

## **Casuística, Material e Métodos**

### **Casuística**

Foi realizada a pesquisa de infecção por HHV-8 em amostras biológicas de pacientes com SK e controles sadios ou infectados pelo HIV/aids, com vistas a identificar fluidos potencialmente infectantes. O presente trabalho apresenta um estudo de corte transversal de pacientes que procuraram o serviço médico do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). Foram utilizadas: a pesquisa de segmentos do genoma de HHV-8 (*ORF K1*, *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73*) em material de biópsia de lesão de SK, células do sangue periférico, saliva e urina e a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 no soro.

O estudo foi conduzido utilizando material de biópsia, sangue, saliva e urina de 76 pacientes com sarcoma de Kaposi com lesão de mucosa, pele, vísceras ou disseminado, HIV-1 soropositivo ou com aids (grupo SK/aids), em acompanhamento clínico-laboratorial no IIER, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2003. Quatro pacientes com SK, HIV-1 soronegativos (grupo SK clássico) foram analisados separadamente.

Ainda, 19 pacientes HIV-1 soropositivos sem SK, virgens de terapia antiretroviral (ARV) em acompanhamento no IIER e 11 indivíduos sadios, HIV-1 soronegativos funcionários da Seção de Imunologia do IAL, tiveram as respectivas amostras de sangue, saliva e urina coletadas e usadas como grupos controle: HIV/aids, controle sadio (CS).

Os pacientes foram submetidos a anamnese, exame clínico geral e todos os prontuários médicos foram consultados no intuito de se obter informações sobre os dados demográficos, clínicos e laboratoriais (Quadros A a C, Apêndice).

Todos os pacientes e indivíduos do grupo controle assinaram o consentimento pós-informado para a realização da pesquisa (modelo pré-estabelecido e aprovado pelo Comitê de Ética do IIER, IAL e FCF-USP), em que constam detalhes sobre os objetivos e a finalidade do material a ser colhido (Consentimento Pós-Informado em Anexo). Após o exame clínico geral e

preenchimento do consentimento pós-informado, os pacientes e os indivíduos do grupo controle tiveram seus materiais biológicos colhidos e encaminhados imediatamente para a Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sob refrigeração, para análise.

Parte da presente casuística foi anteriormente utilizada na Tese de Doutorado de Eliana Rodrigues (RODRIGUES, 2000), durante o Programa de Pós-Doutorado no Exterior de Adele Caterino de Araujo (FAPESP # 98/13315-8) e na Dissertação de Mestrado de Abdiel Aparecido Moreira (MOREIRA, 2003).

Assim, resumidamente, a casuística do presente estudo foi composta por:

- ✓ 76 pacientes com SK-aids
- ✓ 4 pacientes com SK clássico
- ✓ 19 pacientes HIV-aids
- ✓ 11 indivíduos sadios (CS)

## **Material e Métodos**

### **Preparo das amostras de biópsia para extração de DNA**

Os materiais obtidos de biópsias secos e congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram colocados em placas de cultura celular estéreis de 6 orifícios e, posteriormente, foram cortados com auxílio de lâmina de barbear de modo a se obter o maior número de fragmentos possível.

Os fragmentos foram recuperados em  $1.000\text{ }\mu\text{L}$  de solução fisiológica com auxílio de pipeta automática e transferidos para tubos cônicos. Estes tubos foram submetidos a centrifugação a  $2.300\text{ g}$  por  $5\text{ min.}$ , a temperatura ambiente, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento de células utilizado para a extração de DNA.

## **Sangue**

### **Separação do soro para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8**

Sangue venoso colhido em tubo seco foi utilizado para a separação do soro dos demais componentes do sangue. O tubo com o sangue foi deixado em repouso e após a retração do coágulo, foi separada a fase fluida e transferida para um tubo cônico e submetida a centrifugação a 650 g. O soro foi coletado e estocado a -20 °C.

