CINARA PRATA CIRINO CASTRO SOARES

Células dendríticas plasmocitóides, expressão de receptores "Toll-like" 9 e 3 e de podoplanina nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi associado à síndrome de imunodeficiência adquirida e esporádico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Cinara Prata Cirino Castro
Células dendríticas plasmocitóides, expressão de receptores "Toll-like" 9 e 3 e de podoplanina nas lesões cutâneas do sarcoma de Kaposi associado à síndrome de imunodeficiência adquirida e esporádico / Cinara Prata Cirino Castro Soares. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Patologia.
Orientadora: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Sarcoma de Kaposi 2.Células dendríticas 3.Receptor *Toll-like* 3 4.Receptor *Toll-like* 9 5.Imunidade inata 6.Herpesvírus humano 8 7.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-164/14

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos filhos, Francisco e Carolina, que me mostram todos os dias como encontrar alegria em coisas tão simples. Conheci, com vocês, o que é o amor de mãe, não explicável com palavras, apenas sentido com o coração.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto pela confiança em mim depositada, desde o estágio no laboratório de Dermatopatologia até a conclusão desta tese. Por toda a paciência e compreensão. Pelo exemplo pessoal e profissional. Foi uma honra e um orgulho ser sua orientanda, professora.

Ao Pedro, meu esposo fiel, companheiro. Agradeço toda a paciência pelos momentos de ausência e de tensão no decorrer destes anos. Nossa família é a coisa mais preciosa da minha vida.

Aos meus pais, Cida e Geraldo. Mãe, meu porto seguro, presente em todas as horas difíceis e alegres da minha vida. Meu exemplo de amor incondicional que tento seguir com meus pequenos. Pai, obrigado por todo o seu amor e carinho. Todo o seu apoio e exemplo de honestidade. Hoje sou a pessoa que sou, graças a vocês.

À minha irmã, Andresa, minha melhor amiga desde sempre. Ensinou-me desde muito pequena como é gostoso caminharmos juntas. Foi meu exemplo para esta tese desde que terminou a sua, com a Cat tão pequenina.

Ao meu sogro, José Fernando, pela compreensão com tantas ausências no laboratório.

À Fernanda Guedes, que realizou com tanta dedicação as reações para o meu trabalho. Companheira desta tese. Sempre lembro com carinho de você.

Ao amigo Luiz Fernando Ferraz da Silva pela disponibilidade e incansável ajuda sempre que solicitei. Todo o merecido sucesso profissional e pessoal para você.

À Dra. Neusa Valente pelas incontáveis horas de conversas no Laboratório. Pelo carinho e atenção.

À Ilana Halpern pela amizade e exemplo de mãe, profissional e vida.

À Maria Cristina, Jacqueline e Luciana do laboratório de Dermatopatologia pelo auxílio na parte técnica, por terem me escutado tantas vezes, sempre disponíveis e atenciosas.

À dna. Ana do Museu de Patologia pela dedicação e cumprimento dos prazos durante o processo de escaneamento das lâminas.

À Cristina Fink que me auxiliou na obtenção dos resultados laboratoriais, tendo me conhecido em apenas um breve encontro.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP Rio Claro que me receberam e me acolheram tão bem na fase final deste trabalho.

A todos os familiares e amigos que me apoiaram nesta longa jornada.

A todos os funcionários da Dermatologia, da Patologia, do Arquivo Médico que me auxiliaram nesta tese.

Epígrafe

"A força não provém da capacidade física,
e sim de uma vontade indomável."

Mahatma Gandhi

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *"International Comittee of Medical Journals Editors"* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de gráficos
Lista de quadros
Lista de tabelas
Resumo
Summary
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 9
2.1 Objetivo geral 11
2.2 Objetivos específicos 11
3 REVISÃO DA LITERATURA 13
3.1 Sarcoma de Kaposi 15
3.1.1 Caracterização e descoberta 15
3.1.2 Epidemiologia e formas clínicas 15
3.1.3 Achados anatomopatológicos 17
3.1.4 O herpes-vírus 8 19
3.1.4.1 Descoberta e classificação 19
3.1.4.2 Prevalência da infecção e vias de transmissão 21
3.1.4.3 Ciclo de vida 21
3.1.4.4 Interação do herpes-vírus 8 com o hospedeiro 22
3.1.4.5 Modelo de carcinogênese no sarcoma de Kaposi e o papel do herpes-vírus 8 26
3.1.4.6 O vírus da imunodeficiência humana e o herpes-vírus 8 27
3.1.4.7 Herpes-vírus 8 e terapia antirretroviral 28
3.2 Imunidade inata 31
3.2.1 Receptores “Toll-like” 33
3.2.1.1 Receptores “Toll-like” e herpes-vírus 8 34
3.2.1.2 Receptores “Toll-like” e o vírus da imunodeficiência humana 36
3.2.2 Células dendríticas plasmocitóides 38
3.2.2.1 Células dendríticas plasmocitóides e o vírus da imunodeficiência humana 42
3.2.2.2 Células dendríticas plasmocitóides e o herpes-vírus 8 45
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS 47
4.1 Casuística 49
4.1.1 Caracterização da amostra 49
4.2 Métodos 55
4.2.1 Avaliação histopatológica 55
4.2.2 Imuno-histoquímica 55
4.2.2.1 Demonstração das células dendríticas plasmocitóides 56

4.2.2.2 Demonstração da expressão do receptor "Toll-like" 3 57
4.2.2.3 Demonstração da expressão do receptor "Toll-like" 9 58
4.2.2.4 Demonstração de parasitismo de células dendríticas plasmocitóides pelo herpes-vírus 8 59
4.2.2.5 Demonstração do componente endotelial linfático 60
4.2.3 Análise morfométrica 61
4.2.3.1 Quantificação de células dendríticas plasmocitóides.....61
4.2.3.2 Análise da expressão de receptores "Toll-like" 3 e 9 62
4.2.3.3 Análise da expressão de podoplanina (D2-40) 62
4.2.3.4 Análise da co-localização do antígeno LANA do herpes-vírus 8 e células dendríticas plasmocitóides 62
4.3 Análise estatística 64
4.4 Ética 65
5 RESULTADOS 67
5.1 Aspectos histopatológicos.....69
5.2 Imuno-histoquímica 71
5.2.1 Demonstração de células dendríticas plasmocitóides nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico.....71
5.2.2 Demonstração do parasitismo de células dendríticas plasmocitóides pelo herpes-vírus 8 nas lesões de sarcoma de Kaposi 72
5.2.3 Quantificação e comparação das células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico 73
5.2.4 Demonstração, quantificação e comparação da expressão do receptor "Toll-like" 3 nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico 77
5.2.5 Demonstração, quantificação e comparação da expressão do receptor "Toll-like" 9 nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico 84
5.2.6 Demonstração da expressão de D2-40.....90
6 DISCUSSÃO 95
7 CONCLUSÕES 115
8 ANEXOS 119
9 REFERÊNCIAS.....129

Listas

Lista de Abreviaturas

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCL2	"B-cell lymphoma 2"
BDCA	"Blood Dendritic Cell Antigen"
BSA	soroalbumina bovina
CCL	"chemokine (C-C motif) ligand"
CCR	"chemokine (C-C motif) receptor"
CDc	células dendríticas convencionais
CDp	células dendríticas plasmocitóides
CLEC-2	"C-type lectin-like receptor 2"
CMV	citomegalovírus
CpG	"cytosine – phosphodiester – guanine"
CXCL	"chemokine (C-X-C motif) ligand"
CXCR	"chemokine (C-X-C motif) receptor"
CyC	"Cyclin"
DC-SIGN	"Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin"
DNA	ácido desoxiribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla (do inglês "double stranded RNA")
EBV	Vírus Epstein-Barr
FLIP	"FLICE-like inhibitory protein" , proteína com função anti-apoptótica
GP	granuloma piogênico (hemangioma capilar lobular)
GPCR	"G-protein-coupled receptors"

HAART	terapia antirretroviral altamente eficaz (do inglês "Highly Active Antiretroviral Therapy")
HHV	herpes-vírus humano
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSV	vírus do herpes simples
IAP	"inhibitor of apoptosis protein"
ICAM	"intercellular adhesion molecule"
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	interferon
IL	interleucina
ILT7	"immunoglobulin-like transcript 7"
IRF	fator liberador de interferon (do inglês "interferon release factor")
IRIS	"Immune reconstitution inflammatory syndrome"
JAK2/STAT3	via de sinalização celular envolvida, por exemplo, em crescimento de tumores
K1 a K15	genes que codificam proteínas estruturais exclusivas do HHV-8, numerados de 1 a 15
KIE	"Kaposi immediate-early gene"
KSHV	vírus herpes ligado ao Sarcoma de Kaposi (do inglês "Kaposi sarcoma herpes vírus")
LANA	antígeno nuclear associado à latência (do inglês "latency-associated nuclear antigen") do HHV-8
LYVE 1	"lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor"
MDA -5	"Melanoma differentiation-associated protein 5"
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
miRNA	micro RNA
m-p/p	máculo-papulares e em placa
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	"myeloid differentiation factor 88"
NF-κB	fator nuclear κB

NK	célula “natural killer”
NLR	“NOD-like receptors”
NOD	“nucleotide oligomerization receptor”
ORF	sequências abertas de leitura (do inglês “open reading frames”)
PAMP	padrão molecular associado a patógenos
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
poli(I:C)	ácido poliriboinosinicopoliribocitidílico
RAP	proteína associada à replicação (do inglês “replication associated protein”)
RB	retinoblastoma
RCA	“regulator of complement activation”
RIG-1	“retinoic acid-inducible gene-1”
RLR	“RIG like receptor”
RNA	ácido ribonucleico
RRP	receptores de reconhecimento de padrões
RTA	“replication and transcription activator”
SDF 1	“stromal derived factor-1 ”
SK	Sarcoma de Kaposi
SK-Aids	Sarcoma de Kaposi associado a Aids (ou epidêmico)
SK-Aids/HAART	Sarcoma de Kaposi associado à Aids com tratamento por terapia HAART
SKc	Sarcoma de Kaposi clássico (esporádico ou do idoso)
ssRNA	RNA fita simples (do inglês “single stranded”)
Th	“T helper”
TIR	“Toll/interleukin-1 receptor”
TLR	“toll-like receptors”
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês “tumor necrose factor”)
TRIF	“TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
VEGFR3	“vascular endothelial growth factor receptor-3”

Lista de Figuras

Figura 1 - Mapa do genoma do herpes-vírus 8 20

Figura 2 - Aspectos microscópicos das células dendríticas plasmocitóides 38

Figura 3 - Desenvolvimento das células dendríticas plasmocitóides e sua relação com as células dendríticas convencionais 40

Figura 4 - Células dendríticas plasmocitóides e seus receptores "Toll-like" 41

Figura 5 - Papel das células dendríticas plasmocitóides na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 44

Figura 6 - Características histológicas das lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi 70

Figura 7 - Células dendríticas plasmocitóides imunomarcadas pelo anticorpo CD 303 e duplamente marcadas pelo CD303 e LANA, em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi 72

Figura 8 - Expressão de receptor "Toll-like" 3 nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi (técnica imuno-histoquímica) 77

Figura 9 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 nas lesões cutâneas de granuloma piogênico (técnica imuno-histoquímica) 78

Figura 10 - Expressão de receptor "Toll-like" 9 nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi (técnica imuno-histoquímica) 84

Figura 11 - Expressão de D2-40 em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi (técnica imuno-histoquímica) 90

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das biopsias de sarcoma de Kaposi clássico e associado à Aids, tratados ou não com HAART 50

Gráfico 2 - Distribuição dos espécimes segundo gênero dos pacientes nos respectivos subgrupos epidemiológicos.....51

Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes com sarcoma de Kaposi e grupo controle de granuloma piogênico por idade (anos).....52

Gráfico 4 - Distribuição dos casos de sarcoma de Kaposi segundo a fase clínico-patológica da lesão: M-P/P (máculo-papular ou placa) e tumoral – nos diferentes grupos clínico-epidemiológicos 53

Gráfico 5 - Comparação da população de células CD303+ (células dendríticas plasmocitóides) nos diferentes grupos de sarcoma de Kaposi (SK-Aids; SK-Aids/HAART e SKc) e no Granuloma Piogênico (GP). 73

Gráfico 6 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões máculo-papulares e em placa (M-P/P) e tumorais de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. 74

Gráfico 7 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi sem evidências de comprometimento visceral e de doentes com comprometimento visceral. 74

Gráfico 8 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi entre doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 75

Gráfico 9 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes com linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 com o granuloma piogênico (GP) 75

Gráfico 10 - Comparação da fração de área com expressão de receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) nos diferentes grupos de sarcoma de Kaposi (associado a Aids SK-Aids; Associado à Aids sob tratamento antirretroviral – SK-Aids/HAART e esporádico – SKc) e no Granuloma Piogênico (GP)..... 79

Gráfico 11 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões máculo-papulares e placas (SK M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi 80

Gráfico 12 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes sem evidência de comprometimento visceral e com comprometimento visceral..... 81

Gráfico 13 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes com nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350/mm^3..... 81

Gráfico 14 - Comparação da expressão de receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) nas lesões de sarcoma de Kaposi dos doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 e no granuloma piogênico (GP)..... 82

Gráfico 15 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nos diferentes grupos de sarcoma de Kaposi (SK-Aids, SK-Aids/HAART) e no granuloma piogênico (GP) 85

Gráfico 16 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões máculo-papulares e placas (SK M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi 86

Gráfico 17 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes sem evidência de comprometimento visceral e com comprometimento visceral 87

Gráfico 18 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes com nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350/mm^3..... 87

Gráfico 19 - Comparação da expressão de receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) nas lesões de sarcoma de Kaposi dos doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual ou maior que 350 células/mm^3 e no granuloma piogênico (GP)..... 88

Gráfico 20 - Comparação da imunomarcação com D2-40 de lesões máculo-papulares/placas (M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi 91

Gráfico 21 - Comparação da imunomarcação com D2-40 de lesões de sarcoma de Kaposi associado a Aids (SK-Aids), associado a Aids e tratados com terapia antirretroviral (SK-Aids/HAART) e esporádico (SKc)..... 91

Gráfico 22 - Comparação do número de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menor que 50% do componente neoplásico 92

Gráfico 23 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menor que 50% do componente neoplásico 93

Gráfico 24 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menor que 50% do componente neoplásico 93

Lista de Quadros

Quadro 1 - Receptores "Toll-like" presentes em células humanas e seus ligantes 34

Quadro 2 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, densidade de células dendríticas plasmocitóides, fração de área marcada pelos anticorpos anti-receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de sarcoma de Kaposi clássico 121

Quadro 3 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, contagem de linfócitos T CD4+ no sangue, densidade de células dendríticas plasmocitóides, fração de área marcada pelos anticorpos anti-receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de sarcoma de Kaposi associado à Aids 122

Quadro 4 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, contagem de linfócitos T CD4+ no sangue, densidade de células dendríticas plasmocitóides, fração de área marcada pelos anticorpos anti receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de sarcoma de Kaposi de doentes com Aids submetidos à terapia antirretroviral altamente eficaz 123

Quadro 5 - Características demográficas, topografia, densidade de células dendríticas plasmocitóides, fração de área marcada pelos anticorpos anti-receptor "Toll-like" 3 e 9 nos controles (granuloma pigoênico) 124

Quadro 6 - Características histopatológicas das lesões de sarcoma de Kaposi estudadas segundo subgrupo epidemiológico 126

Quadro 7 - Características histopatológicas das lesões de sarcoma de Kaposi estudadas segundo fase clínico-patológica da lesão 127

Quadro 8 - Frequência e grau de atipias celulares nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi estudadas 128

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides de acordo com o grupo epidemiológico de sarcoma de Kaposi, comprometimento visceral associado, fase clínico-patológica da lesão e nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ e granuloma piogênico.....76

Tabela 2 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 3 de acordo com o grupo epidemiológico de sarcoma de Kaposi, comprometimento visceral associado, fase clínico-patológica da lesão e nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ e granuloma piogênico.....83

Tabela 3 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 9 de acordo com o grupo epidemiológico de sarcoma de Kaposi, comprometimento visceral associado, fase clínico-patológica da lesão e nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ e granuloma piogênico.....89

Tabela 4 - Comparação do componente endotelial linfático do sarcoma de Kaposi segundo subgrupo epidemiológico e fase clínico-patológica da lesão.....92

Tabela 5 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides, expressão de receptores "Toll-like" 3 e "Toll-like" 9 com a expressão de D2-40 94

Resumo

Soares CPCC. *Células dendríticas plasmocitóides, expressão de receptores "Toll-like" 9 e 3 e de podoplanina nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi associado à síndrome de imunodeficiência adquirida e esporádico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O Sarcoma de Kaposi (SK) é a neoplasia mais frequente dos doentes com Aids. É causada pelo herpes-vírus 8 (HHV-8). As células dendríticas plasmocitóides (CDp) são especializadas na produção de interferon tipo 1 e participam da resposta imune aos vírus. Os receptores "toll-like" são os principais receptores de reconhecimento de padrão, sendo que os receptores toll-like (TLR) 3 e 9 têm função no reconhecimento de vírus. O D2-40 é o anticorpo que reconhece a podoplanina, uma proteína transmembrana, presente no endotélio linfático e que tem função na imunidade. OBJETIVO: Demonstrar e comparar os componentes da imunidade inata: CDp e TLR 3 e 9, nas lesões cutâneas de SK associado a Aids e esporádico. Identificar a presença do HHV-8 nas CDp. Verificar o componente endotelial linfático na progressão das lesões de SK e comparar a expressão dos elementos da imunidade inata estudados, nas lesões com menor e maior componente endotelial linfático. MÉTODOS: Estudo retrospectivo de 50 biopsias de pacientes com diagnóstico de SK, todos com comprovação pelo exame histopatológico e demonstração do antígeno nuclear associado à latência (LANA) do HHV-8. Foram avaliados 11 biopsias de SK da forma clássica (SKc), 22 lesões de doentes com Aids (SK-Aids) e de 17 de doentes com Aids submetidos a tratamento com terapia antirretroviral altamente eficaz (SK-Aids/HAART). Os espécimes foram submetidos a exame por técnica imuno-histoquímica para evidenciar a presença de CDp (anticorpo CD303/BDCA-2), a expressão de TLR 3 e 9, bem como de podoplanina (anticorpo D2-40). Foi realizada também técnica de dupla marcação com CD303 e LANA, objetivando a identificação de CDp infectadas pelo HHV-8.Vinte e três espécimes de granuloma piogênico constituíram o grupo controle. A população de CDp e expressão de TLR 3 e TLR 9 também foi comparada nas lesões cutâneas de SK de doentes com e sem comprometimento visceral pela neoplasia; lesões não tumorais (máculo-papulares/placas) foram comparadas às lesões tumorais (nodulares) e de acordo com níveis sanguíneos de linfócitos T CD4+ (menor e igual ou maior que 350 células/mm^3). RESULTADOS: As CDp foram mais numerosas nos espécimes de SK-Aids quando comparado com o granuloma piogênico. Foram identificadas CDp infectadas pelo HHV-8. A expressão de TLR 3 foi menor nas lesões de SK, independente da forma epidemiológica, do que no granuloma piogênico. Para todas as outras comparações da densidade de CDp e expressão de TLR 3 e de TLR 9 não houve diferença entre os grupos. Não houve diferença no componente endotelial linfático das lesões máculo-papulares/placas e tumorais do SK, assim como na expressão dos elementos da imunidade inata estudados entre as lesões com maior e menor componente endotelial linfático. CONCLUSÕES: Demonstrou-se pela primeira vez a presença de CDp e a expressão de TLR 3 e 9 em lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi, bem como a infecção de CDp pelo HHV-8 "in situ" nos tumores. Os resultados obtidos sugerem a participação das células CDp e do TLR 3 na patogênese das lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi, independente da presença do vírus da imunodeficiência humana. A imunomarcação de SK com o anticorpo D2-40, tanto nas fases precoce como tardia das lesões, confirma a natureza

endotelial linfática das células neoplásicas. Esta parece não ter relação com a expressão dos elementos da imunidade inata estudados.

Descritores: 1.Sarcoma de Kaposi 2.Células dendríticas 3.Receptor *Toll-like* 3 4.Receptor *Toll-like* 9 5.Imunidade inata 6.Herpesvírus humano 8 7.Imuno-histoquímica

Summary

Soares CPCC. *Plasmacytoid dendritic cells and the expression of toll-like receptors 9 and 3 and podoplaninin in cutaneous lesions of Aids-associated Kaposi's sarcoma and classic Kaposi's sarcoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction: Kaposi's sarcoma (KS) is the most common Aids-associated malignancy. It is caused by human herpesvirus-8. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are professional interferon producing cells, and participate in the immune response against viruses. Toll-like receptors (TLR) are the main pattern recognition receptors, and TLR 3 and TLR 9 participate in the recognition of viruses. Podoplanin, recognized by antibody D2-40, is a transmembrane protein identified on lymphatic endothelial cells with functions inimmunity. **Objective:** Demonstrate and compare some innate immunity components: pDC, TLR 3 and TLR 9, in cutaneous lesions of Aids-associated Kaposi's sarcoma and classic Kaposi's sarcoma. Identify the infection of pDC by HHV-8. Compare the lymphatic endothelial component in the course of tumor progression and compare the expression of innate immunity elements in lesions with a predominance of lymphatic endothelial components or not. **Methods:** Retrospective study of 50 biopsies diagnosed as Kaposi's sarcoma withpositive staining for latency-associated nuclear antigen (LANA) of HHV-8. Eleven classic KS, 22 Aids-associated KS and 17 Aids-associated KS from patients undergoing highly active antiretroviral therapy (HAART) were assessed. Paraffin-embedded tissue was submitted to immunohistochemistry technique in order to demonstrate pDC (CD303/BDCA-2 antibody), expression of TLR 3, TLR 9 and podoplanin (D2-40 antibody). We performed double staining with CD303 and LANA in order to identify pDC infection with HHV-8. Twenty-three pyogenic granuloma(PG) specimens were analyzed as a control group. Plasmacytoid dendritic cells population, TLR 3 and TLR 9 expressions were compared between patients with and without visceral disease, nodular stageandpatch/plaque stage and according to bloodlymphocytes T CD4 count(< and ≥350 cells/mm^3). **Results:** Plasmacytoid dendritic cells density in Aids-associated SK was higher than in PG. We could identify pDC infection by HHV-8. The expression of TLR 3 in all forms of KS was less extensive than PG. All others comparisons about pDC density, TLR 3 and 9expressions were similar. We found no difference in D2-40 expression between nodular and patch/plaque stages. When comparing tumors with extensive expression of D2-40 (≥ 50% of cells) and tumors with less expression (<50% of cells), we found no differences in density of pDC and expression of TLR 3 and TLR 9. **Conclusion:** This is the first time that pDC, TLR 3 and TLR 9 have been demonstrated in skin lesions of KS, as well as the infection of pDC in the lesions. Our results suggest that pDC and TLR 3 participate in the pathogenesis of KS, independently of HIV presence. The positive staining with D2-40 antibody, in all the stages of KS, confirmsthe lymphatic nature of neoplastic cells. It seems that podoplanin is not related to the innate immunity elements studied here.

Descriptors: 1.Kaposi sarcoma 2.Dendritic cells 3.Toll-like receptor 3 4.Toll-like receptor 9 5.Innate immunity 6.Human Herpesvirus 8 7.Immunohistochemistry

1 Introdução

O Sarcoma de Kaposi (SK) é uma neoplasia endotelial localmente agressiva que tipicamente apresenta-se com lesões cutâneas na forma de máculas, pápulas, placas ou nódulos mas que também pode envolver mucosas, linfonodos e órgãos internos (World Health Organization, 2002). São descritas quatro formas clínico-epidemiológicas: SK clássico (SKc), SK de pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (SK-Aids), SK iatrogênico e SK endêmico. É considerado doença definidora de Aids, sendo a neoplasia mais frequente neste grupo de pacientes, embora com a introdução da terapia antirretroviral combinada, sua incidência tenha diminuído bastante (Grabar *et al.*, 2006; El Amari *et al.*, 2008; Armstrong *et al.*, 2013).

O SK faz parte do grupo de neoplasias causadas por vírus sendo que o herpes-vírus 8 (HHV-8) é o seu agente causal (Chang *et al.*, 1994). Como todos os outros agentes da família do herpes, uma vez que ocorre a infecção, o vírus se perpetua no organismo, sendo para isso necessário que desenvolva mecanismos de escape imunológico (Coscoy, 2007; Areste; Blackbourn, 2009). Nos doentes co-infectados existe cooperação mútua entre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o HHV-8 na patogênese e na carcinogênese do SK (Huang *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; da Silva e de Oliveira, 2011).

Independente da forma clínico-epidemiológica, os achados anatomopatológicos são idênticos. Caracterizam-se por proliferação de células fusiformes associada a infiltrado inflamatório linfomononuclear, angiogênese e siderose dérmica. No início, o SK apresenta características de processo inflamatório,

sendo que as células fusiformes prevalecem apenas nas fases mais avançadas da doença. As células neoplásicas do SK apresentam origem incerta, mas acredita-se que são células progenitoras endoteliais que, quando infectadas pelo HHV-8, sofrem reprogramação para fenótipo linfático (Della Bella *et al.*, 2008). O endotélio vascular sanguíneo também pode ser infectado pelo vírus (Wang; Damania, 2008).

A imunidade inata, outrora definida apenas como a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos, recentemente adquiriu papel na organização da resposta imunológica, tanto da própria resposta inata como também da imunidade adquirida (Akira *et al.*, 2006). Sabe-se que a imunidade inata continua a atuar mesmo nas infecções crônicas (Gregory *et al.*, 2009).

Em relação ao HIV, a imunidade inata tem papel fundamental nos mecanismos de progressão da doença e falência imunológica (Fitzgerald-Bocarsly; Jacobs, 2010; Swiecki; Colonna, 2010; Chang *et al.*, 2012; Ploquin *et al.*, 2012). As células dendríticas plasmocitóides (CDp) são fundamentais nos mecanismos de defesa contra vírus pois são as principais produtoras de interferon (IFN) de tipo 1 em humanos (Liu, 2005). São células altamente especializadas capazes de produzir grandes quantidades de citocinas e após sua maturação apresentar antígenos através do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), o que lhe confere a capacidade de célula apresentadora de antígenos (Liu, 2005).

Os receptores “Toll-like” (TLR) constituem o principal grupo dos chamados receptores de reconhecimento de padrão (RRP). São assim denominados pois têm fundamental importância para o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Vasselon; Detmers, 2002). São descritos dez TLRs na espécie

humana, mas quatro deles são os principais para a defesa contra vírus (Sironi *et al.*, 2012).

A imunidade "in situ", em lesões cutâneas de SK é pouco estudada. Há raros trabalhos que enfocam os componentes da imunidade inata nas lesões de SK. Esses envolvem principalmente o componente dendrocítico cutâneo nessa neoplasia (Luiz, 2008).

A natureza endotelial sanguínea e linfática do SK tem sido discutida na literatura. Os dados são conflitantes quanto ao predomínio de endotélio linfático no curso evolutivo das lesões de SK (Ramírez-Amador *et al.*, 2009; Kandemir *et al.*, 2011; Rosado *et al.*, 2012). Além disso, a podoplanina, que é um dos marcadores de células endoteliais linfáticas, foi recentemente considerada fator envolvido no processo imunológico, promovendo migração de células dendríticas (Acton *et al.*, 2012; Astarita *et al.*, 2012).

Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a resposta imunológica no SK, com ênfase nos componentes da imunidade inata nas lesões cutâneas, investigamos a presença de alguns deles em biopsias de pele cujo diagnóstico foi realizado no Laboratório de Dermatopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre os anos de 2006 e 2009. Pesquisamos a presença do vírus HHV-8 nas CDp em lesões cutâneas de SK. Propusemo-nos também a verificar o componente linfático nas lesões cutâneas de SK, relacioná-lo à evolução das lesões e também aos componentes da imunidade inata abaixo relatados. Espécimes de granuloma piogênico não ulcerados, uma lesão vascular sem etiologia viral, representaram o grupo controle. Para tanto, os

espécimes foram submetidos a exame por técnica imuno-histoquímica com os seguintes marcadores:

1) **CD303/BDCA-2:** receptor de superfície celular lectina tipo C tipo II envolvida no processo de ligação, internalização e apresentação de antígenos. Presente exclusivamente nas células dendríticas plasmocitóides (Dzionek *et al.*, 2001).
2) **TLR 3:** receptor da família dos receptores "Toll-like". Está presente em membranas endossomais e é capaz de reconhecer dsRNA formado durante o processo de replicação viral, tanto nos vírus DNA como nos vírus RNA (Zhou *et al.*, 2010). Está presente em diversas linhagens celulares e tem sua expressão aumentada pelo IFN-α/β (Akira *et al.*, 2006). Monócitos apresentam aumento de expressão de TLR 3 na infecção pelo HHV-8 (West; Damania, 2008).
3) **TLR 9:** receptor da família dos receptores "Toll-like". Está presente em membranas endossomais e faz o reconhecimento de sequências CpG-DNA não metiladas presentes em vírus e bactérias (Akira *et al.*, 2006). É um dos receptores presentes nas CDp, sendo responsável pelo reconhecimento do HHV-8 e resposta com produção de IFN tipo 1 por aquela célula (West *et al.*, 2011).
4) **D2-40:** anticorpo monoclonal que se liga à podoplanina, uma proteína transmembrana presente em diversas linhagens celulares, inclusive no endotélio linfático (Astarita *et al.*, 2012). Em neoplasias vasculares é usado, portanto, para diferenciar endotélio sanguíneo de endotélio linfático.

5) **LANA (antígeno nuclear associado à latência):** proteína do HHV-8 com múltiplas funções, entre elas a separação dos epissomos entre as células-filhas quando ocorre divisão celular (Aresté; Blackbourn, 2009). É uma proteína expressa em todas as células infectadas e ainda não são bem conhecidos os mecanismos de evasão do sistema imunológico que permitem sua expressão durante a fase de latência (Coscoy, 2007).

Uma vez que estes elementos fazem parte da imunidade inata e que estão relacionados aos mecanismos de defesa contra o HHV-8 e o HIV, desenvolvemos este trabalho a fim de identificar sua presença e comparar sua expressão nas lesões cutâneas de SKc e SK-Aids tratados ou não com esquema de terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART), e estabelecer a participação destes elementos nos mecanismos de lesão do SK.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

- Com o objetivo de contribuir para a patogenia do SK pretendeu-se verificar a participação das CDp, expressão de TRL 3 e TLR 9 e da podoplanina nos sítios de lesão de SK-Aids e de SKc.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar e comparar a população de CDp nas lesões de SK-Aids, SK-Aids/HAART, SKc e de grupo controle de lesões de granuloma piogênico.
- Comparar a população das CDp segundo a fase clínico-patológica das lesões.
- Comparar a população de CDp de acordo com o comprometimento visceral associado e grau de imunodepressão, nas lesões de SK-Aids e SK-Aids/HAART.
- Demonstrar a infecção das CDp pelo HHV-8 nas lesões cutâneas de SK.
- Demonstrar e comparar a expressão de TLR 3 nas lesões de SK-Aids, SK-Aids/HAART, SKc e de grupo controle de lesões de granuloma piogênico.

