	pos	neg	neg		
230	pos	pos	pos	pos	pos
231	pos	pos	pos	pos	pos
232	pos	neg	pos		pos
237	pos	pos	pos	pos	neg
239	pos	nt	nt	nt	nt
260	pos	neg	pos		pos
265	pos	pos	pos	pos	pos
274	pos	pos	pos	pos	pos
281	pos	pos	neg	pos	
283	pos	neg	neg		
284	pos	pos	pos	pos	pos
285	pos	pos	pos	pos	pos
288	pos	pos	pos	pos	pos
289	pos	neg	neg		
293	pos	pos	pos	pos	pos
294	pos	pos	pos	pos	neg
298	pos	pos	pos	pos	pos
300	pos	pos	pos	pos	pos
304	pos	pos	pos	pos	pos
312	pos	neg	neg		
315	pos	nt	nt	nt	nt

continua

conclusão

Tabela 9 – Resultados de todos os testes moleculares realizados no presente estudo, Pará-2003

Indío	PCR(ORF26)	VR-1	VR-2	Sequenc.VR-1	Sequenc.VR-2
317	pos	nt	nt	nt	nt
324	pos	neg	neg		
325	pos	pos	pos	pos	pos
327	pos	neg	pos		pos
333	pos	nt	nt	nt	nt
340	pos	nt	nt	nt	nt
359	pos	pos	pos	pos	pos
362	pos	neg	pos		pos
367	pos	neg	pos		pos
373	pos	neg	neg		
377	pos	pos	pos	pos	pos
381	pos	pos	pos	pos	pos
386	pos	pos	pos	pos	pos
389	pos	pos	pos	pos	pos
390	pos	pos	pos	pos	pos

Legenda: : Amostras cujas PCR foram negativas nt : Amostras não realizadas

Sequenciamento das amostras

Como podemos observar pela Tabela 9, das 51 amostras positivas para a ORF26, foi possível amplificar 29 amostras para VR1 e 36 amostras para VR2, sendo que 28 dessas amplificaram para ambas as regiões. Não foi possível realizar a PCR para VR1 e VR2 em seis amostras. A genotipagem por sequenciamento da região VR1 e VR2 da ORF-K1, foi necessária para a confirmação dos subtipos circulantes na presente população. Foram analisados 37 indivíduos, sendo 29 sequências nucleotídicas de VR1/ORF-K1 e 33 sequências de VR2/ORF-K1. Com essa finalidade foram construídas duas árvores filogenéticas a partir respectivamente

da análise comparativa das sequências VR1 e VR2. Não foi possível incluir uma sequência para a região VR1 na análise, pois o fragmento sequenciado não permitiu um bom alinhamento.

O modelo de substituição estimado para a região VR1 foi o de JC com distribuição gama (JC+G). Para a região VR2, o modelo estimado foi Kimura 2 parâmetros (K80) selecionado pelo Modeltest 3.7. Foram calculados os valores de bootstrap, com 1000 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas.

As sequências de DNA do presente estudo da ORF-K1/VR1 depositadas no *GenBank* com os números de acesso: EF204998 – EF205001, EF 209410 – EF209421 e EF375500 – EF375513; e as sequências de DNA da ORF-K1/VR2 com os números de acesso: EF375514 – EF375549, estão listadas na Tabela 10 e 11.

Todas as amostras foram agrupadas como subtipo E, sendo que a maioria das amostras dos indígenas da aldeia Mapuera foi mais relacionada com os isolados dos indígenas Huaorani do Equador, e somente duas amostras com o isolado da tribo Tupi, dos indígenas brasileiros. As figuras 10 A e 10 B representam as duas árvores filogenéticas.

Tabela 10 – Listagem das amostras determinadas no presente estudo e os respectivos números de acesso no *GenBank*, para VR1, Aldeia Mapuera-PA-2003

Registro	Número de acesso-<i>GenBank</i>	Herpesvírus 8 humano, subtipoE- região VR1
1	EF204998	Wai9
2	EF205000	Kat13
3	EF209418	Wai24
4	EF209419	Wai34
5	EF209420	Wai35
6	EF205001	Kat65
7	EF209421	Wai201
8	EF209410	Kat222=Wai222
9	EF209411	Kat230
10	EF209412	Kat231
11	EF375511	Xer237
12	EF209413	Kat265
13	EF375513/EF209414	Kat274
14	EF209415	Kat281
15	EF375500	Wai284
16	EF209417	Maw285
17	EF375501	Wai288
18	EF375502	Wai293
19	EF204999	Hex294
20	EF209416	Map298
21	EF375503	Wai300
22	EF375504	Wai304
23	EF375505	Wai325
24	EF375512	Xer359
25	EF375506	Wai377
26	EF375507	Wai381
27	EF375508	Wai386
28	EF375509	Wai389
29	EF375510	Wai390

Tabela 11 – Listagem das amostras determinadas no presente estudo e os respectivos números de acesso no *GenBank*, para VR2, Aldeia Mapuera-PA-2003

Registro	Número de acesso - <i>Genbank</i>	Herpesvírus 8 humano, subtipoE- região VR2
1	EF375514	Kat13
2	EF375516	Kat65
3	EF375517	Kat216
4	EF375518	Kat222=Wai222
5	EF375519	Kat230
6	EF375520	Kat231
7	EF375521/EF375528	Kat232
8	EF375522	Kat265
9	EF375523	Kat274
10	EF375524	Kat362
11	EF375525	Kat260=Map260
12	EF375526	Map298
13	EF375529	Wai9
14	EF375530	Wai24
15	EF375532	Wai34
16	EF375533	Wai35
17	EF375534	Wai201
18	EF375535	Wai202
19	EF375536	Wai284
20	EF375537	Wai288
21	EF375538	Wai293
22	EF375539	Wai300
23	EF375540	Wai304
24	EF375541	Wai325
25	EF375542	Wai327
26	EF375543	Wai367
27	EF375544	Wai377
28	EF375545	Wai381
29	EF375546	Wai386
30	EF375547	Wai389
31	EF375548	Wai390
32	EF375549	Xer359
33	EF375528	Maw 285

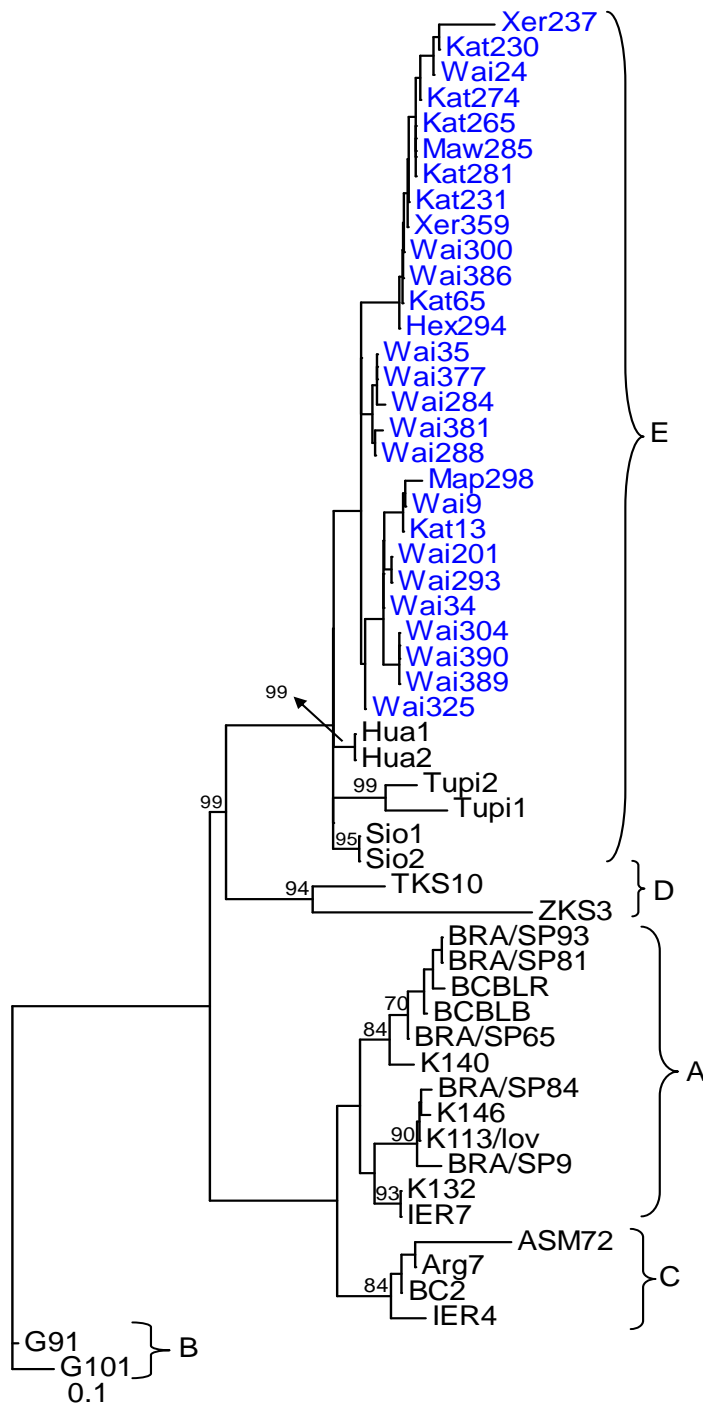


Figura 10A – Árvore filogenética não enraizada de sequências de DNA ORFK1/VR1 do HHV-8, obtidas na Aldeia Mapuera-PA. A árvore filogenética foi obtida com o algoritmo de reconstrução filogenética “Neighbor Joining”, modelo de substituição nucleotídica JC+G, com *bootstrap* de 1000 réplicas no programa PAUP-4. Estão indicados somente os valores de *bootstrap* superiores a 70%. A identificação em azul refere-se às sequências desse estudo. As em preto representam as sequências referências obtidas do *GenBank*

