FERNANDA GUEDES LUIZ

**Avaliação da resposta tecidual “in situ” do fenótipo,
da expressão de HHV-8/LANA e de citocinas em lesões
cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de
Kaposi associado à AIDS na era pré e pós-terapia
anti-retroviral combinada**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Irma Seixas Duarte

SÃO PAULO

2008

FERNANDA GUEDES LUIZ

**Avaliação da resposta tecidual “in situ” do fenótipo,
da expressão de HHV-8/LANA e de citocinas em lesões
cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de
Kaposi associado à AIDS na era pré e pós-terapia
anti-retroviral combinada**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Irma Seixas Duarte

SÃO PAULO

2008

*Aos pacientes, motivo maior do trabalho de quem se dedicou ao
estudo do sarcoma de Kaposi.*

Nessa fase importante da minha vida desejo dividir com todos vocês a felicidade e a satisfação que sinto. A concretização desse trabalho só foi possível porque tive o auxílio e a amizade de pessoas tão queridas assim expresso aqui os meus agradecimentos sinceros.

Ao meu companheiro de todas as horas, Jesus, que sempre guia os meus passos pela estrada da vida.

À Prof.^a Dr.^a Maria Irma Seixas Duarte, por ter me recebido em seu laboratório e pelo incentivo inicial para fazer o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, talvez agradecer seja pouco diante de tudo o que me foi oferecido, você é um exemplo de pesquisador. Obrigada pelo auxílio na análise estatística e na finalização dessa pesquisa. Jamais esquecerei!

À Prof.^a Dr.^a Mirian Nacagami Sotto, pela inestimável colaboração para obtenção da casuística dessa tese.

À Andréa Luciene Tinoco, pela prontidão em providenciar a relação dos casos de sarcoma de Kaposi.

A todos os funcionários do Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Washington, funcionário da casa da Aids, pelo auxílio no levantamento de alguns prontuários médicos.

A Maria Cristina, Jacqueline, Marlene e Ivete, funcionárias do Laboratório de Dermatopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo precioso trabalho nos cortes histológicos.

À Dr.^a Rosecelis Araújo Brasil, pelo valioso auxílio nas avaliações histopatológicas.

Aos funcionários do Laboratório de Imuno-histoquímica do InCor, Dr.^a Nádia Vieira Sambiase, Suefy Aparecida P. Palomino e Antônio Vicente Guedes, pela estimável disponibilidade na padronização de algumas reações.

Ao aluno de pós-graduação Julio Croda, pelo esclarecimento de dúvidas sobre estatística.

Ao aluno de pós-graduação Felipe Tuon, pela ajuda nas discussões.

Ao aluno de iniciação científica Eduardo, pelo auxílio na documentação fotográfica.

Ao Prof. Dr. Jorge do Rosário Casseb, por sua gentileza e valiosas sugestões.

A Liduvina Barros, secretária da pós-graduação do Departamento de Patologia, por ter me auxiliado na burocracia dessa tese.

Aos meus amados pais, Joviano e Maria das Graças, pelo apoio em todas as minhas decisões permitindo a realização de mais um sonho. Tenho por vocês imensa gratidão por tudo que ainda me proporcionam com muito amor e fé.

À minha querida irmã Daniela, que é um exemplo de profissional apaixonada pelo que faz obrigada pelo apoio constante na tarefa científica.

Ao meu sobrinho Nicolas, por tornar a minha vida mais feliz. Amo você!

À querida amiga Elaine Raniero Fernandes, agradeço pela oportunidade da amizade sincera, exemplo de profissional e ser humano verdadeiro. Tenho orgulho de ser sua amiga!

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da FMUSP que conquistei e pelos quais tenho enorme carinho: Wellington Dantas Lourenço, Tálib Moíses Moussallem, Naiura Vieira Pereira, Luciane Kanashiro, Cleusa Fumica Takakura, Monica Rebecca Kauffman, Carla Pagliari, Rosana Conceição Cardoso, Amaro

---

Duarte e Irineu Francisco Massaia, vocês sempre estarão em minhas lembranças.

Ao Fernando Luis Annes da Silva, pelo carinho e apoio durante esses quatro anos de dedicação ao estudo. Desde que te conheci sou mais feliz!

Às minhas eternas amigas, Maylee Lendini, Monalisa dos Santos, Erika Ono e Cíntia Milani, pela amizade sincera e torcida de sempre. Adoro vocês!

À Vanessa Monteiro da Silva e à “tia” Mary, pessoas especiais que fizeram parte do início dessa tarefa. Sou eternamente grata a vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter financiado a minha Bolsa de Doutorado.

A todos que, embora não citados nominalmente, colaboraram para a realização desse trabalho.