- Comparar a expressão de TLR 3 segundo a fase clínico-patológica das lesões.
- Comparar a expressão de TLR 3 de acordo com o comprometimento visceral associado e grau de imunodepressão nas lesões de SK-Aids e SK-Aids/HAART.
- Demonstrar e comparar a expressão de TLR 9 nas lesões de SK-Aids, SK-Aids/HAART, SKc e de grupo controle de lesões de granuloma piogênico.
- Comparar a expressão de TLR 9 segundo a fase clínico-patológica das lesões.
- Comparar a expressão de TLR 9 de acordo com o comprometimento visceral associado e grau de imunodepressão nas lesões de SK-Aids e SK-Aids/HAART.
- Verificar e comparar o componente endotelial linfático, pela expressão de podoplanina, nas fases clínico-patológicas das lesões de SK-Aids, SK-Aids/HAART e SKc.
- Comparar o número de CDp nos grupos de SK com componente endotelial linfático menor e igual/maior de 50%.
- Comparar a expressão de TLR 3 e 9 nos grupos de SK com componente endotelial linfático menor e igual/maior de 50%.

3 Revisão da Literatura

3.1 SARCOMA DE KAPOSI

3.1.1 Caracterização e descoberta

O SK foi descrito pela primeira vez em 1872 pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi, em Viena (Gessain; Duprez, 2005). Na época foi denominado "sarcoma da pele pigmentado, múltiplo e idiopático". É causado pelo herpes-vírus 8 (HHV-8) ou herpes-vírus ligado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV). A presença do vírus é necessária porém não suficiente para o desenvolvimento da neoplasia (Antman; Chang, 2000; Douglas *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2008).

3.1.2 Epidemiologia e formas clínicas

O comprometimento cutâneo é predominante, sendo as lesões únicas ou múltiplas. Nas fases iniciais as lesões são caracterizadas por máculas ou pápulas eritematosas e nas fases tardias são nódulos que podem ulcerar. Eventualmente, num mesmo paciente coexistem lesões em diferentes estágios. Lesões maculares podem ser numerosas assim como nódulos podem ser restritos. O comprometimento visceral marca estágios avançados da doença. Os principais órgãos internos comprometidos são dos tratos gastro-intestinal e respiratório (Friedman-Kien, 1981; Hengge *et al.*, 2002).

A incidência do Sarcoma de Kaposi não é uma constante nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, comparando-se a era pré Aids com o início da epidemia onde não havia terapia antirretroviral, a incidência de SK passou de dois para 47 casos por

milhão de habitantes-ano (American Cancer Society, 2013). No final da década de 80, a chance de uma pessoa infectada pelo HIV desenvolver SK era 20.000 vezes maior que a chance da população geral e 300 vezes maior do que qualquer outra pessoa imunodeprimida (Beral *et al.*, 1990). Com o uso da terapia HAART, a incidência da neoplasia na população geral passou para 6 casos por milhão de habitantes-ano (American Cancer Society, 2013). Em pacientes transplantados, um em cada 200 pacientes desenvolve a doença (American Cancer Society, 2013). No Brasil, segundo Parkin *et al.* (2002), entre 1995 e 1998, a incidência de Sarcoma de Kaposi na população geral foi de 1,1 por 100.000 habitantes para homens e 0,2 por 100.000 habitantes para mulheres.

Quatro formas clínico-epidemiológicas do SK são identificadas:

- Uma forma indolente, chamada de forma clássica, é encontrada principalmente em homens (na proporção de 15:1), idosos, judeus, na região do Mediterrâneo e leste europeu. Geralmente acomete extremidades, tem evolução lenta e há comprometimento visceral em apenas 10% dos casos (Iscovich *et al.*, 2000; Antman; Chang, 2000).
- A forma endêmica acontece em países da África Central e leste africano. Ocorre em crianças e adultos jovens. Não está relacionada ao vírus HIV. A forma linfadenopática é agressiva e clinicamente há envolvimento de vísceras e órgãos linfáticos. Geralmente é fatal (Antman; Chang, 2000).
- A forma iatrogênica que acomete cerca de 0,5% dos pacientes transplantados ou em uso de imunossupressores (Trattner *et al.*, 1993; Hengge *et al.*, 2002; American Cancer Society, 2013). O curso da doença pode ser indolente ou agressivo, mas geralmente há regressão das lesões

com a diminuição ou substituição do esquema de drogas imunossupressoras.

- A forma epidêmica que acomete indivíduos infectados pelo HIV, sendo doença definidora de Aids. Neste grupo, o SK é a neoplasia mais comum (Chang *et al.*, 1994; Rubinstein *et al.*, 2014). É doença agressiva e pode comprometer a pele de forma disseminada, além de outros órgãos.

3.1.3 Achados anatomopatológicos

Todas as formas epidemiológicas e clínicas têm achados anatomopatológicos idênticos sendo características desta lesão a angiogênese, edema, extravasamento de hemácias, infiltrado linfomononuclear e a proliferação de células fusiformes. O estágio de mácula tem seu diagnóstico mais difícil pois a proliferação vascular é discreta e apenas o aumento de celularidade dérmica (em sua maioria células inflamatórias) chama atenção, mimetizando doenças inflamatórias. À medida que a lesão progride, canais vasculares contendo hemácias passam a ser facilmente identificados, as células fusiformes proliferam-se e se tornam as predominantes nos nódulos.

Algumas variantes histológicas do SK foram recentemente descritas, dentre elas encontram-se as formas hiperqueratótica, equimótica, intravascular, queloidiana e as formas semelhantes ao granuloma piogênico e ao linfangioma (Urquhart *et al.*, 2006; Grayson; Pantanowitz, 2008).

As células fusiformes são consideradas as células neoplásicas do SK. São caracterizadas por citoplasma e núcleo alongados, contém inclusões hialinas e pigmento de hemossiderina. Mitoses e atipias celulares podem estar presentes.

Expressam marcadores endoteliais incluindo CD31, CD34 e fator VIII. Expressam também marcadores de endotélio linfático como LYVE1 (receptor do endotélio linfático para hialuronan) e VEGFR3 (receptor para fator de crescimento endotelial 3) (Kalof; Cooper, 2009; Pantanowitz *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2012; Radu; Pantanowitz, 2013). O marcador para podoplanina, D2-40 é expresso nas lesões de SK, mas existe divergência entre os autores sobre sua expressão durante a evolução das lesões, sendo que alguns autores acreditam no aumento de sua expressão conforme as lesões progridem, enquanto outros acreditam em uma expressão não relacionada à fase em que o SK se encontra (Pyakurel *et al.*, 2006; Kandemir *et al.* 2011).

Ao exame por microscopia eletrônica as células fusiformes têm características de células endoteliais, apresentando marcadores tanto de endotélio vascular sanguíneo como linfático (Orenstein, 2008). Surgiram, entretanto, evidências para diferenciação linfática. Wang *et al.* (2004) demonstraram, através de estudo de expressão genética em biópsias de SK, na fase tumoral, que as células fusiformes eram mais semelhantes às células endoteliais linfáticas do que às células endoteliais vasculares sanguíneas. No mesmo ano, Hong *et al.* (2004) demonstraram que células endoteliais, quando infectadas pelo HHV-8, sofrem uma reprogramação genética com indução de genes de endotélio linfático. Ao serem infectadas pelo HHV-8, as células endoteliais adquirem vantagens de sobrevivência quando cultivadas na presença de indutores de apoptose e também apresentam facilidade para formação de túbulos mesmo havendo restrição de fatores de crescimento (Wang; Damania, 2008). Existem evidências de que células progenitoras endoteliais seriam reservatórios para

o HHV-8 e que estas poderiam também ser as precursoras das células fusiformes do SK (Della Bella *et al.*, 2008).

3.1.4 O herpes-vírus 8

3.1.4.1 Descoberta e classificação

Existem oito herpes-vírus humanos conhecidos (HHV) que estão divididos em três subfamílias: α, β e γ. A subfamília α inclui o HHV-1 e -2 e o vírus da varicela-zoster (HHV-3). A subfamília β tem como membros o citomegalovírus (HHV-5), o HHV-6 e o HHV-7. Na subfamília γ estão o vírus Epstein-Barr (EBV/HHV-4) e o herpes-vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV/HHV-8) (Antman; Chang, 2000; Nicholas, 2000; Dukers; Rezza, 2003). Os vírus da subfamília γ estão envolvidos com o desenvolvimento de neoplasias sendo que o EBV está associado ao linfoma de Burkitt, ao linfoma de Hodgkin, ao carcinoma de nasofaringe, ao linfoma de células T e "natural killer" (NK). O HHV-8, por sua vez, é agente etiológico do Sarcoma de Kaposi, do linfoma efusional primário e da doença de Castleman multicêntrica variante plasmablástica.

O HHV-8 foi descoberto em 1994 por Chang *et al.* através da identificação de sequências de DNA viral em biopsias de SK. É um vírus grande, envelopado, de DNA dupla fita. Pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae* e ao gênero *Rhadinovirus*. É o único *Rhadinovirus* que infecta humanos. Seu genoma contém 87 sequências abertas de leitura (ORF) e pelo menos 17 miRNA (Mesri *et al.*, 2010). Apresenta regiões codificantes conservadas de proteínas estruturais e metabólitos comuns a outros herpes-vírus e também regiões não conservadas, exclusivas do HHV-8 que foram nomeadas K (K1 a K15) (Jenner; Boshoff, 2002; Douglas *et al.*

2007). Muito do genoma do HHV-8 é constituído por genes pirateados de células e estes têm função no controle do ciclo celular, inibição da apoptose e evasão do sistema imune (Areste; Blackbourn, 2009).

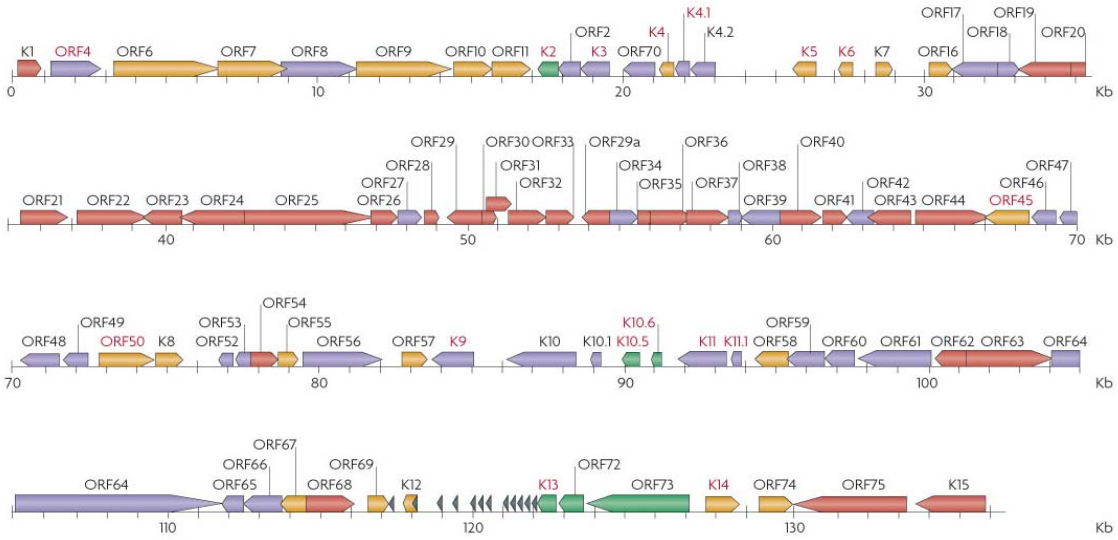

Figura 1 - Mapa do genoma do herpes-vírus 8. Os genes expressos durante o período de latência estão em verde e os genes pirateados de células estão escritos com letras vermelhas. Extraído de Coscoy, 2007.

A análise da sequência da ORF K1, permitiu a identificação de quatro subtipos principais do HHV-8 (A, B, C, D), com distribuição geográfica distinta (Dukers; Rezza, 2003; Mancuso *et al.*, 2008). Os subtipos A e C predominam na Europa e Estados Unidos, o subtipo B na África, o D em Ilhas do Pacífico. Novos subtipos têm sido identificados como o E que aparece em populações ameríndias no Brasil (Biggar *et al.*, 2000). Parece que o subtipo A do vírus está ligado a formas mais rapidamente progressivas das neoplasias do que os outros (Mancuso *et al.*, 2008). Em São Paulo, os subtipos encontrados são o A, B e C (Nascimento *et al.*, 2005).

3.1.4.2 Prevalência da infecção e vias de transmissão

A prevalência da infecção pelo HHV-8 não é uniforme no mundo. No Brasil, país de prevalência intermediária, um estudo multicêntrico realizado entre doadores de sangue, encontrou presença de anticorpos para HHV-8 em 25% das amostras de doadores de sangue de São Paulo, Salvador e Manaus (Nascimento *et al.*, 2008). A infecção é mais frequente em mulheres (31,7%) do que em homens (21,7%) (Nascimento *et al.*, 2008). Em tribos de ameríndios da Amazônia, onde o HHV-8 é endêmico, a prevalência dos anticorpos chega a mais de 60% (Biggar *et al.*, 2000). As vias de transmissão do HHV-8 ainda não estão completamente esclarecidas, mas acredita-se que em áreas endêmicas a transmissão do vírus acontece entre a mãe e a criança ou entre as próprias crianças, possivelmente através da saliva. Em regiões não endêmicas acredita-se que a principal forma de transmissão seja a sexual, principalmente em relações homossexuais (Hengge *et al.*, 2002; Dukers; Rezza, 2003).

3.1.4.3 Ciclo de vida

São consideradas células alvo do HHV-8 os linfócitos B, as células endoteliais, os monócitos, os queratinócitos, as células endoteliais e outras células epiteliais (Chakraborty *et al.*, 2012). Para aderir-se e entrar nas células alvo, o HHV-8 utiliza o sulfato de heparan, a molécula de adesão intercelular não integrina específica das células dendríticas (DC-SIGN) e também integrinas (Rappacciolo *et al.*, 2006, 2008; Chakraborty *et al.*, 2012). Após a infecção primária, geralmente ocorre o ciclo lítico e num prazo de 72-96 horas, na maioria das células, o vírus entra na fase de latência (West; Damania, 2010). A reativação da latência leva ao retorno

do ciclo lítico, o qual é necessário para propagação e sobrevivência no hospedeiro (West; Damania, 2010). A latência é caracterizada pelo genoma circular extra-cromossômico (epissomo), pela ausência de produção de vírions e pela expressão de pequena quantidade de genes (LANA, vCyclin, vFLIP, kaposina, miRNAs) (Jenner *et al.*, 2001). Na fase lítica há produção de vírions, lise celular e transcrição de maior número de genes (entre eles K2, K4, K6, K15, K9) (Jenner *et al.*, 2001; Coscoy, 2007). A transcrição na fase lítica inicia-se com o RTA ("replication and transcription activator") e obedece então, uma sequência temporal, como acontece com os outros herpes-vírus (Coscoy, 2007; Mesri *et al.*, 2010)

3.1.4.4 Interação com o hospedeiro

A infecção pelo HHV-8 é crônica, sendo que indivíduos infectados, mesmo que sejam imunocompetentes, carregam o vírus por toda a vida. Para isso, o vírus desenvolveu mecanismos sofisticados de evasão do sistema imunológico, mecanismos anti-apoptóticos e interação com o ciclo celular (Coscoy, 2007). Além de perpetuar a infecção, esta intervenção na célula hospedeira e no microambiente fornece condições para o desenvolvimento das síndromes proliferativas relacionadas ao HHV-8.

Estratégias de evasão do sistema imune:

- **Período de latência**

O próprio longo período de latência colabora para persistência da infecção. Neste período os vírus da subfamília γ herpes-vírus expressam reduzido número de genes, minimizando sua exposição para o sistema imunológico.

- **Inibição do antígeno do complexo principal de histocompatibilidadede classe I**

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I é expresso em todas as células nucleadas e tem função na apresentação de antígenos para as células citotóxicas (linfócitos T CD8+). Estes antígenos geralmente são intracelulares e os vírus fazem parte deste grupo.

O HHV-8 produz duas proteínas, chamadas K3 e K5 (ou também de MIR 1 e MIR 2) que diminuem a expressão do MHC classe I, inibindo a resposta citotóxica (Coscoy; Ganem, 2000). Seu mecanismo de ação é baseado no aumento da degradação do MHC-I pelo lisossomo após internalização da molécula (Hewitt *et al.*, 2002).

- **Inibição das células "natural killer"**

As células NK eliminam rapidamente células infectadas por vírus. As células infectadas sofrem lise pois tornam-se alvo de grânulos citotóxicos contendo perforinas e granzimas. Além disto, as células NK também liberam IFN-γ e TNF-α que participam da resposta adaptativa. A atividade das células NK é controlada por sinais positivos e negativos. A principal molécula inibitória para estas células é o MHC classe I. Por estar presente em todas as células, o MHC I impede que as mesmas sejam atacadas pelas células NK.

Como já descrito, células infectadas pelo HHV-8 têm menor expressão de MHC classe I, sendo, portanto, esperado que se tornassem alvo das células NK. Isto não acontece pois o próprio K5 inibe o ICAM-1 e o CD86 que são moléculas coestimuladoras para as células NK (Coscoy; Ganem, 2001). A

célula NK perde sua habilidade, portanto, de estabelecer contato com as células infectadas pelo HHV-8.

- **Polarização para Th2**

O HHV-8 é capaz de polarizar a resposta imune para Th2 através da produção de citocinas. A resposta imune Th1 é necessária no combate às infecções por patógenos intracelulares. O HHV-8, através da produção de citocinas, por exemplo vCCL1, vCCL2 e vCCL3, leva a uma resposta Th2 (Sallusto *et al.*, 1998; Coscoy, 2007) ineficaz na erradicação da infecção. Existe, nas lesões de SK, um predomínio dos efeitos de IL-10 sobre o IFN-γ (Riva *et al.*, 2010).

- **vIL-6**

O KSHV é capaz de codificar um homólogo à IL-6 humana, chamada de vIL-6 que apresenta 25% de homologia com a primeira (Neipel *et al.*, 1997). É produzida tanto na fase de latência como na fase lítica e tem propriedade de estimular a angiogênese tumoral, diminuir o efeito do IFN e induzir resposta Th2 (Aoki *et al.*, 1999; Moore; Chang, 2003).

- **Desarranjo na sinalização do interferon**

Os interferons são um grupo de citocinas que coordenam a resposta imune aos vírus e outros patógenos. Estão também envolvidos em mecanismos de crescimento e diferenciação celular. Os IFN tipo I são produzidos por praticamente todas as células do corpo como resposta a infecções virais. O controle da sua transcrição acontece pelos fatores reguladores de IFN (IRFs).

O KSHV é capaz de produzir homólogos aos IRFs celulares que atrapalham a produção de IFN em resposta a infecções virais e regulam também a expressão de genes virais (Taniguchi *et al.*, 2001; Moore; Chang, 2003).

- **Interação com o Sistema Complemento**

O sistema complemento é um importante componente do sistema imunológico inato e também do adaptativo. Para evitar sua ativação aberrante, a cascata do complemento é controlada por proteínas reguladoras chamadas de reguladores da ativação do complemento (RCA). O KSHV, como todos os rhadinovírus, interferem com a ativação do complemento pois são capazes de sintetizar homólogos aos RCAs do hospedeiro (Moore; Chang, 2003; Spiller *et al.*, 2003).

Mecanismos anti-apoptóticos

A apoptose é um importante mecanismo de controle de infecções virais. Tamanha importância que o HHV-8 possui diversos genes com função de controlá-la. Entre eles estão o vBCL2 (do inglês "B-cell lymphoma 2") e vIAP (do inglês "inhibitor of apoptosis protein"), presentes nas membranas mitocondriais, o LANA-1, LANA-2 e o vIRF-1 que inibem a ativação do gene *p53* (Moore; Chang, 2003).

Interação com o ciclo celular

O vCyC e o LANA-1 do HHV-8 são capazes de desregular a proteína RB que "checa" o DNA na transição G1/S. Outras proteínas virais como a RAP (do inglês

"replication associated protein") fazem com que a célula, durante a fase lítica, pare a mitose entre as fases G2/M maximizando a replicação viral (Moore; Chang, 2003).

3.1.4.5 Modelo de carcinogênese no Sarcoma de Kaposi e o papel do herpes-virus 8

Algumas características do SK fazem com que, nas fases iniciais da doença, não existam critérios que a definam como neoplasia. As lesões iniciais de SK têm exuberante componente inflamatório e são policlonais. O SK é uma doença onde é encontrado o fenômeno de Koebner, isto é, podem aparecer lesões em sítios de traumas (Mesri *et al.*, 2010). As células fusiformes do SK, quando em cultura, precisam de citocinas para sua sobrevivência (Douglas *et al.*, 2007). Pacientes imunodeprimidos podem ter regressão da doença apenas com a melhora imunológica, por exemplo, introdução de esquema antirretroviral para aqueles com Aids ou mudança dos esquemas imunossupressores no caso do SK iatrogênico. Todas estas evidências nos levam a crer que, em suas fases iniciais, o SK é uma doença inflamatória mas que a ação viral prolongada leva a vantagens de clones celulares com sua proliferação desordenada e surgimento de sarcomas. Nos tumores em estágios avançados existe monoclonalidade (Judde *et al.*, 2000).

A infecção das células endoteliais e suas progenitoras pelo HHV-8 leva a mudanças em sua morfologia, no seu ritmo de crescimento e na sua expressão gênica (Moses *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004). Na infecção *in vitro,* entretanto, estas mudanças não são suficientes para a transformação maligna (Mesri *et al.*, 2010) e células do SK quando em cultura perdem o genoma do HHV-8 após ciclos de divisão celular (Douglas *et al.*, 2007). Indivíduos saudáveis não desenvolvem lesões de SK

após a infecção pelo HHV-8. Fica claro, portanto, que são necessários cofatores para que o vírus consiga induzir o aparecimento dos tumores.

O principal reservatório do HHV-8 são os linfócitos B e os monócitos (Gregory *et al.*, 2009a; Chakraborty *et al.*, 2012) que, quando submetidos a agentes químicos como butirato, citocinas, hipoxia ou estímulo do TLR 7 e TLR 8, permitem a reativação lítica do vírus (Davis *et al.*, 2001; Gregory; Damania, 2009b).

Em organismos imunodeprimidos, o vírus encontra condições para se multiplicar. Genes da fase lítica são responsáveis pela produção de citocinas, fatores de crescimento, recrutamento de células inflamatórias da resposta Th2 e células progenitoras que promoverão angiogênese. A produção de citocinas angiogênicas faz com que sejam atraídas novas células-alvo para os sítios de lesão (Riva *et al.*, 2010).

Os vírus nas células recém infectadas poderão entrar em fase lítica, perpetuando este ciclo ou entrar na fase de latência onde ocorrerá proliferação celular e imortalização.

O SK é, portanto, uma doença onde a grande maioria das células apresenta o HHV-8 em sua fase de latência, mas a expressão de genes da fase lítica é fundamental para o seu desenvolvimento (Mesri *et al.*, 2010).

3.1.4.6 O vírus da imunodeficiência humana e o herpes-vírus 8

Pacientes com Aids apresentam uma chance muito aumentada de desenvolver o SK e nestes pacientes a neoplasia tem maior agressividade (da Silva; de Oliveira, 2011). Acredita-se que a interação entre os vírus HIV e HHV-8 seja a causa deste comportamento. A própria depressão imunológica causada pelo HIV colabora para a evasão imunológica do HHV-8.

Ambos os vírus infectam células dendríticas e células da linhagem monocítica/macrofágica, mas não é fundamental que a célula esteja co-infectada para que haja interação entre estes vírus (da Silva; de Oliveira, 2011). Apesar do HIV não infectar as células do SK, a proteína Tat do HIV está presente nas células fusiformes, promovendo seu crescimento (Zhou *et al.*, 2013). Tat é capaz de induzir o ciclo lítico do HHV-8 através da ativação da via JAK2/STAT3 (Zeng *et al.*, 2007), acelera a proliferação celular e tumorigênese induzida pela kaposina (Chen *et al.*, 2009) e pelo vGPCR via NF-κB (Guo *et al.*, 2004). Promove também angiogênese e tumorigênese induzida por vIL-6 (Zhou *et al.*, 2013). A proteína Tat também aumenta a expressão do receptor de quimiocina CXCR-4 (Gibellini *et al.*, 2003). Este receptor liga-se ao SDF-1 (do inglês "stromal derived factor"), expresso no endotélio da pele, e permite a adesão de células circulantes infectadas (Yao *et al.*, 2003). Desta maneira, o SDF-1 facilita o aparecimento de lesões de SK na pele.

Além da Tat, outras proteínas do HIV podem interagir com o HHV-8, aumentando seu potencial oncogênico. A proteína Nef é sinérgica ao vIL-6 promovendo formação de canais vasculares e proliferação celular quando presente em células endoteliais e em fibroblastos (Zhu *et al.*, 2014).

O HHV-8, por sua vez, aumenta a replicação do HIV nos linfócitos T CD4+ e nos monócitos quando ambos os vírus estão presentes na mesma cultura (Mercader *et al.*, 2001; Caselli *et al.*, 2005). Células dendríticas infectadas pelo HHV-8 são estimuladas, passando a capturar mais partículas do HIV e transmitindo-o para os linfócitos T CD4+ (Liu *et al.*, 2013). LANA ativa a transcrição do HIV pois interage, de maneira sinérgica, com Tat. A proteína KIE-2 do HHV-8 (ORF45) ativa a replicação do HIV quando co-expressa com Tat. As proteínas Tat e vpr do HIV

ativam KIE-2 do HHV-8, criando assim uma alça de amplificação da replicação viral (Huang *et al.*, 2001).

3.1.4.7 Herpes-vírus 8 e terapia antirretroviral

O Sarcoma de Kaposi é a neoplasia mais frequente em pacientes com Aids, mas desde a introdução da terapia antirretroviral combinada, por volta de 1990, sua incidência, bem como sua morbi-mortalidade diminuíram drasticamente (Chokunonga *et al.*, 2013). Paralelamente a isto, cerca de 50% dos pacientes com lesões clínicas de SK, ao iniciar a terapia antirretroviral como único tratamento, apresentam uma redução total ou parcial das lesões (Gill *et al.*, 2002).

O esquema antirretroviral proposto atualmente é chamado de terapia antirretroviral altamente eficaz (do inglês "highly active antiretroviral therapy" - HAART). Esta compreende a combinação de pelo menos três drogas que incluem dois inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos, associados a um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo ou a um inibidor de protease reforçado com ritonavir (Ministério da Saúde, 2008).

Os efeitos da HAART sobre a co-infecção HIV/HHV-8, segundo da Silva e de Oliveira (2011), são: 1) impacto direto na reativação e replicação do HHV-8 com reflexo na carga viral; 2) promoção da reconstituição parcial do sistema imunológico, melhorando o controle sobre a infecção primária e reativação viral, diminuindo a chance de transformação celular a longo prazo e melhorando a vigilância imunológica sobre as células transformadas; 3) diminuição da carga viral do HIV, diminuindo a interação viral e os produtos que participam dos mecanismos de cooperação viral.

Sabe-se que o uso da terapia antirretroviral combinada diminui a carga viral plasmática do HHV-8 e a infecção das células mononucleares do sangue periférico pelo vírus (Bourboulia *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2010). Ainda não é totalmente conhecido o mecanismo pelo qual isto acontece. Sabe-se que há um aumento dos anticorpos para a fase lítica, aumento dos anticorpos para a fase de latência e que há aumento da resposta inflamatória por linfócitos T CD8+ (Bourboulia *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2010). No passado existiram teorias que associavam a diminuição das lesões de SK ao efeito de inibidores da protease (Lebbé *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 1998) uma vez que os inibidores de protease têm atividade anti-angiogênica (Sgadari *et al.*, 2002). Mais recentemente a relação direta entre inibidores de protease e redução tumoral não foi comprovada, uma vez que esquemas que usavam combinações de HAART baseadas em inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleosídeos também apresentaram regressão tumoral (Gill *et al.*, 2002; Portmouth *et al.*, 2003; Grabar *et al.*, 2006).

Existe também uma porcentagem de pacientes que desenvolve a síndrome da reconstituição imune (IRIS). Em relação ao Sarcoma de Kaposi, esta síndrome é caracterizada por piora do quadro clínico em pacientes que já apresentavam lesões ou aparecimento de lesões em pacientes que não as apresentavam, mas estavam infectados pelo HHV-8. A piora de lesões pré-existentes aconteceu em cerca de 30% dos casos em um estudo realizado em Moçambique (Letang *et al.*, 2010) e o surgimento de lesões em pacientes sem história prévia de SK aconteceu em 7% dos casos de Aids onde se inicia HAART, segundo este mesmo estudo. O risco de desenvolver SK é maior nos primeiros três meses após início da terapia antirretroviral (Lacombe *et al.*, 2013).

3.2 IMUNIDADE INATA

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa de um organismo contra possíveis agentes agressores. Consegue identificar e controlar muitas infecções, mas é também um estímulo para a resposta imune adaptativa, podendo influenciar esta última de tal maneira que seja ótima contra diferentes tipos de microorganismos. A imunidade inata é capaz de promover alterações celulares que impedem a replicação e propagação dos vírus auxiliando a resposta imune adaptativa no seu controle. Fazem parte da imunidade inata as barreiras físicas que dificultam a entrada de agressores, fagócitos e o sistema complemento.

O reconhecimento dos agentes infecciosos pelos componentes da reposta imune inata é feito através de estruturas essenciais aos microorganismos, mas que não estão presentes em células do hospedeiro. Estas estruturas marcam classes de patógenos, são chamadas de padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) e incluem lipídeos, lipoproteínas, proteínas, glicoproteínas e ácidos nucleicos.

Os receptores que fazem este reconhecimento estão presentes nas membranas celulares (da superfície ou de endossomos citoplasmáticos) ou são proteínas solúveis no plasma ou no meio extracelular. São chamados de receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Três classes principais destes receptores foram identificadas e estão envolvidas em mecanismos da imunidade inata. São os receptores semelhantes a “toll” (do inglês TLR), receptores semelhantes a RIG-1 (do inglês RLR) e os receptores semelhantes a NOD (do inglês NLR) (Takeuchi; Akira, 2009). Outros receptores que reconhecem padrões são a família lectina tipo C, os receptores “scavengers” e os receptores n-formilMet-Leu-Phe (Abbas *et al.*, 2012).

Quanto ao componente celular da imunidade inata, participam as barreiras epiteliais, fagócitos que compreendem os macrófagos e neutrófilos, as células NK, os mastócitos e as células dendríticas. O termo dendrítica vem do grego "dendron" que significa árvore. Segundo Zaba *et al.* (2009), a expressão "célula dendrítica" começou a ser usada em 1973 quando Steinman e Cohn descreveram estas células em linfonodos. Como características comuns, as células dendríticas apresentam sua morfologia, com prolongamentos citoplasmáticos chamados dendritos, e a capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos T. Representam um grupo heterogêneo de células fundamentais para o desencadeamento da resposta imune, fazendo a ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa.

Sendo a pele um órgão de interface com o meio externo, deve apresentar mecanismos de defesa bastante desenvolvidos. Diferentes populações de células dendríticas fazem parte desta vigilância imunológica. Na epiderme estão presentes as células de Langerhans, identificadas através de dois anticorpos, o CD207 (langerina) e o CD1a. É uma célula apresentadora de antígenos que tem papel em mecanismos de tolerância imunológica a antígenos cutâneos (Steinman; Nussenzweig, 2002). Na derme existem as células dendríticas mielóides dérmicas e as células dendríticas plasmocitóides. As primeiras compõem um grupo heterogêneo sendo que são divididas entre as células residentes e as células inflamatórias. Apresentam, em comum, a expressão de CD11c (Zaba *et al.*, 2009). As CDp são raras ou ausentes na pele normal mas estão aumentadas em doenças infecciosas, auto-imunes e são as células com maior capacidade de produção de IFN tipo 1 (Liu, 2005; Valladeau; Saeland, 2005; Zaba *et al.*, 2009).