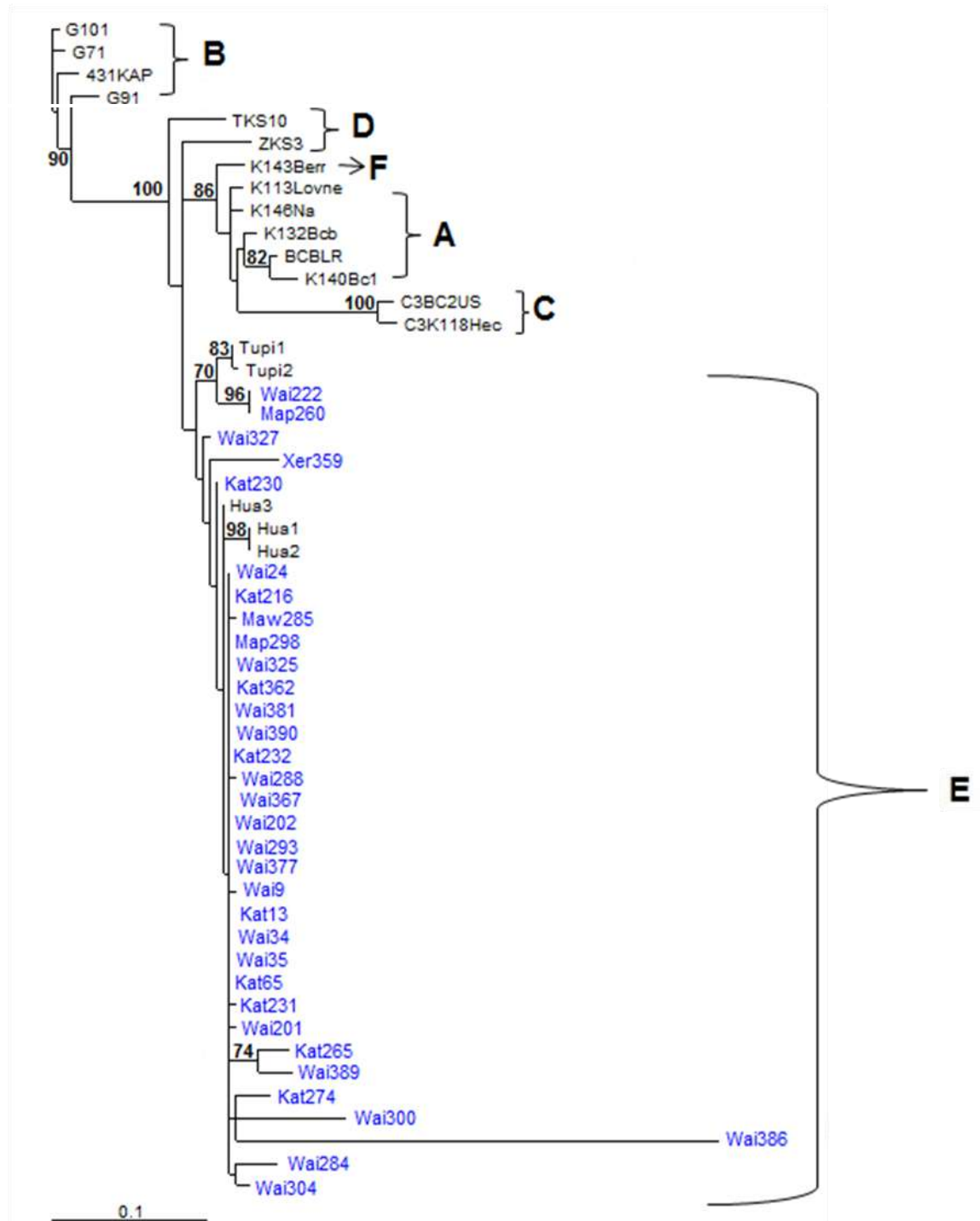


Figura 10B – Árvore filogenética não enraizada de sequências de DNA ORFK1/VR2 do HHV-8, obtidas na Aldeia Mapuera-PA. A árvore filogenética foi obtida com o algoritmo de reconstrução filogenética “*Neighbor Joining*”, modelo de substituição nucleotídica K80, com *bootstrap* de 1000 réplicas no programa PAUP-4. Estão indicados somente os valores de *bootstrap* superiores a 70%. A identificação em azul refere-se às sequências desse estudo. As em preto representam as sequências referências obtidas do *GenBank*

DISCUSSÃO

5 Discussão

O Brasil, um país de diversas etnias, possibilitou a pesquisa em dois grupos étnicos distintos – indígenas e não indígenas.

O presente estudo avaliou a soroprevalência para os antígenos LANA e lítico do HHV-8 em populações indígenas e não indígenas que viviam em uma mesma localização geográfica da Amazônia brasileira, na região do rio Trombetas, no Pará. Em virtude da falta de um teste definitivo para determinar a infecção pelo HHV-8, nosso estudo considerou como critério diagnóstico, a positividade tanto para os anticorpos contra os antígenos da fase LANA quanto da fase lítica, realizados pela técnica de imunofluorescência indireta. Lennette et al. demonstram a especificidade do método para a detecção de anticorpos contra o HHV-8 em 40 pacientes com infecção pelo EBV, pois não encontram reatividade ao HHV-8 por IFA-Lítico usando células BCBL-1. (Lennette et al., 1996). Devido a esta alta especificidade, diversos estudos têm utilizado esta técnica em inquéritos sorológicos, (Kedes et al., 1996; Chandran et al., 1998a; Martin et al., 1998; Rezza et al., 1998; Enbom et al., 2000; Hudnall et al., 2003; Souza et al., 2004).

A avaliação de prevalência da infecção pelo HHV-8 na casuística da população indígena para os antígenos LANA ou lítico, demonstrou que 79,1% dos indivíduos apresentaram anticorpos para este vírus. Ao pesquisarmos os antígenos

separadamente, constatamos que 76,7% dos indivíduos apresentaram anticorpos para LANA e 62,2% para lítico. Estes resultados sustentam a característica de uma população endêmica para o HHV-8 e confirmam os achados de estudos anteriores realizados em populações indígenas do Brasil, Equador e Guiana Francesa (Biggar et al., 2000; Whitby et al., 2004; Kazanji et al., 2005) que relatam soroprevalências variando de 24% a 100%. Assim, Biggar et al. (2000), autores da primeira pesquisa em populações indígenas, utilizam IFA para os antígenos LANA, e detectam uma soroprevalência de 53% em amostras coletadas de diversas tribos indígenas presentes na Casa dos Índios em Belém e Altamira (PA). Outro estudo, realizado por Cunha et al. (2005) em duas tribos indígenas Tiriyo e Waiampi (PA), demonstra, por IFA LANA e lítico, soroprevalência de 57,4% e 55,7% respectivamente, também semelhante ao nosso estudo. Em um terceiro estudo realizado nas tribos Kararao, Arara Laranjal, Tiriyo e Zo'e, Ishak et al. (2007) utilizam um teste imunoenzimático ELISA com uma mistura de antígenos recombinantes da ORF59, ORF65, K8.1A, K8.1B e ORF73. Tal estudo registra soroprevalências de 25%, 19,6%, 42,9% e 36,7% nas respectivas tribos acima citadas.

O fato de que em nosso estudo analisamos duas populações que vivem em uma mesma área geográfica, sob condições de vida semelhantes, indicou que a infecção por HHV-8 na população indígena estava associada a fatores de risco específicos ou comportamentos que não foram ainda elucidados, mas que não pareciam estar ligados ao meio ambiente.