*“Vivendo, se aprende; mas o que aprende, mais, é só a fazer
outras maiores perguntas”.*

João Guimarães Rosa

Grande sertão: veredas

9ª Ed. José Olympio, Rio de Janeiro, 1974, p.312

Normalização adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.1.1. Objetivos específicos.....	8
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1. Caracterização e formas clínico-epidemiológicas do sarcoma de Kaposi.....	11
3.2. Apresentação clínica do sarcoma de Kaposi.....	12
3.3. Características histológicas do sarcoma de Kaposi.....	13
3.4. Herpesvírus 8 Humano e sua descoberta.....	14
3.4.1. Estrutura do Herpesvírus 8 Humano.....	15
3.4.2. Biologia do Herpesvírus 8 Humano.....	16
3.5. Imunopatogênese do sarcoma de Kaposi.....	19
3.6. Interação HIV e HHV-8.....	22
3.7. Sarcoma de Kaposi: inflamação e/ou tumor?.....	23
3.8. A pele como órgão imune.....	25
3.9. HAART e o sarcoma de Kaposi.....	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
4.1. Casuística.....	34
4.1.1. Critérios de inclusão.....	35
4.1.2. Critérios de exclusão.....	35

4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Avaliação histopatológica das lesões.....	38
4.2.2. Processamento do material para estudo Imuno-histoquímico.....	39
4.2.3. Demonstração imuno-histoquímica de Linfócitos T CD4+, T CD8+, Células de Langerhans CD1a+, Dendrócitos dérmicos FXIIIa+, Macrófagos CD68+ e Células S100+.....	39
4.2.4. Demonstração imuno-histoquímica de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e do HHV-8 através do <i>Antígeno Nuclear associado à Latência-LANA</i>	42
4.2.5. Reação imuno-histoquímica de dupla-marcação para estudo da interação do HHV-8 com os dendrócitos dérmicos FXIIIa+.....	44
4.2.6. Reação imuno-histoquímica de dupla-marcação para estudo de linfócitos T CD4+ e T CD8+ expressando IFN- γ	45
4.2.7. Análise morfométrica.....	47
4.2.8. Aprovação da Comissão de Ética.....	48
4.2.9. Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Dados demográficos dos pacientes.....	51
5.2. Avaliação histopatológica das lesões.....	52
5.3. Caracterização imuno-histoquímica de células inflamatórias...	58
5.3.1. Análise morfológica de linfócitos T CD4+.....	58
5.3.2. Análise morfológica de linfócitos T CD8+.....	59
5.3.3. Análise morfológica de macrófagos CD68+.....	61
5.3.4. Análise morfológica de Células de Langerhans CD1a...	63
5.3.5. Análise morfológica de Células dérmicas S100+.....	67
5.3.6. Células dérmicas S100+ CD1a-.....	69
5.3.7. Análise morfológica de Dendrócitos dérmicos FXIIIa+...	70
5.4. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de citocinas.....	73
5.4.1. Análise morfológica de células com expressão de IFN- γ	73

5.4.2. Análise morfológica de células com expressão de TNF- α	76
5.4.3. Análise morfológica de células com expressão de IL-1 β	78
5.4.4. Análise morfológica de células com expressão de IL-4.....	80
5.4.5. Análise morfológica de células com expressão de IL-6.....	82
5.5. Análise morfológica de células com expressão de HHV-8/LANA.....	84
5.6. Dupla-marcação dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ com o HHV-8/LANA.....	87
6. DISCUSSÃO.....	88
7. CONCLUSÕES.....	111
8. ANEXOS.....	116
Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética.....	117
Anexo B - Análise quantitativa de células inflamatórias.....	118
Anexo C - Análise quantitativa de células com expressão de citocinas e do HHV-8.....	120
Anexo D - Dados estatísticos de células inflamatórias e de células com expressão do HHV-8.....	122
Anexo E - Dados estatísticos de células com expressão de citocinas.....	127
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

RESUMO

LUIZ FG. *Avaliação da resposta tecidual “in situ” do fenótipo, da expressão de HHV-8/LANA e de citocinas em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma associado à AIDS na era pré e pós-terapia anti-retroviral combinada* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 159p.

Sarcoma de Kaposi (SK) é um tumor de origem vascular associado ao herpesvírus 8 humano (HHV-8). A incidência do SK-AIDS tem diminuído após o advento da terapia anti-retroviral combinada (HAART), sem estudos relacionando a resposta inflamatória cutânea e a expressão de HHV-8 na era pré e pós HAART. Utilizamos a imuno-histoquímica para caracterizar e quantificar “in situ” as células inflamatórias, o padrão de citocinas e a expressão de HHV-8 em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico (SKC), sarcoma de Kaposi associado à AIDS (com ou sem HAART). O número diminuído de linfócitos TCD4⁺ em lesões de SK-AIDS quando comparado com SKC, reflete a imunodeficiência severa causada pelo HIV. O número de linfócitos TCD8⁺ foi similar nos três grupos de SK, o qual parece não se correlacionar com a forma clínico-epidemiológica do SK. As células S100⁺ e DD FXIIIa⁺ estiveram aumentadas em todas as lesões de SK comparadas com a pele normal. Nós também encontramos uma população celular dérmica S100⁺CD1a⁻ peculiar nas lesões de SK. Os macrófagos CD68⁺ estiveram aumentados nas lesões de SKC quando comparados com as lesões de SK-AIDS, mas similares com aqueles encontrados em lesões de SK-AIDS/HAART. Dados semelhantes foram encontrados nas células de Langerhans epidérmicas nesses grupos, sugerindo uma recuperação immune parcial através da HAART. O número aumentado de células expressando IFN- γ em lesões de SKC e SK-AIDS/HAART quando comparado com SK-AIDS sugere essa citocina como um indicador de resposta immune mais eficaz. A expressão aumentada de IL-1 β nas lesões de SKC e SK-AIDS/HAART poderia estar relacionada ao seu efeito anti-tumoral. A expressão de TNF- α , IL-4 e IL-6 foram similares entre as lesões de SK avaliadas. Através de dupla marcação, a identificação nuclear de HHV-8 em DD FXIIIa⁺ sugere esse tipo celular como alvo para infecção por HHV-8. As lesões de SKC apresentaram número aumentado de células com expressão de HHV-8 quando comparado com os grupos de SK-AIDS, independente da HAART. Nosso estudo mostra que existiu uma recuperação da resposta immune local nas lesões de SK-AIDS/HAART e que a severidade clínica do SK não pode estar diretamente associada com a densidade aumentada de células infectadas pelo HHV-8 no tecido.