Recentemente à podoplanina, uma proteína transmembrana, presente nas células endoteliais linfáticas e células reticulares dos órgãos linfóides, foi atribuído papel na imunidade inata. Através da sua ligação com o receptor CLEC-2, presente em células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos B e células dendríticas dérmicas (Acton *et al.*, 2012), a podoplanina tem função na migração celular durante a resposta imunológica tecidual (Acton *et al.*, 2012; Astarita *et al.*, 2012). Em neoplasias e durante a embriogênese, a podoplanina interage com proteínas do citoesqueleto contribuindo nos mecanismos de adesão e migração celular (Astarita *et al.*, 2012).

3.2.1 Receptores "Toll-like"

O receptor "Toll" foi inicialmente identificado no desenvolvimento da *Drosophila melanogaster*. O receptor era responsável pelo desenvolvimento do eixo dorso ventral e as moscas mutantes tinham um fenótipo muito distorcido, daí o nome "Toll", estranho em alemão (Akira *et al.,* 2006; Kang *et al.*, 2006). Manteve-se evolutivamente e no homem são conhecidos dez TLRs (Vasselon; Detmers, 2002). Os TLRs são proteínas transmembranas do tipo 1 com ectodomínio contendo sequências ricas em leucina que reconhecem os PAMPs, domínio transmembrana e domínio intracelular receptor de interleucina 1 (TIR) necessário para a transdução do sinal (Kawai; Akira, 2010). Destes os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados nas membranas dos endossomos. Após a união do TLR com seu ligante, inicia-se uma cascata de vias de sinalização, sendo que os TLRs são capazes de selecionar uma via específica, com suas proteínas adaptadoras, controlando o tipo de resposta inflamatória (Akira *et al.*, 2006). Todos os TLRs, exceto o TLR 3, utilizam como

proteína adaptadora o MyD88. O TLR 3, por sua vez, usa o TRIF (adaptador contendo domínio TIR indutor de β interferon) (West; Damania, 2008).

Quadro 1 - Receptores "Toll-like" de células humanas e seus respectivos ligantes. TLR: receptor "Toll-like". Adaptado de Akira *et al.*, 2006 e Abbas *et al.*, 2012

Receptor "Toll-like"	Ligante
Heterodímero TLR 1: TLR 2	Lipoproteínas
Heterodímero TLR 2: TLR 6	Lipoproteínas, ácido lipoteicoico, zimosan
TLR 3	ds RNA
TLR 4	Lipopolissacárides
TLR 5	Flagelina
TLR 7	ssRNA
TLR 8	ssRNA
TLR 9	CpG DNA
TLR 10	desconhecido

O TLR 3 reconhece RNA dupla fita, produzido por vírus durante a fase de replicação (Alexopoulou *et al.*, 2001; Akira; Hemmi, 2003; Karikó *et al.*, 2004). O TLR 9 reconhece sequências CpG não metiladas comuns em DNA de procariontes (Akira *et al.*, 2006). A ligação com o TLR 9 leva à ativação das células dendríticas, dos macrófagos e dos linfócitos B com exuberante resposta Th1 (Akira *et al.*, 2006). É um importante receptor nas infecções causadas por DNA vírus (Akira *et al.*, 2006, Kawai; Akira, 2006).

3.2.1.1 Receptores "Toll-like" e herpes-vírus 8

Os TLRs têm participação na resposta imune inata e adaptativa ao HHV-8 (Knowlton *et al.*, 2013).

Durante a infecção primária pelo HHV-8 há ativação dos TLRs. West e Damania (2008) observaram que a infecção de monócitos e células da linhagem da leucemia monocítica apresentavam aumento da expressão de TLR 3 após a infecção com o HHV-8 e aumento das citocinas IFN-β1, CCL2 e CXCL10. A importância do TLR 3 no controle da infecção por herpes-vírus ficou provada uma vez que crianças com sua deficiência eram muito suscetíveis à encefalite pelo HSV-1 (Zhang *et al.*, 2007). Na infecção pelo HHV-8, a ativação da via do TLR 3 promove liberação de citocinas, ativação imune e da via do NF-κB que são necessárias para indução da latência viral e manutenção da infecção (Brown *et al.*, 2003).

O RTA é necessário para desencadear a reativação lítica viral. Além disso, o RTA tem capacidade de inibir a produção de IFN através da degradação do TRIF, a proteína adaptadora da via do TLR 3 (Ahmad *et al.*, 2011). A ativação do TRIF e do TLR 3, por sua vez, aumenta a expressão da proteína RTA (Meyer *et al.*, 2013).

O HHV-8 estimula o TLR 4 através da ligação direta de glicoproteínas do envelope viral. O TLR 4 também induz a produção de citocinas, entre elas o IFN (Lagos *et al.*, 2008). Estudando-se experimentalmente a interação do HHV-8 e do TLR 4 descobriu-se que o vírus desenvolveu mecanismo de escape imunológico através da diminuição da expressão de TLR 4 (Lagos *et al.*, 2008).

Como já mencionado e em concordância com outros herpes-vírus, o HHV-8 apresenta duas fases em seu ciclo de vida: fase de latência e fase lítica. Não apenas a hipoxia, epinefrina, citocinas (por exemplo IFN-γ), mas também agonistas do TLR 7 e principalmente do TLR 8 são capazes de reativar o vírus (Davis *et al.*, 2001; Gregory; Damania, 2009; Gregory *et al.*, 2009). Desta maneira, outras infecções virais associadas interferem no ciclo de vida do HHV-8. A reativação periódica é

importante para a manutenção da infecção através da propagação do vírus para novas células alvo e para a transmissão para outro organismo.

O TLR 9 é importante para a produção de IFN-α em resposta aos DNA vírus (Bowie; Haga, 2005; Kawai; Akira, 2006). A CDp estimulada pelo EBV ativa as células NK e os linfócitos T, em resposta ao estímulo de TLR 9 (Lim*et al.*, 2007). Em cultura de células de camundongo, não há produção de IL-12 após infecção por gamaherpes-virus (gammaherpes-virus murino 68), na ausência de TLR 9 (Guggemoos *et al.*, 2008). Além disso, o TLR 9 é o receptor que reconhece o HHV-8 nas CDp (West *et al.*, 2011).

3.2.1.2 Receptores "Toll-like" e o vírus da imunodeficiência humana

A resposta dos TLR nas células dendríticas e nos monócitos está alterada tanto na infecção primária como na infecção crônica pelo HIV (Chang *et al.*, 2012).

Na infecção aguda, logo após a penetração do vírus nas barreiras epiteliais, a resposta inflamatória local recruta células que servirão como alvo do HIV, amplificando e disseminando a infecção (Kamga *et al.*, 2005; Ploquin *et al.*, 2012). A resposta dos monócitos e células dendríticas mielóides, ao estímulo dos TLR 7 e 8 está aumentada e a produção de citocinas é maior do que acontece nos indivíduos não infectados ou naqueles com infecção crônica (Chang *et al.*, 2012) . Estes são achados consistentes com a grande quantidade de citocinas produzidas durante a fase aguda da infecção.

Descobertas recentes estão atribuindo aos TLR a ativação imunológica crônica que perpetua e intensifica a imunodepressão causada pelo HIV, levando à Aids e à progressão da doença (Chang; Altfeld, 2009). Os lipopolissacárides,

resultantes da translocação de bactérias Gram negativas que acontece no intestino dos pacientes infectados pelo HIV, estimulam cronicamente o TLR 4 (Brenchley *et al.*, 2006; Marchetti *et al.*, 2013).

O próprio vírus HIV expressa ligantes dos TLR 7 e 8 que levam à ativação imunológica direta e crônica (Meier *et al.*, 2007). Em ratos, a ativação imune crônica pelo TLR 7 provoca alterações imunológicas semelhantes àquelas encontradas na Aids (Baenziger *et al.*, 2009). Já havia sido demonstrado que a ativação crônica do TLR 9 pelo CpG DNA leva à destruição folicular e imunodepressão (Heikenwalder *et al.*, 2004). A presença de polimorfismos nos genes dos TLRs determina diferentes graus de resistência à infecção pelo HIV (Oh *et al.*, 2008).

O TLR 3 parece ter papel nos mecanismos de defesa. Polimorfismos da porção extracelular (ectodomínio) do TLR 3 determinam maior resistência à infecção pelo HIV (Sironi *et al.*, 2012). Em indivíduos cronicamente expostos à infecção pelo HIV e que não apresentam soroconversão, o estímulo do TLR 3 pelo seu agonista sintético, poli(I:C) - ácido poliriboinosinicopoliribocitidílico – desencadeia maior produção de citocinas inflamatórias (Biasin *et al.*, 2010). Além disso, a ativação do TLR 3 em macrófagos suprime a infecção e a replicação do HIV através de mecanismos dependentes de IFN tipo 1 (Zhou *et al.*, 2010).

O HIV é reconhecido nas CDp pelo TLR 7 (Beignon *et al.*, 2005). Outros receptores celulares também interagem com o vírus. CXCR4, CCR5, CD4, BDCA-2 ligam-se à proteína do envelope viral gp120 (Martinelli *et al.*, 2007). Sendo o BDCA-2 um receptor inibitório, na presença de gp120, CDp estimuladas por agonistas de TLR 9, produzem menos IFN-α, TNF-α e IL-6 que o esperado (Dzionek *et al.*, 2001; Martinelli *et al.*, 2007). A CDp torna-se então menos responsiva aos

ligantes de TLR 9 presentes em bactérias e DNA vírus, possibilitando aparecimento de infecções oportunistas (Chang *et al.*, 2012).

3.2.2 Células dendríticas plasmocitóides

Lennert e Remmele (1958) citados por Liu (2005) foram os patologistas que descreveram pela primeira vez as CDp, através de estudos em linfonodos.

Trata-se de um exemplo único, na biologia celular, onde uma célula diferenciada, especializada na produção de interferon e com morfologia semelhante ao plasmócito, quando estimulada, é capaz de sofrer nova diferenciação, com mudança em sua morfologia e sua função, tornando-se dendrítica e especializada na apresentação de antígenos (Soumelis; Liu, 2006). A CDp adquire a morfologia dendrítica quando estimulada com IL-3, IL-3 com CD40L, vírus e bactérias contendo sequências de CpG-DNA não metiladas (Grouard *et al.*, 1997; Dzionek *et al.*, 2001). A Figura 2 ilustra a morfologia das CDp ao exame de microscopia óptica e eletrônica.

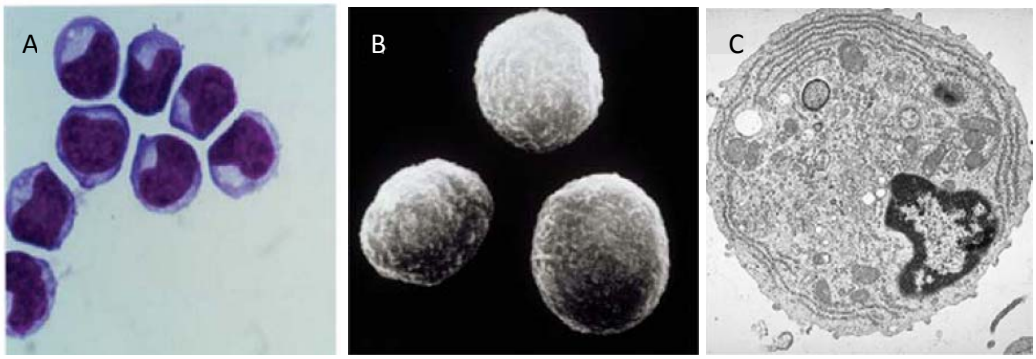

Figura 2 - Morfologia das células dendríticas plasmocitóides. **A)** Ao microscópio óptico, coloração de Giensa. **B)** Ao microscópio eletrônico de varredura. **C)** Ao microscópio eletrônico de transmissão. Extraído de Liu, 2005

São células raras (0,3-0,5% das células mononucleares do sangue periférico) (Liu, 2005; Randolph *et al.*, 2008). Seus marcadores são o BDCA-2 (do inglês "blood dendritic cell antigen-2), o ILT7 (do inglês "immunoglobulin-like transcript-7"), o IL-3Rα (CD123) e o BDCA-4 (Dzionek *et al.*, 2001; Liu, 2005; Reizis *et al.*, 2011). Destes, os dois últimos são menos específicos.

As CDp têm origem em uma célula hematopoiética progenitora localizada na medula óssea (Figura 3). Esta célula tem como características a presença dos receptores CD135, CD115 e o CD117. Estas precursoras dão origem não apenas às CDp mas também às células dendríticas convencionais (CDc) e às células linfóides (Reizis *et al.*, 2011). Após sua formação na medula, as CDp entram na corrente sanguínea e vão para órgãos linfóides (linfonodos, baço, timo, tecido linfóide associado à mucosa) (Sozzani *et al.*, 2010). Durante o desenvolvimento na medula, a expressão do fator de transcrição E2-2 é fundamental para sua diferenciação e para o desenvolvimento de características comuns entre as CDp e os linfócitos B (Reizis, 2010). Mesmo após a célula estar diferenciada, seu fenótipo pode ser alterado apenas pela falta de fator de transcrição. A CDp, por exemplo, pode se "transformar" em CDc apenas eliminando-se o E2-2 (Reizis *et al.*., 2011).

As CDp são importantes na resposta imune inata aos vírus. Para tanto, lançam mão de RRPs localizados nas membranas dos endossomos (TLR 7 e 9) e no citossol (RIG-I e MDA-5) (Cervantes-Barragan *et al.*, 2012). Os primeiros reconhecem respectivamente ssRNA e sequências CpG não metiladas do DNA. O RIG-I identifica ssRNA e dsRNA curtos, enquanto o MDA-5 reconhece dsRNA longo (Swiecki; Colonna, 2010).

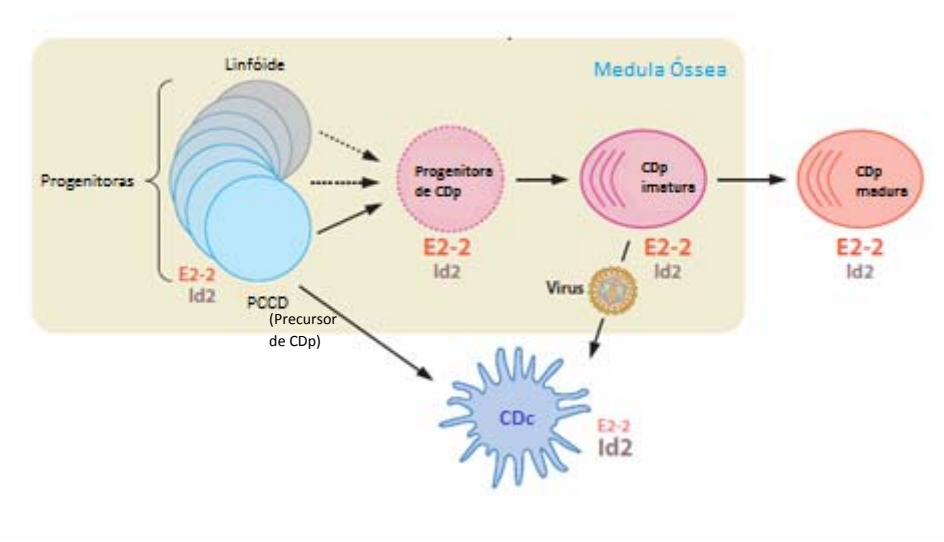

Figura 3 - Desenvolvimento da célula dendrítica plasmocitóide (CDp) e sua relação com a célula dendrítica convencional (CDc). As CDp têm origem na medula óssea a partir de um precursor comum entre as células dendríticas e a linhagem linfóide. A partir deste precursor, surge a célula progenitora de CDp e então a CDp imatura, a qual se transforma em CDp madura na periferia. A CDp imatura pode, sob ação viral, transformar-se em CDc. É fundamental para o desenvolvimento das CDp a proteína E2-2, assim como a expressão reduzida de seu inibidor, Id2. Adaptado de Reizis *et al.*, 2011

Todas as células humanas são capazes de produzir IFN sob determinado estímulo mas as CDp são especialmente eficientes, produzindo 1000 vezes mais do que a maioria das outras células após estímulo dos TLR presentes em suas membranas (Siegal *et al.*, 1999; Liu, 2005). Segundo Reizis (2010), algumas características favoreceram esta capacidade especial das CDp, dentre elas o potencial de retenção de ligantes dos TLR em endossomos; a expressão basal de IRF7, o principal regulador do IFN; a morfologia lembrando um plasmócito, com retículo endoplasmático bastante desenvolvido. As CDp são capazes, portanto, de produzir IFN na infecção por DNA ou RNA vírus. O HIV é reconhecido pelo TLR 7, o HHV-8 pelo TLR 9 e o EBV por ambos, TLR 7 e TLR 9 (McKenna *et al.*, 2005; Quan *et al.*, 2010; West *et al.*, 2011). A Figura 4 esquematiza o acima descrito.

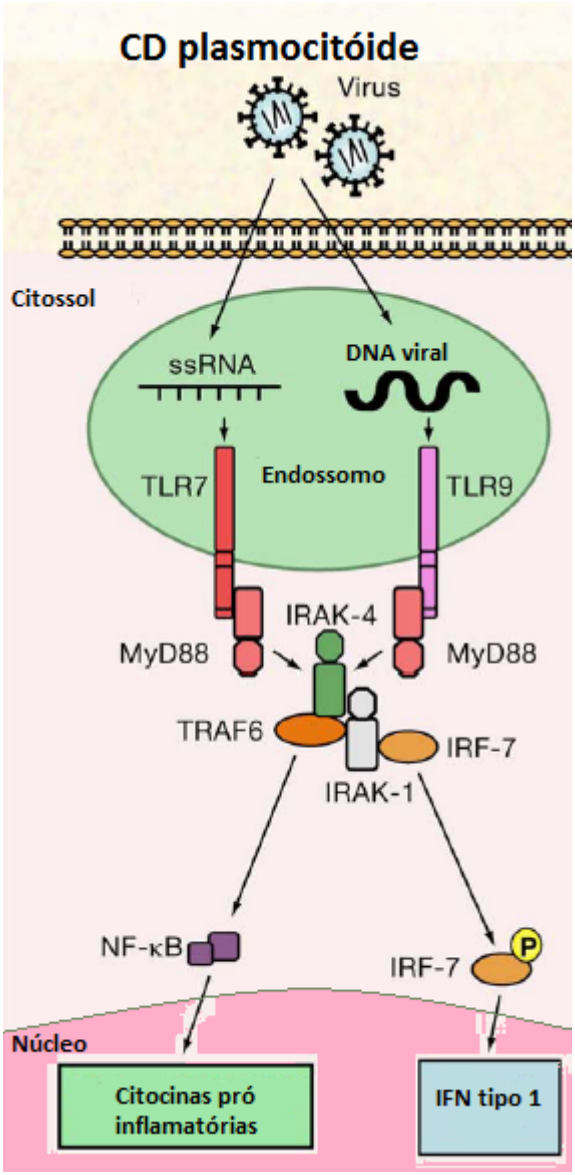

Figura 4 - A célula dendrítica plasmocitóide (CDp) e os receptores "toll-like" (TLR). A CDp reconhece DNA e ssRNA virais através dos receptores TLR 9 e 7 respectivamente. Ambos estão presentes nas membranas endossomais. Após estímulo, são recrutadas diversas moléculas intermediárias para que finalmente sejam produzidas citocinas. CD: célula dendrítica; ssRNA: RNA fita simples; TLR: receptor "toll-like"; IRAK: "Interleukin-1 receptor-associated kinase"; MyD88: "Myeloid differentiation factor 88"; TRAF: "TNF receptor associated factor"; NF-κB: Fator nuclear κB; IRF: fator liberador de interferon; IFN: interferon. Adaptado de Akira *et al.*, 2006.

Além da produção de IFN tipo 1, a célula dendrítica plasmocitóide, após estímulo, produz também IL-12, IL-6, TNF-α e outras citocinas inflamatórias, participando tanto da resposta imune inata como da resposta adaptativa (Swiecki;

Colonna, 2010; Reizis *et al.*, 2011). O IFN-α e a IL-12 são capazes de aumentar a sobrevida das células T, polarizar a resposta da células T para Th1, promover a atividade das células T citotóxicas, estimular a produção de IFN-γ, aumentar a citoxicidade das células NK (Marrack *et al.*, 1999; Biron, 2001; Le Bom; Tough, 2002; Trinchieri, 2003).

3.2.2.1 Células dendríticas plasmocitóides e o vírus da imunodeficiência humana

As CDp estão diminuídas no sangue de pacientes infectados pelo HIV. Esta diminuição é acompanhada pelo aumento da carga viral, pela diminuição de linfócitos T CD4+ no sangue e pelo aparecimento de doenças oportunistas. As possíveis causas para a redução do número das CDp no sangue são: o parasitismo e consequente destruição pelo HIV (Swiecki; Colonna, 2010); as CDp sofreriam apoptose pelo aumento da atividade da caspase 3 e não seriam repostas de maneira adequada pela medula óssea (Fitzgerald-Bocarsly; Jacobs, 2010); as CDp estariam redistribuídas para sítios de grande exposição antigênica como o trato gastro-intestinal (Li *et al.*, 2013); as CDp migrariam e se acumulariam em linfonodos e no baço durante a infecção (Lehmann *et al.*, 2010) ou migrariam e seriam destruídas nos linfonodos (Fiorentini *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009). Mesmo com o uso da HAART, há controversas sobre a recuperação dos valores da contagem de CDp no sangue (Pacanowski *et al.*, 2001; Chehimi *et al.*, 2002; Finke *et al.*, 2004; Swiecki; Colonna, 2010).

O BDCA-2 é um receptor das CDp. Tem ação inibitória sobre a produção de IFN (Dzionek *et al.*, 2001). O HIV é capaz de se ligar ao BDCA-2 através da

proteína gp120 e como consequência, há diminuição na produção de IFN após estímulo do TLR 9 (Martinelli *et al.*, 2007). Outros autores demonstraram que a produção de IFN pelas CDp está diminuída em resposta ao TLR 7 e na infecção aguda também (Feldman *et al.*, 2001; Pacanowski *et al.*, 2001; Martison *et al.*, 2007; Sachdeva *et al.*, 2008). Não existe, entretanto, consenso pois para Sabado *et al.* (2010) e Lehmann *et al.* (2008), apesar das CDp estarem diminuídas no sangue, elas estariam hiperfuncionantes, principalmente na infecção aguda. Seriam elas as responsáveis pelo estado de ativação crônica que desencadeia a alteração imunológica da Aids. Existe ainda estudo que mostra que a quantidade de IFN produzida individualmente por cada célula não se altera quando comparados grupos de infectados com grupos de indivíduos não infectados (Chang *et al.*, 2012).

Na infecção aguda pelo HIV, o IFN produzido pelas CDp é responsável por limitar a replicação do HIV nos linfócitos T CD4+ e promover a maturação de CDp e CDc (Pacanowski *et al.*, 2004; Reizis *et al.*, 2011). A ativação crônica das CDp é, entretanto, deletéria pois leva a um aumento da expressão de marcadores de ativação nas células T CD8+, à supressão da resposta T pelas células T reguladoras e à depleção das células T CD4+ por apoptose (Herbeuval; Shearer, 2007; Boasso; Shearer, 2008; Swiecki; Colonna, 2010). As CDp infectadas e ativadas pelo HIV expressam indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que induz os linfócitos T “naive” a se diferenciarem em células reguladoras, suprimindo a proliferação de linfócitos T e dificultando a maturação das CD (Boasso *et al.*, 2007; Manches *et al.*, 2008).

A Figura 5 resume a ação das CDp na infecção pelo HIV.

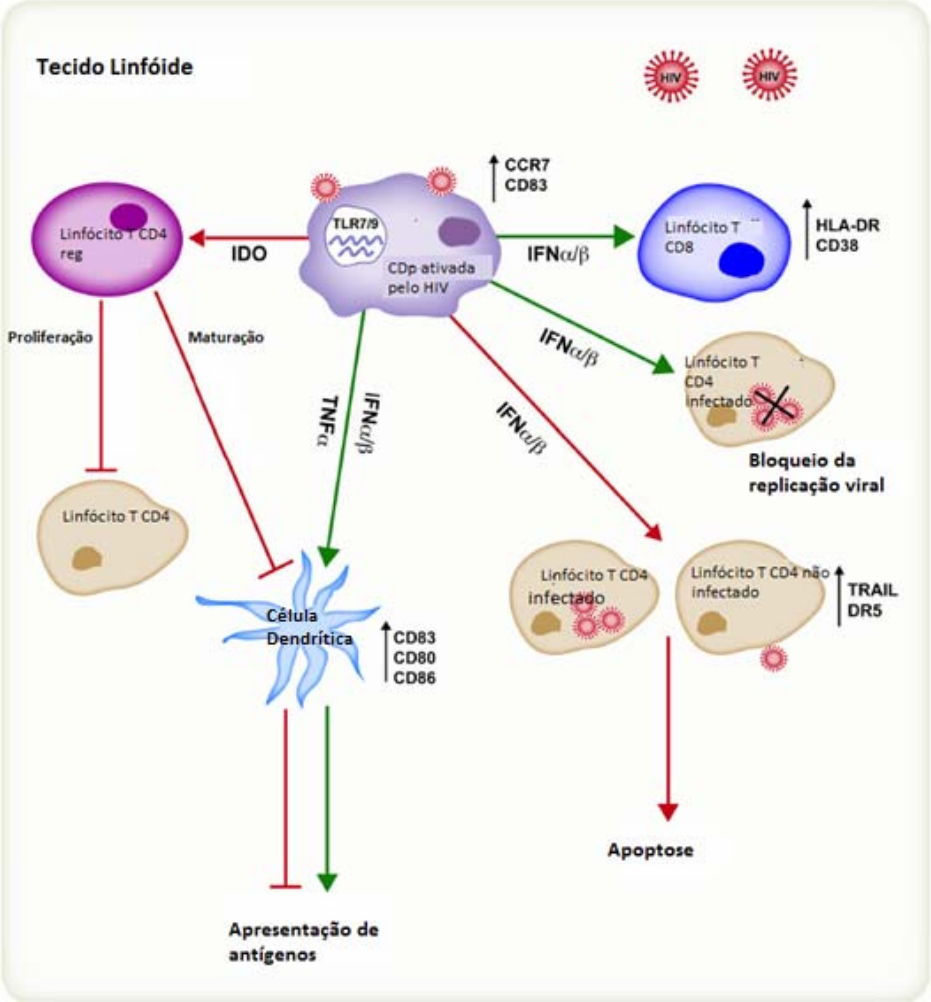

Figura 5 - Papel das células dendríticas plasmocitóides (CDp) na infecção pelo HIV envolve mecanismos protetores (setas verdes) e deletérios (setas vermelhas). Entre os benéficos: as CDp secretam IFN tipo 1 e TNF-α promovendo a maturação de células dendríticas e apresentação de antígenos para as células T. O IFN tipo 1 também limita a replicação do HIV nos linfócitos T CD4+. Efeitos deletérios: o HIV ativa a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), pela CDp, que suprime a proliferação dos linfócitos T CD4+ e a maturação das CD. A ativação crônica das CDp está associada com o aumento dos marcadores de ativação dos linfócitos T CD8+ e com a depleção das células T CD4+ infectadas e não infectadas. CCR: "chemokine (C-C motif) receptor"; HLA-DR: gene que codifica um tipo de MHC II; IFN: Interferon; TNF: Fator de necrose tumoral; TRAIL: "TNF-related apoptosis-inducing ligand; DR: "death receptors". Adaptado de Swiecki e Colonna, 2010

3.2.2.2 Células dendríticas plasmocitóides e o herpes-vírus 8

O HHV-8 é capaz de infectar linfócitos B, CDc, CDp, monócitos/macrófagos, células epiteliais e endoteliais (Chakraborty *et al.*, 2012).

Tendo a CDp, um papel de suma importância no combate às infecções virais, é natural que o HHV-8 tenha desenvolvido mecanismos de escape imunológico que interferem com a função desta célula. O IFN-α e o IFN-β, produzidos pelas CDp, são importantes para restringir a replicação viral e inibir a propagação da infecção. Por outro lado, o HHV-8 produz quatro proteínas homólogas aos IRF de mamíferos, os vIRF, que são capazes de atrapalhar a produção de IFN tanto na fase lítica como na fase de latência (Coscoy, 2007; Areste; Blackbourn, 2009).

As CDp estão diminuídas no sangue periférico de pacientes com SKc e apresentam suas funções alteradas neste grupo de pacientes quando comparados com indivíduos da mesma idade (Della Bella *et al.*, 2006).

O HHV-8 liga-se a receptores da superfície celular para conseguir adesão e infecção celular. O DC-SIGN é o principal receptor para as CDc, macrófagos e linfócitos B ativados (Rappacciolo *et al.* 2006, 2008; Knowlton *et al.,* 2013). Apesar da CDp não o expressar, ela pode ser infectada, "in vitro" pelo HHV-8 e produtos da transcrição de genes virais podem ser identificados após 48-72 horas de infecção. O receptor responsável pela entrada do HHV-8 na CDp ainda não é conhecido (West *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2013). Após a infecção, o vírus liga-se ao TLR 9 presente nos endossomos das CDp desencadeando a produção de IFN-α, o aumento da expressão de CD 83, CD 86 e MHC-II na sua superfície, melhorando, assim, a comunicação desta célula com os linfócitos T (West *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2013). Ao infectar células dendríticas, o vírus estaria manipulando o principal

mecanismo de indução de uma resposta imune mediada por linfócitos T. Esta interferência com os mecanismos de defesa é fundamental para o sucesso da infecção crônica e da carcinogênese.

A partir da revisão da literatura observamos que os trabalhos que enfocam o papel das células dendríticas plasmocitóides na Aids e no Sarcoma de Kaposi, são de natureza experimental "in vitro" e da quantificação dessas células no sangue dos doentes. Além disso, não encontramos igualmente estudos sobre a expressão dos receptores "Toll-like" nas lesões do SK.

Desse modo, nos propusemos a verificar a presença desses componentes da imunidade inata nas lesões cutâneas de SK, a fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos patogenéticos dessa neoplasia que, quando associada a Aids é resultante da ação de dois vírus. Além disso, os resultados desse trabalho poderão eventualmente contribuir para as bases teóricas de possibilidades terapêuticas futuras para esse processo neoplásico.

4 Casuística e Métodos

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Caracterização da amostra

Estudo retrospectivo onde foram selecionadas 50 biopsias cujo diagnóstico histopatológico foi Sarcoma de Kaposi, comprovado através da reação imuno-histoquímica positiva para o antígeno nuclear associado à latência (LANA) do HHV-8. Estas biopsias eram provenientes do arquivo do Laboratório de Dermatopatologia do Departamento/Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 2006 a 2009.

Como critério de inclusão considerou-se ser o material embebido em parafina suficiente para obtenção de cortes histológicos para a realização das técnicas imuno-histoquímica propostas. Além disso, apenas pacientes com a forma clássica (SKc) ou epidêmica, isto é, relacionado à Aids (SK-Aids) foram incluídos.