O estudo realizado por Whitby et al., 2004 em indígenas do Equador encontra prevalência de 100 % para IFA-LANA e ELISA para a ORF73 e 63 % para ELISA da K8.1. Apesar da alta soroprevalência, não são encontradas, nessa população,

evidências de taxa elevada de SK, a exemplo do que observamos em nosso estudo. Estes achados estão em discordância com o que se observa em algumas populações da África, onde a infecção pelo HHV-8 é endêmica, com altas taxas de soroprevalências para o HHV-8, porém com taxas elevadas de SK (Mayama et al., 1998, Olsen et al., 1998; Rezza et al., 2000). Uma das hipóteses que pode ser levantada para explicar esta diferença está relacionada aos subtipos do HHV-8 que circulam nestas populações (subtipos B e A5 na África e subtipo E entre os indígenas da região Amazônica). No entanto, não existem até o momento evidências de que os diferentes subtipos do HHV-8 tenham um diferente potencial oncogênico.

Os resultados encontrados na população não indígena foram significativamente diferentes. Nesta população, a soroprevalência para o HHV-8 (6,1%) foi menos de 1/10 quando comparada à indígena (79,1%). Para os antígenos isoladamente, detectamos que apenas 0,5% da população apresentou anticorpos para LANA e 6,1% para lítico. Estas baixas taxas de soroprevalência em populações não-indígenas já foram relatadas em diferentes estudos no Brasil. Assim, estudo em São Paulo, com crianças e adultos da população geral, relata soroprevalência variando de 1- 4,1% (Souza et al., 2004). A pesquisa de Caterino-de-Araujo et al. registra soroprevalência de 7,4% por IFA-LANA, em doadores de sangue. Em outro estudo, os mesmos pesquisadores relatam soroprevalência de 1,3% por IFA-LANA e 0,3% por IFAl-lítico, em mulheres HIV negativas. (Caterino-de-Araujo et al., 1999; Caterino-de-Araujo et al., 2003). O estudo realizado por Zago et al. (2000) na região Sudeste, com doadores de sangue, encontra soroprevalência de 4,6% para anticorpos anti-LANA. Além disso, na população indígena, o perfil sorológico foi diferente, com predomínio de anticorpos anti-LANA. Este mesmo perfil, é descrito por Whitby

et al. em outra população indígena no Equador (Whitby et al., 2004). Outros estudos são necessários para avaliar o significado destes achados e a possível conexão desta resposta imunológica peculiar com as características genéticas do vírus, da população indígena, ou de ambos. A população não-indígena é constituída por uma mistura de etnias tornando-a heterogênea, ao contrário da população indígena, que é mais homogênea. Se a hipótese levantada por Plancoulaine, de que há um gene recessivo ligado à susceptibilidade ao HHV-8 (Plancoulaine et al., 2003), for verdadeira, o vírus pode ser transmitido mais facilmente numa população homogênea, como os indígenas, caso houvesse predomínio de homozigose para este gene recessivo nesta população. Outro aspecto relevante de nossos resultados foi que em nossa população não indígena, que tem importante contribuição de descendentes de africanos, os resultados foram totalmente diferentes da prevalência descrita em países da África. Todavia, nossos dados são semelhantes aos de Whitby et al., 2004 que reportam baixa soroprevalência para HHV-8 em descendentes africanos do Equador (12,5% por IFA-LANA e 14% por ELISA K8.1). Essa baixa prevalência é consistente com a relatada em populações descendentes da África no Caribe, América do Sul e Reino Unido e em afro-americanos (Goedert et al., 1997; Smith et al., 1999; Lacoste et al., 2000).

Como não há um teste padrão ouro e como sabemos que a concordância interensaios, quanto à sensibilidade e especificidade, é baixa, não se pode afirmar com segurança até que ponto nossos dados, quanto à população não-indígena, foram realmente diferentes quando comparados com os países endêmicos para o HHV-8 na África. Além disso, os estudos realizados na população africana podem ter incluído

indivíduos infectados pelo HIV. Tal fato pode alterar significativamente as taxas de soroprevalência.

Apesar de suas limitações, os resultados de estudos sorológicos têm propiciado melhor compreensão sobre a disseminação e rotas de aquisição da infecção, bem como a relação entre a infecção pelo HHV-8 e o início do SK (Sarmati, 2001). Dessa forma, avaliamos a distribuição etária da infecção pelo HHV-8 nas populações desse estudo e observamos, nos indígenas, um predomínio da infecção em crianças abaixo de 14 anos, com 69,5% delas apresentando anticorpos anti-LANA ou anti-lítico. Pudemos observar, também, soroprevalência de 89,5% entre adultos com idade superior a 20 anos. O fato de 2/3 das crianças abaixo de 14 anos já estarem infectadas pelo HHV-8 nos faz acreditar que a transmissão horizontal, não sexual, foi uma importante via de infecção pelo HHV-8 na população indígena, ao contrário do que ocorreu nas populações não-indígenas. Os estudos realizados por Biggar (2000) e Cunha (2005), em populações indígenas da Amazônia, registram respectivamente soroprevalência de 35% e 41% em crianças abaixo de 10 anos. Tais resultados são semelhantes aos nossos, reforçando a possibilidade de transmissão interpessoal e materno-infantil nessa população. Em alguns países do Mediterrâneo, com altas taxas de SK clássico, a infecção por HHV-8 também pode ocorrer durante a infância e adolescência, sugerindo que a transmissão do vírus possa ocorrer por via não sexual (Calabrò et al., 1998; Whitby et al., 2000). Em áreas endêmicas, como na África, em crianças de 5-10 anos em Camarões, encontra-se taxa de soroprevalência de 39,8% (Rezza et al., 2000). Em Uganda, aproximadamente 50% das crianças antes da puberdade são infectadas pelo HHV-8 (Mayama et al., 1998) reforçando as evidências de que a transmissão possa

ocorrer por contato não sexual. No presente estudo, não foi possível determinar a transmissão perinatal ou vertical, devido ao pequeno número de casos em crianças de baixa idade, já que tivemos apenas quatro crianças na faixa etária de 3 anos, todas com ausência de anticorpos contra HHV-8. Diversos estudos indicam que a transmissão materno-infantil não-vertical possa ocorrer em populações endêmicas e também em crianças nascidas de mãe HIV-positivas. Nestes estudos demonstra-se um aumento na soroprevalência para HHV-8 na infância em relação à idade, enfatizando a importância da transmissão horizontal do vírus. Existe, igualmente, correlação entre a soropositividade para o HHV-8, em crianças, a soropositividade das mães e irmãos e também aquela de indivíduos convivendo com muitas pessoas na mesma casa. Tal fato sugere que a transmissão ocorra, principalmente, por contato interpessoal íntimo e próximo, provavelmente por saliva (Bourboulija et al., 1998; Lyall et al., 1999; Plancoulaine et al., 2003; Dedicoat et al., 2004; Plancoulaine et al., 2004; Mbulaiteye et al., 2006).

O convívio íntimo com a mãe foi muito intenso na população indígena e fortalece a hipótese de transmissão materno-infantil por contato interpessoal, provavelmente pela saliva. Contudo, como nossos achados têm uma circulação restrita em crianças abaixo de 14 anos, e como em nossa população infantil, nas aldeias indígenas, ocorreu intenso contato interpessoal nas várias atividades realizadas nessa comunidade, sejam elas na escola, igreja e em muitas brincadeiras ao ar livre envolvendo atividades que implicam em contaminação com saliva, não se pôde excluir a possibilidade de transmissão horizontal extrafamiliar nessa população.

Com relação à população não indígena, não houve diferença estatística entre as taxas de soroprevalência nas diferentes faixas etárias. Tal fato sugeriu que apenas

a avaliação sorológica para a infecção pelo HHV-8 não foi capaz de identificar a via de transmissão desse agente infeccioso neste grupo populacional.

Nossos resultados de soroprevalência de anticorpos anti-LANA e lítico não mostraram diferença estatística entre os sexos nas duas populações.