Descritores: Sarcoma de Kaposi, Herpesvirus humano 8, Síndrome de imunodeficiência adquirida, Pele, Terapia anti-retroviral de alta atividade, Imunohistoquímica, Células dendríticas, Citocinas

---

SUMMARY

Luiz FG. *Evaluation of tissue response "in situ" of the phenotype, expression of HHV-8/LANA and cytokines in cutaneous lesions of classic Kaposi sarcoma and AIDS associated Kaposi sarcoma in the pre-and post- highly active antiretroviral therapy era* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2008. 159p.

Kaposi's sarcoma (KS) is a vascular-originated tumor associated to human herpesvirus 8 (HHV-8). The incidence of AIDS-KS has decreased after the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART), without studies regarding cutaneous inflammatory response and HHV-8 expression in pre- and post-HAART era. We used immunohistochemistry to characterize and to quantify "in situ" inflammatory cells, its cytokines pattern and the expression of HHV-8 in cutaneous lesions of classic Kaposi's sarcoma (CKS), AIDS associated Kaposi's sarcoma (with or without HAART). The decreased number of T CD4⁺ lymphocytes in lesions of AIDS-KS as compared with CKS, reflect the severe immunodeficiency caused by HIV. T CD8⁺ lymphocytes numbers were similar in three KS groups, which appeared unrelated to the clinical or epidemiological type of KS. S100⁺ cells and FXIIIa⁺ DD were increased in all KS lesions as compared with normal skin. We also found a peculiar dermal cellular population in KS lesions. CD68⁺ macrophages were higher in CKS lesions as compared with AIDS-KS lesions, but similar to those found in lesions of HAART/AIDS-KS. Similar data were found in epidermal Langerhans cells in these groups, suggesting a partial immune recovery by HAART. The high number of cells expressing IFN- γ in CKS lesions and HAART/AIDS-KS as compared with AIDS-KS suggests that this cytokine may be a marker of effective immune response. The increased expression of IL-1 β in CKS lesions and HAART/AIDS-KS could be related with its anti-tumor effect. Expression of TNF- α , IL-4 e IL-6 were similar between KS lesions. Demonstrated by double-immunostaining, nuclear identification of HHV-8 in FXIIIa⁺ DD suggests this cell type as target for HHV-8 infection. CKS lesions showed increased number of cells with HHV-8 expression as compared with another groups of AIDS-KS, independent of HAART. Our data shown that there was a partial recovery of local immune response in HAART/AIDS-KS lesions and that the KS clinical severity cannot be directly associated with the increased density of HHV-8 infected cells in tissue.

Descriptors: Kaposi sarcoma, Herpesvirus 8 human, Acquired immunodeficiency syndrome, Skin, Antiretroviral therapy highly active, Immunohistochemistry, Dendritic cells, Cytokines

Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

O sarcoma de Kaposi (SK) é o tumor mais freqüente em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Leão *et al.*, 2002; Torre *et al.*, 2005). É definido como uma neoplasia vascular, caracterizado por neoangiogênese, proliferação de células fusiformes “spindle-shaped”, presença de infiltrado inflamatório linfomononuclear e edema (Ensoli *et al.*, 2001).

Baseado nas características clínicas e epidemiológicas, quatro formas da doença são descritas: SK clássico (SKC), SK endêmico (SKE), SK iatrogênico (SKI) e SK associado à AIDS (SK-AIDS) (Antman e Chang, 2000; Ensoli *et al.*, 2001). Do ponto de vista histológico, as lesões são indistinguíveis entre as diferentes formas da doença e os estágios histológicos são diferenciados em mácula, pápula e nódulo (Chor e Santa Cruz, 1992; Babal e Péc, 2003). Em geral, as lesões de SK acometem a pele, no entanto, podem disseminar para mucosas e órgãos viscerais principalmente o trato gastrointestinal, pulmões e linfonodos (Hengge *et al.*, 2002a; Von Roenn, 2003).

A pele é considerada um órgão com função imunológica peculiar, desempenhada por um sistema integrado de vigilância imune, constituído pelas células apresentadoras de antígenos como as células de Langerhans (CLs), células dendríticas dérmicas, uma população distinta de linfócitos T

---

com tropismo preferencial para ela, queratinócitos, vasos sangüíneos dérmicos e linfonodos periféricos que drenam a mesma (Streilein, 1978; Streilein, 1983; Bos e Kapsenberg, 1986; Bos *et al.*, 1987).