### **Separação dos leucócitos do sangue periférico para extração de DNA**

Sangue venoso colhido em tubo com EDTA foi utilizado para a separação dos leucócitos do sangue periférico. O tubo com o sangue foi deixado em repouso e após a sedimentação das hemácias, a fase fluída foi separada e transferida para um tubo cônico e submetida a centrifugação a 650 g. O plasma foi coletado e estocado a -20 °C e o sedimento celular foi submetido a choque hipotônico com 6 mL de água destilada gelada (livre de DNase e RNase) por um minuto (min.) para a lise das hemácias. A isotonicidade foi recuperada após o acréscimo de 2 mL de solução de NaCl 3,6 %. O material foi novamente submetido a centrifugação a 650 g por 10 min. O sedimento celular foi transferido para tubo cônico, lavado com solução fisiológica por centrifugação a 1.300 g por 5 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi congelado e estocado durante o período máximo de 3 meses em freezer – 70 °C até a extração de DNA.

### **Separação do sedimento de saliva e urina para extração de DNA**

Saliva (de preferência a primeira da manhã, aproximadamente um volume de 3 mL) e urina (de preferência a primeira da manhã ou após 3 horas da última micção, aproximadamente um volume de 10 mL) foram coletadas em frascos

novos e estéreis; o volume obtido foi rapidamente transferido para tubos cônicos e submetidos a centrifugação a 2.300 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e estocado em tubo estéril a  $-20^{\circ}\text{C}$  e o sedimento congelado e estocado durante o período máximo de 3 meses em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA.

### **Extração de DNA**

Às células obtidas de material de biópsias, sangue periférico, saliva e urina foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise contendo TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0; EDTA 0,025 M; SDS 0,5% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) na concentração final de 0,1mg/mL e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15-18 h para solubilização e digestão das proteínas. Posteriormente, esta mistura foi aquecida a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min. para inativar a proteinase K.

O produto da digestão celular foi acrescido de igual volume de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) na razão 25:24:1 e mantido sob agitação constante por 5 min. a temperatura ambiente. Nesta etapa os solventes orgânicos extraíram as proteínas degradadas e esta emulsão foi centrifugada a 55.000 g por 10 min.

Foram obtidas duas fases: uma aquosa contendo DNA e outra orgânica. A fase aquosa superior foi recuperada e à ela foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

O produto obtido foi novamente submetido a agitação constante por 5 min. a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado a 55.000 g por 10 min. Assim, todo o fenol foi retirado e a fase aquosa contendo DNA foi recuperada e o DNA foi precipitado com a adição de acetato de sódio 3 M, pH 5,0 (1/20 do volume final) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e etanol absoluto (1.000  $\mu\text{L}$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Nesta etapa, invertendo-se o tubo delicadamente foi observada a formação de fio de DNA.

A solução contendo DNA foi mantida a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 min. (para precipitação total do DNA) e centrifugada a 55.000 g por 60 min. a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), por centrifugação a 55.000 g, por 30 min. a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Depois de retirado o sobrenadante, o DNA foi seco a temperatura ambiente e finalmente ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE (TRIS-HCl 10 mM, pH8,0; EDTA 1mM, pH 8,0) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) ou água DEPC (dietilpirocarbonato) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA).

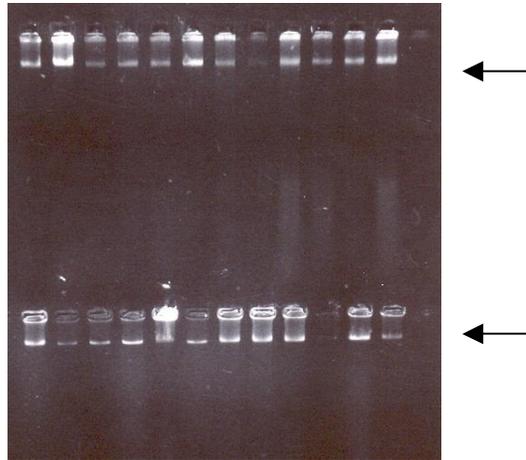
Para dissolver o DNA foi necessário mantê-lo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos 18-24 h antes da determinação de sua qualidade e concentração.

### **Controle da qualidade do DNA mediante eletroforese em gel de agarose**

Para controle da qualidade do DNA extraído, uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  foi dissolvida em 6  $\mu\text{L}$  de água e 2  $\mu\text{L}$  de corante orange G (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) [4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  preparado em glicerol/água (v/v)] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). O DNA a ser analisado foi aplicado ao gel de agarose preparado a 1,2 % em tampão TBE (TRIS-base; ácido bórico; EDTA 0,001 M, pH 8,0) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

A corrida eletroforética foi processada em cuba horizontal contendo tampão TBE, numa diferença de potencial de 6 Volts/cm do gel. Ao final da corrida o gel foi corado em tampão TBE acrescido de brometo de etídeo (EtBr) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) preparado na concentração de 10mg/mL. Após a coloração o gel foi colocado sob transiluminador UV (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e uma banda laranja próxima ao local de aplicação do DNA indicou a presença de DNA de alto PM, ou seja, de boa qualidade, enquanto que uma fluorescência em direção anódica difusa indicou degradação de DNA.