Uma vez analisada a soroprevalência da população indígena, passamos a averiguar a presença do vírus em amostras de saliva para podermos entender como ocorreu a disseminação desse agente e tentar elucidar os modos de transmissão. Nosso estudo realizou a PCR direcionada à ORF26 do vírus da região KS330Bam, uma vez que a amplificação desse fragmento de 233bp demonstra ser um produto específico, presente em lesões de SK, mas não em tecidos de pacientes sem SK, conforme descreve Chang et al., (1994) ao identificar esse agente. Foram realizadas PCR em todas as amostras de saliva coletadas no estudo. Todas as amostras extraídas também foram testadas para o gene da beta globina para avaliação da viabilidade do DNA, e excluímos do estudo apenas seis amostras negativas para beta globina e HHV-8, podendo afirmar que tivemos um excelente rendimento em nossa extração. Constatamos que 51 indígenas estavam excretando o vírus pela via oral. Os resultados da PCR na população indígena foram pareados com as sorologias, e registramos que 73,7% (250/339) dos indivíduos incluídos no estudo apresentaram as duas amostras. Verificamos que 96% (47/49) dos indivíduos excretando vírus pela saliva e 77,6% dos que não excretavam apresentaram sorologia positiva para antígenos LANA ou líticos. Dos 47 indivíduos excretadores, com sorologia positiva, 100% tinham anticorpos anti-LANA, mas somente 80,8% tinham anticorpos anti-antígeno lítico. Estes dados sugeriram que a presença de anticorpos anti-LANA poderia estar mais relacionada com a replicação do HHV-8 do que com a presença de

anticorpos anti-antígeno lítico. Por outro lado, detectamos que 23,2% dos indivíduos soropositivos para LANA ou lítico excretavam o vírus pela saliva. Entre os não excretadores do vírus pela saliva, 73,6% foram positivos para anticorpos anti-LANA e 60,1% para anticorpos anti-lítico. Esses dados mostraram que os indivíduos excretadores tinham maior chance de serem soropositivos, talvez devido à constante apresentação de antígenos virais que ocorreu na cavidade bucal. Dessa maneira, podemos inferir que praticamente todos os excretadores eram soropositivos, mas que nem todo soropositivo era excretor. Esta dissociação também foi observada na população não indígena, no qual a excreção salivar foi pesquisada em oito indivíduos soropositivos, e nenhum deles apresentou excreção oral. Por outro lado, a constatação de que 4% dos indivíduos soronegativos estavam excretando o vírus pela saliva, sugeriu que tal fato poderia significar o estabelecimento primário da infecção ou de uma tolerância que o indivíduo obteve pela longa exposição aos antígenos virais. Duus et al. (2004), demonstram a presença do vírus na cavidade oral de indivíduos saudáveis tanto soropositivos como soronegativos. Os estudos realizados por Andreoni et al. (2002) e Casper et al. (2004), também detectam o DNA do HHV-8 em indivíduos soronegativos para HHV-8.

Essa presença de excreção salivar na população indígena confirmou a transmissão horizontal do vírus. Acreditamos que essas crianças foram contaminadas, provavelmente, no ambiente intrafamiliar pelos pais ou irmãos ou por outras crianças excretoras do vírus na saliva. Nossos resultados demonstraram que os homens estavam excretando mais o vírus pela saliva do que as mulheres. Estudos destacam a maior predisposição do sexo masculino a infecções do que as mulheres. O fato de que o sistema imune e fatores hormonais deixam os homens mais

susceptíveis às infecções já está descrito, e o fato de que o vírus estaria se multiplicando mais em indivíduos mais novos talvez fosse explicado por uma infecção mais recente. Dedicoat et al., (2004) descreve, em população hiperendêmica na África do Sul, que maiores taxas de soroprevalência entre as crianças está correlacionada com a carga mais alta de HHV-8 na saliva das mães. Houve em nosso estudo, uma excreção salivar maior, estatisticamente significativa em crianças abaixo de 15 anos, principalmente entre os do sexo masculino, podendo ser um indício de que os meninos fossem fonte importante de vírus nesta aldeia. Podemos também levantar a hipótese de que essas crianças mantiveram um contato maior com as outras crianças da aldeia, enquanto brincavam e frequentavam a escola e igreja, tendo assim um convívio mais próximo com indivíduos da mesma faixa etária do que com os próprios pais, explicando assim a disseminação do vírus nesse grupo. Apesar de não termos encontrado em nossa casuística uma maior excreção em mulheres, acreditamos que a mãe também seria uma importante fonte de transmissão do vírus, pois os filhos, quando pequenos, passam a maior parte da suas vidas em sua presença.

Em decorrência das amostras de saliva ter sido coletada apenas uma vez, e devido à natureza intermitente da excreção viral, é possível que a taxa observada nesse estudo tenha sido subestimada. Além disso, não coletamos amostras de outras possíveis fontes de excreção viral, como secreções genitais, urina ou fezes, embora saibamos que tais fontes possam desempenhar um papel menor quando comparadas com aquele da excreção oral. Sendo assim, a frequência total da excreção do HHV-8 nessa população, embora não conhecida, pode ser mais alta.

Outros estudos realizados na África, diferentemente desse estudo, reportam que o DNA na saliva está associado tanto à soropositividade quanto aos títulos mais altos de anticorpos contra os antígenos líticos. Talvez a diferença se deva ao subtipo viral circulante nessa população, característica de fatores genéticos do hospedeiro da população indígena ou interações vírus-hospedeiro específicas.

Em nosso estudo, ambas as populações apresentaram condições precárias de higiene, não sendo esta uma explicação plausível para uma prevalência excepcionalmente alta de HHV-8, já que outras áreas do mundo também apresentam as mesmas condições ou piores, como citou Biggar et al., 2000.

Como um dos objetivos desse estudo foi avaliar possíveis mecanismos de transmissão do HHV-8, foi necessário pesquisar os marcadores de transmissão já conhecidos e identificados. A maioria desses marcadores é considerada suficientemente específica para certas modalidades de transmissão e mais confiável do que o próprio comportamento relatado, sendo assim utilizada por muitos pesquisadores na falta de informações sobre comportamento de risco. Assim sendo, foram realizados testes sorológicos para determinação da presença de marcadores de infecções transmitidas mediante diferentes mecanismos. Para o vírus da hepatite A, constatamos que as duas populações apresentaram uma alta soroprevalência, refletindo condições bastante precárias de saneamento básico nessa área do rio Trombetas. Por outro lado, o marcador sorológico realizado para o vírus da hepatite C (anti-HCV) não foi detectado em nenhuma das duas populações, enquanto a soroprevalência para a infecção para o vírus da hepatite B foi mais baixa para os indígenas do que a população não indígena. Tal achado sugeriu que as práticas culturais associadas a maior risco de transmissão parenteral, tais como sangria,

escarificação e tatuagem nesse grupo não apresentaram um papel importante na transmissão do HHV-8. Da mesma forma os dados sugeriram que a transmissão via atividade sexual na população indígena, provavelmente, não representou uma rota relevante já que as sorologias para sífilis foram negativas e para o HSV-2 e hepatite B foram baixas.

As relações genéticas entre diferentes cepas virais são importantes para determinar a origem e distribuição geográfica de diferentes subtipos virais, identificarem mecanismos de transmissão e para o desenvolvimento de vacinas (Brown, 1994). Os avanços das técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento genômico, juntamente com estudos filogenéticos, nos permitem realizar estudos mais detalhados de epidemiologia molecular, os quais nos ajudam a melhor compreender a disseminação de agentes infecciosos, como os vírus (McCormack e Clewley, 2002).

Realizamos a caracterização molecular nesse estudo apenas com o intuito de identificar qual o subtipo do vírus que estaria circulando nessa população, não buscando a relação filogenética para estudar a variabilidade evolucionária do HHV8. O sistema de classificação para a subtipagem no presente estudo utilizou a comparação das sequências obtidas da amplificação dos fragmentos VR1 e VR2 da ORF-K1 com os protótipos descritos por Zong et al. (1999). O mesmo método é utilizado por Lacoste et al., 2000 e Cook et al., 2002 em diferentes regiões geográficas do mundo. Confirmamos a classificação dos subtipos de HHV-8 ao construir as árvores filogenéticas para VR1 e VR2, comparando com os vários subtipos descritos e depositados no *GenBank*. Todas as amostras sequenciadas em nosso estudo se enquadraram ao subtipo E, a maioria estava relacionada com os

isolados dos indígenas Huaorani do Equador (Whitby et al., 2004). Estas sequências foram depositadas no *GenBank* e representam a maior série de subtipo E do HHV-8 disponível até o momento. Dessa maneira, confirmamos a presença do subtipo E em populações indígenas, em diferentes grupos linguísticos localizados na região Amazônica.

Concluimos que a infecção pelo HHV-8 foi altamente prevalente nos indígenas, mas não em não indígenas vivendo na mesma região da Amazônia brasileira. Nos indígenas por nós estudados, a infecção pelo HHV-8 foi adquirida principalmente na infância, sugerindo que a transmissão foi horizontal, não-sexual. Entre os indígenas, a excreção do vírus pela saliva foi comum, sendo mais frequente em crianças do sexo masculino, sendo o subtipo E o único encontrado. Fatores que determinam a aquisição e transmissão do HHV-8 em indígenas devem ser mais bem estudados.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

Conclusão geral

Demonstrou-se alta prevalência da infecção pelo HHV-8 na população indígena estudada, quando comparada a uma população não indígena, da Amazônia brasileira. Na população indígena, a alta taxa de infecção na infância e a presença de DNA do HHV-8 em 23% das amostras analisadas, sugere transmissão horizontal do vírus pela saliva.

Conclusões específicas

- 1 A prevalência de infecção pelo HHV-8 em indígenas da Aldeia Mapuera foi alta (79,1%).
- 2 A prevalência de infecção pelo HHV-8 em não indígenas de Cachoeira Porteira foi baixa (6,1%).