Nas lesões cutâneas de SK-AIDS, as CLs estão diminuídas em número (Valcuende-Cavero *et al.*, 1994) provavelmente pela ação do HIV, uma vez que esta população celular é alvo da infecção pelo retrovírus (Tschachler *et al.*, 1987; Braathen *et al.*, 1991; Loré e Larsson, 2003).

Um outro grupo de células dendríticas da pele são os dendrócitos dérmicos (DD) Fator XIIIa+ (DD FXIIIa+), que possuem funções de fagocitose e apresentação de antígenos (Cerio *et al.*, 1989; Pagliari e Sotto, 2002; Sotto *et al.*, 2004). A presença desses DD FXIIIa+ tem sido relatada nas lesões de SK associado ou não à infecção pelo HIV (Nickoloff e Griffiths, 1989a; Kanitakis e Roca-Miralles, 1992). Além disso, estas células não foram observadas em lesões de SK extracutâneo, sugerindo assim que os DD FXIIIa+ participem da resposta tecidual própria da pele ao tumor (Kumar *et al.*, 1992).

Em 1994, Chang *et al.* identificaram duas seqüências de DNA homólogas e distintas dos genes dos gamaherpesvírus presentes em biópsias de SK-AIDS. Estas seqüências pertenciam a um novo herpesvírus denominado herpesvírus 8 humano (HHV-8). Este agente viral está relacionado à patogênese de todas as formas de SK, além de outras duas desordens linfoproliferativas, como o linfoma efusional primário e a doença de Castleman's multicêntrica (Boshoff e Weiss, 2002; Cesarman, 2003; Schulz, 2006).

Como todos os herpesvírus, o HHV-8 possui um ciclo de vida latente e outro lítico, este último caracterizado pela replicação viral. As células infectadas com o HHV-8 em sua fase latente abrigam inúmeras cópias desse agente viral com o genoma em forma circular. O *Latency Associated Nuclear Antigen* – LANA é uma proteína codificada pelo HHV-8 que exerce papel fundamental na manutenção da forma epissomal do herpesvírus, propiciando o estado de latência e a imortalização das células infectadas (Ballestas *et al.*, 1999). Enquanto genes latentes do HHV-8 são expressos em praticamente todas as células fusiformes do SK, somente uma pequena fração delas expressa marcadores da replicação viral. Por isso, o SK é considerado uma doença de fase latente do HHV8 (Katano *et al.*, 2000; Parravicini *et al.*, 2000; Hengge *et al.*, 2002b; Asahi-Ozaki *et al.*, 2006).

Nas lesões de SK o HHV-8 tem sido demonstrado nas células fusiformes, células endoteliais e células mononucleares (Katano *et al.*, 2000; Pyakurel *et al.*, 2004; Pak *et al.*, 2007; Ramos da Silva *et al.*, 2007).

A patogênese do SK é complexa e envolve a interação entre o HHV-8, as citocinas pró-inflamatórias e inflamatórias locais e os fatores angiogênicos que culminam com o desenvolvimento e progressão do tumor (Ensoli *et al.*, 2001; Hengge *et al.*, 2002b; Douglas *et al.*, 2007; Feller e Lemmer, 2008).

Uma diversidade de esquemas terapêuticos está disponível para o controle do SK sem que se tenha conseguido sua cura definitiva. Em geral, a escolha de tratamento mais apropriado deve ser individualizada, considerando a extensão da doença e o estado clínico do paciente. As

---

principais terapias utilizadas incluem quimioterapia, radioterapia e crioterapia (Vanni *et al.*, 2006).

A infecção pelo HIV influencia no desencadeamento e manutenção do SK através da promoção da imunossupressão e imunodesregulação, caracterizadas pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Hengge *et al.*, 2002a; Krown, 2004; Appay e Sauce, 2008). Outrossim, a proteína de trans-ativação do HIV (Tat), em sua forma extracelular age na proliferação, migração, invasão e adesão das células fusiformes, endoteliais e monócitos (Barillari e Ensoli, 2002; Pyakurel *et al.*, 2007) e promove a replicação do HHV-8 (Huang *et al.*, 2001).

Embora a terapia anti-retroviral combinada (HAART, “highly active antiretroviral therapy”) não interfira diretamente na replicação do HHV-8, os casos de regressão da lesão de SK-AIDS têm coincidido com o início do uso dessa terapêutica (Monini *et al.*, 2004; Feller e Lemmer, 2008). O mecanismo pelo qual a HAART determina regressão e melhora das manifestações clínicas do SK ainda é controverso. Sabe-se que o uso dessa terapia leva à reconstituição imunológica e melhora geral da função imune, tendo também efeitos anti-angiogênicos diretos (através dos inibidores de protease) e diminui a concentração da proteína Tat do HIV (Sgadari *et al.*, 2003; Stebbing *et al.*, 2003; Monini *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Stebbing *et al.* 2006; Bihl *et al.*, 2007). É relatado que indivíduos que fazem uso de HAART antes de apresentarem SK-AIDS, mostram um comportamento menos agressivo do mesmo quando comparado àqueles indivíduos isentos de tratamento (Nasti *et al.*, 2003; Gallafent *et al.*, 2005).

Apesar de haver um número considerável de trabalhos sobre a regressão da lesão do SK e os benefícios que a HAART proporciona, desconhecemos estudos sobre a caracterização da resposta imune no microambiente da lesão na era pré e pós o uso de HAART.