Esses materiais foram quantificados quanto ao teor protéico e de DNA e, posteriormente, foram diluídos em tampão TE ou água DEPC para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}$  de DNA/10 $\mu\text{L}$ .



**Figura V.** Amostras representativas do rendimento de DNA obtido de diferentes espécimes biológicos, com a técnica de extração com fenol/clorofórmio, quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2%. As setas indicam a posição do DNA.

#### **Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA**

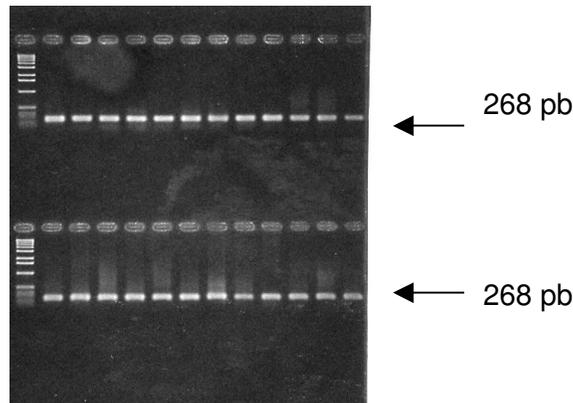
As diluições de DNA (1:200 e 1:400) foram colocadas em cubas de espectrofotômetro e as concentrações de DNA e de proteínas foram lidas quanto à densidade óptica (D.O.) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) 260 e 280 nm, respectivamente. Sabendo-se que 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA resulta em D.O. igual a 1 (um), foi determinada a concentração de DNA das amostras a serem analisadas.

Quando a relação entre os valores das D.O obtidas a 260 e 280 nm era entre 1,6 e 1,8 significou DNA de boa qualidade. Os valores maiores que 1,8, indicaram contaminação com RNA e os valores menores que 1,6 a contaminação com proteínas.

#### **Controle da qualidade do DNA pela amplificação de segmento do gene da beta-globina humana**

As amostras de DNA que resultaram negativas em todos os ensaios de PCRs para a pesquisa de segmentos do genoma de HHV-8 foram submetidas a PCR para amplificação de beta-globina humana segundo o protocolo de SAIKI *et*

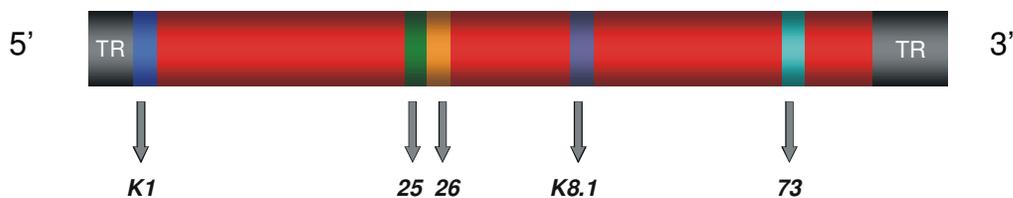
al., 1985. O volume final da mistura de reação foi de 25  $\mu$ L e composta por 1x PCR buffer, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,175 mM de cada dNTP, 1 pmol de cada "primer", 1 Unidade de *Taq* polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) por reação e 200 ng de DNA alvo.



**Figura VI.** Amostras representativas do padrão eletroforético de produtos de PCR de beta-globina humana (banda de 268 pb) em gel de agarose a 2,0%. Marcador de peso molecular (PM) (DNA Ladder 1Kb, Invitrogen, Life Technologies, Ca, USA).

### **Pesquisa de segmentos do genoma de HHV-8 em diferentes espécimes biológicos**

Foram utilizadas as técnicas de PCR e PCR "nested" para a pesquisa de segmentos da *ORF K1*, *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73* do genoma de HHV-8 nas amostras de DNA extraídas de material de biópsia, sangue, saliva e urina. Estas *ORFs* foram escolhidas pela sua localização no genoma viral e por codificarem proteínas relacionadas a componentes expressos nas fases latente e lítica de replicação viral (Figura VII e Quadro II).