Foram consultados os respectivos prontuários médicos, exames laboratoriais e complementares além de relatórios de autopsia em alguns casos. Tínhamos como finalidade verificar idade dos pacientes e resultado da sorologia para HIV; averiguar se o paciente usava esquema de tratamento nos casos de SK-Aids; comprovar a fase clínico-patológica da lesão de SK; verificar se comprometimento de outros órgãos estava presente e obter os resultados da contagem de linfócitos T CD 4 sanguínea, por ocasião da colheita das biopsias.

Onze espécimes provinham de 10 doentes com SKc, 22 espécimes de 19 doentes com SK-Aids e 17 espécimes de 16 doentes com Aids e submetidos à terapia

antirretroviral altamente eficaz (SK-Aids/HAART) por ocasião do diagnóstico do SK. Para pacientes com mais de uma biopsia, todas as variáveis foram analisadas com dados independentes, da mesma maneira que os espécimes de diferentes origens.

O Gráfico 1 ilustra a distribuição da casuística, quanto ao subtipo epidemiológico de SK, assim como doentes com Aids tratados ou não com HAART.

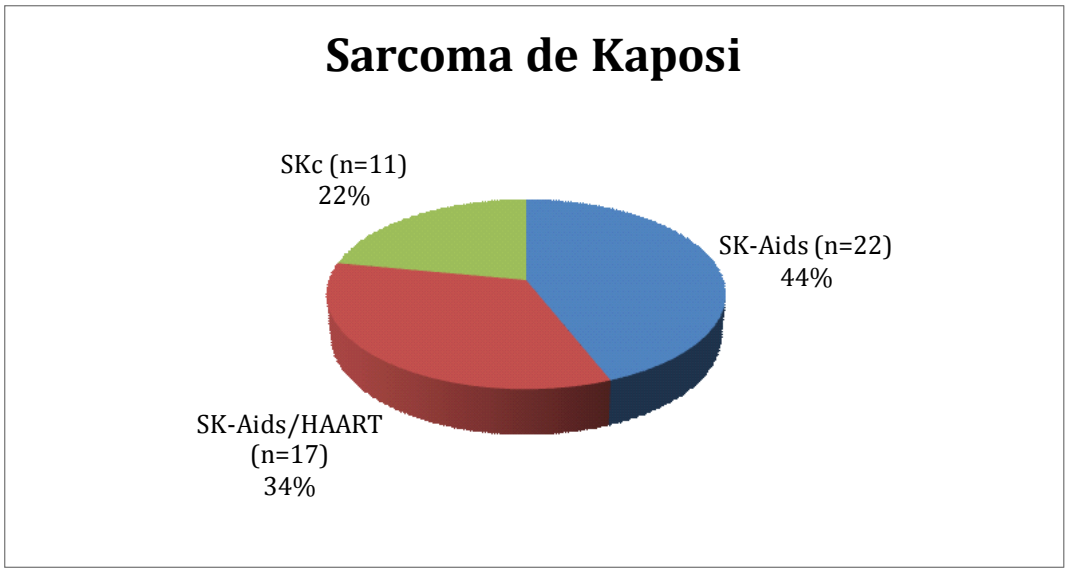

Gráfico 1 - Distribuição das biopsias de Sarcoma de Kaposi clássico e associado à Aids, tratados ou não com HAART. SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em pacientes sob tratamento com HAART; HAART: Terapia antirretroviral altamente eficaz

Vinte e três espécimes de granuloma piogênico não ulcerado (hemangioma capilar lobular) compuseram o grupo controle.

O Gráfico 2 demonstra a distribuição quanto ao gênero dos grupos de Sarcoma de Kaposi e do grupo controle.

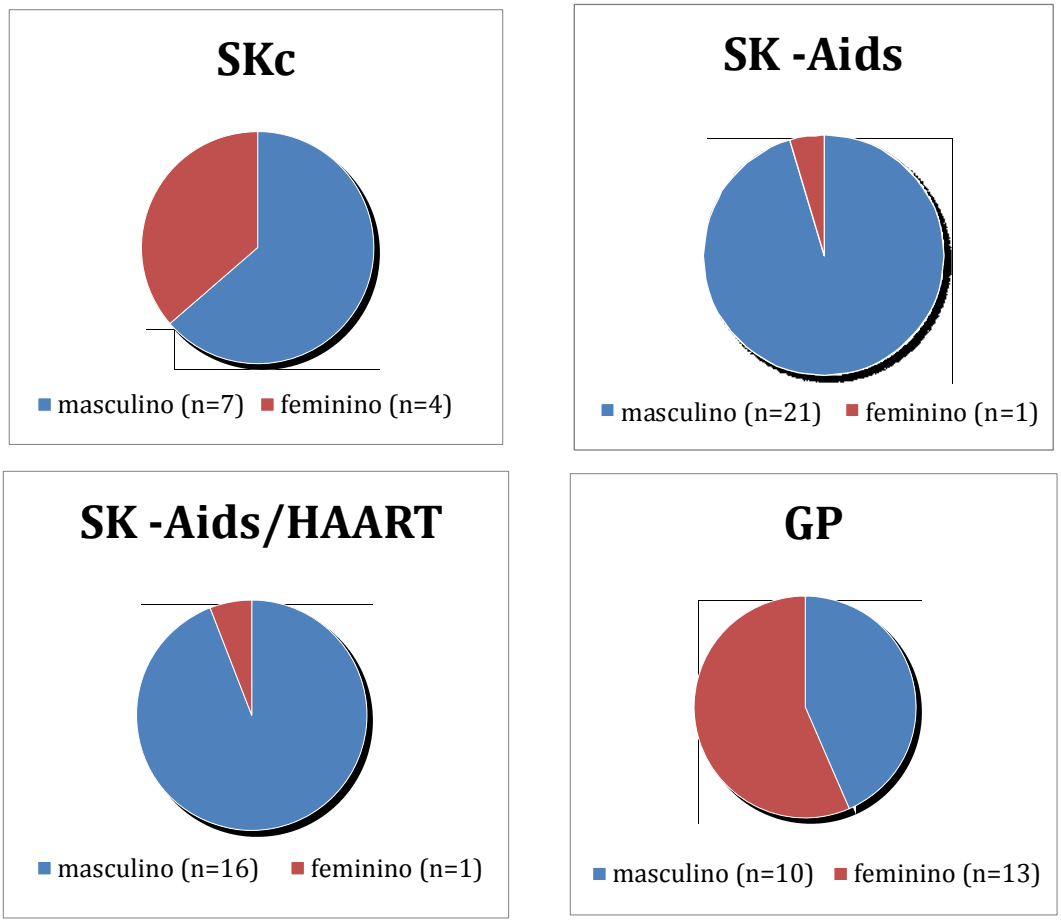

Gráfico 2 - Distribuição dos espécimes segundo gênero dos pacientes nos respectivos subgrupos epidemiológicos. SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em pacientes submetidos a tratamento com HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz; GP: granuloma piogênico

A média das idades dos pacientes com SKc foi de 80 anos (61-91 anos). No grupo dos pacientes com SK-Aids, a média etária foi de 37 anos (23-70 anos). No grupo SK-Aids/HAART, a média foi de 41 anos (29-65 anos). No grupo controle (granuloma piogênico), a média das idades foi de 36 anos (3-69 anos), sendo que para um paciente não havia informação disponível. A distribuição dos pacientes por faixa etária, nos quatro grupos, encontra-se representada no Gráfico 3.

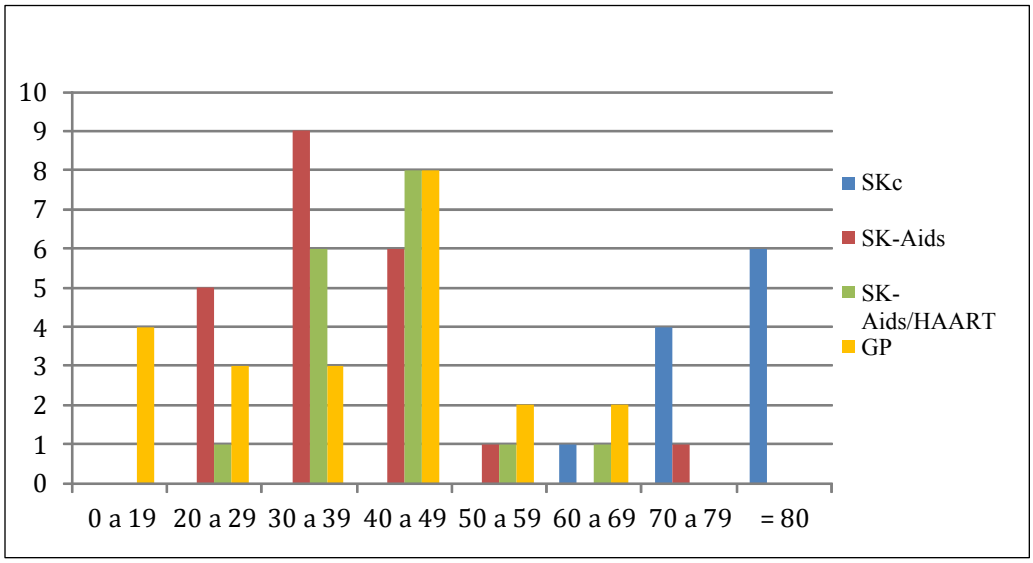

Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes com Sarcoma de Kaposi e grupo controle de granuloma piogênico por idade (anos). SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em pacientes submetidos a tratamento com HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz; GP: granuloma piogênico

Todas as lesões de SKc localizavam-se nos membros. No grupo SK-Aids houve a seguinte distribuição: dez lesões dos membros, três no tronco, três na região genital, dois na cabeça e quatro sem topografia especificada. No grupo SK-Aids/HAART, a distribuição topográfica foi a seguinte: 11 lesões nos membros, quatro lesões no tronco e dois em topografia não especificada.

Quinze lesões estudadas estavam na fase tumoral do SK e 35 eram lesões não tumorais, máculo-papulares ou placas (M-P/P). O Gráfico 4 ilustra a distribuição das lesões de acordo com a fase clínico-patológica da neoplasia, nos três grupos de SK estudados.

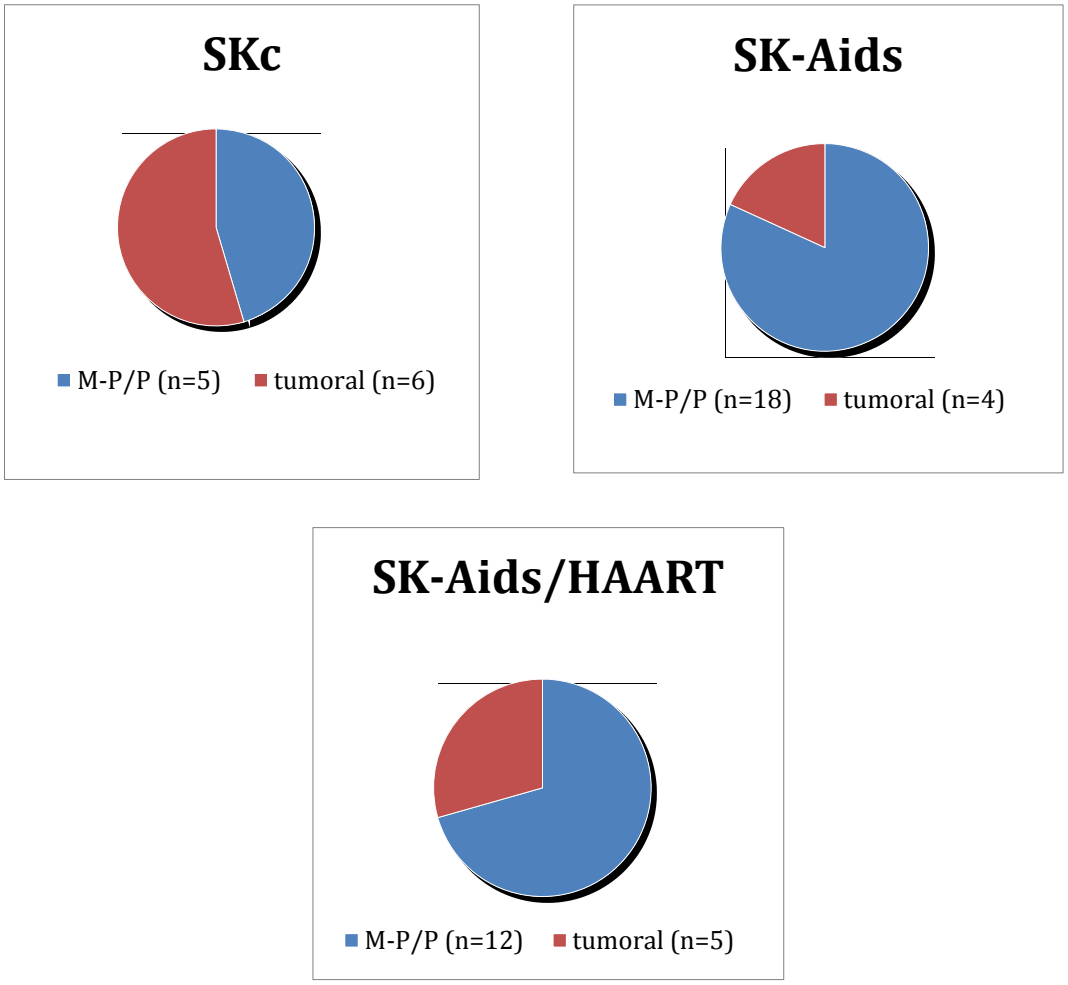

Gráfico 4 - Distribuição dos casos de Sarcoma de Kaposi segundo a fase clínico-patológica da lesão: M-P/P (máculo-papular ou placa) e tumoral – nos diferentes grupos clínico-epidemiológicos. SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em pacientes submetidos a tratamento com HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz

Dezessete espécimes provinham de pacientes com Aids e comprometimento visceral associado. Dez do grupo SK-Aids e sete do grupo SK-Aids/HAART. O trato gastro-intestinal foi acometido mais frequentemente, sendo o estômago o órgão com maior frequência de lesões. Dois pacientes apresentavam comprometimento de três órgãos além da pele.

Treze espécimes do grupo SK-Aids e 12 do grupo SK-Aids/HAART eram de doentes que apresentavam nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ <350 células/mm^3. Quatro doentes com SK-Aids e três doentes com SK-Aids/HAART tinham contagem de linfócitos T CD4≥350 células/mm^3. Em sete doentes a contagem de linfócitos T CD4 no sangue, na época da biopsia, não pode ser obtida.

Os Quadros 2, 3, 4 e 5 (Anexo A) demonstram respectivamente os dados demográficos e clínicos dos pacientes com SKc, SK-Aids, SK-Aids/HAART e do grupo de granuloma piogênico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Avaliação histopatológica

Os 50 preparados histológicos de pele, embebidos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de quatro micrômetros e corados pela hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica. Essa avaliação incluiu a pesquisa dos seguintes aspectos morfológicos:

- Proliferação vascular na forma de fendas,
- Sinal do Promontório,
- Proliferação de células fusiformes,
- Mitoses,
- Glóbulos Hialinos,
- Infiltrado inflamatório, com caracterização morfológica das células,
- Extravasamento de hemácias,
- Siderose dérmica.

Uma análise semiquantitativa das atipias das células fusiformes foi realizada, classificando-as, quando presentes, em leve, moderada ou intensa.

4.2.2 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3-amino-propyltriethoxy-silane (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO/EUA, cód. A3648) a 2%.

4.2.2.1 Demonstração das células dendríticas plasmocitóides

Os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e dez minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e submetidos à lavagem em água corrente por cinco minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por dez minutos cada uma.

Posteriormente, os preparados foram lavados em água corrente durante cinco minutos e submetidos a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em panela a vapor a 95ºC, por 20 minutos, na solução Target Retrieval Solution (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, cód. 51699).

Foram a seguir lavados em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido pela incubação em solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Os preparados histológicos foram incubados com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-CD303 (clone 124B3.13, Dendritics, Lyon, France, cód. DDX0043), diluído a 1:150 em soroalbumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “over-night” a 4ºC.

Após o procedimento de lavagem do material, por duas vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com a solução pós primária NovoLink Max PolymerDetection System (Leica Microsystems, Newcastle Upon

Tyne, UK, cód. RE7280-K) pronta para uso, em câmara úmida durante 30 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena roxa ImmPACT VIP peroxidase substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA /EUA, cód. SK-4605). A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através da observação do controle positivo (biopsia cutânea com lesão de lúpus eritematoso). Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por soro isotípico não imune.

Após os procedimentos descritos fez-se nova lavagem em água corrente por cinco minutos, contracoloração do tecido com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos, seguida de lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente. A montagem das lâminas foi feita com lamínulas de vidro e resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/EUA, cód. SP15-100).

4.2.2.2 Demonstração da expressão do receptor "Toll-like" 3

Após a desparafinizacão, hidratação e bloqueio da peroxidase endógena como acima descrito, fez-se a exposição antigênica em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9,0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C. A seguir o material foi mantido em repouso, à temperatura ambiente, por 20 minutos para resfriamento. Previamente à incubação com o anticorpo primário, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido através da incubação em solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 10%, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

A seguir os cortes histológicos foram incubadas com o anticorpo monoclonal primário anti-TLR 3 (Imgenex, San Diego, CA, EUA, código IMG-315A) diluído a 1:100, "over-night" a 4ºC.

Após esse período fez-se a lavagem do material em PBS pH 7, 4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e a seguir procedeu-se a incubação com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) - "Advance™ HRP Link" (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K4067) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a 37ºC.

A seguir, procedeu-se a novas lavagens em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubação com o polímero marcado com peroxidase - "Advance™ HRP Enzyme" (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K4067) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a 37ºC.

Procedeu-se à lavagem do material em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada.

Os sítios de reação foram visualizados através do cromógeno diaminobenzidina (3,3´-diaminobenzidine, SIGMA ChemicalCo., St. Louis, MO/EUA, código D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio a 3%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através de controles positivos (biopsia de lesão cutânea de molusco contagioso). Os controles negativos das reações foram obtidos como acima descrito para a demonstração de CDp.

Os cortes assim processados foram lavados em água corrente por cinco minutos, contra corados com a técnica de coloração de Perls por 10 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A

montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/EUA, cód. SP15-100). Fez-se a contra coloração com Perls para facilitar a distinção dos sítios de reação revelados pelo cromógeno castanho-dourado e o pigmento de hemossiderina abundante nas lesões.

4.2.2.3 Demonstração da expressão do receptor "Toll-like" 9

Procedeu-se à desparafinização, exposição antigênica e bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido conforme descrito para o TLR 3.

A seguir o material foi incubado com o anticorpo monoclonal anti-TLR 9 (Imgenex, San Diego, CA, EUA, código IMG-305A) diluído a 1:200 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, "overnight" a 4ºC.

Após o procedimento de lavagem por duas vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) EnVision™G2 system-AP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K5355) pronto para uso, durante 30 minutos a 37ºC.

A seguir, o material foi lavado em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubado com o polímero marcado com fosfatase alcalina EnVision™G2 system-AP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K5355) pronto para uso em câmara úmida, durante 30 minutos a 37ºC.

A reação foi visualizada com o cromógeno "Permanent Red" (DAKO, Carpinteria, CA, EUA, código K0640) 0,13% acrescido de 40µl de levamisole (DAKO, Carpinteria, CA, EUA, código X3021). A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico pela observação do controle positivo (biopsia cutânea de

molusco contagioso). Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por soro isotípico não imune.

Fez-se, a seguir, a contra coloração das reações e montagem das lâminas como previamente descrito para a demonstração de CDp.

4.2.2.4 Demonstração de parasitismo de células dendríticas plasmocitóides pelo herpes-vírus 8

A pesquisa do parasitismo das CDp pelo HHV-8 foi realizada em nove espécimes, sendo três provenientes de cada subgrupo epidemiológico. O critério de escolha dos casos foi a maior densidade de CDp, identificadas na reação de CD303 isolada.

Para a dupla-marcação de HHV-8 e CD303, após os procedimentos de desparafinização, bloqueio da peroxidase endógena e lavagens com PBS, pH 7,4 conforme descrito para o anticorpo CD303, fez-se a exposição antigênica com a solução "Retrievel" pH 6,0 (Dako, código S2369) à temperatura de 95°C, em banho-maria, por 20 minutos. A seguir o material foi lavado em água corrente (dez minutos) e em PBS pH 7,4 por duas vezes (cinco minutos cada vez). Procedeu-se à incubação do material por 30 minutos com leite desnatado (Molico®, Nestlé) 10%, para o bloqueio de proteínas inespecíficas.

Fez-se em primeiro lugar a incubação do material com o anticorpo primário anti-LANA do HHV-8 (Novocastra/NCL-HHV-8-LANA, Newcastle upon Tyne, UK), diluído 1:25 em BSA 1%, por uma noite a 4ºC. Após lavagem em PBS (10 minutos) procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário "post primary" do "kit" Novo Link (Novocastra RE7159), 30 minutos a 37ºC seguida de lavagem em

PBS. A seguir o material foi incubado com o sistema de polímero NovoLink (Novocastra RE7161), 30 minutos a 37ºC.

Procedeu-se à revelação dos sítios de reação com 3, 3 diaminobenzidina, 45mg em PBS, acrescido de 45 mg de Cloreto de Niquel e 1,2 mL de peróxido de hidrogênio 3%.

Após lavagem em água corrente, fez-se bloqueio com a solução bloqueadora de proteínas (Novocastra RE7158) por dez minutos e lavagem em PBS por cinco minutos. Em seguida o material foi incubado com o anticorpo monoclonal anti-CD303 (clone 124B3.13, Dendritics, Lyon, France, cód. DDX0043) diluído 1:20 em BSA 1%, por uma noite a 4ºC.

Após esses procedimentos o material foi novamente lavado por dez minutos com PBS e prodeceu-se à incubação com o anticorpo secundário anti imunoglobulina de camundongo/coelho (Envision G2, K5355), por 30 minutos a 37ºC, nova lavagem em PBS e incubação com o sistema "AP enzyme enhancer" (Envision G2, K5355), 30 minutos a 37ºC.

Fez-se a revelação dessa reação com o cromógeno "Permanent Red" (Dako, K0640) 10 µL em 1mL de tampão, por dez minutos.

A seguir o material foi lavado em água corrente e água destilada, desidratado em sequência ascendente de etanol, diafanização em xilol e montagem com resina Permount e lamínulas de vidro .

4.2.2.5 Demonstração do componente endotelial linfático

Os procedimentos foram semelhantes aos descritos para a demonstração da expressão de TLR 3. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal D2-

40 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, código M3619) diluído a 1:600 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4. Utilizou-se como controle positivo, cortes histológicos de pele (imunomarcação do componente linfático dérmico).

4.2.3 Análise morfométrica

As análises quantitativas foram realizadas com programa de análise de imagens Image Pro Plus, versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, EUA).

4.2.3.1 Quantificação de células dendríticas plasmocitóides

Os cortes histológicos submetidos à técnica imuno-histoquímica para demonstração de CDp foram digitalizados no programa "Pannoramic Scan" (3D Histech, Hungria) para obtenção de lâminas histológicas virtuais. A leitura do material e captação das imagens a serem analisadas foi realizada com o programa "Pannoramic Viewer" versão 1.15.2.21080" (3D Histech, Budapest, Hungria).

A quantificação de CDp foi obtida de imagens digitais de cinco campos microscópicos com aumento de 400× (área de 28505,8μm^2/campo) representativos das áreas "hot spots" para a presença de células imunomarcadas com o anticorpo CD303. Regiões teciduais com artefatos de dobras e epitélio anexial foram desconsideradas para o cálculo da área válida a ser quantificada. Fez-se o cálculo da média de células/mm^2.

4.2.3.2 Análise da expressão de receptores "Toll-like" 3 e 9

A expressão de TLR 3 e TLR 9 foi aferida pela fração de área tecidual com a expressão desses marcadores. Para tanto foram obtidas imagens digitais com aumento de 400× (área de 65317,7μm^2) utilizando-se uma câmera digital Nikon DS-Fi1 acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse 400 com o programa NIS-Elements (Nikon Corporation, Japão). Fez-se a captação de 30 campos microscópicos consecutivos não coincidentes, excluindo-se da análise os campos microscópicos com menos de 50% da área ocupada pelas células inflamatórias ou neoplásicas do microambiente tumoral. Foram excluídas também áreas de dobras, artefatos, epitélio de anexos e epiderme.

4.2.3.3 Análise da expressão de podoplanina (D2-40)

A análise da expressão de podoplanina foi semiquantitativa, considerando-se se dois grupos: um deles quando havia imunomarcação de menos de 50% da proliferação neoplásica e o outro quando havia 50% ou mais da área neoplásica imunomarcada pelo anticorpo D2-40.

4.2.3.4 Análise da co-localização do antígeno LANA do herpes-vírus 8 e células dendríticas plasmocitóides

Considerou-se, nessa análise, se a amostra submetida à técnica de dupla-marcação com os anticorpos anti-LANA do HHV8 e CD303, apresentava células com imunomarcação nuclear com o cromógeno DAB-Niquel (presença do HHV-8) e citoplasma imunomarcado pelo anticorpo CD303 em vermelho.

Para a quantificação do parasitismo das CDp pelo HHV-8 fizemos uma análise semiquantitativa, adotando 1+/3+ para casos com menos de 50% das CDp parasitadas, 2+/3+ para casos onde 50 a 90% das CDp eram parasitadas e 3+/3+ se mais de 90% das CDp estivessem parasitadas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da quantificação de CDp e expressão de TLR 3 e 9 foram comparados nos diferentes grupos de SK, bem como quanto aos parâmetros de tipos de lesão (M-P/P e tumor), ausência/presença de comprometimento visceral e níveis de linfócitos T CD4+ sanguíneos (< ou ≥ 350 células/mm^3). Fez-se as comparações pelos testes não paramétricos de Kruskall-Wallis (três ou mais grupos; seguida pela comparação dois a dois pelo teste de Dunn) e teste de Mann-Whitney.

A análise comparativa do componente endotelial linfático das lesões foi realizada pelos testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A comparação dos demais parâmetros (número de CDp e expressão de TLR 3 e 9) nos grupos de SK com menos de 50% e 50% ou mais de componente linfático foi feita utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa GraphPad, versão 3.1 (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Estabeleceu-se o nível de significância de 5%

4.4 ÉTICA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 0231/09 (Anexo B).

5 Resultados

5.1 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

A análise dos achados histopatológicos das lesões de SK revelou proliferação vascular e infiltrado inflamatório linfomononuclear em todos os casos. As lesões precoces (M-P/P) demonstravam proliferação vascular irregular, de limites imprecisos, com formação de fendas por entre as fibras colágenas. Estas fendas eram revestidas por células endoteliais achatadas, as quais mostraram-se mais volumosas nas lesões com proliferação vascular mais acentuada (Figura 6A). O sinal do promontório, caracterizado por protuberância de vasos neoformados no interior de vasos sanguíneos pré-existentes, esteve presente em 46/50 espécimes (Figura 6B). O infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral foi representado por células mononucleares, linfócitos em sua maioria, além de histiócitos e plasmócitos (Figura 6C, D). Alguns casos apresentaram exsudação de neutrófilos.

Células fusiformes foram raramente observadas nas biopsias das lesões iniciais e, quando presentes, localizaram-se em topografia perianexial. Nos espécimes das lesões tumoriformes eram abundantes e assumiam arranjos em feixes irregulares, compondo o nódulo neoplásico (Figura 6E). Estas células algumas vezes apresentaram mitoses típicas e atipias celulares (Figura 6F e 6G).

O extravasamento de hemácias foi um achado marcante e frequente. Esteve presente em todos os espécimes, em graus variados. Os glóbulos hialinos, compostos por agrupamentos de fragmentos de eritrócitos no espaço extravascular, foram frequentemente observados (Figura 6H). O pigmento de hemossiderina foi observado, à coloração de hematoxilina-eosina, em cerca de 90% das biopsias estudadas.

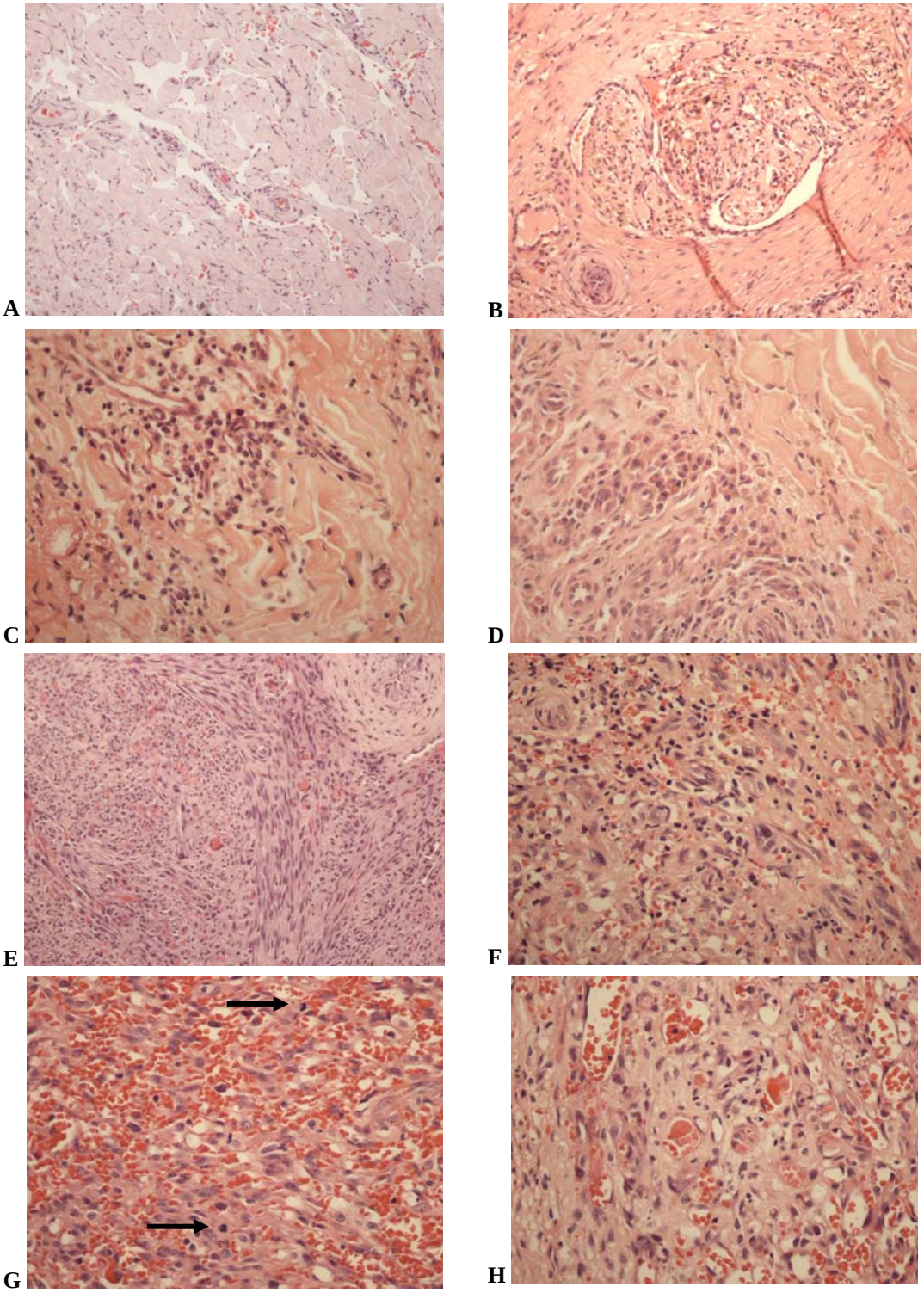

Figura 6 - Características histopatológicas das lesões de Sarcoma de Kaposi estudadas. **A)** Células endoteliais achatadas revestindo fendas (aumento original 200×); **B)** Sinal do promontório (aumento original 200×); **C)** Infiltrado inflamatório linfomononuclear (aumento original 400×); **D)** plasmócitos (aumento original 400×); **E)**Feixes de células fusiformes em fase tumoral (aumento original 200×); **F)** Atipias celulares (aumento original 400×); **G)** Mitoses (seta –aumento original 400×); **H)** Glóbulos hialinos (aumento original 400×).