Paralelo a esse estudo é do nosso interesse caracterizar a resposta imune “in situ” nas lesões do SK clássico e verificar se existem diferenças da resposta tecidual entre as duas entidades SKC e SK-AIDS, considerando-se que as mesmas estão relacionadas às situações etiológicas e imunológicas diversas.

Recentemente, tem sido enfatizado que a resposta imune é compartimentalizada, órgão específica e crucial para manutenção da fisiologia de órgãos e sistemas, sendo de grande relevância nos processos infecciosos (Engwerda e Kaye, 2000; Raz, 2007). Considerando esses pressupostos, acreditamos que o estudo das lesões do SKC e SK-AIDS no “compartimento cutâneo”, nos permitirá caracterizar e compreender melhor a resposta imune local relacionada ao SK e sua possível interação com o HHV-8.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar estudo da resposta tecidual “in situ” e da expressão do HHV-8 nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de Kaposi associado à AIDS.

2.1.1. Objetivos específicos a serem atingidos

Nas lesões cutâneas de pacientes com sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de Kaposi associado à AIDS (tratados e não tratados com HAART) pretendemos, através de avaliação com metodologia imuno-histoquímica:

- Caracterizar e quantificar as subpopulações de linfócitos T, macrófagos, células dendríticas epidérmicas e dérmicas.
- Caracterizar e quantificar as células expressando citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-6.

- Detectar e quantificar as células com expressão do antígeno nuclear associado à latência do herpesvírus 8 humano.
- Verificar possíveis diferenças no comportamento das células inflamatórias, na expressão de citocinas e expressão do antígeno associado à latência do herpesvírus 8 humano.
- Demonstrar a provável interação dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ com o herpesvírus 8 humano nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi.

Revisão da Literatura

---

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Caracterização e formas clínico-epidemiológicas do sarcoma de Kaposi

O sarcoma de Kaposi foi descrito inicialmente por Moritz Kaposi em 1872 (Sternbach e Varon, 1995) como “sarcoma pigmentado idiopático da pele”. É definido como um tumor caracterizado por proliferação vascular, proliferação de células fusiformes as “spindle-shaped”, presença de infiltrado inflamatório linfomononuclear e edema (Ensoli *et al.*, 2001).

A descrição feita por Moritz Kaposi refere-se à forma clássica do SK, uma forma rara, mais freqüente em homens idosos descendentes de judeus do Leste Europeu e povos da região do mar Mediterrâneo. As lesões cutâneas predominam nos membros inferiores e são na maioria das vezes localizadas (Friedman-Birnbaum *et al.*, 1990; Antman e Chang, 2000).

Posteriormente, foram descritas mais três formas. A forma endêmica ou Africana do SK, encontrada no continente africano, que pode estar ou não associada HIV, constituindo forma mais agressiva em adultos jovens e crianças (Taylor *et al.*, 1971). Em algumas regiões da África o SK em crianças representa 50% de todos os casos de câncer diagnosticados (Sarmati, 2004).

Em meados da década de 70, com o advento dos transplantes de órgãos, o uso de drogas imunossupressoras e o tratamento quimioterápico de neoplasias, foi constatado aumento dos casos de SK associado imunodeficiência grave. Esta ocorrência foi denominada de forma iatrogênica do SK com lesões envolvendo principalmente a pele (Qunibi *et al.*, 1988).

Na década de 80, foi documentada uma forma mais agressiva, em geral, mais freqüente entre adultos jovens, do sexo masculino, homossexuais ou bissexuais, associada ao HIV, sendo denominada forma epidêmica do SK (Friedman-Kien, 1981; Beral *et al.*, 1990). Essa forma progride rapidamente, com múltiplas lesões disseminadas acometendo principalmente a pele, linfonodos e trato gastrointestinal (Hengge *et al.*, 2002a).

O SK foi a primeira doença oportunista reconhecida em associação com a infecção pelo HIV, e ainda é a neoplasia mais freqüente relacionada à AIDS (Beral *et al.*, 1990; Feller e Lemmer, 2008).

3.2. Apresentação clínica do sarcoma de Kaposi

Nas quatro variantes clínico-epidemiológicas do SK, o acometimento cutâneo predomina (Hengge *et al.*, 2002a). As lesões cutâneas são rosadas, vermelhas, púrpuras ou castanhas. As manifestações cutâneas são observadas como máculas e pápulas (lesões iniciais) e lesões nodulares (tardias) (Gessain e Duprez, 2005, Hengge *et al.*, 2002a). Excetuando-se o

SKC, em geral, as lesões localizam-se nas extremidades do corpo, em membros superiores e inferiores, podendo surgir no tronco, pescoço, face etc... (Beral *et al.*, 1990; Hengge *et al.*, 2002a). Podem variar em número, observando-se desde lesões isoladas até muitas lesões disseminadas por todo o corpo, caracterizando o estágio mais grave da doença (Antman e Chang, 2000; Hengge *et al.*, 2002a).