**Figura VII.**— Localização das *ORFs K1*, *25*, *26*, *K8.1* e *73* no genoma de HHV-8

**Quadro II** – Descrição das proteínas codificadas pelos genes *ORF K1*, *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73* de HHV-8.

Gene do HHV-8	Proteína do HHV-8	Expressão	Localização
<i>ORF K1</i>	gp46 KDa	Células líticas	Proteína de transmembrana
<i>ORF 25</i>		Células líticas	Principal proteína de capsídeo
<i>ORF 26</i>	P 34 KDa	Células líticas	Menor proteína de capsídeo
<i>ORF K8.1</i>	gp 35-37KDa	Células líticas	Glicoproteína de membrana
<i>ORF 73</i>	Ag LANA(220-234 KDa)	Células latentes	Epissoma viral

Para amplificação dessas regiões do genoma do HHV-8 foram utilizados os protocolos padronizados no Public Health Laboratory Service/Hepatitis and Retrovirus Laboratory (PHLS/HRL) durante o Programa de Pós-Doutorado no Exterior da pesquisadora científica Adele Caterino de Araujo (FAPESP 98#13313-8), conforme descrição a seguir.

Para amplificar a *ORF 26* e a *ORF 25* foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes, dois ciclos de PCR (PCR e PCR "nested"), em volume final de reação de 25 µL. A mistura de reação foi composta por 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 0,8 pmol de cada "primer", 1 Unidade de *Taq* polimerase e 500 ng de DNA por reação.

Para amplificar a *ORF K1*, *ORF K8.1* e *ORF 73* o volume final da mistura de reação foi de 50 µL contendo 1x Opti-Prime™ buffer # 8 (Stratagene, La Jolla, CA) – que corresponde a 10mM Tris-HCl pH 8,8; 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 75 mM KCl – 0,05 mM de cada dNTP, 0,4 pmol de cada "primer", 1 Unidade de *Taq* polimerase e 500 ng de DNA alvo.

Foram utilizadas como controle positivo as amostras de DNA extraídas de células BCBL-1 (latentemente infectadas pelo HHV-8) e como controle negativo a água Milli Q estéril.

O programa de temperaturas do termociclador (MJ Research Inc, PTC 100, USA) foi único para todas as amplificações e consistiu de 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 60°C e 1 min. a 72°C precedido de 5 min. a 94°C para a desnaturação do DNA e 5 min. a 72°C para a etapa final de extensão dos produtos amplificados. O registro fotográfico foi feito pelo sistema fotodocumentador (Polaroid-USA).

No Quadro III são apresentadas as regiões do genoma que foram amplificadas, os nomes e as seqüências dos “primers” e os tamanhos dos produtos das PCRs e PCRs “nested”. As figuras VIII a X mostram o perfil eletroforético de amostras representativas de produtos de PCRs “nested” das *ORFs 26 e ORF K1, ORF 73, K8.1 e 25*, respectivamente.

**Quadro III** – Relação das regiões do genoma de HHV-8 pesquisadas, nome e seqüência dos "primers" e tamanho dos produtos das PCRs

Região do genoma	Nome dos "primers"	Seqüência dos "primers"	Tamanho do produto (pb)	
ORF 25 <sup>1</sup>	"primer" anti senso	N25.1	5'CATGGGAGTACATTGTCAGGACCTC3'	238
	"primer" senso I	N25.2	5' AGGCAACGTCAGATGTGAC 3'	
	"primer" senso II	N25.3	5' GGAATTATCCGCAGGTTGCC 3'	
ORF 26 <sup>2</sup>	"primer" senso	KS 1	5' AGCCGAAAGGATTCCACCAT 3'	233
	"primer" anti senso	KS 2	5' TCCCGTGTTGTCTACGTCCAG 3'	
	"primer" senso	KS inn 1	5' TTCCACCATTGTGCTCGAAT 3'	211
	"primer" anti senso	KS inn 2	5' TCCGTGTTGTCTACGTCCAG 3'	
ORF K1 <sup>3</sup>	"primer" senso	K1 inn 5	5' CCCGGAGTGATTTCAACGC 3'	255
	"primer" anti senso	K1 inn 6	5' ACATGCTGACCACAAGTGAC 3'	
	"primer" senso	K1-1	5' GAGTGATTTCAACGCCTTAC 3'	247
	"primer" anti senso	K1-N	5'TGCTGACCACAAGTGACTION 3'	
ORF 73 <sup>4</sup>	"primer" senso	7308	5' GCATTCCCGGGGGCGCCATC 3'	584
	"primer" anti senso	7-out	5' AGCAGTCACGTCCCCAAGAG 3'	
	"primer" senso	7311	5' TCCTCGGAAATCTGGTCT 3'	547
	"primer" anti senso	7	5' AGCAGCAGCTTGGTCCGGCTG 3'	
ORF K 8.1 <sup>5</sup>	"primer" senso	K8.1-B1	5' TAACCATGAGTTCCACACAGATTC 3'	795
	"primer" anti senso	K8.1-X1	5' GGTTTTGTGTTACACTATGTAGG 3'	
	"primer" senso	K8.1-M Bam	5' AATTGTCCCACGTATCGTTC 3'	537
	"primer" anti senso	K8.1-Hind R	5' TGGCACACGGTTACTAGCACC 3'	