3 A excreção salivar do HHV-8 ocorreu em todas as faixas etárias dos indivíduos soropositivos, observando-se uma maior excreção no sexo masculino.

4 Houve forte evidência de transmissão fecal-oral nas duas populações, devido à alta soroprevalência de infecção por HAV.

A transmissão parenteral não parece ser mecanismo importante de transmissão de agentes infecciosos nos indígenas, sugerido pela baixa soroprevalência para a infecção por HBV e HCV.

A baixa prevalência de DST na população indígena, expressa pela baixa soroprevalência para a infecção por HBV, HSV-2 e *T.pallidum*, sugeriu que esse mecanismo de transmissão não é relevante.

5 Todas as amostras submetidas à genotipagem apresentaram o subtipo E do HHV-8.

ANEXOS

Anexo A




Ref.: Carta datada de 17.11.06

Ao

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04.12.06, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **577/02** intitulado **"Prevalência de infecção por herpesvírus sexualmente transmissíveis (HSV-2 e HHV-8) em comunidades ribeirinhas e indígenas da Aldeia Mapuera"**, apresentado pelo Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti contempla o sub-projeto intitulado **"Prevalência de infecção pelo herpesvírus 8 humano e excreção viral em saliva em ameríndios brasileiros e em populações não-indígenas da região do rio Trombetas"**, que será dissertação de mestrado do **SRA. LAURA MASAMI SUMITA**.

São Paulo, 04 de dezembro de 2006.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

REFERÊNCIAS

8 Referências

Ablashi DV, Chatlynne LG, Cooper HC, Thomas DA, Yadav M, Norhanom AW, Chandana AK, Churdboonchart V, Kulpradist SAR, Patnaik M, Liegmann K, Masood R, Reitz M, Cleghorn F, Manns A, Levine PH, Rabkin CS, Biggar R, Jensen F, Gill PS, Jack N, Edwards J, Whitman JE, Boshoff C. Seroprevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean, and Africa. *Br J Cancer*. 1999;81:893-7.

Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:439-64.

Ambroziak JA, Blackbourn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, Lennette ET, Levy JA. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science*. 1995;268:582-3.

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;91:465-9.

Andreoni M, Sarmati L, Nicastrì E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, Bugarini R, Parisi SG, Rezza G. Primary human herpesvirus 8 Infection in immunocompetent children. *JAMA*. 2002;287:1295-300.

Angeloni A, Heston L, Uccini S, Sirianni MC, Cottoni F, Masala MV, Cerimele D, Lin SF, Sun R, Rigsby M, Faggioni A, Miller G. High prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in relatives of patients with classic Kaposi's sarcoma from Sardinia. *J Infect Dis.* 1998;177:1715-8.

Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 2000;342:1027-38.

Atkinson J, Edlin BR, Engels EA, Kral AH, Seal K, Gamache CJ, Whitby D, O'Brien TR. Seroprevalence of human herpesvirus 8 among injection drug users in San Francisco. *J Infect Dis.* 2003;187:974-81.

Baillargeon J, Deng JH, Hettler E, Harrison C, Grady JJ, Korte LG, Alexander J, Montalvo E, Jenson HB, Gao SJ. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors from Texas. *Ann Epidemiol.* 2001;11:512-8.

Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science.* 1999;284:641-4.

Bélec L, Cancré N, Hallouin MC, Morvan J, Si Mohamed A, Grésenguet G. High prevalence in Central Africa of blood donors who are potentially infectious for human herpesvirus 8. *Transfusion.* 1998;38:771-5.

Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet.* 1990;335:123-8.

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

Bigoni B, Dolcetti R, de Lellis L, Carbone A, Boiocchi M, Cassai E, Di Luca D. Human herpesvirus 8 is present in the lymphoid system of healthy persons and can reactivate in the course of AIDS. *J Infect Dis.* 1996;173:542-9.

Blackbourn DJ, Ambroziak J, Lennette E, Adams M, Ramachandran B, Levy JA. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet.* 1997;349:609-11.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis.* 1998;177:213-6.

Blackbourn DJ, Osmond D, Levy JA, Lennette ET. Increased human herpesvirus 8 seroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. *J Infect Dis.* 1999;179:237-9.

Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer N, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Stürzl M. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1997;71:7963-8.

Blauvelt A, Sei S, Cook PM, Schulz TF, Jeang KT. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. *J Infect Dis.* 1997;176:771-4.

Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med.* 1995;1:1274-8.

Boshoff C, Weiss RA. Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond B.* 2001;356:517-34.

Boshoff C. Kaposi virus scores cancer coup. *Nat Med.* 2003;9:261-2.

Bourboulia D, Whitby D, Boshoff C, Newton R, Beral V, Carrara H, Lane A, Sitas F. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *JAMA*. 1998;280:31-2.

Brayfield BP, Kankasa C, West JT, Muyanga J, Bhat G, Klaskala W, Mitchell CD, Wood C. Distribution of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in maternal saliva and breast milk in Zambia: implications for transmission. *J Infect Dis*. 2004;189:2260-70.

Brown AJL. Methods of evolutionary analysis of viral sequence. In: Stephen S. Morse, editors. *The evolutionary biology of viruses*. New York: The Rockefeller University; 1994; p.75-84.

Bubman D, Cesarman E. Pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17:717-45.

Bussab WO, Morettin PA. Estatística básica. 1987; 4th edn. São Paulo: atual.

Calabrò ML, Sheldon J, Favero A, Simpson GR, Fiore JR, Gomes E, Angarano G, Chieco-Bianchi L, Schulz TF. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Hum Virol*. 1998;1:207-213.

Calabrò ML, Fiore JR, Favero A, Lepera A, Saracino A, Angarano G, Schulz TF, Chieco-Bianchi L. Detection of human herpesvirus 8 in cervicovaginal secretions and seroprevalence in human immunodeficiency virus type 1- seropositive and - seronegative women. *J Infect Dis*. 1999;179:1534-7.

Camera Pierrotti L, Masami Sumita L, Santos Freire W, Hehl Caiaffa Filho H, de Souza VA. Detection of human herpesvirus 8 DNA and antibodies to latent nuclear and lytic-phase antigens in serial samples from aids patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Virol*. 2000;16:247-51.

Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, Vlahov D, Pellett PE; HIV Epidemiology Research Study Group. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 2001;344:637-43.

Casper C, Krantz E, Taylor H, Dalessio J, Carrell D, Wald A, Corey L, Ashley R. Assessment of a combined testing strategy for detection of antibodies to human herpesvirus 8 (HHV-8) in persons with Kaposi's sarcoma, persons with asymptomatic HHV-8 infection, and persons at low risk for HHV-8 infection. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3822-5.

Casper C, Redman M, Huang M-L, Pauk J, Lampinen TM, Hawes SE, Critchlow CW, Morrow RA, Corey L, Kiviat N, Wald A. HIV infection and human herpesvirus-8 oral shedding among men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;35:233-38.

Caterino-de-Araujo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1998;177:1136-7.

Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, de los Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1999;179:1591-2.

Caterino-de-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Carbone PH, Cibella SE, Moreira AA. Human herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies in women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:395-401.

Cattani P, Capuano M, Cerimele F, Parola IL, Santangelo R, Masini C, Cerimele D, Fadda G. Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human

immunodeficiency virus-seronegative patients from Central and Southern Italy, with and without Kaposi's Sarcoma. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1150-3.

Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S, Ricci R, Capodicasa N, Fuga L, Amico R, Cherchi G, Gazzilli M, Zanetti S, Fadda G. Age-specific seroprevalence of human herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:274-79.

Chandran B, Smith MS, Koelle DM, Corey L, Horvat R, Goldstein E. Reactivities of human sera with human herpesvirus-8-infected BCBL-1 cells and identification of HHV-8-specific proteins and glycoproteins and the encoding cDNAs. *Virology.* 1998a;243:208-17.

Chandran B, Bloomer C, Chan SR, Zhu L, Goldstein E, Horvat R. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology.* 1998b;249:140-9.

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;266:1865-9.

Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KHSV). *Semin Cancer Biol.* 1999;9:175-85.

Chironna M, Tosatti MA, Di Gangi IM, Sallustio A, Germinario C, Coluzzi M, Quarto M, Chieco-Bianchi L, Calabrò ML. High human herpesvirus 8 seroprevalence in populations from Western Balkan countries. *J Med Virol.* 2006;78:933-37.

Coluzzi M, Calabrò ML, Manno D, Chieco-Bianchi, Schulz TF, Ascoli V. Reduced seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), human

herpesvirus 8 (HHV8), related to suppression of Anopheles density in Italy. *Med Vet Entomol.* 2003;17:461-64.

Cook PM, Whitby D, Calabro ML, Luppi M, Kakoola DN, Hjalgrim H, Ariyoshi K, Ensoli B, Davison AJ, Schulz TF. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. *AIDS.* 1999;13:1165-76.