3.3. Características histológicas do sarcoma de Kaposi

As máculas são caracterizadas por vasos dilatados e aumentados em número, que alteram a estrutura habitual da derme papilar e superficial, cujas células endoteliais são hipertróficas podendo fazer protusão no lúmen vascular e formar novos vasos sangüíneos próximos à superfície e ao redor dos anexos da derme (Ackerman, 1979). Nessa fase a proliferação vascular é discreta, pode limitar-se à derme papilar e é acompanhada por leve infiltrado inflamatório perivascular e/ou difuso, composto de linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Blumenfeld *et al.*, 1985).

Na fase de pápula, os vasos sangüíneos neoformados são mais evidentes, alguns representados por fendas, com quadro de proliferação de células fusiformes dispersas também na derme reticular, podendo haver extravasamento de eritrócitos e depósito de hemossiderina (Ackerman, 1979).

A lesão progride com o aumento de células fusiformes dispostas em feixes que passam a permear os vasos e assumir caráter infiltrativo (Chor e

---

Santa Cruz, 1992), constituindo as lesões nodulares. Nesta fase, o estroma exibe vasos irregulares, angulados, em forma de fenda, congestos e revestidos ou não por endotélio reconhecível, que se interligam com canais vasculares normais (Babal e Péc, 2003).

A apresentação histológica das várias formas epidemiológicas do SK não mostra diferenças significativas entre as mesmas (Chor e Santa Cruz, 1992).

3.4. Herpesvírus 8 Humano e sua descoberta

Após mais de cem anos da descrição do SK, Chang *et al.* (1994), identificaram uma seqüência viral em amostras de DNA extraído de biópsia cutânea de pacientes com SK-AIDS, através da metodologia de RDA (*Representational Difference Analysis*). Foi inicialmente denominado *Kaposi Sarcoma Herpesvirus*, atualmente conhecido como Herpesvírus 8 Humano, porque foi detectado em outras doenças não relacionadas à AIDS, como o linfoma efusional primário e a doença de Castleman's multicêntrica (Cesarman *et al.*, 1995; Dupin *et al.*, 2000; Cathomas, 2003). Mais recentemente, alguns estudiosos sugeriram a participação desse herpesvírus na patogênese do mieloma múltiplo, da parapsoríase e da hipertensão pulmonar, porém, são estudos ainda não conclusivos (Trento *et al.*, 2005). A associação do HHV-8 com outros linfomas não Hodgkin apresentam controvérsias, havendo a necessidade de mais estudos (Schulz, 1999; Carbone *et al.*, 2008).

3.4.1. Estrutura do Herpesvírus 8 Humano

O vírus pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*, sendo o único do gênero a infectar o homem. Possui ultra-estrutura comum aos herpesvírus, apresentando regiões do DNA similares a dois *Gamaherpesvírus*: Epstein-Barr e o Herpesvírus saimiri, ambos com potencial oncogênico (Jenner e Boshoff, 2002).

O genoma do HHV-8 tem aproximadamente 170 kb com pelo menos 85 seqüências abertas de leitura (ORFs, “open reading frames”) identificadas. As ORFs homólogas ao Herpesvírus saimiri foram numeradas de 1 a 75, e algumas delas são homólogas aos genes celulares humanos (Jenner e Boshoff; 2002; Moore e Chang, 2001). Outras ORFs identificadas no genoma do HHV-8 são únicas desse herpesvírus e foram designadas com o prefixo K (K1 a K15) (Russo *et al.*, 1996) (Figura 1).

Figura 1 - Representação gráfica do genoma do HHV-8 na forma linear.

3.4.2. Biologia do Herpesvírus 8 Humano

Atualmente cinco subtipos desse herpesvírus têm sido descritos: A, B, C, D e E e N (Dukers, Rezza, 2003). No Brasil foram relatados os subtipos A, B e C no estado de São Paulo (Biggar *et al.*, 2000; Caterino-de-Araujo *et al.*, 2003) e o subtipo E em índios da região Amazônica (Nascimento *et al.*, 2005; Ishak *et al.*, 2007).

O HHV-8 tem tropismo para linfócitos, células endoteliais, macrófagos, queratinócitos e possivelmente células estromais da medula óssea (Hengge *et al.*, 2002b). A partir de estudos “in vitro” foi demonstrado que o HHV-8 é capaz de infectar os macrófagos e as células dendríticas através do ligante de ICAM-3 a lectina tipo II C não-integrina (DC-SIGN) (Rappocciolo *et al.*, 2006). No sangue periférico o vírus tem sido detectado em linfócitos T,

---

linfócitos B, monócitos e células CD34+ (Ambroziak *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2006).

Durante a fase lítica de infecção pelo HHV-8 ocorre a expressão de genes virais das fases imediata, intermediária e tardia. Experiências “in vitro” demonstram a participação de três principais ORFs envolvidas no processo de indução do SK: ORF-K1, ORF-K9 e ORF-74 (Jenner e Boshoff, 2002).

Durante a fase de latência do HHV-8 em células das lesões de SK infectadas ocorre a expressão de quatro transcritos: *Latency Associated Nuclear Antigen* – LANA (ORF-73), Kaposina (ORF K-12), v-ciclina (ORF-72) e v-FLIP (ORF K13) (Jenner, Boshoff, 2002). A proteína LANA exerce papel fundamental na manutenção da forma episomal do HHV-8, mantendo o estado de latência viral e a imortalização das células infectadas (Ballestas *et al.*, 1999). Essa proteína é considerada um marcador universal de infecção pelo HHV-8 (Katano *et al.*, 2000; Parravicini *et al.*, 2000; Robin *et al.*, 2004).