Os Quadros 6, 7 e 8 dos Anexos C, D e E respectivamente, demonstram os parâmetros histopatológicos analisados e suas respectivas frequências.

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.2.1 Demonstração de células dendríticas plasmocitóides nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico

Foram identificadas CDp, reveladas pelo anticorpo CD303, em 10/10 biopsias de SKc, 21/21 biopsias de SK-Aids e 15/15 biopsias de SK-Aids/HAART. No grupo de GP, estas células foram encontradas em 21/21 amostras submetidas à reação.

As CDp mostraram-se isoladas ou agrupadas, em meio ao infiltrado inflamatório na derme superficial e profunda. Foram mais frequentes em topografia perivascular e perianexial (Figura 7A e B), sendo raras entre as células neoplásicas fusiformes nas lesões tumorais de SK. Através da dupla marcação demonstramos o parasitismo das CDp pelo HHV-8 nas lesões de SK cutâneo (Figura 7C e D).

5.2.2 Demonstração do parasitismo de células dendríticas plasmocitóides pelo herpes-vírus 8 nas lesões de sarcoma de Kaposi

Foram encontradas CDp parasitadas em 7/9 casos submetidos à técnica de dupla marcação para LANA e CD303. Dos casos positivos, 5 (71,4%) apresentaram positividade 1+/3+, 1 caso (14,3%) para 2+/3+ e 1 caso (14,3%) para 3+/3+.

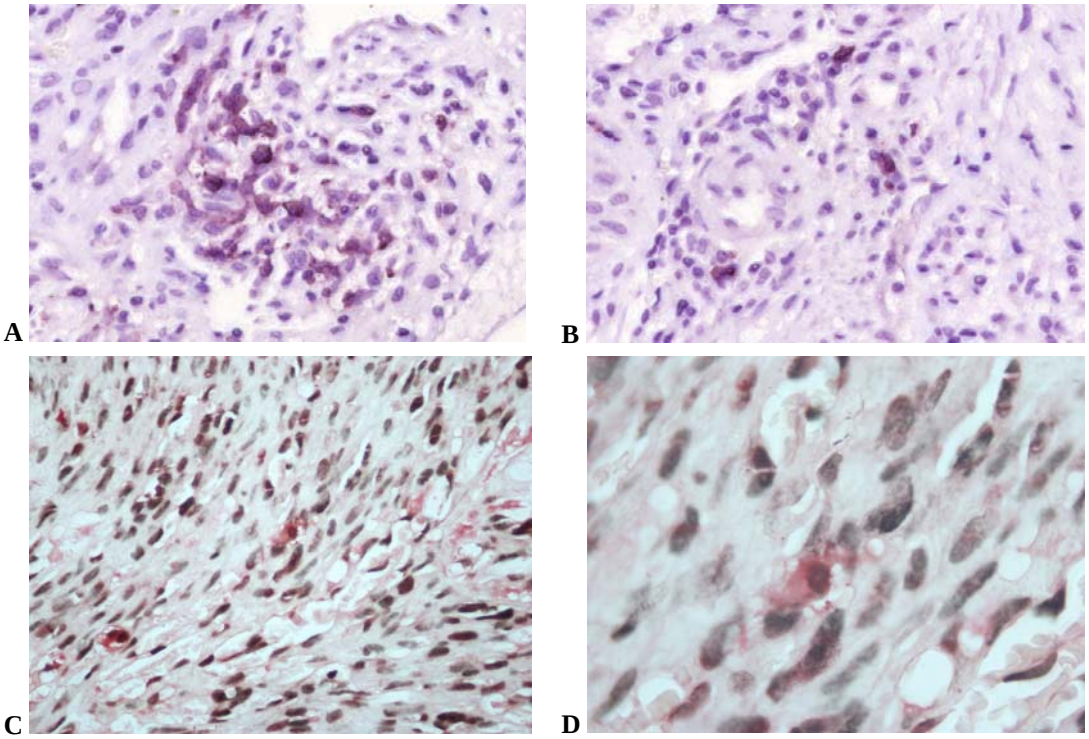

Figura 7 - Células dendríticas plasmocitóides imunomarcadas pelo anticorpo CD303 em lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi. **A)** Células CD303+ agrupadas (aumento original400×). **B)** Células CD303+ isoladas (aumento original400×). **C e D)** Célula dendrítica plasmocitóide marcada pelo anticorpo CD303 (citoplasma vermelho) parasitada pelo herpes-vírus 8 (núcleo imunomarcado em preto) (C aumento original 400×; D aumento original 1000×)

5.2.3 Quantificação e comparação das células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico

Não houve diferença quando comparada a densidade das CDp nas lesões cutâneas de SK nos três grupos estudados (SKc, SK-Aids e SK-Aids/HAART).

O número de CDp do SK-Aids, em doentes não tratados com a terapia antirretroviral, foi maior que no grupo controle de GP ($p<0,01$), mas o número de CDp não diferiu entre o grupo de SKc e o grupo de SK-Aids/HAART quando comparados ao grupo controle de GP.

O Gráfico 5 demonstra a comparação do número de CDp entre os grupos de SK e o grupo controle.

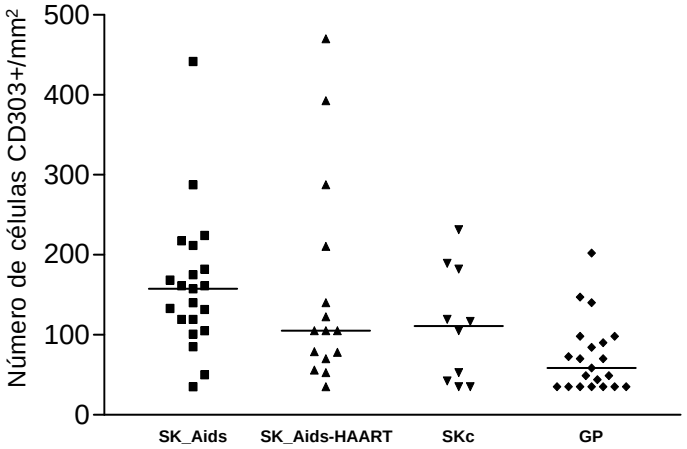

Gráfico 5 - Comparação da população de células CD303+ (células dendríticas plasmocitóides) nos diferentes grupos de Sarcoma de Kaposi (SK-Aids; SK-Aids/HAART e SKc) e no Granuloma Piogênico (GP). SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi em paciente com Aids em uso de HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz; SKc: Sarcoma de Kaposi clássico. Barra – mediana. Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,0008$; teste de Dunn: SK-Aids versus GP: $p<0,01$

Não houve diferença na população de CDp quanto a fase evolutiva das lesões, se máculo-papulares/placas (não tumorais) e tumorais (Gráfico 6), assim como na comparação das lesões cutâneas de doentes sem evidências de comprometimento visceral e doentes com lesões viscerais do SK (Gráfico 7).

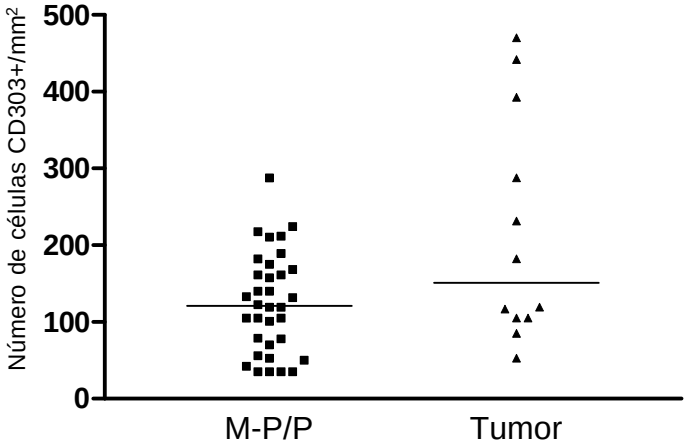

Gráfico 6 – Comparação da população de células dendríticasplasmocitóides (CD303+) nas lesões máculo-papulares e em placa (M-P/P) e tumorais de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

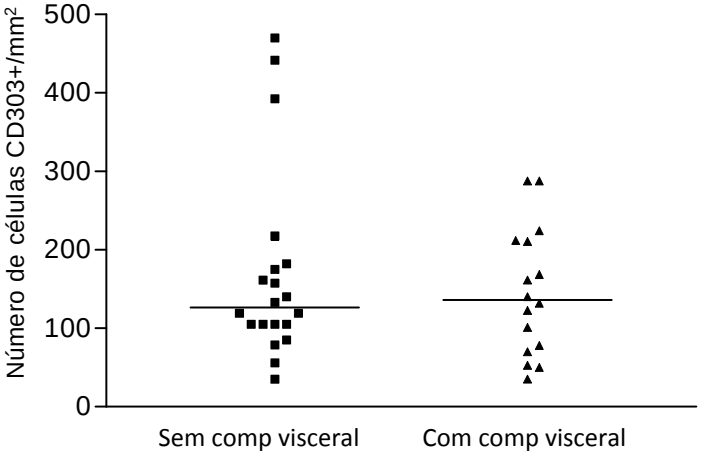

Gráfico 7 – Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi sem evidências de comprometimento visceral e de doentes com comprometimento visceral. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

A população de CDp das lesões cutâneas de pacientes com SK relacionado à Aids, independente do tratamento, não diferiu nos doentes com níveis de linfócitos CD4+ igual/maior e menor que 350 células/mm^3 (Gráfico 8).

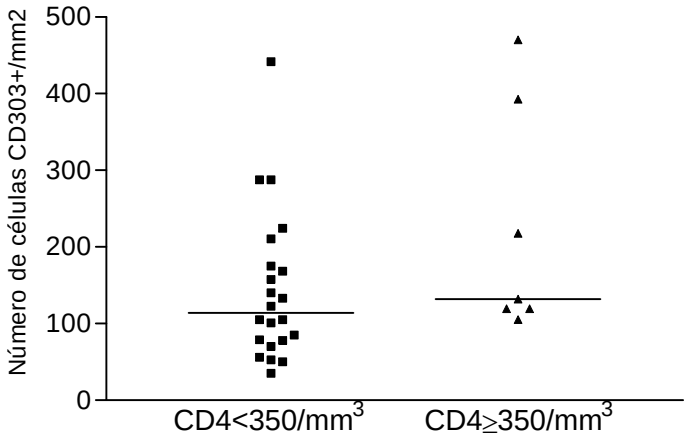

Gráfico 8 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi entre doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney ($p>0,05$)

Estes mesmos grupos apresentaram diferença quando comparados com o GP (Gráfico 9).

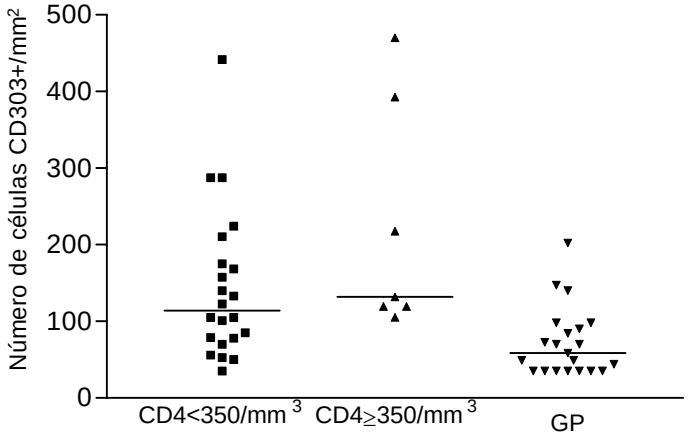

Gráfico 9 - Comparação da população de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi de doentes com linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 com o granuloma piogênico (GP). Barra – mediana. Teste de Kruskal-Wallis: $p=0,0003$; teste de Dunn: CD4<350/mm^3 versus GP: $p<0,01$; CD4≥350/mm^3 versus GP: $p<0,01$

A Tabela 1 demonstra a comparação da população de células dendríticas plasmocitóides de acordo com os grupos de Sarcoma de Kaposi e granuloma piogênico segundo os parâmetros acima relatados.

Tabela 1 - Comparação do número de células dendríticas plasmocitóides (células CD303+) nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi associado a Aids, Sarcoma de Kaposi clássico e no granuloma piogênico; no Sarcoma de Kaposi de acordo com o tipo de lesão e se associado à Aids, de acordo com presença de comprometimento visceral associado e nível de linfócitos T CD4+ no sangue

	Células CD303+ /mm^2		
	Mínimo	Mediana	Máximo
Sarcoma de Kaposi-Aids (n=21)	35,10	157,6[a]	442
Sarcoma de Kaposi-Aids/HAART (n=15)	35,10	105,2[b]	470,1
Sarcoma de Kaposi Clássico (n=10)	35,10	111,1[c]	231,5
Granuloma piogênico (n=21)	35,10	58,4[d]	202,3
Sarcoma de Kaposi com comprometimento visceral (n= 16)	35,10	136,1[e]	287,7
Sarcoma de Kaposi sem comprometimento visceral (n=20)	35,10	126,3[f]	470,1
Sarcoma de Kaposi mácula-pápula/placa (n= 34)	35,10	121,1[g]	287,7
Sarcoma de Kaposi Tumor (n=12)	52,60	150,9[h]	470,1
Sarcoma de Kaposi CD4 <350/mm^3 (n=22)	35,10	114,0[i]	442,0
Sarcoma de Kaposi CD4 ≥350/mm^3 (n=7)	105,2	131,9[j]	470,1

a vs b vs c vs d (p=0,0008) (teste de Kruskal-Wallis); a vs b (p>0,05); a vs c (p>0,05); a vs d (p<0,001); b vs c (p>0,05); c vs d (p>0,05); c vs d (p>0,05) (teste de Dunn); e vs f (p>0,05); g vs h (p>0,05); i vs j (p>0,05) (teste de Mann-Whitney); i vs j vs d (p=0,001) (teste de Kruskal-Wallis); i vs d (p>0,05); j vs d (p<0,01) (teste de Dunn)

5.2.4 Demonstração, quantificação e comparação da expressão do receptor "Toll-like" 3 nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico

Todos os espécimes de SK exibiram imunomarcação para TLR 3. Houve imunomarcação dos componentes inflamatório, de células neoplásicas fusocelulares e de células endoteliais que compunham os elementos vasculares da neoplasia, assim como dos vasos sanguíneos dérmicos. A expressão de TLR 3 foi observada nas regiões perinucleares das células imunomarcadas. Os queratinócitos também mostraram-se marcados com o anticorpo anti-TLR 3. A expressão de TLR 3, entretanto, foi bastante variável nos diferentes espécimes (Figura 8 A-D). Em alguns casos, poucos elementos celulares mostraram-se imunomarcados e, em outros, a quase totalidade das células apresentavam imunomarcação para TLR 3. Os espécimes de SK em fase tumoral apresentaram variação da positividade das células neoplásicas fusiformes até mesmo em um mesmo nódulo.

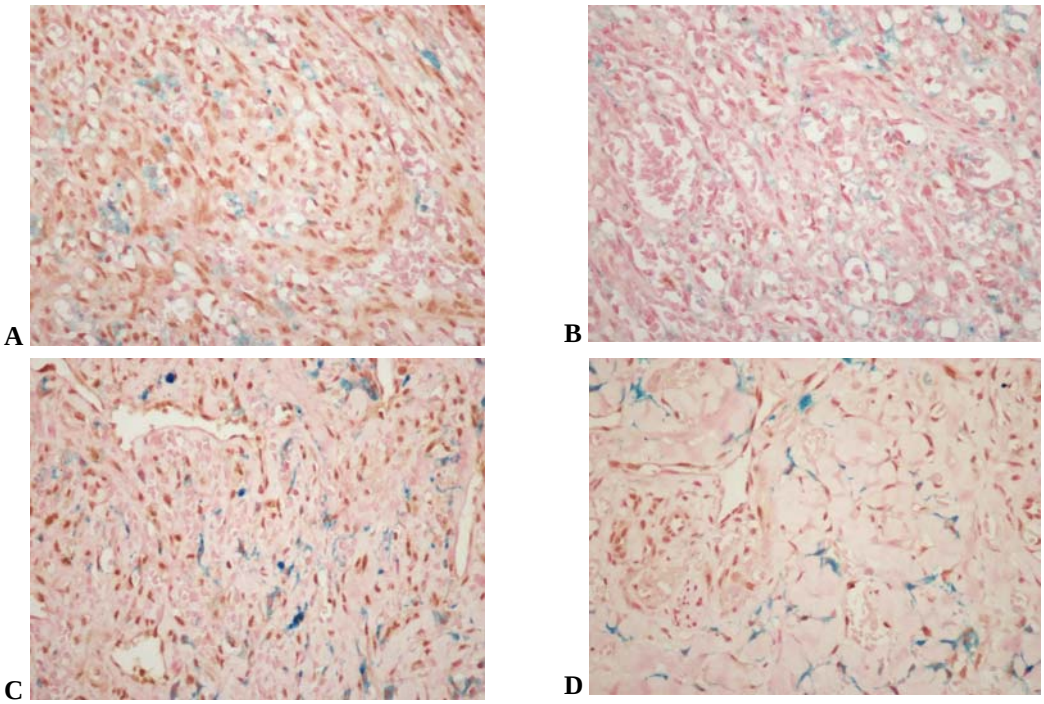

Figura 8 - Expressão de receptor "Toll-like" 3 em lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi. **A e B)** fase tumoral. **C e D)** fase não tumoral (M-P/P). Técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti-receptor "Toll-like" 3 contra-corada com Perls (aumento original 400×)

Todas as biopsias de GP apresentaram positividade para TLR 3. Na epiderme dessas lesões houve marcação dos queratinócitos. Na derme, as células endoteliais da lesão angiomatosa e do estroma dérmico apresentaram imunomarcação variável, com poucas células imunomarcadas. Em outros espécimes havia a imunomarcação de quase a totalidade dos elementos celulares que compunham a proliferação angiomatosa. Raríssimas células endoteliais de vasos sanguíneos da derme adjacente à proliferação angiomatosa lobular, apresentavam expressão de TLR 3 (Figura 9).

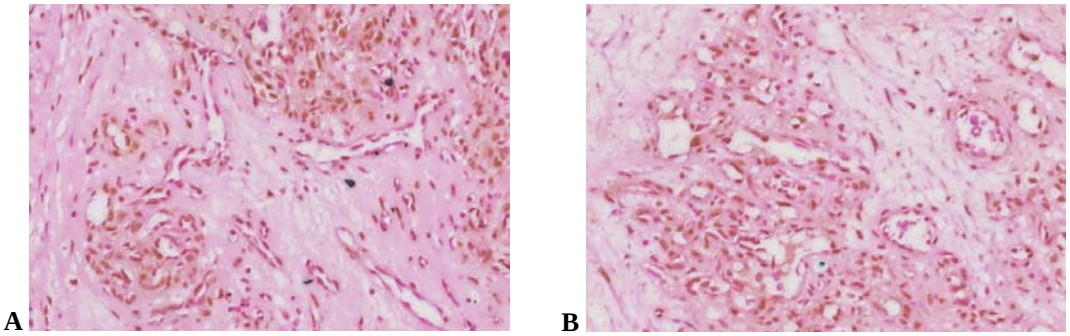

Figura 9 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 em lesões cutâneas de granuloma piogênico. (aumento original 400×)

A expressão de TLR 3 do grupo de granuloma piogênico foi maior que a observada nos grupos de SK (p=0,0005). Esta diferença persistiu mesmo na comparação isolada de cada grupo epidemiológico de SK com o GP (Gráfico 10).

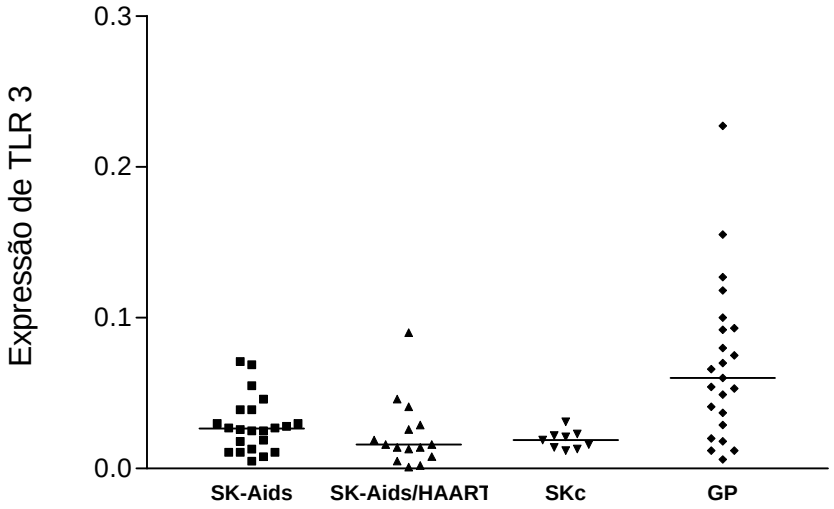

Gráfico 10 - Comparação da fração de área com expressão de receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) nos diferentes grupos de Sarcoma de Kaposi (associado a Aids SK-Aids; Associado à Aids sob tratamento antirretroviral – SK-Aids/HAART e esporádico – SKc) e no Granuloma Piogênico (GP). Barra – mediana. Teste de Kruskal-Wallis; (p= 0,0005) comparação entre grupos pelo teste de Dunn: GP vs SK-Aids: p<0,05; GP vs SK-Aids/HAART: p<0,01; GP vs SKc: p<0,05

A expressão de TLR 3 não diferiu nas lesões de SK máculo-papulares/placas quando comparadas às lesões tumorais, assim como no SK sem e com disseminação visceral e nos casos agrupados quanto ao nível de linfócitos T CD4+ no sangue (Gráficos 11, 12 e 13).

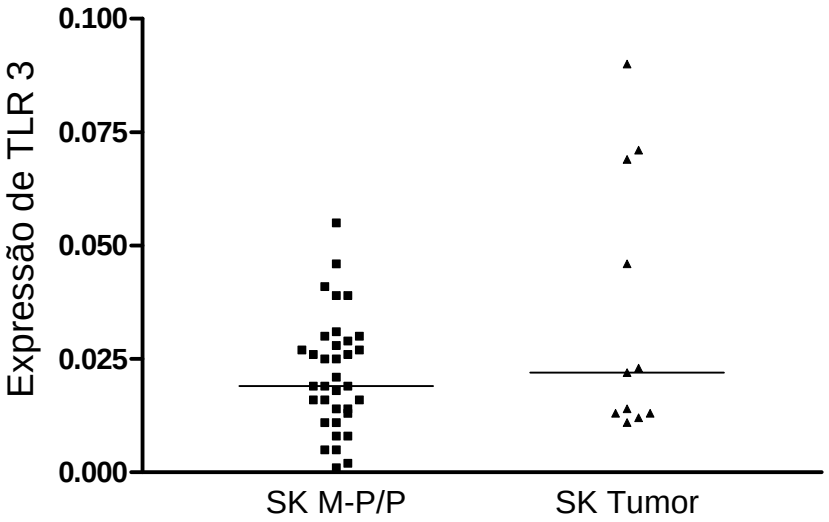

Gráfico 11 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões maculo-papulares e placas (SK M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

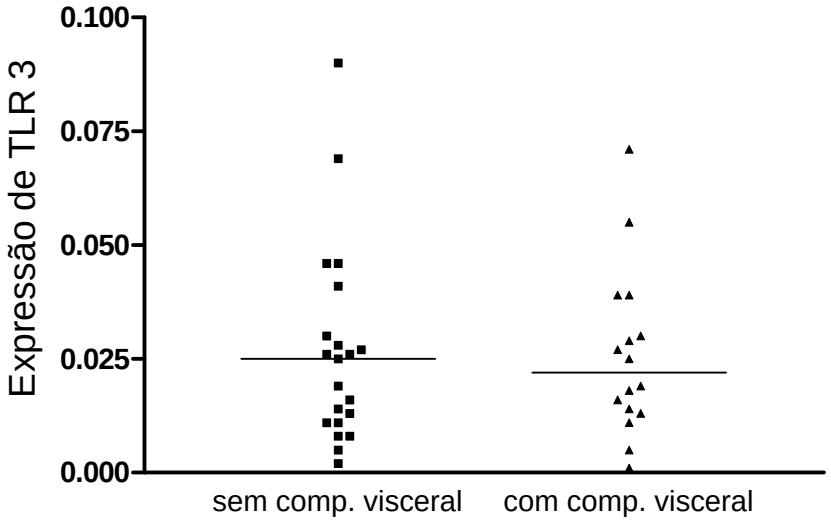

Gráfico 12 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes sem evidência de comprometimento visceral e com comprometimento visceral. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

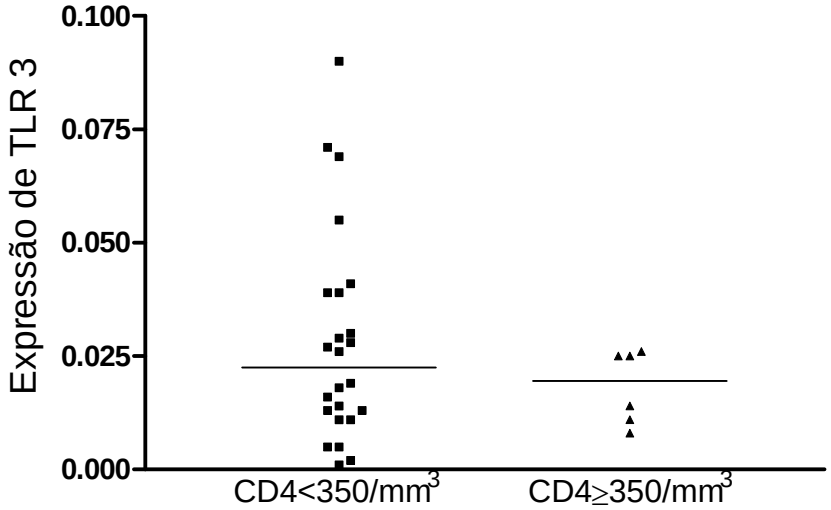

Gráfico 13 - Expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes com nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350/mm^3. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

As lesões de SK de ambos os grupos acima apresentaram expressão de TLR 3 menor que a das lesões de GP (Gráfico 14).

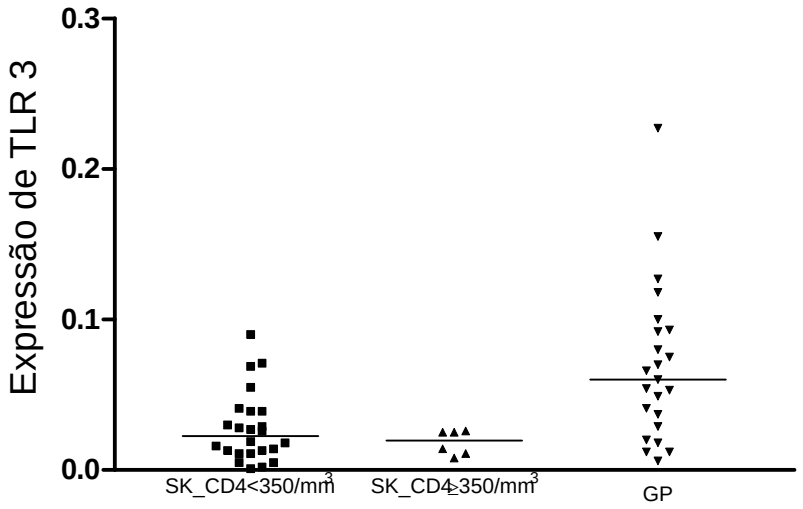

Gráfico 14 - Comparação da expressão de receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) nas lesões de sarcoma de Kaposi dos doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 e no granuloma piogênico (GP). Barra – mediana. Teste de Kruskal-Wallis (p=0,001); teste de Dunn: SK_CD4+<350/mm^3 versus GP: p<0,01; SK CD4+≥350/mm^3 versus GP: p<0,05

A Tabela 2 apresenta a comparação da expressão de TLR3 de acordo com os grupos de Sarcoma de Kaposi e os parâmetros acima relatados.

Tabela 2 - Fração de área com expressão do receptor "Toll-like" 3 nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi associado à Aids, Sarcoma de Kaposi clássico e no granuloma piogênico; no Sarcoma de Kaposi de acordo com o tipo de lesão e se associado à Aids, de acordo com presença de comprometimento visceral associado e nível de linfócitos T CD4+ no sangue

	Expressão de TLR 3		
	Mínimo	Mediana	Máximo
Sarcoma de Kaposi-Aids (n=22)	0,005	0,0265[a]	0,071
Sarcoma de Kaposi-Aids/HAART (n=15)	0,001	0,016[b]	0,09
Sarcoma de Kaposi Clássico (n=9)	0,012	0,019[c]	0,0310
Granuloma piogênico (n=23)	0,006	0,06[d]	0,227
Sarcoma de Kaposi com comprometimento visceral (n= 16)	0,001	0,022[e]	0,071
Sarcoma de Kaposi sem comprometimento visceral (n=21)	0,002	0,025[f]	0,09
Sarcoma de Kaposi mácula-pápula/placa (n= 35)	0,001	0,019[g]	0,055
Sarcoma de Kaposi Tumor (n=11)	0,011	0,022[h]	0,09
Sarcoma de Kaposi CD4 <350/mm^3 (n=24)	0,001	0,0225[i]	0,09
Sarcoma de Kaposi CD4 ≥350/mm^3 (n=6)	0,008	0,0195[j]	0,026

TLR – receptor "Toll-like"; a vs b vs c vs d (p=0,0005) (teste de Kruskal-Wallis); a vs b (p>0,05); a vs c (p>0,05); a vs d (p<0,05); b vs c (p>0,05); b vs d (p<0,01); c vs d (p<0,05) (teste de Dunn); e vs f (p>0,05); g vs h (p>0,05); i vs j (p>0,05) (teste de Mann-Whitney); i vs j vs d (p=0,0011) (teste de Kruskal-Wallis); i vs d (p<0,01); j vs d (p<0,05) (teste de Dunn)

5.2.5 Demonstração, quantificação e comparação da expressão do receptor "Toll-like" 9 nas lesões de sarcoma de Kaposi e no granuloma piogênico

Houve expressão de TLR 9 em todos os espécimes estudados. A imunomarcação da epiderme ocorreu nas camadas espinhosa alta e granulosa. Células com morfologia dendrítica presentes nas camadas basal e espinhosa da epiderme mostraram-se marcadas com o anticorpo anti-TLR 9.