Cook RD, Hodgson TA, Waugh AC, Molyneux EM, Borgstein E, Sherry A, Teo CG, Porter SR. Mixed patterns of transmission of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families. *J Gen Virol.* 2002;83:1613-9.

Cunha AM, Caterino-de-Araujo A, Costa SC, Santos Fortuna E, Boa Sorte NC, Gonçalves MS, Costa FF, Galvão-Castro B. Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol.* 2005;86:2433-7.

Dedicoat M, Newton R, Alkharsah KR, Sheldon J, Szabados I, Ndlovu B, Page T, Casabonne D, Gilks CF, Cassol SA, Whitby D, Schulz TF. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J Infect Dis.* 2004;190:1068-75.

Di Alberti L, Ngui SL, Porter SR, Speight PM, Scully CM, Zakrewska JM, Williams IG, Artese L, Piattelli A, Teo CG. Presence of human herpesvirus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis.* 1997;175:703-7.

Diamond C, Thiede H, Perdue T, MacKellar D, Valleroy LA, Corey L; Seattle Young Men's Survey Team. Seroepidemiology of human herpesvirus 8 among young men who have sex with men. *Sex Transm Dis.* 2001;28:176-83.

Dilnur P, Katano H, Wang ZH, Osakabe Y, Kudo M, Sata T, Ebihara Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Internat.* 2001;51:845-52.

Du M-Q, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol.* 2007;60:1350-57.

Dukers NH, Rezza G. Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know. *AIDS.* 2003;17:1717-30.

Dukers NH, Renwick N, Prins M, Geskus RB, Schulz TF, Weverling GJ, Coutinho RA, Goudsmit J. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol.* 2000;151:213-24.

Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4546-51.

Duus KM, Lentchitsky V, Wagenaar T, Grose C, Webster-Cyriaque J. Wild-type Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolated from the oropharynx of immune-competent individuals has tropism for cultured oral epithelial cells. *J Virol.* 2004;78:4074-84.

Edelman DC. Human herpesvirus 8 – a novel human pathogen. *Virol J.* 2005;2:78.

Eltom MA, Mbulaiteye SM, Dada AJ, Whitby D, Biggar RJ. Transmission of human herpesvirus 8 by sexual activity among adults in Lagos, Nigeria. *AIDS.* 2002;16:2473-8.

Enbom M, Sheldon J, Lennette E, Schulz T, Ablashi DV, Neipel F, Biberfeld P, Carlberg H, Ljungman P, Nilsson A, Söderström T, Wadström J, Linde A. Antibodies to human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in blood donors and potential high-risk groups in Sweden: variable frequencies found in a multicenter serological study. *J Med Virol.* 2000;62:498-504.

Enbom M, Urassa W, Massambu C, Thorstensson R, Mhalu F, Linde A. Detection of human herpesvirus 8 DNA in serum from blood donors with HHV-8 antibodies indicates possible bloodborne virus transmission. *J Med Virol.* 2002;68:264-7.

Engels EA, Eastman H, Ablashi DV, Wilks RJ, Braham J, Manns A. Risk of transfusion-associated transmission of human herpesvirus 8. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1773-5.

Engels EA, Sinclair MD, Biggar RJ, Whitby D, Ebbesen P, Goedert JJ, Gastwirth JL. Latent class analysis of human herpesvirus 8 assay performance and infection prevalence in sub-Saharan Africa and Malta. *Int J Cancer.* 2000;88:1003-8.

Engels EA, Clark E, Aledort LM, Goedert JJ, Whitby D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in elderly Jews and non-Jews from New York City. *Int J Epidemiol.* 2002;31:946-50.

Engels EA, Biggar RJ, Marshall VA, Walters MA, Gamache CJ, Whitby D, Goedert JJ. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS.* 2003;17:1847-51.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-791.

Freitas RB, Freitas MR, Linhares AC. Prevalence of human herpesvirus 8 antibodies in the population of Bélem, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002;44:309-13.

Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Tadokoro K, Juji T, Iwamoto A. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol.* 1999;57:159-62.

Gambús G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, Sirera G, Muga R, del Romero J, Boshoff C, Whitby D, Casabona J. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *AIDS.* 2001;15:1167-74.

Gandhi M, Koelle DM, Ameli N, Bacchetti P, Greenspan JS, Navazesh M, Anastos K, Greenblatt RM. Prevalence of human herpesvirus-8 salivary shedding in HIV increases with CD4 count. *J Dent Res.* 2004;83:639-43.

Ganem D. KSHV Infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:273-96.

Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Preston P, Chang Y, Moore PS. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 1996;335:233-41.

Gessain A, Maucière P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayouba A, Essame-Oyono JL, Martin PM, de Thé G. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer.* 1999;81:189-92.

Gnann JW Jr, Pellett PE, Jaffe HW. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2000;30:S72-6.

Goedert JJ, Kedes DH, Ganem D. Antibodies to human herpesvirus 8 in women and infants born in Haiti and the USA. *Lancet.* 1997;349:1368.

Greenblatt RM, Jacobson LP, Levine AM, Melnick S, Anastos K, Cohen M, DeHovitz J, Young MA, Burns D, Miotti P, Koelle DM. Human herpesvirus 8 infection and Kaposi's sarcoma among human immunodeficiency virus-infected and -uninfected women. *J Infect Dis.* 2001;183:1130-4.

Grulich AE, Kaldor JM, Hendry O, Luo K, Bodsworth NJ, Cooper DA. Risk of Kaposi's sarcoma and oroanal sexual contact. *Am J Epidemiol.* 1997;145:673-9.

Grulich AE, Cunningham P, Munier ML, Prestage G, Amin J, Ringland C, Whitby D, Kippax S, Kaldor JM, Rawlinson W. Sexual behaviour and human herpesvirus 8 infection in homosexual men in Australia. *Sex Health.* 2005;2:13-8.

Hayward GS, KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Sem Can Biol.* 1999;9:187-99.

He F, Wang X, He B, Feng Z, Lu X, Zhang Y, Zhao S, Lin R, Hui Y, Bao Y, Zhang Z, Wen H. Human herpesvirus 8: seroprevalence and correlates in tumor patients from Xinjiang, China. *J Med Virol.* 2007;79:161-6.

Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:281-92.

Howard MR, Whitby D, Bahadur G, Suggett F, Boshoff C, Tenant FM, Schulz TF, Kirk S, Mathews S, Weller I, Tedder RS, Weiss RA. Detection of human herpesvirus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. *AIDS.* 1997;11:F15-9.

Huang LM, Huang SY, Chen MY, Chao MF, Lu CY, Tien HF, Lee CY, Jeang KT. Geographical differences in human herpesvirus 8 seroepidemiology: a survey of 1,201 individuals in Asia. *J Med Virol.* 2000;60:290-93.

Hudnall SD, Chen T, Rady P, Tyring S, Allison P. Human herpesvirus 8 seroprevalence and viral load in healthy adult blood donors. *Transfusion*. 2003;43:85-90.

Ishak MO, Martins RN, Machado PR, de Souza LL, Machado LF, Azevedo VN, Katano H, Sata T, Hasegawa H, Vallinoto AC, Ishak R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: evidence of an ancient human infection. *J Med Virol*. 2007;79:1537-44.

Jenner RG, Boshoff C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602:1-22.

Juhász A, Remenyik E, Kónya J, Veress G, Bégany A, Andirkó I, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L. Prevalence and age distribution of human herpesvirus-8 specific antibodies in Hungarian blood donors. *J Med Virol*. 2001;64:526-30.

Kajumbula H, Wallace RG, Zong J-C, Hokello J, Sussman N, Simms S, Rockwell RF, Pozos R, Hayward GS, Boto W. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology*. 2006;49:133-43.

Kazanji M, Dussart P, Duprez R, Tortevoeye P, Pouliquen JF, Vandekerkhove J, Couppié P, Morvan J, Talarmin A, Gessain A. Serological and molecular evidence that human herpesvirus 8 is endemic among Amerindians in French Guiana. *J Infect Dis*. 2005;192:1525-9.

Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med*. 1996;2:918.

Klaskala W, Brayfield BP, Kankasa C, Bhat G, West JT, Mitchell CD, Wood C. Epidemiological characteristics of human herpesvirus-8 Infection in a large population of antenatal women in Zambia. *J Med Virol.* 2005;75:93-100.

Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis.* 1997;176:94-102.

Lacoste V, Judde J-G, Brière J, Tulliez M, Garin B, Kassa-Kelembho E, Morvan J, Couppié P, Clyti E, Vila JF, Rio B, Delmer A, Mauclère P, Gessain A. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in Africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 Loci, are frequent and widespread. *Virology.* 2000;278:60-74.