Todos os herpesvírus induzem infecção latente em seus hospedeiros naturais por toda a vida, no entanto, o mecanismo de latência do HHV-8 ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que os genes dos herpesvírus continuam ativos e atuam como reguladores, mantendo o vírus pronto para recorrência (Ackermann, 2006).

Enquanto genes latentes do HHV-8 são expressos em praticamente todas as células fusiformes, somente uma pequena fração delas expressa marcadores da replicação lítica viral, por isso o SK é considerado uma doença de fase latente (Hengge *et al.*, 2002b). Mesmo que os genes líticos sejam expressos na minoria das células do SK, desempenham papel

---

importante na indução da angiogênese, proliferação das células fusiformes e na disseminação do HHV-8 para os tecidos (Bubman e Cesarman, 2003). Em relação à disseminação do HHV-8 estudos têm demonstrado que a carga viral do HHV-8 é mais alta em pacientes que desenvolvem SK do que naqueles infectados por esse herpesvírus, mas sem lesão de SK (Decker *et al.*, 1996; Sturzl *et al.*, 1997; Engels *et al.*, 2003). Entretanto, Guihot *et al.* (2006) analisando a carga viral do HHV-8 em indivíduos com SK clássico, SK-AIDS e indivíduos apenas infectados pelo HHV-8 e assintomáticos não evidenciaram diferenças de carga viral nesses três grupos.

Não se sabe ainda, se existe alguma correlação entre o subtipo do HHV-8 e a agressividade do SK. Boralevi *et al.* (1998) encontraram que o subtipo A estava associado a um maior grau de patogenicidade e agressividade do SK, ocorrendo com maior frequência em associação com lesões mucosas e viscerais.

Apesar do grande número de trabalhos abordando o HHV-8, ainda estão sendo conduzidos estudos no intuito de compreender melhor os mecanismos da patogênese viral. Estes mecanismos incluem aqueles envolvidos no estabelecimento da infecção, na disseminação no hospedeiro, em novas estratégias de evasão imune, na avaliação da contribuição do microambiente para o desenvolvimento da lesão e na ativação de latência do HHV-8.

3.5. Imunopatogênese do sarcoma de Kaposi

A lesão de SK inicia-se em um contexto de desequilíbrio imune caracterizado por ativação de linfócitos T CD8+, linfócitos T CD4+, macrófagos, aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias e de tipo Th1 (IL-1 β , IL-6 TNF- α , IL-2, IFN- γ) (Fiorelli *et al.*, 1998; Ensoli *et al.*, 2001). Estas citocinas induzem o recrutamento de células circulantes para os tecidos, através de moléculas quimiotáticas e de adesão, tais como: molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1), molécula de adesão de leucócito endotelial - 1 (ELAM-1) e molécula de adesão celular vascular - 1 (VCAM-1). Essa situação leva à produção de fatores angiogênicos incluindo fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF A e B), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de permeabilidade vascular (VPF) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Tais fatores mediam a angiogênese, o edema e induzem as células endoteliais a adquirirem o fenótipo de células fusiformes (Figura 2) (Ensoli *et al.*, 2001; Sgadari *et al.*, 2003).

A participação das citocinas na reativação do HHV-8 e o papel desempenhado por esse herpesvírus no desenvolvimento do SK ainda é algo não totalmente esclarecido. Enquanto alguns trabalhos demonstram a ação das citocinas na reativação do HHV-8, em particular a ação do IFN- γ (Mercader *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000), outros sugerem a ação das

---

mesmas como resposta imune contra o herpesvírus (Pugliese *et al.*, 2001; Pozharskaya *et al.*, 2004).

Dessa forma, pode-se resumir que o desenvolvimento do SK associado ao HHV-8, aliada à proliferação das células endoteliais e fusiformes induzidas por citocinas, atuando em conjunto com algum estado de comprometimento imune, representam condições multifatoriais efetivas e importantes para a oncogênese dessa neoplasia (Hengge *et al.*, 2002a; Hengge *et al.*, 2002b; Sgadari *et al.*, 2003). No entanto, não está esclarecido como ocorre a precisa interação desses fatores com o HHV-8 e/ou HIV para a promoção do SK.

É inquestionável que o HHV-8 é necessário para o desenvolvimento do SK, mas por si só, não é suficiente para o desencadeamento do processo. Apesar do HHV-8 ter sido demonstrado em todos os tipos de SK, por outro lado, deve-se ressaltar que a infecção por esse herpesvírus é mais freqüente em alguns países do Mediterrâneo e em algumas regiões da África do que a ocorrência de SK (Sgadari *et al.*, 2003).

Figura 2 - Modelo da imunopatogênese do sarcoma de Kaposi.

3.6. Interação HIV e HHV-8

O HIV é um importante co-fator na reativação do HHV-8. É responsável por codificar três proteínas estruturais (matriz, capsídeo e nucleocapsídeo), duas proteínas do envelope (gp41 e gp120), três enzimas (protease, transcriptase reversa e integrase), duas proteínas regulatórias (Tat e Rev) e quatro proteínas acessórias (Nef, Vpr, Vpu e Vif) (Frankel e Young, 1998).