A expressão de TLR 9 na derme foi observada no citoplasma de células inflamatórias, endoteliais e epiteliais dos anexos cutâneos. A imunomarcação apresentou-se também de forma variada, desde apenas raras células, até a quase totalidade dos elementos celulares representados (Figura 9 A-D). Entretanto, nas células fusiformes do SK a expressão de TLR 9 foi leve e mesmo ausente em alguns casos.

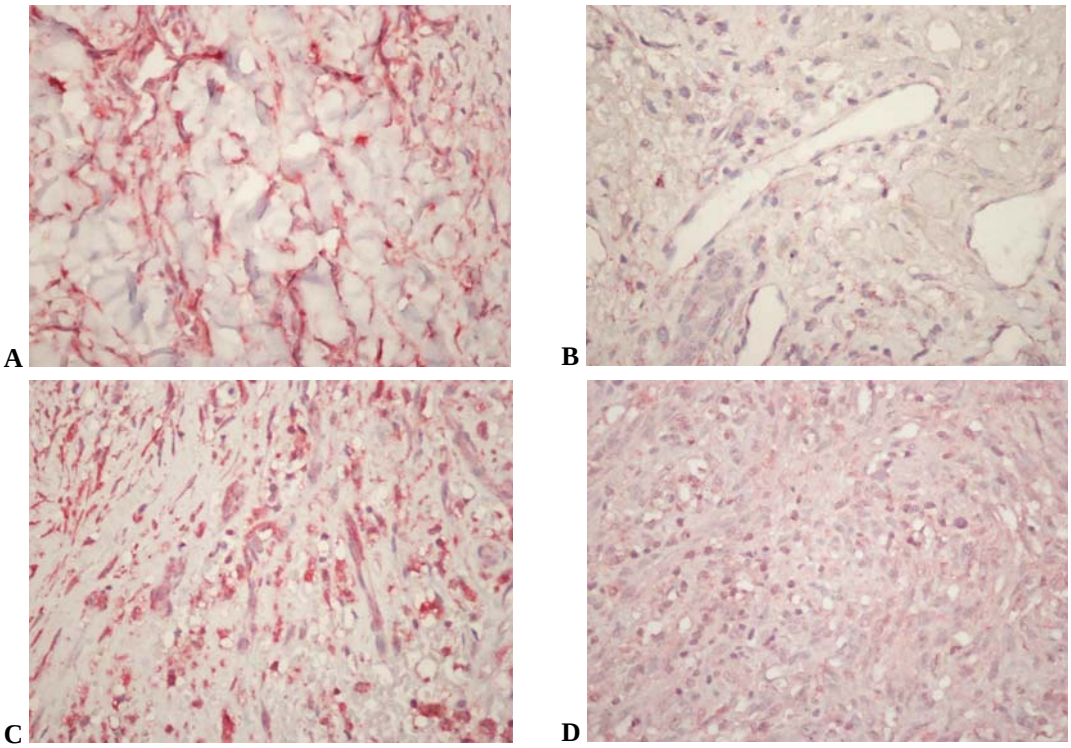

Figura 10 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 em lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi. **A-C)** lesões não tumorais. **D)** Fase tumoral. Técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti-receptor "Toll-like" 9 (aumento original 400×)

No GP, as células endoteliais proliferadas apresentaram expressão de TLR 9 muito leve ou ausente.

A expressão de TLR9 não diferiu entre os grupos de SK estudados e o grupo controle de GP (Gráfico 15).

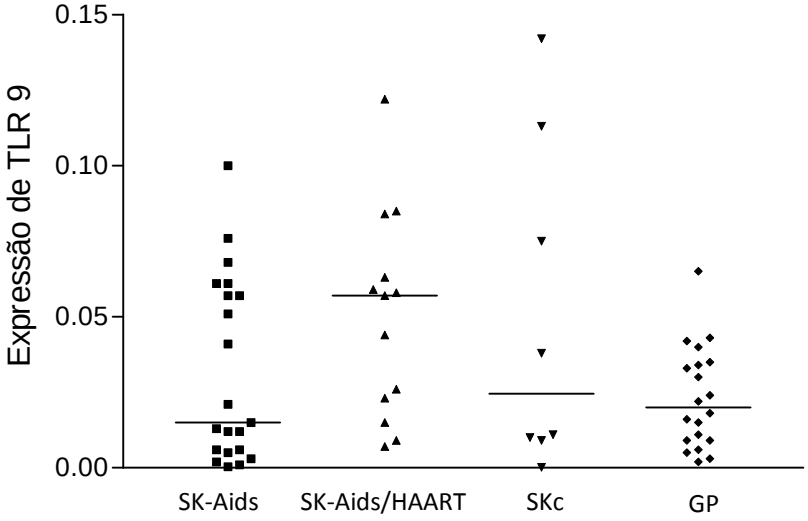

Gráfico 15 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nos diferentes grupos de Sarcoma de Kaposi (SK-Aids, SK-Aids/HAART) e no granuloma piogênico (GP). SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: de Kaposi em paciente com Aids em uso de HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz; SKc: Sarcoma de Kaposi clássico. Barra-mediana. Teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$)

A expressão de TLR 9 não diferiu nas lesões máculo-papulares/placas e tumorais do SK, assim como nas lesões cutâneas de SK dos doentes sem e com envolvimento visceral. As lesões de SK de doentes com níveis de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3 apresentaram expressão de TLR9 semelhante (Gráficos 16, 17 e 18).

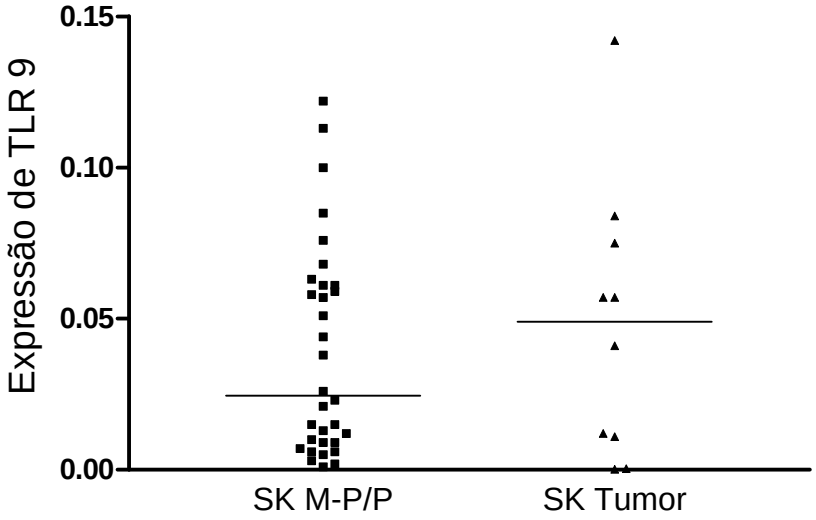

Gráfico 16 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões maculo-papulares e placas (SK M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

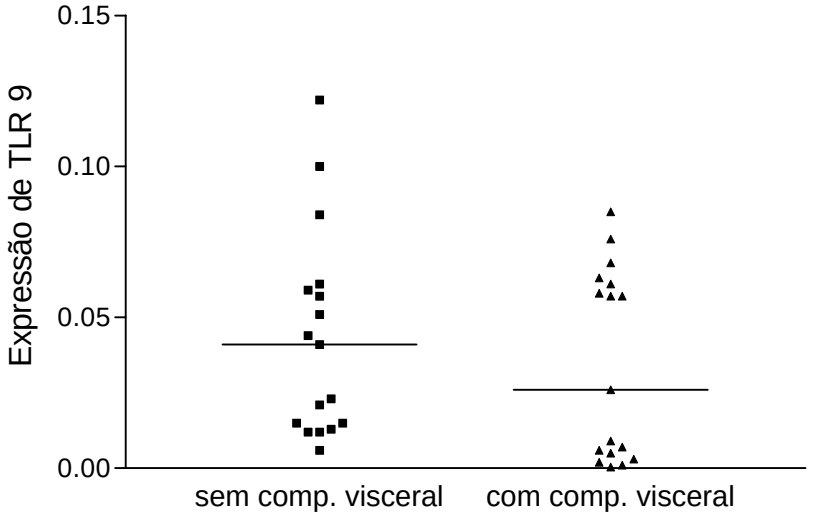

Gráfico 17 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes sem evidência de comprometimento visceral e com comprometimento visceral. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

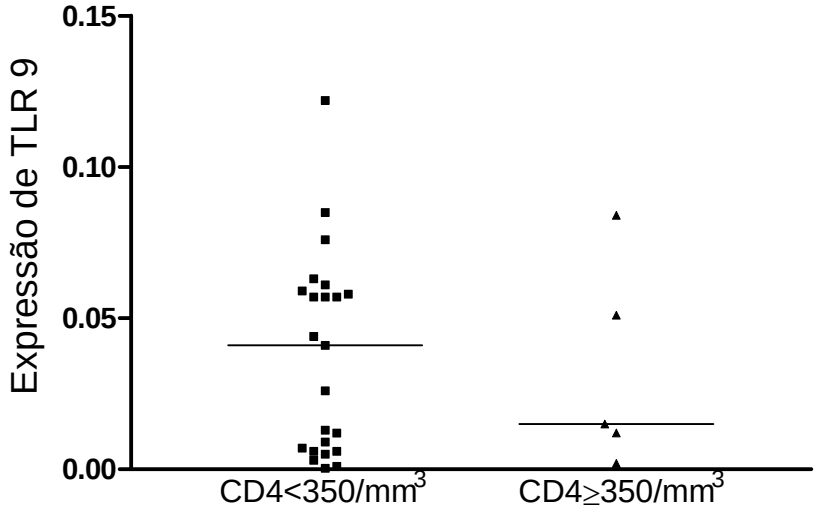

Gráfico 18 - Expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de doentes com nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350/mm^3. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

A expressão de TLR9 desses dois grupos de lesões de SK também não diferiu do GP (Gráfico 19).

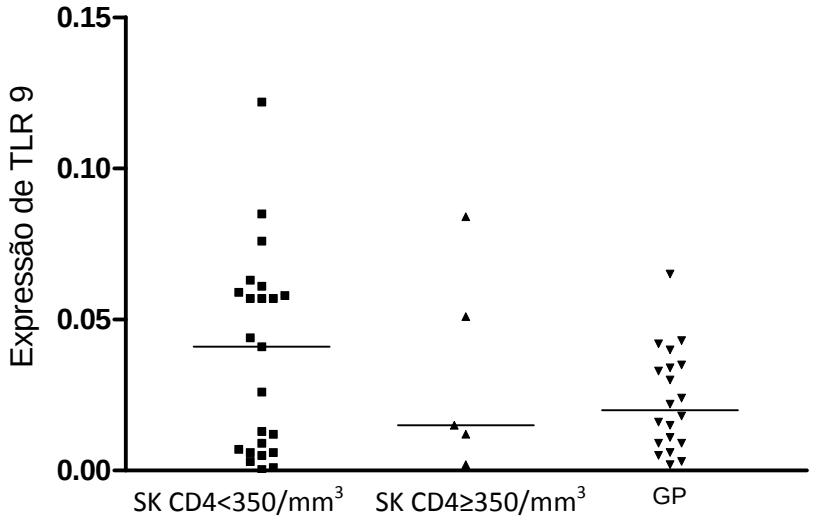

Gráfico 19 - Comparação da expressão de receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) nas lesões de sarcoma de Kaposi dos doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/ maior que 350 células/mm^3 e no granuloma piogênico (GP). Barra – mediana. Teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$)

A Tabela 3 apresenta os resultados da comparação da expressão de TLR 9 de acordo com os grupos de Sarcoma de Kaposi e os parâmetros acima relatados.

Tabela 3 - Fração de área com expressão do receptor "Toll-like" 9 nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi associado à Aids, Sarcoma de Kaposi clássico e no granuloma piogênico; no Sarcoma de Kaposi de acordo com o tipo de lesão e se associado à Aids, de acordo com a presença de comprometimento visceral associado e nível de linfócitos T CD4+ no sangue

	Expressão de TLR 9		
	Mínimo	Mediana	Máximo
Sarcoma de Kaposi-Aids (n=21)	0,0004	0,015[a]	0,1
Sarcoma de Kaposi-Aids/HAART (n=13)	0,007	0,057[b]	0,122
Sarcoma de Kaposi Clássico (n=8)	0,0002	0,0245[c]	0,142
Granuloma piogênico (n=20)	0,002	0,02[d]	0,065
Sarcoma de Kaposi com comprometimento visceral (n= 17)	0,0004	0,026[e]	0,085
Sarcoma de Kaposi sem comprometimento visceral (n=17)	0,006	0,041[f]	0,122
Sarcoma de Kaposi mácula-pápula/placa (n= 32)	0,001	0,0245[g]	0,122
Sarcoma de Kaposi Tumor (n=10)	0,0002	0,049[h]	0,142
Sarcoma de Kaposi CD4 <350/mm^3 (n=23)	0,0004	0,041[i]	0,122
Sarcoma de Kaposi CD4 ≥350/mm^3 (n=5)	0,002	0,015[j]	0,084

TLR – receptor "Toll-like"; a vsb vs c vs d (p>0,05) (teste de Kruskal-Wallis); a vs b (p>0,05); a vs c (p>0,05); a vs d (p>0,05); b vs c (p>0,05); b vs d (p>0,05);) c vs d (p>0,05)(teste de Dunn); e vs f (p>0,05); g vs h (p>0,05); i vs j (p>0,05) (teste de Mann-Whitney); i vs j vs d (p>0,05) (teste de Kruskall-Wallis); i vs d (p>0,05); j vs d (p>0,05) (teste de Dunn)

5.2.6 Demonstração da expressão de D2-40

Todos os casos de SK apresentaram imunomarcação para podoplanina (D2-40) no componente de células endoteliais, sem atipias evidentes e também nas células neoplásicas fusiformes (Figura 11). Entretanto, a porcentagem de células imunomarcadas para D2-40 não foi constante, havendo variação em todos os grupos epidemiológicos de SK, assim como nas lesões em diferentes estágios de evolução. Não obtivemos diferença quando comparamos a expressão de D2-40 (maior/igual a 50% e menos de 50% do componente neoplásico) com a fase clínico-patológica da lesão (máculo-papular/placa ou tumoral) (Gráfico 20). Também não houve diferença quando comparada a expressão de D2-40 nos diferentes grupos epidemiológicos do tumor (Gráfico 21).

Todos os espécimes de GP não exibiram qualquer imunomarcação para D2-40.

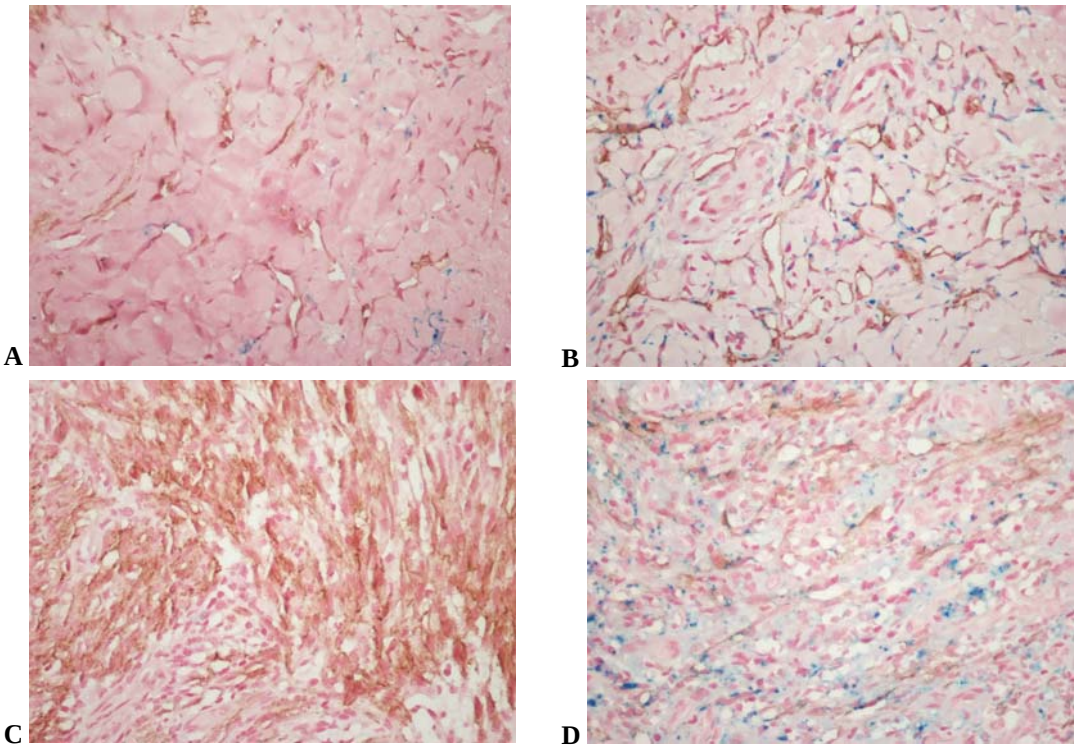

Figura 11 - Expressão de podoplanina (D2-40) em lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi. **A e B)** Lesões em fase não tumoral. **C)** Fase tumoral com expressão em mais de 50% das células neoplásicas. **D)** Fase tumoral com expressão em menos de 50% das células neoplásicas. **A-D** (aumento original 400×)

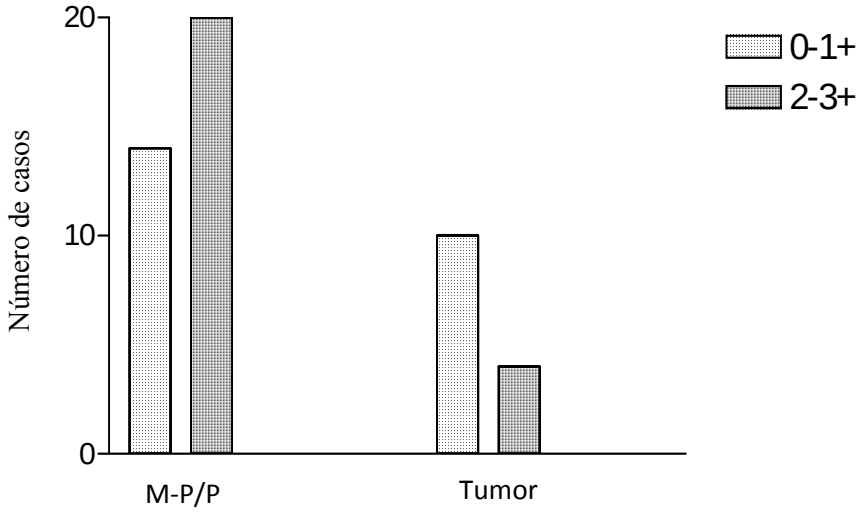

Gráfico 20 - Comparação da imunomarcação com D2-40 de lesões maculo-papulares/placas (M-P/P) e tumorais do sarcoma de Kaposi. Teste exato de Fisher (p>0,05)

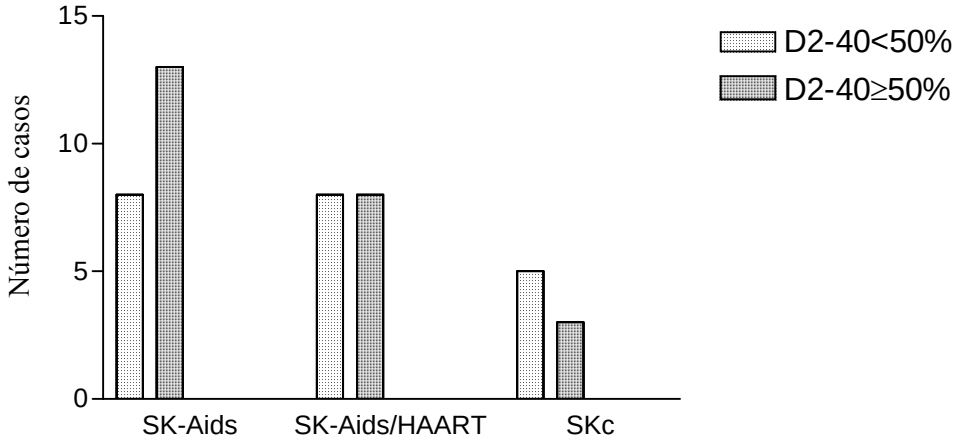

Gráfico 21 - Comparação da imunomarcação com D2-40 de lesões de sarcoma de Kaposi associado a Aids (SK-Aids), associado a Aids e tratados com terapia antirretroviral (SK-Aids/HAART) e esporádico (SKc). Teste do χ^2 (p>0,05)

A Tabela 4 demonstra os resultados acima.

Tabela 4 - Comparação do componente endotelial linfático do sarcoma de Kaposi esporádico (SKc), associado a Aids (SK-Aids) e de doentes tratados com terapia antirretroviral (SK-Aids/HAART) e entre as lesões máculo-papulares/placas (M-P/P) e tumorais

	D2-40<50%	D2-40≥50%	N	p
SK-Aids	8 (38%)	13 (62%)	21	NS
SK-Aids/HAART	8 (50%)	8 (50%)	16	
SKc	5 (62%)	3 (38%)	8	
M-P/P	12 (57%)	9 (43%)	21	NS
Tumor	20 (83%)	4 (17%)	24	

NS – não significante; Teste do χ^2 e teste exato de Fisher

O número CDp, assim como a expressão de TLR 3 e 9 não diferiu nos grupos de SK com menos de 50% e igual/mais de 50% do seu componente tumoral com expressão de podoplanina (D2-40) (Gráficos 22, 23 e 24).

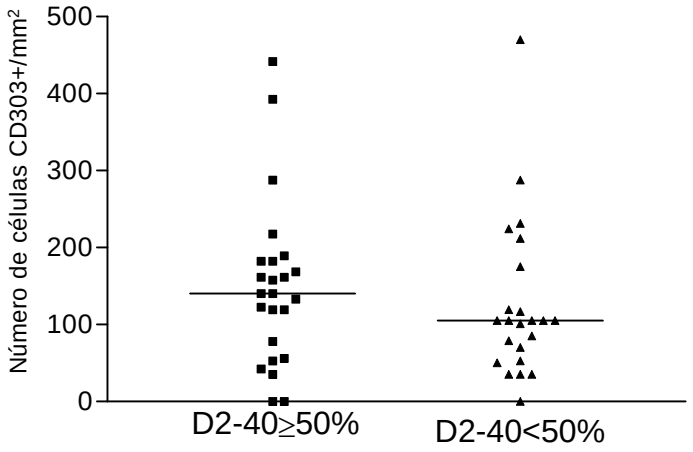

Gráfico 22 - Comparação do número de células dendríticas plasmocitóides (CD303+) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menos de 50% do componente neoplásico. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

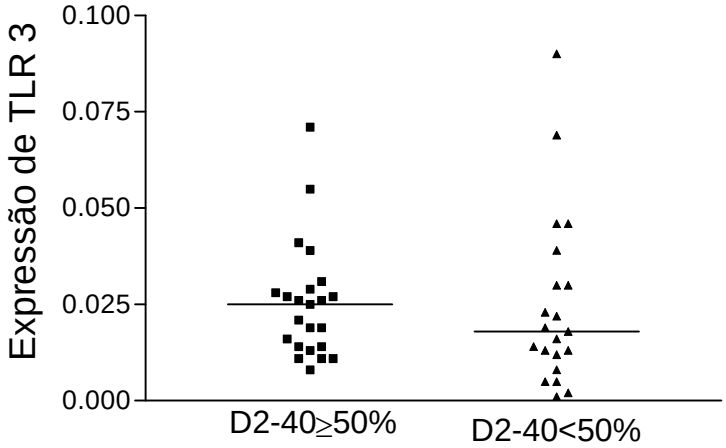

Gráfico 23 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 3 (TLR 3) (fração de área) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menos de 50% do componente neoplásico. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

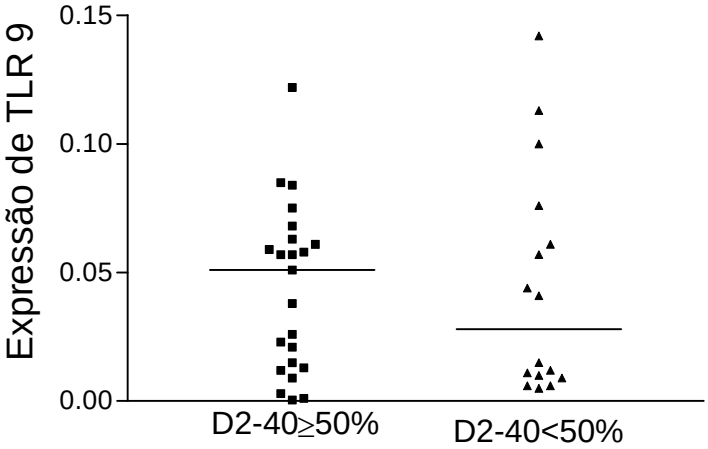

Gráfico 24 - Comparação da expressão do receptor "Toll-like" 9 (TLR 9) (fração de área) nas lesões de sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) maior ou igual a 50% e menos de 50% do componente neoplásico. Barra – mediana. Teste de Mann-Whitney (p>0,05)

A Tabela 5 demonstra os resultados da comparação do número de CDp, expressão de TLR 3 e 9 nas lesões de sarcoma de Kaposi de acordo com a expressão de podoplanina.

Tabela 5 - Comparação do número de células dendríticas plasmocitóides (CD303+), expressão dos receptores "Toll-like" 3 e 9 nas lesões de Sarcoma de Kaposi com expressão de podoplanina (D2-40) menor de 50% e igual ou maior de 50%

	D2-40<50%	D2-40≥50%
	Células CD303+/mm^2 (n=22)	Células CD303+/mm^2 (n=22)
mínimo	35,10	35,10
mediana	149	105,2
máximo	442	470,1
	TLR 3 (n=21)	TLR 3 (n=23)
mínimo	0,001	0,008
mediana	0,018	0,025
Máximo	0,09	0,071
	TLR 9 (n=16)	TLR 9 (n=23)
mínimo	0,005	0,0004
mediana	0,028	0,043
máximo	0,142	0,122

TLR – receptor "Toll-like"; teste de Mann-Whitney - p>0,05

6 Discussão

O Sarcoma de Kaposi foi considerado doença definidora de Aids em 1982, sendo ainda hoje a principal neoplasia neste grupo de pacientes. Com o advento da HAART, a queda na incidência de SK nesta população foi de 84% (Rubinstein *et al.*, 2014). Apesar disso, sua incidência em indivíduos HIV positivos é muito superior a da população geral, podendo surgir mesmo em pacientes com contagem de linfócitos T CD4 maior ou igual a 350 células/mm^3 (Crum-Cianflone, 2010).

Nosso estudo compreendeu a análise de 50 biopsias realizadas na Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, cujo diagnóstico histológico foi Sarcoma de Kaposi, com confirmação da presença do vírus HHV-8 através de técnica imuno-histoquímica.

Os dados epidemiológicos do Sarcoma de Kaposi no Brasil são escassos, mas os dados demográficos da nossa casuística estão de acordo com os de outros países onde não existe a forma endêmica da doença (Gao *et al.*, 1996; Hengge *et al.*, 2002).

Na casuística por nós estudada, as lesões de SK nodulares ou tumorais predominaram no grupo de doentes com a forma clássica. No grupo de doentes com Aids, por outro lado, houve um predomínio de formas não tumorais. Essa característica foi semelhante à de outros estudos em nosso meio (Ramos da Silva *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2008). Nos doentes com Aids, as lesões são geralmente mais numerosas e o diagnóstico do SK é feito mais precocemente. Nos pacientes idosos, numa região com baixa incidência de SK não relacionado à Aids, o diagnóstico é feito mais tardiamente, quando do estágio tumoral das lesões.

As CDp podem ser infectadas pelo HIV e/ou responder à infecção com secreção de IFN. Acredita-se que a função das CDp na infecção pelo HIV se altera, na progressão da doença, de protetora para patogênica (Reizis *et al.*, 2011).

Os trabalhos da literatura que abordam as CDp no SK-Aids e SKc, enfocam o comportamento dessa população celular somente no sangue periférico (Stebbing *et al.*, 2003; Della Bella *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011). Não encontramos, na literatura, trabalhos que abordam a presença e participação das CDp nos sítios de lesão do SK.

Surpreendeu-nos o fato da densidade de CDp não apresentar diferença entre os três grupos de SK estudados. As CDp estão ausentes ou são encontradas em pequeno número na pele normal (Zaba *et al.*, 2009) e são as principais produtoras de IFN tipo 1, fundamental na resposta imune contra vírus (Cella *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 2001; Liu, 2005). No SKc, as células tumorais e a resposta imunológica "in situ" estão sob efeito apenas do HHV-8 ao passo que no SK-Aids estão sob efeito de dois vírus, o HIV e o HHV-8. Existem mecanismos de cooperação mútua desses dois vírus tanto na patogênese como na carcinogênese do SK (da Silva; de Oliveira, 2011). A imunodepressão causada pelo HIV facilita a evasão do HHV-8 dos mecanismos da imunidade, assim como o processo de carcinogênese (Liu *et al.*, 2013). Além disso, o HIV induz a reativação e replicação lítica do HHV-8 (Harrington *et al.*, 1997). Por sua vez, a presença de HHV-8 está relacionada ao aumento da replicação do HIV em monócitos, em modelo experimental (Caselli *et al.*, 2005).

O número de CDp, imunomarcadas pelo anticorpo CD303 (BDCA-2), das lesões de SK-Aids foi maior que o observado no grupo controle de granuloma

piogênico. Entretanto, essa população celular não diferiu no SK-Aids/HAART e no SKc quando comparados ao grupo de granuloma piogênico.

As CDp estão diminuídas no sangue periférico de pacientes cronicamente infectados pelo HIV. De acordo com a literatura as CDp são parasitadas e destruídas pelo HIV e, por este motivo, estariam diminuídas no sangue periférico de doentes com Aids (Swiecki; Colonna, 2010). Além disso, as CDp sofreriam apoptose através do aumento da atividade da caspase 3 e não seriam repostas de maneira adequada pela medula óssea (Fitzgerald-Bocarsly; Jacobs, 2010). Essas células dendríticas estariam redistribuídas para sítios de grande exposição antigênica como o trato gastro-intestinal (Li *et al.*, 2013), migrariam e se acumulariam em linfonodos e no baço durante a infecção (Lehmann *et al.*, 2010) ou migrariam e seriam destruídas nos linfonodos (Brown *et al.*, 2009). Na Aids essa população celular mostra-se mais diminuída em número quanto mais avançada encontra-se a doença (Soumelis *et al.*, 2001; Fitzgerald-Bocarsly; Jacobs, 2010). Observamos, entretanto, que nos sítios de lesão de SK, as CDp mostraram-se mais abundantes que no grupo controle. Tal fato poderia ser explicado pela compartimentalização da resposta imune, isto é, a resposta imune é órgão específica e não reflete necessariamente o que ocorre no sangue (Engwerda; Kaye, 2000).

Não houve diferença entre a densidade de CDp no grupo SKc e GP. As CDp estão diminuídas no sangue e apresentam alteração na produção de citocinas e expressão de receptores nos doentes com SKc (Della Bella *et al.*, 2006). Esta diminuição é mais acentuada nos pacientes com lesões mais avançadas (Della Bella *et al.*, 2006). Ao estudar essa população celular nas lesões de SK, entretanto, não observamos esta correlação pois não houve diferença do número de CDp entre o

grupo de lesões precoces (M-P/P) e tumorais. Apesar de não haver consenso, alguns autores referem ocorrer diminuição fisiológica das CDp do sangue periférico com o envelhecimento (Shodell; Siegal, 2002). Esta poderia ser uma possível explicação para justificar o que observamos nas lesões de SKc quanto à população de CDp. Entretanto, não podemos afastar a possibilidade de que essa observação tenha ocorrido devido ao menor número de lesões de SKc estudadas.