Lacoste V, Fuente C, Kashanchi F, Pumfery A. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immediate early gene activity. *Frontiers in Bioscience.* 2004;9:2245-2272.

LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz BJ. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infect Dis.* 1998;178:1610-5.

Lampinen TM, Kulasingam S, Min J, Borok M, Gwanzura L, Lamb J, Mahomed K, Woelk GB, Strand KB, Bosch ML, Edelman DC, Constantine NT, Katzenstein D, Williams MA. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oral and genital secretions of Zimbabwean women. *J Infect Dis.* 2000;181:1785-90.

Lavreys L, Chohan B, Ashley R, Richardson BA, Corey L, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK. Human herpesvirus 8: seroprevalence and correlates in prostitutes in Mombasa, Kenya. *J Infect Dis.* 2003;187:359-63.

Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet*. 1996;348:858-61.

Lin JC, Lin SC, Mar EC, Pellett PE, Stamey FR, Stewart JA, Spira TJ. Is Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men? *Lancet*. 1995;346:1601-2.

Lin SF, Sun R, Heston L, Gradoville L, Shedd D, Haglund K, Rigsby M, Miller G. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol*. 1997;71:3069-76.

Luppi M, Barozzi P, Guaraldi G, Ravazzini L, Rasini V, Spano C, Riva G, Vallerini D, Pinna AD, Torelli G. Human herpesvirus 8-associated diseases in solid-organ transplantation: importance of viral transmission from the donor. *Clin Infect Dis*. 2003;37:606-7.

Lyall EG, Patton GS, Sheldon J, Stainsby C, Mullen J, O'Shea S, Smith NA, De Ruiter A, McClure MO, Schulz TF. Evidence for horizontal and not vertical transmission of human herpesvirus 8 in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;19:795-9.

Machado DM, Sumita LM, Pannuti CS, Succi RC, Moraes-Pinto MI, Souza VA. Seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in children born to HIV-1-infected women in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:237-40.

Marcelin AG, Gorin I, Morand P, Ait-Arkoub Z, Deleuze J, Morini JP, Calvez V, Dupin N. Quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in blood, oral mucosa, and saliva in patients with Kaposi's sarcoma. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:704-8.

Marchioli CC, Love JL, Abbott LZ, Huang YQ, Remick SC, Surtento-Reodica N, Hutchison RE, Mildvan D, Friedman-Kien AE, Poiesz BJ. Prevalence of human

herpesvirus 8 DNA sequences in several patient populations. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2635-8.

Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med.* 1998;338:948-54.

Martin JN, Osmond DH. Invited commentary: determining specific sexual practices associated with human herpesvirus 8 transmission. *Am J Epidemiol.* 2000;151:225-9.

Martró E, Bulterys M, Stewart JA, Spira TJ, Cannon MJ, Thacher TD, Bruns R, Pellett PE, Dollard SC. Comparison of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr Virus seropositivity among children in areas endemic and non-endemic for Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2004;72:126-31.

Martró E, Esteve A, Schulz TF, Sheldon J, Gambús G, Muñoz R, Whitby D, Casabona J; Euro-Shaks study group. Risk factors for human herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicentre study. *Int J Cancer.* 2006;120:1129-35.

Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer.* 1998;77:817-20.

Mbulaiteye SM, Pfeiffer RM, Whitby D, Brubaker GR, Shao J, Biggar RJ. Human herpesvirus 8 infection within families in rural Tanzania. *J Infect Dis.* 2003;187:1780-5.

Mbulaiteye SM, Biggar RJ. Saliva and the transmission of human herpesvirus 8: potential role of promoter-arthropod bites. *J Infect Dis.* 2004a;190:200-1.

Mbulaiteye SM, Pfeiffer RM, Engels EA, Marshall V, Bakaki PM, Owor AM, Ndugwa CM, Katongole-Mbidde, Goedert JJ, Biggar RJ, Whitby D. Detection of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus DNA in saliva and buffy-coat samples from children with sickle cell disease in Uganda. *J Infect Dis.* 2004b;190:1382-6.

Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Pfeiffer RM, Bakaki PM, Gamache C, Owor AM, Katongole-Mbidde E, Ndugwa CM, Goedert JJ, Whitby D, Engels EA. Water, socioeconomic factors, and human herpesvirus 8 infection in Ugandan children and their mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;38:474-9.

Mbulaiteye S, Marshall V, Bagni RK, Wang CD, Mbisa G, Bakaki PM, Owor AM, Ndugwa CM, Engels EA, Katongole-Mbidde E, Biggar RJ, Whitby D. Molecular evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in Uganda and K1 gene evolution within the host. *J Infect Dis.* 2006;193:1250-7.

Mbulaiteye SM, Goedert JJ. Transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in sub-Saharan Africa. *AIDS.* 2008;22:535-7.

McCormack GP, Clewley JP. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. *Rev Med Virol.* 2002;12(4): 221-38.

Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, Ebbesen P, Schulz TF. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer.* 1998;77:543-8.

Meng YX, Spira TJ, Bhat GJ, Birch CJ, Druce JD, Edlin BR, Edwards R, Gunthel C, Newton R, Stamey FR, Wood C, Pellett PE. Individuals from North America, Australasia and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology.* 1999;261:106-19.

Mohanna S, Maco V, Bravo F, Gotuzzo E. Epidemiology and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma, seroprevalence, and variants of human herpesvirus 8 in South America: A critical review of an old disease. *Int J Infect Dis.* 2005;9:239-50.

Mohanna S, Portillo JA, Carriquiry G, Vidal J, Ferrufino JC, Sanches J, Bravo F, Gotuzzo E. Human herpesvirus-8 in Peruvian blood donors: a population with hyperendemic disease? *Clin Infect Dis.* 2007;44:558-61.

Monini P, de Lellis L, Fabris M, Rigolin F, Cassai E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med.* 1996;334:1168-72.

Moore PS. The emergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *N Engl J Med.* 2000;343:1411-13.

Moore PS, Chang Y. Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2001;356:499-516.

Moore PS. Transplanting cancer: donor-cell transmission of Kaposi sarcoma. *Nat Med.* 2003; 9:506-8.

Nascimento MC, Wilder N, Pannuti CS, Weiss HA, Mayaud P. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2005; 33:52-9.

Nascimento MC, de Souza VA, Sumita LM, Freire W, Munoz F, Kim J, Pannuti CS, Mayaud P. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:715-20.

Nascimento MC, de Souza VA, Sumita LM, Freire W, Weiss HA, Sabino EC, Franceschi S, Pannuti CS, Mayaud P. Prevalence of, and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. *J Med Virol.* 2008;80:1202-210.

Newton R, Ziegler J, Bourbouli D, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, Carpenter L, Reeves G, Parkin DM, Wabinga H, Mbulaiteye S, Jaffe H, Weiss R, Boshoff C; Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. The sero-epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in adults with cancer in Uganda. *Int J Cancer.* 2003;103:226-32.

Nicholas J, Zong JC, Alcendor DJ, Ciuffo DM, Poole LJ, Sarisky RT, Chiou CJ, Zhang X, Wan X, Guo HG, Reitz MS, Hayward GS. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998;23:79-88.

O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, Goedert JJ. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis.* 1999;180:1010-7.

Olsen SJ, Chang Y, Moore PS, Biggar RJ, Melbye M. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. *AIDS.* 1998;12:1921-5.

Parravicini C, Olsen SJ, Capra M, Poli F, Sirchia G, Gao SJ, Berti E, Nocera A, Rossi E, Bestetti G, Pizzuto M, Galli M, Moroni M, Moore PS, Corbellino M. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood.* 1997;90:2826-9.

Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, Celum C, Selke S, Corey L. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*. 2000;343:1369-77.

Pellett PE, Spira TJ, Bagasra O, Boshoff C, Corey L, de Lellis L, Huang ML, Lin JC, Matthews S, Monini P, Rimessi P, Sosa C, Wood C, Stewart JA. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 8 DNA in semen. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1298-301.

Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, Glynn SA, Goedert JJ, Jenkins FJ, Lee TH, Neipel F, Todd DS, Whitby D, Nemo GJ, Busch MP; Retrovirus Epidemiology Donor Study. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion*. 2003;43:1260-8.

Pérez C, Tous M, Gallego S, Zala N, Rabinovich O, Garbiero S, Martínez MJ, Cunha AM, Camino S, Cámara A, Costa SC, Larrondo M, Francalancia V, Landreau F, Bartomioli MA. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in blood donors from different geographical regions of Argentina, Brazil, and Chile. *J Med Virol*. 2004;72:661-7.

Perna AM, Bonura F, Vitale F, Viviano E, Di Benedetto MA, Ajello F, Villafrate MR, Prestileo T, Mancuso S, Goedert JJ, Romano N. Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. *Int J Epidemiol*. 2000;29:175-9.

Pica F, Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:152-6.