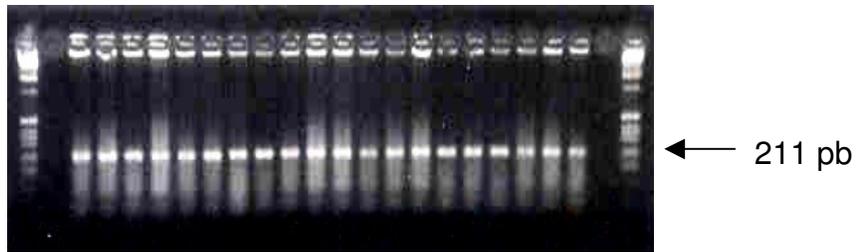
<sup>1</sup> "primers" segundo BOSHOF *et al.*, Lancet 1996

<sup>2</sup> "primers" segundo CHANG *et al.*, 1994

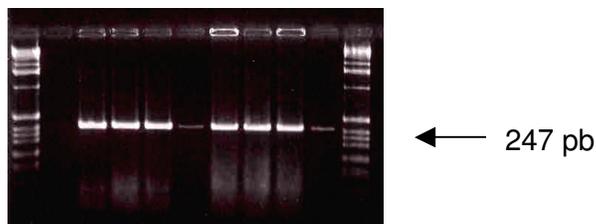
<sup>3</sup> "primers" segundo ZONG *et al.*,1999

<sup>4</sup> "primers" segundo DITTMER *et al.*, 1998 exceto para o "primer" denominado 7-out que foi desenhado no PHLS

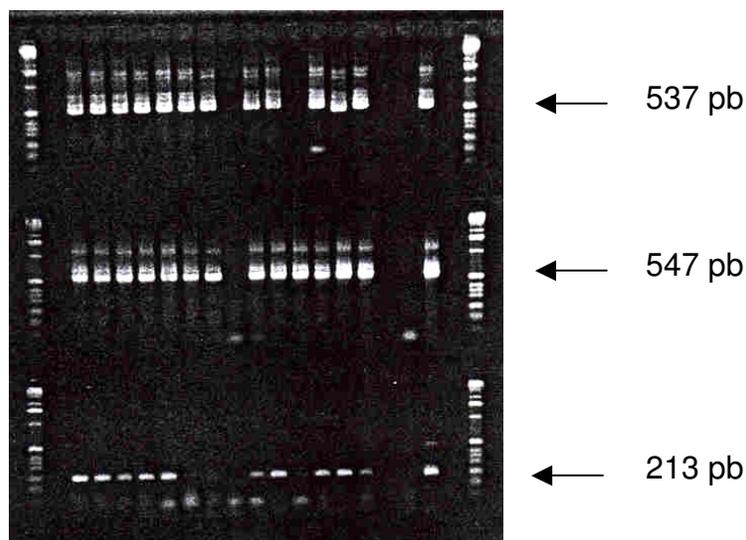
<sup>5</sup> "primers" segundo RAAB *et al.*,1998



**Figura VIII** - Amostras representativas dos produtos de PCR “nested” da *ORF 26* do genoma do HHV-8 (banda de 211 pb), quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com EtBr. Marcador de PM (DNA Ladder 1 Kb, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA).