Apesar do tratamento antirretroviral, o SK continua a ser a neoplasia mais frequente nos pacientes com Aids (Unemori *et al.*, 2013). Sua incidência neste grupo de doentes foi alta no início da década de 90, quando foram observados 47 casos por milhão de pessoas/ano nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2013). Com a introdução da HAART, a incidência do SK diminuiu até o ano 2000 e desde então continua estável (National Cancer Institute, 2013), com seis casos por milhão de pessoas/ano, nos Estados Unidos. A diminuição da incidência da neoplasia deve-se à restauração parcial das funções do sistema imunológico com o uso da terapêutica antirretroviral combinada. O restabelecimento dos valores sanguíneos das CDp com o uso de HAART ainda é controverso (Chehimi *et al.*, 2002; Swiecki; Colonna, 2010). Poderíamos relacionar, como o aventado para o grupo de SKc, a ausência de diferença na comparação do SK-Aids/HAART com o GP ao menor número de casos neste grupo de SK, ou mesmo que, sob a terapia antirretroviral as lesões de SK desses doentes apresentaram características imunopatológicas semelhantes às do SKc que estão sob a influência de apenas um vírus.

Durante a infecção pelo HIV acontece um processo de envelhecimento imunológico (Unemori *et al.*, 2013). Este envelhecimento é determinado pelo estado de ativação imunológica crônica que ocorre de forma independente do tratamento

antirretroviral. A ativação imunológica crônica seria secundária à ação do próprio HIV e de infecções associadas, ou à translocação de bactérias e seus produtos no intestino dos doentes (Brenchley *et al.*, 2006). A ativação imunológica crônica resultaria em fenótipo imunológico semelhante ao de indivíduos idosos, com aumento da diferenciação de linfócitosT (principalmente células efetoras T CD8+), diminuição de sua renovação e aumento da expressão/produção dos marcadores inflamatórios (Pathai *et al.*, 2013).

Infecções associadas, como a do vírus da doença de inclusão citomegálica (CMV), atuam acelerando o processo de envelhecimento imunológico, especialmente entre indivíduos sob tratamento para a infecção pelo HIV (Aiello; Simanek, 2012). A coinfecção pelo HHV-8 também contribuiria para esse processo de envelhecimento imunológico (Unemori *et al.*, 2013).

Apesar da baixa contagem de linfócitos T CD4+ no sangue estar associada a graus mais acentuados de imunodepressão e ocorrência de SK em estágios mais avançados (El Amari *et al.*, 2008), a densidade de CDp não apresentou diferença significativa entre os grupos com e sem comprometimento visceral, assim como em relação à contagem de linfócitos T CD4 no sangue. Acreditamos que em todos os doentes com SK-Aids exista comprometimento imunológico intenso, uma vez que esses doentes encontram-se na fase crônica e apresentam doença definidora de Aids.

O risco de um doente com Aids desenvolver SK aumenta quanto mais acentuado for o seu estado de imunodepressão (Crum-Cianflone *et al.*, 2010), mas doentes com linfócitos T CD4+ acima de 350 células/mm^3 também apresentam SK (Crum-Cianflone *et al.*, 2010). Em nossa casuística tivemos lesões de SK em sete pacientes nesta situação. Destes apenas um apresentava SK com envolvimento

extracutâneo. Três pacientes faziam tratamento com HAART ao passo que quatro não estavam sob qualquer tratamento antirretroviral. A média de idade destes pacientes foi de 37 anos, não sendo diferente dos demais pacientes. Na literatura, alguns autores acreditam que em doentes com contagem alta de linfócitos T CD4 no sangue, o SK comporta-se como o SKc e não como o SK-Aids (Unemori *et al.*, 2013). O envelhecimento do sistema imunológico causado pelo HIV seria a causa do aparecimento das lesões em pacientes cuja imunidade não estivesse tão comprometida. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que o pequeno número de casos no grupo SK em pacientes com contagem de linfócitos T CD 4 no sangue igual ou maior que 350 células/mm^3 ser a causa da ausência de diferença significante na comparação das CDp no SK dos doentes que apresentaram contagem de linfócitos T CD4+ menor que 350/mm^3. Por outro lado, as CDp foram menos numerosas nas lesões de GP quando comparadas com lesões de SK em indivíduos com contagem sanguínea de linfócitos T CD4 igual/maior ou menor que 350/mm^3. Essa observação reforça a possível participação desse componente dendrocítico na patogenia do SK.

O fato de não encontrarmos o resultado esperado na comparação entre as lesões de SK dos três grupos de doentes estudados nos fez pensar que as CDp apresentariam suas funções alteradas nessa neoplasia qualquer que fosse a condição associada. Estudos experimentais demonstraram que as CDp isoladas do sangue estão alteradas em número e função tanto na infecção aguda (Huang *et al.*, 2011) como na infecção crônica pelo HIV (Feldman *et al.*, 2001; Fitzgerald-Bocarsly; Jacobs, 2010).

Não houve diferença entre a densidade das CDp nas lesões tumorais de SK quando comparadas com as lesões M-P/P. Seria esperado que o número destas células fosse maior em lesões precoces, pois as lesões tardias poderiam ser consequência da falta de controle sobre o vírus, com replicação e infecção das células que adquirem o fenótipo fusiforme característico dessa fase do SK.

Demonstramos, pela primeira vez, que as CDp no SK são parasitadas pelo HHV-8. Observamos, através de técnica de imuno-histoquímica com dupla marcação, a co-localização do antígeno LANA do HHV-8 no núcleo de CDp (imunomarcadas pelo anticorpo CD303) , tanto em espécimes de lesões tumorais como em lesões M-P/P do SK. Transcrição de genes do HHV-8 em CDp foram demonstrados em experimentos "in vitro" (West *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2013), assim como o parasitismo de CDp pelo HIV (Swiecki; Colonna, 2010; O'Brien *et al.*, 2013). Desse modo podemos inferir que as CDp, embora mais numerosas no SK do que no GP, por serem parasitadas e estarem sob a influência viral não estariam exercendo atividades anti-virais adequadas, nos sítios de lesão.

O sistema imune inato reconhece patógenos através de estruturas características e conservadas, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e não através de estruturas particulares. Esta estratégia evolucionária do hospedeiro tenta prevenir o escape de organismos mutantes além de permitir que um número limitado de receptores da linhagem germinativa reconheçam uma grande variedade de organismos invasores (Muzio *et al.*, 2000).

Os TLR constituem uma família de receptores de reconhecimento de padrões. Os TLR expressos por diferentes subpopulações de células apresentadoras de

antígenos têm despontado como importantes fatores na resposta imune e adaptativa ao HHV-8 (Knowlton *et al.*, 2013).

Os principais TLR envolvidos na resposta imunológica aos vírus são o TLR 3, 7, 8 e 9 (Biasin *et al.*, 2010; Sironi *et al.*, 2012). O TLR 3 foi admitido como o principal TLR no reconhecimento dos vírus uma vez que seu ligante, o dsRNA, é formado durante o processo de replicação viral, tanto dos vírus DNA como RNA (Zhou *et al.*, 2010). O TLR 9 tem como ligante sequências CpG não metiladas de DNA que são encontradas em vírus e bactérias (Akira; Hemmi, 2003; Bowie; Haga, 2005; Akira *et al.*, 2006). Ambos os receptores podem ter ampla distribuição na pele, podendo ser expressos na epiderme pelos queratinócitos e células de Langerhans (Lebre *et al.*, 2007). Na derme, podem ser expressos por células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos (Miller; Modlin, 2007; Fitzner *et al.*, 2008).

Sendo estes receptores importantes no reconhecimento e resposta imune inicial aos vírus, podemos supor que o HHV-8 tem mecanismos de interação e modulação dos TLR. Tais mecanismos permitem que o vírus infecte e permaneça no organismo do hospedeiro (Coscoy, 2007; Areste; Blackbourn, 2009).

Em nosso estudo demonstramos expressão de TLR 3 nas células do SK, mesmo as fusocelulares, assim como nos componentes inflamatório e endotelial não transformado.

A expressão de TLR 3 é observada na pele normal (Fitzner *et al.*, 2008; Pegu *et al.*, 2008). O estímulo de TLR3 desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas, dentre elas o CCL-2, CXCL-10, IL-6 e IFN-β (West; Damania, 2008). Estas proteínas são quimiotáticas para células inflamatórias e participam da

promoção da angiogênese nos sítios de infecção. Desse modo, o TLR 3 pode ter papel na patogênese das lesões de SK.

O TLR 3, por outro lado, tem efeitos paradoxais nas infecções virais. Participa dos eventos para a eliminação de alguns vírus, mas para outros, é benéfico e propicia a permanência do agente infeccioso (Vercammen *et al.*, 2008). Pouco se conhece do papel do TLR 3 na infecção pelos herpes vírus. Foi descrita a associação entre a deficiência de TLR 3 em humanos, a disseminação viral e ocorrência de encefalite pelo HSV-1 (Zhang *et al.*, 2007). O HHV-8, apesar de ser um DNA-vírus estimula o TLR 3, levando à produção de citocinas e quimiocinas (West; Damania, 2008). Experimentos "in vitro" demonstraram que monócitos têm grande expressão de TLR 3 quando infectados com o HHV-8 (West; Damania, 2008). Entretanto, no decorrer do experimento a quantidade de mRNA de TLR 3 começa a diminuir e após 120 horas atinge níveis semelhantes ao do período de latência. A diminuição na expressão de TLR 3 poderia ser decorrente da interação de genes virais que sabidamente interagem com mecanismos imunológicos do hospedeiro (Gregory *et al.*, 2012; Jacobs *et al.*, 2013).

Em relação ao HIV, o TLR 3 parece ter papel nos mecanismos de defesa. Polimorfismos da porção extracelular (ectodomínio) do TLR 3 determinam maior resistência à infecção pelo HIV (Sironi *et al.*, 2012). Em indivíduos cronicamente expostos à infecção pelo HIV e que não apresentam soroconversão, o estímulo do TLR 3 pelo seu agonista sintético, poli(I:C) - ácido poliriboinosinicopoliribocitidílico – desencadeia maior produção de citocinas inflamatórias (Biasin *et al.*, 2010). Além disso, a ativação do TLR 3 em macrófagos suprime a infecção e a replicação do HIV através de mecanismos dependentes de IFN tipo 1 (Zhou *et al.*, 2010).

Encontramos expressão de TLR 3 nas lesões cutâneas de SK e GP. Sob estímulo de IFN tipo 1 ocorre aumento da expressão de TLR 3 pelos macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e fibroblastos cutâneos (Schreiner *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2011). Podemos relacionar a expressão de TLR 3 nas lesões de SK, por nós observada, à produção local de IFN tipo 1 pelas CDp presentes nas lesões, assim como secundária à liberação de material genético decorrente de necrose celular e remodelamento nas lesões que também poderiam ativar as vias de sinalização e expressão dos TLRs (Muehleisen *et al.*, 2012).

O nosso estudo é pioneiro na demonstração da expressão de TLR 3 em lesões cutâneas de SK. A expressão de TLR 3 foi demonstrada na miosite associada a infecção pelo HIV (Schreiner *et al.*., 2006). Neoplasias cutâneas como o carcinoma espinocelular e o melanoma também exibem expressão de TLR3. No carcinoma espinocelular não há diferenças na expressão de TLR 3 quer os tumores sejam de doentes imunossuprimidos pós-transplantes de órgãos ou imunocompetentes (Muehleisen *et al.*, 2012; Eiró *et al.*, 2013).

Observamos que a expressão de TLR 3 foi maior nas lesões de GP quando comparada com as lesões de SK, qualquer que fosse o grupo epidemiológico em questão. A menor expressão no TLR 3 acontece independente do grau de imunodepressão, como evidenciado pelas comparações da expressão de TLR 3 no SK-Aids de doentes com nível sanguíneo de linfócitos T CD4 $<350/mm^3$ e $\geq 350/mm^3$ e o GP. A lesão angiomatosa do GP, entretanto, não sofre efeito viral como acontece com o SK. Acreditamos que exista uma relação entre as CDp no ambiente tumoral e a expressão de TLR 3 pois, como já mencionado, o IFN tipo 1 é um

potente indutor da expressão dessa molécula reconhecedora de padrões moleculares (Schreiner *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2011).

Podemos, desse modo, relacionar os resultados, por nós observados no SK, com dois eventos imunológicos. O primeiro seria consequência da disfunção das CDp decorrente do envelhecimento ou da infecção pelo HIV (Feldman *et al.*, 2001; Chehimi *et al.*, 2002; Shodell; Siegal, 2002; Della Bella *et al.*, 2006). O segundo seria consequência de mecanismos de escape imunológico do HHV-8, que sabidamente suprime a produção de interferon α e β através da interação com os fatores liberadores de IFN (IRF) 3 e 7 (Areste; Blackbourn, 2009).

A expressão de TLR 3 não diferiu de acordo com a progressão do SK. Não encontramos diferença na sua expressão nas lesões tumorais e M-P/P, assim como nas lesões cutâneas de doentes com envolvimento somente da pele e daqueles com comprovado envolvimento visceral. Não houve também diferença na expressão de TLR 3 nos SK-Aids (com e sem tratamento) com maior ou menor evidência de imunodepressão (níveis sanguíneos de linfócitos T CD4 menor ou igual/maior que 350 células/mm^3). A disfunção de CDp e a ação do HHV-8 com consequente alteração na produção e liberação de IFN poderia explicar esse resultado.

A expressão de TLR 3 pelas células neoplásicas do SK pode implicar em novas possibilidades para o seu tratamento. Foi demonstrado que algumas linhagens de células de carcinoma de mama expressam TLR 3 e são susceptíveis à morte por apoptose pelo tratamento de agonista sintético de TLR 3 (Salaun *et al.*, 2006). Esse mesmo agonista do TLR 3 aumenta a suscetibilidade de células musculares infectadas pelo HIV, à lise induzida por células NK (Schreiner *et al.*, 2006).

A expressão de TLR 9, observada através de técnica de imuno-histoquímica, na pele normal é fraca (Curry *et al.*, 2003). Em nosso estudo, entretanto, demonstramos, por essa técnica, a expressão de TLR 9 nas lesões cutâneas de SK. A imunomarcação não foi homogênea. Apresentou-se mais intensa nas células inflamatórias do microambiente tumoral. A imunomarcação das células endoteliais foi menos exuberante. Nas células neoplásicas do SK (células fusiformes), a marcação foi discreta. Na epiderme, tanto nos casos de SK como nos espécimes de GP, houve expressão apenas nos queratinócitos mais superficiais das camadas espinhosa e granulosa, como o que é descrito na pele normal (Miller *et al.*, 2005).

O TLR 9 é um receptor que reconhece sequências CpG DNA não metiladas e está presente nas CDp (Hornung *et al.*, 2002). Nessas células, agonistas do TLR 9 provocam a liberação de IFN tipo 1, outras citocinas, quimiocinas e/ou a maturação celular, aumentando sua capacidade de apresentação de antígenos (Guillerey *et al.*, 2012). Por outro lado, no próprio processo de maturação das CDp ocorre a diminuição da expressão de TLR 9 (Hornung *et al.*, 2002).

O TLR 9 participa de mecanismos imunológicos contra gama-herpesvírus nas fases lítica e de latência (Guggemoos *et al.*, 2008). Estaria, portanto, justificado o porquê da presença de TLR 9 nas lesões de SK, independentemente do grupo epidemiológico.

O TLR 9 está envolvido em mecanismos de evasão imunológica de patógenos (Hisaeda *et al.*, 2008). Demonstramos que o HHV-8 parasita as CDp nas lesões de SK. Esse vírus interfere no controle da liberação de IFN pelas CDp e o TLR 9 está envolvido nesse mecanismo (Knowlton *et al.*, 2013). A ação do HHV-8 faz-se através dos IRFs que participam das vias de sinalização controladas pelo TLR 9

(Areste; Blackbourn, 2009). Além disso, o estímulo de TLR 9 presente em células endoteliais, induz a produção de citocinas reguladoras (Fitzner *et al.*, 2008). Quando da infecção "in vitro" das CDp pelo HHV-8 ocorre expressão das moléculas co-estimulatórias CD83 e CD86. A molécula CD86 ao modular a resposta imunológica dependente de linfócitos T pode promover o estabelecimento da fase de latência da infecção viral. O TLR 9 também está envolvido nesse mecanismo (West *et al.*, 2011).

Em nosso estudo não observamos diferença na expressão de TLR 9 entre os casos de SK e os espécimes de GP. Em ambos os grupos a marcação de TLR 9 foi mais intensa nas células inflamatórias, seguidas pela marcação endotelial. Acreditamos que não houve diferença entre os dois grupos de proliferação angiomatosa, pois as células fusiformes que compõem o SK não expressaram TLR 9 ou exibiram pouca marcação. Desse modo, a expressão do receptor foi restrita aos componentes celulares que estão presentes tanto nos espécimes de SK como no GP. Além disso, como o componente fusocelular não é extensamente marcado, não observamos diferença entre as fases clínico-patológicas (tumor ou M-P/P) das lesões.

O TLR 9 está envolvido no reconhecimento do HHV-8 pelas CDp (West *et al.*, 2011). Não observamos diferença na expressão do receptor TLR 9 nos diferentes grupos de SK, assim como não houve diferença na população de CDp entre os mesmos.

Não encontramos diferença entre a expressão do TLR 9 nas lesões de SK de doentes com nível de linfócitos T CD4+ menor e igual/maior que 350 células/mm^3. As CDp têm sua função alterada na infecção pelo HIV, mas ainda é controverso se a produção de citocinas em resposta ao estímulo do TLR 9 está relacionada aos níveis

de linfócitos T CD4+ e à carga viral sanguíneos (Chang *et al.*, 2012; Kaushik *et al.*, 2013).

Também não foi observada diferença entre a expressão de TLR 9 no SK de pacientes com contagem de linfócitos T CD4+ no sangue menor e igual/maior que 350/mm^3 quando comparados com o grupo de GP. Este resultado sugere que a expressão de TLR 9 não está relacionada ao grau de imunodepressão dos pacientes.

A expressão de TLR 9 foi semelhante nos grupos com comprometimento visceral associado e com comprometimento exclusivo da pele. O TLR 9 está envolvido no reconhecimento viral. O HHV-8 é encontrado em todas as fases evolutivas do SK, fato que justificaria não termos encontrado diferença na expressão de TLR9 nos diferentes grupos estudados.

A expressão de TLR 9 já foi demonstrada em outras neoplasias cutâneas como o melanoma. Entretanto, a função desse receptor nesta neoplasia ainda não está conhecida (Saint-Jean *et al.*, 2011).

Observamos a marcação pelo D2-40 exclusivamente nas células endoteliais linfáticas e nas células fusiformes do SK. Somente dois espécimes de SKc não apresentaram imunomarcação pelo anticorpo D2-40. Nove lesões desse grupo, assim como 37 lesões de SK associados a Aids apresentaram imunomarcação revelando o componente linfático da neoplasia.

O anticorpo D2-40 foi proposto como um dos marcadores de painel para o diagnóstico diferencial histológico do SK (Pyakurel *et al.*, 2006; Pantanowitz *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2012). Outras neoplasias, vasculares e também não vasculares, podem ser positivas para o marcador D2-40 (Gomaa *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2008). Apesar da baixa especificidade do D2-40 para a diagnose do SK, sua sensibilidade é

próxima de 100% em todas as fases e subgrupos epidemiológicos do SK (Pantanowitz *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2012).

Não houve marcação nos espécimes de GP pelo anticorpo D2-40. Já foi descrito que a expressão de D2-40 é também considerada de valor diagnóstico nos casos de SK que se assemelham morfologicamente ao GP, uma vez que nessa proliferação vascular a expressão desse marcador é negativo em 100% dos casos (Ramirez-Amador *et al.*, 2009).

Em nossa casuística não observamos diferença na expressão de D2-40 entre os espécimes de SK na fase M-P/P e do grupo de lesões tumorais. Os dados da literatura são conflitantes quanto à participação do componente linfático na progressão das lesões de SK. Nosso resultado está de acordo com o encontrado por Kandemir *et al.* (2011) que também não observaram diferenças na expressão desse marcador linfático entre as lesões precoces e avançadas do SKc. Esses autores, entretanto, referem ter havido diferença na intensidade da imunomarcação entre os grupos. Não consideramos esse parâmetro em nosso estudo, uma vez que a técnica de imuno-histoquímica não é estequiométrica. Lembramos que outros fatores pré analíticos ou presentes na elaboração da técnica podem interferir na intensidade da marcação por técnicas de imuno-histoquímica. Em contrapartida, Pyakurel *et al.* (2006) demonstraram, em seu estudo, haver aumento do número de células marcadas com o anticorpo D2-40 nos tumores em fases mais avançadas quando se apresentam nodulares ou tumoriformes.

Recentemente a podoplanina foi identificada como elemento participante no processo de resposta imunológica. Através de seu receptor, o CLEC-2, um receptor lectina tipo C presente em plaquetas, neutrófilos, linfócitos B e células dendríticas

dérmicas (Acton *et al.*, 2012), a podoplanina (presente no endotélio linfático, em fibroblastos e células reticulares dos órgãos linfóides) orienta a migração celular durante a resposta inflamatória tecidual (Acton *et al.*, 2012; Astarita *et al.*, 2012). Em nosso estudo não observamos diferença na porcentagem de células imunomarcadas com D2-40 nos grupos de SK relacionado ou não à Aids, independente do estágio das lesões. A descoberta do papel imunológico da podoplanina é recente e ainda pouco estudada. Não encontramos relação entre a expressão de podoplanina e os elementos da imunidade inata por nós estudados. Não é possível definir se a podoplanina expressa pelas células do SK tem alguma função imunológica. Esta permanece a ser estabelecida. Não encontramos também dados da literatura acerca da presença do receptor CLEC-2 nas células dendríticas plasmocitóides, um dos alvos de nosso estudo no SK.

O presente estudo teve como objetivo verificar a participação de elementos da imunidade inata no microambiente do SK associado ou não a Aids. Dentre esses elementos foram elegidas as CDp, devido a sua atuação reconhecida na imunidade frente às infecções virais e os TLR 3 e 9. Esses últimos, junto dos TLR 7 e 8, são os principais envolvidos na resposta imune frente aos vírus. Além disso, o TLR 9 é um sensor das CDp no reconhecimento dos vírus (Ito *et al.*, 2005). Da mesma forma, propusemo-nos a verificar a natureza endotelial linfática do SK através da expressão de podoplanina, que atualmente é também considerada um fator atuante nos mecanismos da imunidade “in situ”.

A elucidação de mecanismos e eventos que influenciam a habilidade das células dendríticas de induzir uma resposta imune efetiva contra o HHV-8 é essencial

para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas para o SK associado ou não a Aids (Knowlton *et al.*, 2013).

Embora não tenhamos feito uma análise através de metodologia que possibilite inferências funcionais dos elementos da imunidade inata no SK, pudemos demonstrar, de modo inédito, que as CDp participam da resposta tecidual das lesões cutâneas do SKc e SK associado a Aids, e que são alvo do HHV-8, pois apresentam o antígeno LANA do vírus no seu núcleo. A expressão de TLR 3 no SK foi menor que no GP e a do TLR 9 não diferiu entre os grupos de tumores estudado. Além disso, não observamos diferenças no comportamento dos elementos estudados que pudessem ser relacionadas somente com a infecção pelo HHV-8 ou esta associada ao HIV. Embora cerca de 95% dos SK estudados tenham apresentado componente endotelial linfático no tumor, esses resultados não possibilitaram relacionar a expressão de podoplanina com a progressão das lesões tumorais, assim como com os elementos da imunidade inata estudados.

7 Conclusões

1. As células dendríticas plasmocitóides participam da resposta tecidual das lesões cutâneas do sarcoma de Kaposi associado a Aids e esporádico.
2. A população de células dendríticas plasmocitóides não difere nas lesões de sarcoma de Kaposi associado a Aids e esporádico. A densidade dessas células independe do tratamento com terapia antirretroviral altamente eficaz, assim como intensidade de imunodepressão, fase clínico-patológica das lesões e presença de comprometimento visceral associado.
3. As células dendríticas plasmocitóides do microambiente do sarcoma de Kaposi cutâneo são parasitadas pelo herpes-vírus 8, pois apresentam o antígeno LANA do vírus em seus núcleos.
4. A expressão de receptor "Toll-like" 3 nas lesões cutâneas do sarcoma de Kaposi associado a Aids e esporádico é menor que no granuloma piogênico, o que demonstra haver alteração desse componente da imunidade inata nesse processo neoplásico. Não houve, entretanto, relação da expressão de TLR 3 entre os três grupos de lesão de sarcoma de Kaposi, assim como com o estado de imunodepressão dos doentes com Aids, fase clínico-patológica das lesões e presença de comprometimento visceral associado.
5. Apesar do receptor "Toll-like" 9 estar envolvido no reconhecimento do herpes-vírus 8 pelas células dendríticas plasmocitóides, a expressão desse elemento da imunidade inata não diferiu nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi e de granuloma piogênico. Não houve igualmente relação da

expressão do receptor “Toll-like 9” entre os três grupos de lesão de sarcoma de Kaposi, assim como com o estado de imunodepressão dos doentes com Aids, fase clínico-patológica das lesões e presença de comprometimento visceral associado.

6. Como 95% dos espécimes de sarcoma de Kaposi apresentaram imunomarcação para podoplanina, e esta foi ausente em todas as lesões de granuloma piogênico, podemos considerar que esse marcador é de utilidade para a diagnose diferencial entre os dois processos proliferativos vasculares.
7. A expressão de podoplanina não se relaciona com a fase clínico-patológica do sarcoma de Kaposi, assim como com a expressão dos elementos da imunidade inata estudados.

8 Anexos

Anexo A

Quadro 2 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, células dendríticas plasmocitoides, fração de área imunomarcada para receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de Sarcoma de Kaposi clássico

Caso	Idade (anos)	Sexo	Topografia	Fase evolutiva	Comprometimento sistêmico	CDp (células/mm^2)	TLR 3	TLR 9	D2-40
C1	77	M	Membro	M-P/P	L	42,1	0,021	0,038	>50%
C2	91	M	Membro	T	L	116,9	0,023	0,142	< 50%
C3	76	M	Membro	T	L	11,9	0,012	0,011	<50%
C4	74	M	Membro	M-P/P	L	35,1	0,014	0,113	<50%
C5	85	F	Membro	M-P/P	L	105,2	0,016	0,010	<50%
C6	73	M	Membro	T	L	182,4	SR	0,075	>50%
C7	69	M	Membro	M-P/P	L	189,4	0,031	0,009	>50%
C8	80	F	Membro	M-PT/P	L	35,1	0,019	SR	negativo
C9	85	F	Membro	T	L	231,5	0,022	SR	<50%
C10	80	M	Membro	T	L	52,6	0,013	SR	negativo
C11	85	F	Membro	T	L	SR	SR	0,0002	SR

CDp: Célula dendrítica plasmocitóide; TLR: Receptor "Toll-like"; SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; M: masculino; F:feminino; T: tumoral; M-P/P: mácula, pápula ou placa; L: localizado; D:disseminado; NI: Não informado; SR: sem resultado por problemas técnicos.

Quadro 3 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, contagem de linfócitos T CD4+ no sangue, densidade de células dendríticas plasmocitoides, fração de área imunomarcada para receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de Sarcoma de Kaposi associado à Aids

Caso	Idade (anos)	Sexo	Topografia	Fase evolutiva	Comprometimento sistêmico	CD4 (células/mm^3)	CDp (células/mm^2)	TLR 3	TLR 9	D2-40
A1	41	M	Membro	M-P/P	D	NI	218,8	0,030	0,061	<50%
A2	49	M	NI	M-P/P	L	NI	35,1	0,046	0,100	<50%
A3	33	M	NI	M-P/P	D	24	168,4	0,011	0,057	>50%
A4	32	M	Genital	M-P/P	L	354	119,3	0,025	0,051	>50%
A5	36	M	Tronco	M-P/P	L	43	133,3	0,028	0,061	>50%
A6	29	M	Membro	T	L	237	85,0	0,013	0,012	<50%
A7	29	M	NI	T	L	237	105,2	0,069	0,041	<50%
A8	32	M	Genital	T	L	85	442,0	0,011	0,057	>50%
A9	44	M	Tronco	M-P/P	L	NI	182,4	0,019	0,021	>50%
A10	23	M	Cabeça	M-P/P	D	27	101,2	0,018	0,076	<50%
A11	23	M	Membro	M-P/P	D	NI	161,4	0,027	0,068	>50%
A12	31	F	Membro	M-P/P	L	53	175,4	0,030	0,006	<50%
A13	70	M	Tronco	M-P/P	L	203	157,6	0,027	0,013	>50%
A14	37	M	NI	M-P/P	D	4	50,1	0,039	0,006	<50%
A15	31	M	Membro	M-P/P	D	85	287,7	0,039	0,001	>50%
A16	54	M	Genital	M-P/P	D	119	224,3	0,005	0,005	<50%
A17	41	M	Cabeça	M-P/P	D	6	140,3	0,055	0,003	>50%
A18	47	M	Membro	M-P/P	L	NI	161,4	0,008	0,015	>50%
A19	37	M	Membro	M-P/P	L	564	119,3	0,011	0,012	>50%
A20	27	M	Membro	T	D	35	SR	0,071	0,0004	>50%
A21	41	M	Membro	M-P/P	D	397	131,9	0,025	0,002	SR
A22	37	M	Membro	M-P/P	L	460	217,5	0,026	SR	>50%

CDp: Célula dendrítica plasmocitóide; TLR: Receptor "Toll-like"; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; M: masculino; F: feminino; T: tumoral; M-P/P: mácula, pápula ou placa; L: localizado; D:disseminado; NI: Não informado; SR: sem resultado por problemas técnicos.

Quadro 4 - Características demográficas, topografia, fase clínico-patológica da lesão, comprometimento sistêmico, contagem de linfócitos T CD4+ no sangue, densidade de células dendríticas plasmocitoides, fração de área imunomarcada para receptor "Toll-like" 3 e 9 e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo D2-40 nos casos de Saarcoma de Kaposi de dentes com Aids em tratamento com terapia antirretroviral altamente eficaz

Caso	Idade (anos)	Sexo	Topografia	Fase evolutiva	Comprometimento sistêmico	CD4 (células/mm^3)	CDp (células/mm^2)	TLR 3	TLR 9	D2-40
H1	34	M	NI	M-P/P	D	66	52,6	0,029	0,058	>50%
H2	65	M	Membro	T	D	97	287,7	SR	0,057	<50%
H3	52	M	Membro	M-P/P	L	32	78,9	0,005	0,044	<50%
H4	41	F	NI	T	L	437	392,9	0,014	0,084	>50%
H5	42	M	Membro	M-P/P	D	2	122,8	0,013	0,085	>50%
H6	47	M	Membro	M-P/P	L	NI	140,3	0,016	0,023	>50%
H7	47	M	Membro	T	L	NI	105,2	0,046	SR	<50%
H8	37	M	Membro	M-P/P	D	2	35,1	0,014	0,063	>50%
H9	44	M	Tronco	M-P/P	L	97	SR	0,026	0,059	>50%
H10	48	M	Membro	M-P/P	L	143	56	0,041	0,122	>50%
H11	36	M	Membro	M-P/P	D	32	78	0,019	0,026	>50%
H12	29	M	Tronco	M-P/P	L	776	105,2	0,008	0,015	<50%
H13	30	M	Membro	M-P/P	D	154	70,2	0,001	0,009	<50%
H14	45	M	Membro	M-P/P	L	140	105,2	0,002	SR	<50%
H15	31	M	Tronco	M-P/P	D	indetectável	210,5	0,016	0,007	SR
H16	33	M	Tronco	T	L	22	SR	0,090	SR	<50%
H17	42	M	Membro	T	L	437	470,1	SR	SR	<50%

CDp: Célula dendrítica plasmocitóide; TLR: Receptor "Toll-like"; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em paciente em HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz; M: masculino; F: feminino; T: tumoral; M-P/P: mácula, pápula ou placa; L: localizado; D:disseminado; NI: Não informado; SR: sem resultado por problemas técnicos.