Pierrotti LC, Etzel A, Sumita LM, Braga PE, Eluf-Neto J, de Souza VA, Segurado AA. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. *Sex Transm Dis*. 2005;32:57-63.

Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Trégouët DA, Joubert M, Tortevoeye P, de Thé G, Gessain A. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet*. 2000;356:1062-5.

Plancoulaine S, Abel L, Van Beveren M, Gessain A. High titers of anti-human herpesvirus 8 antibodies in elderly males in an endemic population. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1333-5.

Plancoulaine S, Gessain A, Van Beveren M, Tortevoeye P, Abel L. Evidence for a recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis* 2003;187:1944-50.

Plancoulaine S, Abel L, Trégouët D, Duprez R, van Beveren M, Tortevoeye P, Froment A, Gessain A. Respective roles of serological status and blood specific antihuman herpesvirus 8 antibody levels in human herpesvirus 8 intrafamilial transmission in a highly endemic area. *Cancer Res*. 2004;62:8782-87.

Poole LJ, Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Cannon JS, Ambinder R, Orenstein JM, Reitz MS, Hayward GS. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J Virol*. 1999;73: 6646-60.

Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14:817-8.

Preiser W, Szép NI, Lang D, Doerr HW, Rabenau HF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence in selected German patients: evaluation by different test systems. *Med Microbiol Immunol*. 2001;190:121-7.

Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI, Chatlynne L, Biggar RJ. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis.* 1998;178:304-9.

Regamey N, Tamm M, Wernli M, Witschi A, Thiel G, Cathomas G, Erb P. Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med.* 1998;339:1358-1363.

Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol.* 1996a:8151-54.

Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med.* 1996b; 2:342-346.

Rezza G, Lennette ET, Giuliani M, Pezzotti P, Caprilli F, Monini P, Buttò S, Lodi G, Di Carlo A, Levy JA, Ensoli B. Prevalence and determinants of anti-lytic and anti-latent antibodies to human herpesvirus-8 among Italian individuals at risk of sexually and parenterally transmitted infections. *Int J Cancer.* 1998;77:361-5.

Rezza G, Tchangmena OB, Andreoni M, Bugarini R, Toma L, Bakary DK, Glikoutou M, Sarmati L, Monini P, Pezzotti P, Ensoli B. Prevalence and risk factors for human herpesvirus 8 infection in Northern Cameroon. *Sex Transm Dis.* 2000;27:159-64.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14862-7.

Said W, Chien K, Tasaka T, Koeffler HP. Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma

lesions: electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV). *J Pathol.* 1997;182:273-281.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-4.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25.

Sarid R, Wiezorek JS, Moore PS, Chang Y. Characterization and cell cycle regulation of the major Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) latent genes and their promoter. *J Virol.* 1999;73:1438-46.

Sarmati L. Serological testing for human herpesvirus 8. *Herpes.* 2001;8:76-9.

Satoh M, Toma H, Sato Y, Futenma C, Kiyuna S, Shiroma Y, Kokaze A, Sakurada S, Sata T, Katano H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2001;54:125-6.

Schulz TF. KSHV (HHV8) infection. *J Infect.* 2000;41:125-9.

Serraino D, Toma L, Andreoni M, Butto S, Tchangmena O, Sarmati L, Monini P, Franceschi S, Ensoli B, Rezza G. A seroprevalence study of human herpesvirus type 8 (HHV8) in eastern and Central Africa and in the Mediterranean area. *Eur J Epidemiol.* 2001;17:871-76.

Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet.* 1996;348:1133-8.

Sitas F, Carrara H, Beral V, Newton R, Reeves G, Bull D, Pacella-Norman R, Bourbouliia D, Whitby D, Boshoff C, Weiss R. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. *N Engl J Med.* 1999;340:1863-71.

Sitas F, Newton R. Kaposi's sarcoma in South Africa. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;28:1-4.

Smith NA, Sabin CA, Gopal R, Bourbouliia D, Labbet W, Boshoff C, Barlow D, Band B, Peters BS, Ruitter A, Brown DWG, Weiss RA, Best JM, Whitby D. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis.* 1999;180:600-6.

Sosa C, Benetucci J, Hanna C, Sieczkowski L, Deluchi G, Canizal AM, Mantina H, Klaskala W, Baum M, Wood C. Human herpesvirus 8 can be transmitted through blood in drug addicts. *Medicine, B Aires.* 2001;61:291-4.

Souza VA, Sumita LM, Freire WS, Sato HK, Grandi JL, Pierrotti LC, Nascimento MC, Pannuti CS. Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in São Paulo State. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:123-7.

Souza VA, Pierrotti LC, Sumita LM, Freire WS, Segurado AA, Pannuti CS. Seroreactivity to Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus (human herpesvirus 8) latent nuclear antigen in AIDS-associated Kaposi's sarcoma patients depends on CD4+T-cell count. *J Med Virol.* 2007;79:1562-8.

Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng YX, Pau CP, Black JB, Burns D, Cooper B, Hamid M, Huong J, Kite-Powell K, Pellett PE. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2174-80.

Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson D J, Ganem D, Haase AT. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *Journal of Virology*. 1997;71:715-719.

Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ. Phylogenetic inference. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1996

Tanzi E, Zappa A, Caramaschi F, Amendola A, Lasagna D, Gatti L, Ascoli V, Rezza G, Zanetti AR. Human herpesvirus type 8 infection in an area of Northern Italy with high incidence of classical Kaposi's sarcoma. *J Medl Virol*. 2005;76:571-5.

Taylor MM, Chohan B, Lavreys L, Hassan W, Huang ML, Corey L, Ashley Morrow R, Richardson BA, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Kreiss J. Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and-seronegative Kenyan women. *J Infect Dis*. 2004;190:484-8.

Tedeschi R, Caggiari L, Silins I, Kallings I, Andersson-Ellström A, De Paoli P, Dillner J. Seropositivity to human herpesvirus 8 in relation to sexual history and risk of sexually transmitted infections among women. *Int J Cancer*. 2000;87:232-5.

Tedeschi R, Dillner J, De Paoli P. Laboratory diagnosis of human herpesvirus 8 infection in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:831-44.

Teo CG. Conceptual emergence of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) as an oral herpesvirus. *Adv Dent Res*. 2006;19:85-90.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:4876-82.

Verma SC, Robertson ES. Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus . *FEMS Microbiol Lett.* 2003;222:155-163.

Vieira J, Huang ML, Koelle DM, Corey L. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 1997;71:7083-7.

Vitale F, Viviano E, Perna AM, Bonura F, Mazzola G, Ajello F, Romano N. Serological and virological evidence of non-sexual transmission of human herpesvirus type 8 (HHV8). *Epidemiol Infect.* 2000;125:671-5.

Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, Hatzioannou T, Suggett FE, Aldam DM, Denton AS, Miller RF, Weller IV, Weiss RA, Tedder RS, Schulz TF. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 1995;346:799.

Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:395-7.

Whitby D, Smith NA, Matthews S, O'Shea S, Sabin CA, Kulasegaram R, Boshoff C, Weiss RA, de Ruiter A, Best JM. Human herpesvirus 8: seroepidemiology among women and detection in the genital tract of seropositive women. *J Infect Dis.* 1999;179:234-6.

Whitby D, Luppi M, Sabin P, Barozzi P, DI Biase AR, Balli F, Cucci F, Weiss RA, Boshoff C, Torelli G. Detection of antibodies to human herpesvirus 8 in Italian children: evidence for horizontal transmission. *Br J Cancer.* 2000;82:702-4.

Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated

herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol.* 2004;8:155-63.

Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Miley WJ, McCloud TG, Hines-Boykin R, Goedert JJ, Conde BA, Nagashima K, Mikovits J, Dittmer DP, Newman DJ. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by natural products from Kaposi's sarcoma endemic regions. *Int J Cancer.* 2006;120:321-8.

Zago A, Bourboulia D, Viana MC, Collandre H, Dietze R, Boshoff C, Keller R. Seroprevalence of human herpesvirus 8 and its association with Kaposi sarcoma in Brazil. *Sex Transm Dis.* 2000;27:468-72.

Zharkikh A, Li WH. Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. *Mol Phylogenet Evol.* 1995;4:44-63.

Ziegler JL, Katongole-Mbidde E. Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int J Cancer.* 1996;65:200-3.

Zong JC, Metroka C, Reitz MS, Nicholas J, Hayward GC. Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J Virol.* 1997;71:2505-11.

Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PL, Tyring SK, Orenstein JM, Rabkin CS, Su IJ, Powell KF, Croxson M, Foreman KE, Nickoloff BJ, Alkan S, Hayward GS. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol.* 1999;73:4156-70.

Zong J, Ciufu DM, Viscidi R, Alagiozoglou L, Tyring S, Rady P, Orenstein J, Boto W, Kalumbuja H, Romano N, Melbye M, Kang GH, Boshoff C, Hayward GS. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J Clin Virol.* 2002;23:119-48.