**Figura IX** - Amostras representativas dos produtos de PCR “nested” da *ORF K1* do genoma do HHV-8 (banda de 247 pb), quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com EtBr. Marcador de PM (DNA Ladder 50 bp, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA).



**Figura X** - Amostras representativas dos produtos de PCR “nested” das *ORFs K8.1, 73 e 25* do genoma do HHV-8 (bandas de 537, 547 e 213 pb, respectivamente) quando submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%,

corado com EtBr. Marcador de PM (DNA Ladder 1 Kb, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA).

### **Pesquisa de subtipos de HHV-8**

Foi realizada a pesquisa de sítios de restrição enzimática presentes em segmento do gene *ORF K1* (VR1) para a subtipagem viral, conforme técnica descrita por MOREIRA, 2003.

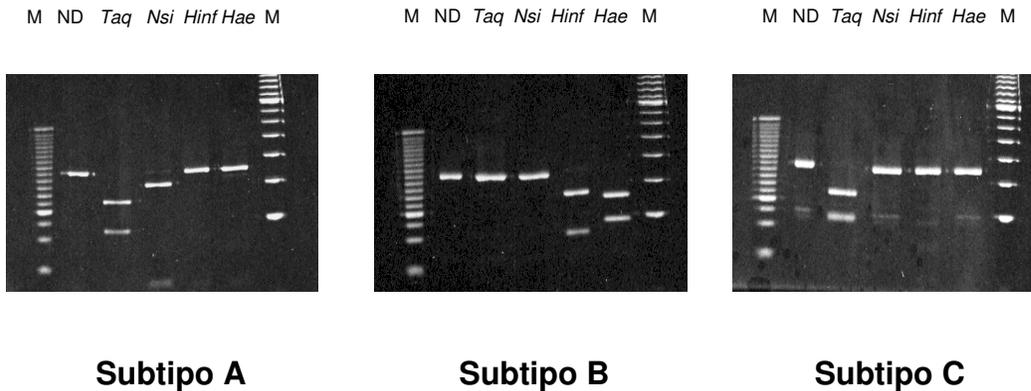
Resumidamente, os produtos de PCR “nested” *ORF K1* (VR1) de 247 pb foram submetidos à digestão com 5 enzimas de restrição: *Taq I*, *Nsi I*, *Hinf I*, *Hae III* e *Mse I* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) Para um volume final de 20 µL de reação foram utilizados 2 µL de tampão da enzima, 1 µL da enzima, 5 µL de produto amplificado e 12 µL de água. As misturas foram submetidas ao aquecimento a 37 °C (banho-maria Fanem, São Paulo, Br) para as enzimas *Nsi I*, *Hinf I*, *Hae III* e *Mse I* e a 65 °C banho-maria com agitação, (Haake, Alemanha) para a *Taq I*, ambas durante 3 horas.

Para a visualização dos fragmentos de digestão enzimática foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE) segundo a técnica de LAEMMLI, utilizando gel de empilhamento a 5% e gel de separação a 10% (LAEMMLI, 1970). Foram aplicados 20 µL de produto digerido e não digerido de PCR “nested” *ORF K1* acrescido de 2 µL de Orange G em cada orifício do gel (sistema Mini Protean II Electrophoresis Cell, Bio-Rad, Hercules, USA) e fonte (modelo 200, 2.0 Bio-Rad, Hercules, USA).

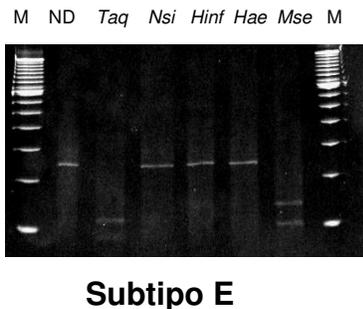
A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 80 V para percorrer o gel de empilhamento e o de separação.

Marcadores de PM (DNA Ladder 25 bp e DNA Ladder 100 bp (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA)) foram utilizados para o cálculo do tamanho dos fragmentos do produto digerido.

Ao término da corrida, o gel foi corado por 10 min. a temperatura ambiente com solução de EtBr e as bandas visibilizadas sob luz ultravioleta (transiluminador UV, Sigma Aldrich, St Louis, USA).



**Figura XI** - Perfil de restrição enzimática obtido com a PCR-RFLP de produtos da *ORF K1* (VR1) de HHV-8, subtipos A, B e C, quando submetidos ao SDS-PAGE. Marcadores de PM (DNA Ladder 25 bp e DNA Ladder 100 bp (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA)) (MOREIRA, 2003).