Quadro 5 - Características demográficas, topografia, densidade de células dendríticas plasmocitoides, fração de área imunomarcada para receptor "Toll-like" 3 e 9 nas lesões de granuloma piogênico

Caso	Idade (anos)	Sexo	Topografia	CDp (células/mm^2)	TLR 3	TLR 9
P1	24	M	Tronco	35,1	0,227	0,065
P2	11	F	Cabeça	58,4	0,070	0,009
P3	63	F	Cabeça	147,3	0,080	0,040
P4	NI	M	Cabeça	35,1	0,012	0,034
P5	54	F	Tronco	140,3	0,018	0,033
P6	37	M	Cabeça	70,2	0,049	0,043
P7	43	F	Cabeça	98,2	0,093	0,016
P8	3	M	Cabeça	84,2	0,06	0,042
P9	9	F	Cabeça	90,4	0,092	0,030
P10	43	M	Membro	98,2	0,054	0,009
P11	50	F	Cabeça	SR	0,037	0,005
P12	48	F	Cabeça	202,3	0,075	0,022
P13	41	F	Tronco	35,1	0,006	0,002
P14	27	F	Cabeça	70,2	0,029	0,018
P15	33	M	Cabeça	49,1	0,020	0,006
P16	46	F	Membro	35,1	0,155	SR
P17	16	F	NI	SR	0,066	0,015
P18	69	M	Cabeça	43,8	0,041	0,035
P19	21	M	Membro	35,1	0,012	0,024
P20	43	M	NI	35,1	0,127	0,011
P21	41	M	Membro	35,3	0,053	SR
P22	39	F	Cabeça	72,8	0,100	SR
P23	48	F	Membro	49,1	0,118	0,003

CDp: Célula dendrítica plasmocitóide; TLR: Receptor "Toll-like"; GP: granuloma piogênico; M: masculino; F: feminino; NI: Não informado; SR: sem resultado por problemas técnicos.

Anexo B - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A 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 sessão de 01/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0231/09**, intitulado: "**CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITÓIDES E EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE 9 E 3 NAS LESÕES CUTÂNEAS DO SARCOMA DE KAPOSI ASSOCIADO À SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA E ESPORÁDICO**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Dra. **Mirian Nacagami Sotto, Dra Fernanda Guedes Luiz**
Pesquisador (a) Executante: **Cinara Prata Cirino Castro Soares**

CAPPesq, 02 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
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 Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo C

Quadro 6 - Características histopatológicas das lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi

	Fendas vasculares	Sinal do promontório	Células fusiformes	Mitoses	Glóbulos Hialinos	Plasmócitos	Neutrófilos	Extravasamento de hemácias	siderose
SKc	9/11 (81,8%)	6/11 (54,5%)	9/11 (81,8%)	5/11 (45,5%)	4/11 (36,4%)	10/11 (90,9%)	4/11 (36,4%)	11/11 (100%)	10/11 (90,9%)
SK-Aids	21/22 (95,5%)	14/22 (63,6%)	18/22 (81,8%)	7/22 (31,8%)	18/22 (81,8%)	16/22 (72,7%)	2/22 (9,1%)	22/22 (100%)	20/22 (90,9%)
SK-Aids HAART	16/17 (94,1%)	13/17 (76,5%)	13/17 (76,5%)	7/17 (41,2%)	12/17 (70,6%)	10/17 (58,8%)	4/17 (23,5%)	15/17 (88,2%)	16/17 (94,1 %)

SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em paciente submetido à HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz

Anexo D

Quadro 7 - Características histopatológicas das lesões máculo-papulares/placas e tumorais do Sarcoma de Kaposi cutâneo

Tipo de lesão	Fendas vasculares	Sinal do promontório	Células fusiformes	Mitoses	Glóbulos hialinos	Extravasamento de hemácias	Siderose dérmica	Plasmócitos
M-P/P	35/35 (100%)	21/35 (60%)	26/35 (74,3%)	7/35 (20%)	24/35 (68,6%)	33/35 (94,3%)	31/35 (88,6%)	22/35 (62,9%)
Tumoral	11/15 (73,3%)	12/15 (80%)	15/15 (100%)	12/15 (80%)	10/15 (66,7%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	14/15 (93,3%)

M-P/P: mácula, pápula e placa

Anexo E

Quadro 8 - Frequência e grau de atipias celulares nas lesões cutâneas do Sarcoma de Kaposi

	Atipias celulares nos casos de SK				
	SKc	SK-Aids	SK-Aids HAART	Lesão tumoral	Lesão não tumoral
Ausente	5/11 (45,4%)	7/22 (31,8%)	5/17 (29,4%)	2/15 (13,33%)	15/35 (42,86%)
Leve	2/11 (18,2%)	7/22 (31,8%)	4/17 (23,5%)	2/15 (13,33%)	11/35 (31,43%)
Moderada	2/11 (18,2%)	7/22 (31,8%)	5/17 (29,4%)	6/15 (40%)	8/35 (22,85%)
Acentuada	2/11 (18,2%)	1/22 (4,5%)	3/17 (17,6%)	5/15 (33,33%)	1/35 (2,86%)

SKc: Sarcoma de Kaposi clássico; SK-Aids: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids; SK-Aids/HAART: Sarcoma de Kaposi relacionado à Aids em paciente submetido à HAART; HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz

9 Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7th edition. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2012.

Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR *et al.* Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity.* 2012; 37:276-89.

Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, Parks DH, Mayes MD, Arnett FC, Tan FK. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(1):R3.

Ahmad H, Gubbels R, Ehlers E, Meyer F, Waterbury T, Lin R, Zhang L. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus degrades cellular Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor-inducing beta-interferon (TRIF). *J Biol Chem.* 2011; 286:7865-72.

Aiello AE, Simanek AM. Cytomegalovirus and immunological aging: the real driver of HIV and heart disease? *J Infect Dis.* 2012; 205:1772-4.

Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 2003; 85(2):85-95.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124:783-801.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413:732-8.

American Cancer Society, 2013 (internet). Disponível em www.cancer.org/cancer/kaposisarcoma/detailedguide/kaposi-sarcoma-what-is-key-statistics .

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

Aoki Y, Jaffe ES, Chang Y, Jones K, Teruya-Feldstein J, Moore PS, Tosato G. Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood.* 1999; 93:4034-43.

Areste C, Blackbourn DJ. Modulation of the immune system by Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3):119-29.

Armstrong AW, Lam KL, Chase EP. Epidemiology of classic and AIDS-related Kaposi's sarcoma in the USA: incidence, survival, and geographical distribution from 1975 to 2005. *Epidemiol Infect.* 2013; 141: 200-6.

Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol.* 2012; 3: 283-93.

Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC *et al.* Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood.* 2009; 113:377-88.

Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, Da Silva I, Kavanagh DG *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3265-75.

Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi`s sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet.* 1990; 335: 123-28.

Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Naddeo V, Pierotti P, Borelli M *et al.* TLR activation pathways in HIV-1 exposed seronegative individuals. *J Immunol.* 2010;184:2710-7.

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

Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators – a new look. *Immunity.* 2001; 14:661-4.

Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, Shearer GM. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2007; 109: 3351-9.

Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol.* 2008; 126:235-42.

Bourboulia D, Aldam D, Lagos D, Allen E, Williams I, Cornforth D *et al.* Short- and long- term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune response and viraemia. *AIDS.* 2004; 18: 485-93.

Bowie AG, Haga IR. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol.* 2005; 42:859-67.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12: 1365-71.

Brown HJ, Song MJ, Deng H, Wu TT, Cheng G, Sun R. NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol.* 2003; 77:8532-40.

Brown KN, Wijewardana V, Liu X, Barratt-Boyes SM. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *Plos Pathol.* 2009; 5(5):e1000413.

Caselli E, Galvan M, Cassai E, Caruso A, Sighinolfi L, Di Luca D. Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood.* 2005;106:2790-7.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999; 5: 919-23.

Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, Thiel V, Hugues S, Reith W, Ludewig B, Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *PNAS.* 2012; 109: 3012-7.

Chakraborty S, Veettil MV, Chandran B. Kaposi`s sarcoma associated herpesvirus entry into target cells. *Front Microbiol.* 2012; 3:6-18.

Chang JJ, Altfeld M. TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood.* 2009; 113: 269-70.

Chang JJ, Lacas A, Lindsay RJ, Doyle EH, Axten KL, Pereyra F *et al.* Differential regulation of toll-like receptor pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS.* 2012; 26:533-41.

Chang Y, Cesarman E, Passin 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.

Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Papasavvas E, Jerandi G, *et al.* Persistent decrease in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2002; 168: 4796-801.

Chen X, Cheng L, Jia X, Zeng Y, Yao S, Lv Z *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Tat accelerates Kaposi sarcoma –associated herpesvirus Kaposin A-mediated tumorigenesis of transformed fibroblasts in vitro as well as in nude and immunocompetent mice. *Neoplasia.* 2009;11:1272-84.

Chokunonga E, Borok MZ, Chirenje ZM, Nyakabau AM, Parkin DM. Trends in the incidence of cancer in the black population of Harare, Zimbabwe 1991-2010. *Int J Cancer.* 2013; 133: 721-9.

Coscoy L. Immune evasion by Kaposi`s sarcoma –associated herpesvirus. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:391-401.

Coscoy L, Ganem D. Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:8051-6.

Coscoy L, Ganem D. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J Clin Invest.* 2001; 107:1599-606.

Crum-Cianflone NF, Hullsiek KH, Ganesan A, Weintrob A, Okulicz JF, Agan BK. Is kaposi's sarcoma occurring at higher CD4 cell counts over the course of the HIV epidemic? *AIDS.* 2010; 24:2881-3.

Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J, *et al.* Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:178-86.

da Silva SR, de Oliveira DE. HIV, EBV and KSHV: Viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. *Cancer Lett.* 2011; 305:175-85.

Davis DA, Rinderknecht AS, Zoeteweij JP, Aoki Y, Read-Connole EL, Tosato G *et al.* Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood.* 2001; 97:3244-50.

Della Bella S, Nicola S, Brambilla L, Riva A, Ferruci S, Presicce P, Boneschi V, Berti E, Villa ML. Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma. *Clin Immunol.* 2006; 119: 317-9.

Della Bella S, Taddeo A, Calabrò ML, Brambilla L, Bellinvia M, Bergamo E *et al.* Peripheral blood endothelial progenitors as potential reservoirs of Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus. *Plos One.* 2008; 3(1):e1520.

Douglas JL, Gustin JK, Dezube BJ, Pantanowitz L, Moses AV. Kaposi's sarcoma: a model of both malignancy and chronic inflammation. *Panminerva Med.* 2007; 49:119-38.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, *et al.* BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α/β induction. *J Exp Med.* 2001; 194: 1823-34.

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

Eiró N, Ovies C, Fernandez-Garcia B, Alvarez-Cuesta CC, Gonzalez L, Gonzalez LO, Vizoso FJ. Expression of TLR 3,4,7 and 9 in cutaneous malignant melanoma: relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. *Arch Dermatol Res.* 2013; 305:59-67.

Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today.* 2000; 21:71-8.

El Amari EB, Toutous-Trellu L, Gayet-Ageron A, Baumann M, Cathomas G, Steffen I *et al.* Predicting the evolution of Kaposi sarcoma in the highly active antiretroviral therapy era. *AIDS.* 2008; 22:1019-28.

Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z *et al.* Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol.* 2001; 101:201-10.

Finke JS, Shodell M, Shah K, Siegal FP, Steinman RM. Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin Immunol.* 2004; 24:647-52.

Fiorentini S, Riboldi E, Facchetti F, Avolio M, Fabbri M, Tosti G *et al.* HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:3867-72.

Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol.* 2010; 87:609-20.

Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(1):138-46.

Friedman-Kien AE. Disseminated Kaposi`s sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol.* 1981; 5: 468-71.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J *et al.* KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi`s sarcoma. *Nat Med.* 1996; 2:925-8.

Gessain A, Duprez R. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *Int J Biochem Cell Biology.* 2005; 37:2457-65.

Gibellini D, Re MC, Vitone F, Rizzo N, Maldini C, La Placa M, Zauli G. Selective up-regulation of functional CXCR4 expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein. *Clin Exp Immunol*. 2003; 131:428-35.

Gill J, Bourboulia D, Wilkinson J, Hayes P, Cope A, Marcelin AG, *et al.* Prospective study of the effects of antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma associated herpesvirus infection in patients with and without Kaposi sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002; 31:384-90.

Gomaa AH, Yaar M, Bhawan J. Cutaneous immunoreactivity of D2-40 antibody beyond the lymphatics. *Am J Dermatopathol.* 2007; 29(1): 18-21.

Grabar S, Abraham B, Mahamat A, Del Giudice P, Rosenthal E, Costagliola D. Differential impact of combination antiretroviral therapy in preventing Kaposi`s sarcoma with and without visceral involvement. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3408-14.

Grayson W, Pantanowitz L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol.* 2008; 3:31-42.

Gregory SM, West JA, Dillon PJ, Hilscher C, Dittmer DP, Damania B. Toll-like receptor signaling controls reactivation of KSHV from latency. *PNAS.* 2009; 106: 11725-30.

Gregory SM, Damania B. KSHV and the toll of innate immune activation. *Cell Cycle.* 2009; 8:3246-7.

Gregory SM, Wang L, West JA, Dittmer DP, Damania B. Latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of monocytes downregulates expression of adaptative immune response costimulatory receptors and proinflammatory cytokines. *J Virol*. 2012; 86:3916-23.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997; 185: 1101-11.

Guedes F, de Andrade HF, Fernandes ER, Tuon FF, Brasil RA, Pagliari C, Duarte MIS. The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon-γ response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus-infected and uninfected individuals. *Br J Dermatol.* 2008; 159:839-46.

Guggemoos S, Hangel D, Hamm S, Heit A, Bauer S, Adler H. TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J Immunol.* 2008; 180:438-43.

Guillerey C, Mouriès J, Polo G, Doyen N, Law HK, Chan S *et al.* Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9 triggering in mice. *Blood.* 2012; 120:90-9.

Guo HG, Pati S, Sadowska M, Charurat M, Reitz M. Tumorigenesis by human herpesvirus 8 vGPCR is accelerated by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol.* 2004;78:9336-42.

Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, Neys L, Lipson KE, *et al.* Comparison of human B cell activation by TLR 7 and TLR 9 agonists. *BMC Immunol.* 2008;9:39-53.

Harrington W Jr, Sieczkowski L, Sosa C, Chan-a-Sue S, Cai JP, Cabral L *et al.* Activation of HHV-8 by HIV-1 tat. *Lancet.* 1997 349:774-5.

Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Siqurdson C, Wagner H, Akira S *et al.* Lymphoid follicle destruction and immunosupression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*. 2004; 10(2):187-92.

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.

Herbeuval JP, Shearer GM. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol.* 2007; 123(2):121-8.

Hewitt EW, Duncan L, Mufti D, Baker J, Stevenson PG, Lehner PJ. Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. *EMBO J.* 2002;21:2418-29.

Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S *et al.* Malaria parasites require TLR 9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 180:2496-503.

Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR *et al.* Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma associated herpesvirus. *Nat Genet.* 2004; 36:683-5.

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002; 168:4531-7.

Huang J, Yang Y, Al-MozainiM, Burke PS, Beamon J, *et al.* Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2011; 2014:1557-62.

Huang LM, Cho MF, Chen MY, Shih Hm, Chiang YP, Chuang CY, Lee CY. Reciprocal regulatory interaction between human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem.* 2001; 276:13427-32.

Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic Kaposi Sarcoma – Epidemiology and Risk Factors. *Cancer.* 2000; 88:500-17.

Ishida M, Kushima R, Okabe H. Immunohistochemical demonstration of D2-40 in basal cell carcinomas of the skin. *J Cutan Pathol.* 2008; 35:926-30.

Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26:221-229.

Jacobs SR, Gregory SM, West JA, Wollish AC, Bennett CL, Blackbourn DJ, *et al.* The viral interferon regulatory factors of Kaposi´s sarcoma associated herpesvirus differ in their inhibition of interferon activation mediated by toll-like receptor 3. *J Virol.* 2013;87:798-806.

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

Jenner RG, Alba MM, Boshoff C, Kellam P. Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol.* 2001; 75:891-902.

Judde JG, Lacoste V, Brière J, Kassa-Kelembho E, Clyti E, Couppié P, *et al.* Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 729-36.

Kalof AN e Cooper K. D2 40 immunohistochemistry – so far!. *Adv Anat Pathol.* 2009; 16: 62-64.

Kamga I, Kahi S, Develioglu L, Lichtner M, Marañón C, Deveau C, *et al.* Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2005; 192:303-10.

Kandemir NO, Barut F, Gun BD, Keser SH, Karadayi N, Gun M, Ozdamar SO. Lymphatic differentiation in Classic Kaposi's Sarcoma: patterns of D2-40 immunoexpression in the course of tumor progression. *Pathol Oncol Res.* 2011; 17:843-51.

Kang SS, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54: 951-83.

Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*. 2004; 279:12542-50.

Kaushik S, Teque F, Patel M, Fujimura SH, Schmidt B, Levy JA. Plasmacytoid dendritic cell number and responses to Toll-like receptor 7 and 9 agonists vary in HIV Type 1-infected individuals in relation to clinical state. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013; 29: 501-10.

Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 2006; 7(2): 131-7.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11: 373-84.

Knowlton ER, Lepone LM, Li J, Rappocciolo G, Jenkins FJ, Rinaldo CR. Professional antigen presenting cells in human herpesvirus 8 infection. *Front Immunol.* 2013; 3: 427-44.

Lacombe JM, Boue F, Grabar S, Viget N, Gazaignes S, Lascaux-Cametz AS, *et al.* Risk of Kaposi sarcoma during the first months on combination antiretroviral therapy. *AIDS.* 2013; 27:635-43.

Lagos D, Vart RJ, Gratix F, Westrop SJ, Emuss V, Wong PP, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates innate immunity to Kaposi sarcoma herpesvirus. *Cell Host Microbe.* 2008; 4:470-83.

Lebbé C, Blum L, Pellet C, Blanchard G, Vérola O, Morel P *et al.* Clinical and biological impact of antiretroviral therapy with protease inhibitors on HIV-related Kaposi`s sarcoma. *AIDS.* 1998; 12(7):F45-9.

Lebre MC, van der Aar AM, van BL, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML *et al.* Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5 and 9. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:331-41.

Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14:432-6.

Lehmann C, Harper JM, Taubert D, Hartmann P, Fatkenheuer G, Jung N. Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Depic Syndr.* 2008; 48: 522-30.

Lehmann C, Lafferty M, Garzino-Demo A, Jung N,Hartmann P, Fatkenheuer G *et al.* Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *Plos One.* 2010; 5(6):e11110.

Lennert K, Remmele W. Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts and lymphocytes. *Acta Haematol.* 1958; 19:99-113.

Letang E, Almeida JM, Miró JM, Ayala E, White IE , Carrilho C, *et al.* Predictors of immune reconstitution inflammatory syndrome-associated with kaposi sarcoma in Mozambique: a prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 53:589-97.

Li H, Gillis J, Johnson RP, Reeves RK. Multi-functional plasmacytoid dendritic cells redistribute to gut tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Immunology*. 2013; 140: 244-9.

Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood.* 2007, 109: 1043-50.

Liu W, Qin Y, Bai L, Lan K, Wang JH. Kaposi`s sarcoma associated herpesvirus activated dendritic cells promote HIV-1 trans infection and suppress CD4+ T cell proliferation. *Virology.* 2013; 440: 150-9.

Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 275-306.

Luiz FG. Avaliação da resposta tecidual "in situ" do fenótipo, da expressão de HHV-8/LANA e de citocinas em lesões de Sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de Kaposi associado à Aids na era pré e pós terapia antiretroviral combinada [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3431-9.

Mancuso R, Biffi R, Valli M, Bellinvia M, Athanasia T, Fetrucci S *et al.* HHV-8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi`s sarcoma. *J Med Virol.* 2008; 80: 2153-60.

Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in pathogenesis of HIV infection and Aids. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1): 2-18.

Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med.* 1999; 189:521-30.

Martinelli C, Zazzi M, Ambu S, Bartolozzi D, Corsi P, Leoncini F. Complete regression of AIDS-related Kaposi`s sarcoma-assoaciated human herpesvirus-8 during therapy with indinavir. *AIDS.* 1998; 12:1717-9.

Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J *et al.* HIV-1 gp 120 inhibits TLR-9 mediated activation and IFN-α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 3396-401.

Martinson JA, Roman-Gonzalez A, Tenorio AR, Montova CJ, Gichinga CN, Rugeles MT *et al.* Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor(TLR) ligands. *Cell Immunol.* 2007; 250(1-2):75-84.

McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol.* 2005; 79: 17-27.

Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A *et al.* MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency vírus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol.* 2007; 81:8180-91.

Mercader M, Nickoloff BJ, Foreman KE. Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125:785-9.

Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi`s sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10:707-19.

Meyer F, Ehlers E, Steadman A, Waterbury T, Cao M, Zhang L. TLR-TRIF pathway enhances the expression of KSHV replication and transcription activator. *J Biol Chem.* 2013; 288:2035-42.

Miller LS, Modlin RL. Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol.* 2007; 29:15-26.

Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE *et al.* TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 2005; 174:6137-43.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008. Brasília, 2008 (internet). Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/recomendação_terapia.pdf.

Moore PS, Chang Y. Kaposi`s sarcoma –associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:609-39.

Moses AV, Fish KN, Ruhl R, Smith PP, Strussenberg JG, Zhu L, *et al.* Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1999;73:6892-902.

Muehleisen B, Jiang SB, Gladsjo JA, Gerber M, Hata T, Gallo RL. Distinct innate immune gene expression profiles in non-melanoma skin cancer of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Plos One.* 2012; 7(7):e40754.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli *et al.* Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR 3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:5998-6004.

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, 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: 1202-10.

National Cancer Institute, 2013 (internet). Disponível em www.cancer.gov/researchandfunding/snapshots/kaposisarcoma.

Neipel F, Albrecht JC, Ensser A, Huang YQ, Li JJ, Friedman-Kien AE, Fleckenstein B. Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol.* 1997; 71:839-42.

Nicholas J. Evolutionary aspects of oncogenic herpesvirus. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 2000; 53:222-37.

O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 762: 71-107.

Oh DY, Taube S, Hamouda O, Kücherer C, Poggensee G, Jessen H *et al.* A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis.* 2008; 198: 701-9.

Orenstein JM. Ultrastructure of Kaposi Sarcoma. *Ultrastructural Pathol.* 2008; 32:211-20.

Pacanowski J, Kathi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C *et al.* Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood.* 2001; 98:3016-21.

Pacanowski J, Develioglu L, Kamga I, Sinet M, Desvarieux M *et al.* Early plasmacytoid dendritic cell changes predict plasma HIV load rebound during primary infection. *J Infect Dis.* 2004;190: 1889-92.

Pantanowitz L, Otis CN, Dezube BJ. Immunohistochemistry in Kaposi's sarcoma. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35:68-72.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Thomas DB, Toppo L. Cancer incidence in five continents. Vol III. IARC Scientific Publications No 155. Lyon, 2002.

Pathai S, Bajillan H, Landay AL, High KP. Is HIV a model of accelerated or accentuated aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013; out 24 PMID 24158766.

Pegu A, Qin S, Fallert Junecko BA, Nisato RE, Pepper MS, Reinhart TA. Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *J Immunol.* 2008; 180:3399-405.

Ploquin MJY, Jacquelin B, Jochems SP, Barré-Sinoussi F, Müller-Trutwin MC. Innate immunity in the control of HIV/AIDS: recent advances and open questions. *AIDS.* 2012; 26:1269-79.

Portmouth S, Stebbing J, Gill J, Mandalia S, Bower M, Nelson M *et al.* A comparison of regimens based on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or protease inhibitors in preventing Kaposi`s sarcoma. *AIDS.* 2003; 17(11):F17-22.

Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Heiden T, Biberfeld P. Lymphatic and vascular origin of Kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development. *Int J Cancer.* 2006; 119:1262-7.

Quan TE, Roman RM, Rudenga BJ, Holers VM, Craft JE. Epstein-Barr virus promotes interferon-alpha production by plamacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:1693-701.

Radu O, Pantanowitz L. Kaposi sarcoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137:289-94.

Ramirez-Amador V, Martínez-Mata G, González-Ramírez I, Anaya-Saavedra G, de Almeida OP. Clinical, histological and immunohistochemical findings in oral Kaposi's sarcoma in a series of Mexican AIDS patients. Comparative study. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38:328-33.

Ramos da Silva S, Bacchi MM, Bacchi CE, Elgui de Oliveira D. Human bcl-2 expression, cleaved caspase-3, and KSHV LANA-1 in Kaposi sarcoma lesions. *Am J Clin Pathol.* 2007; 128:794-802.

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:293-316.

Rappacciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, Piazza P, Jais M, Borowski L, Watkins SC, Rinaldo CR. DC SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 2006: 176: 1741-9.

Rappocciolo G, Hensler HR, Jais M, Reinhart TA, Pegu A, Jenkins FJ, Rinaldo CR. Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *J Virol.* 2008; 82:4793-4806.

Reizis B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(2): 206-11.

Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 163-183.

Riva G, Barozzi P, Torelli G, Luppi M. Immunological and inflammatory features of Kaposi`s sarcoma and other Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8-associated neoplasias. *Aids Rev.* 2010;12:40-51.

Rosado FGN, Itani DM, Coffin CM, Cates JM. Utility of immunohistochemical staining with FLI1, D2-40, CD31, and CD34 in the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related and non-acquired immunodeficiency syndrome-related kaposi sarcoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136:301-4.

Rubinstein PG, Aboulafia DM, Zloza A. Malignancies in HIV/AIDS: from epidemiology to therapeutic challenges. *AIDS.* 2014; 20:453-65.

Sabado RL, O`Brien M, Subedi A, Qin L, Hu N, Taylor E *et al.* Evidence of disregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood.* 2010; 116:3839-52.

Sachdeva N, Asthana V, Brewer TH, Garcia D, Asthana D. Impaired restoration of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected patients with poor CD4 T cell reconstitution is associated with decrease in capacity to produce IFN-alpha but not proinflamatory cytokines. *J Immunol.* 2008; 181: 2887-97.

Saint-Jean M, Knol AC, Nguyen JM, Khammari A, Dréno B. TLR expression in human melanoma cells. *Eur J Dermatol.* 2011; 21: 899-905.

Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol.* 2006; 176: 4894-901.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 187:875-83.

Schreiner B, Voss J, Wischhusen J, Dombrowski Y, Steinle A, Lochmüller H, *et al.* Expression of toll-like receptors by human muscle cells in vitro and in vivo: TLR 3 is highly expressed in inflammatory and HIV myopathies, mediates IL-8 release and up-regulation of NKG2D-ligands. *FASEB J.* 2006;20(1):118-20.

Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, *et al.* HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. *Nat Med.* 2002;8:225-32.

Shodell M, Siegal FP. Circulating interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. *Scand J immunol.* 2002;56:518-21.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999; 284:1835-7.

Sironi M, Biasin M, Cagliari R, Forni D, De Luca M, Saulle I, *et al.* A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol.* 2012; 188:818-23.

Soumelis V, Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 2286-92.

Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L *et al.* Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood.* 2001; 98:906-12.

Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F.Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31: 270-7.

Spiller OB, Robinson M, O`Donnell E, Milligan S, Morgan BP, Davinson AJ *et al.* Complement regulation by Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein. *J Virol.* 2003; 77(1):592-9.

Stebbing J, Gazzard B, Portsmouth S, Gotch F, Kim L, Bower M *et al.* Disease-associated dendritic cells respond to disease-specific antigens through the common heat shock protein receptor. *Blood.* 2003; 102:1806-14.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99 (1):351-8.

Sullivan SG, Hirsch HH, Franceschi S, Steffen I, Amari EB, Mueller NJ *et al.* Kaposi sarcoma herpes virus antibody response and viremia following highly active antiretroviral therapy in the Swiss JIV Cohort study. *AIDS.* 2010; 24:2245-52.

Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev.* 2010; 234:142-62.

Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 2009; 227(1):75-86.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:623-55.

Trattner A, Hodak E, David M, SandbankM. The appearance of Kaposi sarcoma during corticosteroid therapy. *Cancer.* 1993; 72:1779-83.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Immunol Rev.* 2003; 3(2):133-46.

Unemori P, Leslie KS, Hunt PW, Sinclair E, Epling L *et al.* Immunosenescence is associated with presence of Kaposi`s sarcoma in antiretroviral treated HIV infection. *AIDS.* 2013; 27(11):1735-42.

Urquhart JL, Uzieblo A, Kohler S. Detection of HHV-8 in Pyogenic Granuloma-like Kaposi Sarcoma. *Am J Dermatopathol.* 2006;28:317-321.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005; 17: 273-83.

Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun.* 2002; 70: 1033-41.

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(1): 13-25.

Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Mäkinen T *et al.* Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet.* 2004; 36:687-93.

Wang L, Damania B. Kaposi`s sarcoma associated herpesvirus confers a survival advantage to endothelial cells. *Cancer Res.* 2008; 68:4640-8.

West J, Damania B. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi`s sarcoma associated herpesvirus during primary infection. *J Virol.* 2008; 82:5440-9.

West JA, Damania B. Kaposi`s sarcoma associated herpesvirus and innate immunity. *Future Virol.* 2010; 5:185-196.

West JA, Gregory SM, Sivaraman V, Su L, Damania B. Activation of Plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.* 2011; 85: 895-904.

World Health Organization. Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissua and Bone. Lyon: IARC Press, 2002.

Yao L, Salvucci O, Cardones AR, Hwang ST, Aoki Y, De La Luz Sierra M, *et al.* Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis. *Blood*. 2003;102:3900-5.

Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 302-8.

Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, *et al.* Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. *J Virol.* 2007;81: 2401-17.

Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romera P *et al.* TLR3 deficincy in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 2007; 317:1522-7.

Zhou F, Xue M, Qin D, Zhu X, Wang C, Zhu J, *et al.* HIV-1 Tat promotes Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) vIL-6-induced angiogenesis and tumorigenesis by regulating PI3K/PTEN/AKT/GSK-3β signaling pathway. *PLoS One.* 2013; 8:e53145.

Zhou Y, Wang X, Liu M, Hu Q, Song L, Ye L, *et al.* A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology.* 2010; 131(1):40-9.

Zhu X, Guo Y, Yao S, Yan Q, Xue M, Hao T *et al.* Synergy between Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) vIL-6 and HIV-1 Nef protein in promotion of angiogenesis and oncogenesis: role of the AKT signaling pathway. *Oncogene.* 2014;33:1986-96.