**Figura XII** - Perfil de restrição enzimática obtido com a PCR-RFLP de HHV-8, subtipo E, quando submetidos ao SDS-PAGE. Marcadores de PM (DNA Ladder 25 bp e DNA Ladder 100 bp (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA)) (MOREIRA, 2003).

## **Pesquisa de anticorpos anti-HHV-8**

### **Ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) “in-house”**

Para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 dirigidos aos antígenos de fase latente da infecção viral (IFI-LANA), foram utilizadas células BCBL-1 latentemente

infectadas pelo HHV-8, soro de pacientes, conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína e contracoloração com azul de Evans, segundo a técnica padronizada e empregada na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (CARBONE, 2003). As mesmas células estimuladas com forbol éster foram usadas para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica (IFI-Lítico).

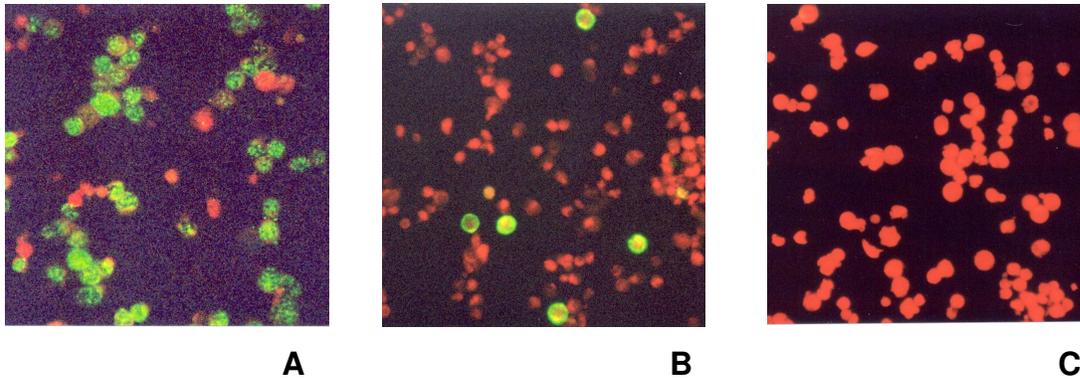
A diluição inicial escolhida para a triagem dos soros foi de 1:50. Nos soros positivos foi feita diluição seriada até 1:25.600.

As lâminas foram lidas por no mínimo duas pessoas tecnicamente treinadas, usando microscópio de fluorescência (Zeiss Axiolab MC80, Carl Zeiss, Alemanha) com equipamento fotográfico e aumento de 400 X.

O critério de positividade para a IFI-LANA foi a presença de fluorescência verde intensa com padrão nuclear pontilhado em mais de 90 % das células BCBL-1 (Figura XIII A). Padrão de fluorescência pontilhado ou difuso em todas as células foi considerado indeterminado e como negativo quando todas as células mostraram coloração vermelha. Nos soros positivos, o título de anticorpos foi determinado pela maior diluição do soro que resultou em padrão positivo.

Para o preparo de lâminas de IFI-Lítico foram utilizadas células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 estimuladas com forbol éster (PMA-phorbol myristate acetate) (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Este potente mitógeno possibilita que as partículas virais presentes nas células BCBL-1 passem do estado de latência para a fase lítica de replicação viral, expressando assim diferentes antígenos.

O critério de positividade adotado para a IFI-Lítico foi a presença de padrão de fluorescência verde maçã intenso de membrana (nuclear e externa) e difuso em toda a célula em aproximadamente 5 % das BCBL-1 e o de negatividade, a coloração vermelha em 100% das células (Figuras XIII B e C, respectivamente).



**Figura XIII-** Padrão de fluorescência observado no ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente (IFI-LANA) e lítica do HHV-8 (IFI-Lítico) utilizando células BCBL-1 latentemente infectadas (A), estimuladas com forbol éster (B), soro de paciente com sarcoma de Kaposi e controle negativo (C) (CARBONE, 2003).

### **Análise Estatística**

Após a coleta dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da casuística deste estudo, foi constituído um banco de dados, utilizando-se os programas Microsoft Word para Windows (versão 2000) e Microsoft Excel para Windows (versão 2000). Os resultados foram analisados com auxílio do programa estatístico SPlus para Windows (versão 4.5) e SPSS (“Statistical Package for Social Sciences”) para Windows (versão 8.0) .

O objetivo da análise estatística foi de verificar os fatores ou variáveis que poderiam discriminar os grupos SK/aids, HIV/aids, SK class e CS, com ênfase nos dois primeiros grupos devido ao tamanho amostral.

Inicialmente foi feita a análise descritiva de todas as variáveis do estudo. A técnica aplicada aos dados teve como principal objetivo comparar as proporções médias de resultados PCR positivos nos diversos fluidos biológicos e das PCR entre e dentro dos grupos. A técnica utilizada foi a regressão logística com medidas repetidas que incorpora a estrutura de dependência existente nos dados, pois se observa o mesmo caso cinco vezes (LIANG & ZEGER, 1986).

A técnica inferencial não foi aplicada ao grupo SK Clássico em função do tamanho amostral.

A técnica usada para avaliar as variáveis sócio-demográficas foi a regressão logística (PAULA, 2004). Como a variável resultado na PCR (material de biópsia, sangue, saliva e urina) assume apenas dois valores (positivo ou negativo) foi utilizada também a regressão logística que é definida pela distribuição binomial. Foi introduzida também uma nova variável chamada “combinação das *ORFs*”. Os resultados foram expressos em coeficiente de regressão da equação, erro padrão desses coeficientes e nível descritivo ou p-valor. Todos os resultados de frequência e conclusão utilizaram o nível de significância de 0,05. O cálculo das razões de chances (“odds ratio”) foi utilizado nas análises univariadas. O teste do Qui-quadrado foi aplicado na análise de frequência dos subtipos virais e em algumas variáveis (cor, origem, combinações das *ORFs*).

#### **Descrição das variáveis**

**Idade:** em anos.

**Sexo:** feminino ou masculino.

**Risco:** heterossexual, homossexual ou bissexual.

**UDI:** não ou sim.

**Cor da pele:** branca ou não branca.

**Origem étnica:** brasileiro, europeu, latino, africano ou asiático.

**Tempo HIV:** em meses.

**Tempo SK:** em meses.

**Terapia HIV:** não ou sim.

**Sorologia HIV:** não ou sim.

**Terapia ARV – IP:** não ou sim.

**Terapia ARV – ITR-N:** não ou sim.

**Terapia ARV – ITR-NN:** não ou sim.

**Localização SK:** superficial ou profunda.

**Terapia SK:** não ou sim.

**CD4:** menor, maior ou igual a 200 cel/mm<sup>3</sup>.

**IFI-LANA:** não reagente ou reagente.

**IFI-Lítico:** não reagente ou reagente.

**Óbito:** não ou sim.

**Grupo:** SK/aids, HIV/aids, SK class., Sadio: CS

**Sangue:** negativo, se todas as *ORFs* avaliadas no sangue forem negativas e positivo, se pelo menos uma das cinco *ORFs* for positiva.

**Saliva:** negativo, se todas as *ORFs* avaliadas em saliva forem negativas e positivo, se pelo menos uma das cinco *ORFs* for positiva.

**Urina:** negativo, se todas as *ORFs* avaliadas em urina forem negativas e positivo, se pelo menos uma das cinco *ORFs* for positiva.

**Biópsia:** negativo, se todas as *ORFs* avaliadas em material de biópsia forem negativas e positivo, se pelo menos uma das cinco *ORFs* for positiva.

**PCRs “nested”:** refere-se as *ORF* 26, *ORF* K1, *ORF* K8.1, *ORF* 73 e *ORF* 25.

**Combinações das *ORFs*:** esta variável tomou como base os resultados obtidos com as PCRs "nested" *ORF* K1, (*ORF* K8.1, *ORF* 26, *ORF* 25) e *ORF* 73. Entretanto, foram consideradas as três *ORFs* intermediárias como sendo uma só, ou seja, se pelo menos uma apresentou resultado positivo, então seu resultado foi considerado positivo; caso contrário, foi negativo. Assim, criou-se a variável “Combinação das *ORFs*” avaliando os resultados obtidos nessas três *ORFs*: K1, intermediária (K8.1, 25 e 26) e 73, categorizando-a da seguinte maneira: nenhum positivo, um positivo, extremos positivos, dois positivos à direita ou à esquerda e todos positivos.