A interação entre os vírus HIV e HHV-8 foi demonstrado por Huang *et al.* (2001) em nível molecular. Um produto do gene do HHV-8 (K1E2) interage de maneira sinérgica com a proteína de trans-ativação do HIV (Tat) ativando a expressão do genoma do HIV. Em contrapartida, as proteínas Tat e Vpr do HIV aumentam a expressão intracelular do HHV-8.

O comportamento mais agressivo do SK é observado em indivíduos com AIDS quando comparado com outros estados de imunodeficiência, como por exemplo, indivíduos transplantados. Dessa forma, outros fatores relacionados particularmente ao HIV poderiam ser responsabilizados pelo pior quadro clínico apresentado pelos pacientes com AIDS (Aoki e Tosato, 2004).

Após anos de intensa investigação na tentativa de compreender melhor os mecanismos moleculares sobre as várias atividades das proteínas derivadas do HIV, é relatado que a proteína Tat induz aumento da expressão do bFGF promovendo assim a angiogênese e a proliferação das células fusiformes (Barillari *et al.*, 1993; Ensoli *et al.*, 1993). Os mesmos autores demonstraram que camundongos que foram injetados com essa proteína

desenvolveram lesões “SK-like” (Barillari *et al.*, 1993). Dentro desse contexto, o bFGF em conjunto com citocinas induziriam as células endoteliais a expressarem receptores para a Tat, como integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ (Barillari *et al.*, 1999; Fiorelli *et al.*, 1999).

Zeng *et al.*, (2007) evidenciaram a partir de estudo experimental que a Tat intracelular é capaz de ativar o ciclo lítico do HHV-8. Essa proteína tem a habilidade de atuar de forma direta na angiogênese por interagir com muitos receptores além de contribuir para a infectividade do HHV-8 (Aoki e Tosato, 2004). A ação da Tat também está associada à sua capacidade de aumentar a expressão do receptor de quimiocina CXCR-4 (Gibellini *et al.*, 2003). A ligação desse receptor de quimiocina com o fator 1 derivado do estroma (SDF-1) que é expresso de modo constitutivo nos capilares endoteliais cutâneos, permitiria a adesão de células circulantes infectadas pelo HHV-8 favorecendo a sua localização na pele (Yao *et al.*, 2003). Dessa forma, considera-se que o SDF-1 contribua para o surgimento das lesões cutâneas de SK.

3.7. Sarcoma de Kaposi: inflamação e/ou tumor?

Como descrito anteriormente, a lesão de SK independentemente da forma clínico-epidemiológica está associada à proliferação de células fusiformes, as quais são na maioria infectadas pelo HHV-8 (Pyakurel *et al.*, 2004). Estudos baseados em microscopia eletrônica revelam que as células fusiformes apresentam características semelhantes àsquelas encontradas

---

nas células endoteliais, dessa maneira reforçando a hipótese da origem endotelial das mesmas. De fato, as células fusiformes em todos os estágios do SK expressam marcadores de vasos sanguíneos (CD31, CD34 e FVIII) (Stürzl *et al.*, 1992), assim como, marcadores específicos de vasos linfáticos (VEGFR-3 e D2-40) (Weninger *et al.*, 1999). Tal fato reforça o conceito de que as células fusiformes do SK originam-se de um determinado tipo celular vascular com capacidade de diferenciação anômala. De acordo com Wang *et al.* (2004), cerca de 80% das células fusiformes apresentam semelhança maior com as células endoteliais linfáticas do que com as células endoteliais sanguíneas por expressarem marcadores específicos de células endoteliais linfáticas. Além disso, evidências sugerem que o próprio HHV-8 em sua fase latente, é capaz de levar à “reprogramação endotelial”, ou seja, as células endoteliais sanguíneas se convertem para o fenótipo linfático (Hong *et al.*, 2004; Carrol *et al.*, 2004).

Em consonância aos questionamentos sobre o SK, permanece a ser esclarecido se o mesmo representa um processo clonal, neoplásico, ou uma ativação inflamatória policlonal (Perez *et al.*, 2003; Ganem, 2006). Mais provavelmente, as lesões iniciam-se como lesões inflamatórias policlonais, que, sob certas circunstâncias, originariam uma população celular clonal neoplásica. No entanto, estudos mais recentes têm mostrado uma variabilidade de demonstração de monoclonalidade, oligoclonalidade e policlonalidade nas lesões de SK (Gill *et al.*, 1998; Duprez *et al.*, 2007). Duprez *et al.*, (2007) ao estudar se as lesões de SK multicêntricas corresponderiam às lesões metastáticas ou à expansão de clones

independentes, observaram em 26 biópsias de SK, que a maioria das lesões apresentava um padrão de oligoclonalidade.

Apesar dos repetidos estudos usando metodologias diversas e casuísticas diferenciadas, até o momento não está absolutamente definido se as formas de SK representam um processo reativo, uma proliferação maligna verdadeira de células fusiformes ou mesmo se a neoplasia se desenvolve em etapas que culminam com lesões verdadeiramente monoclonais.

3.8. A pele como órgão imune

A pele foi considerada pela primeira vez como componente do sistema imune por Fichtelius *et al.* (1970). Desde então, trabalhos posteriores surgiram dando evidências de que a pele está organizada para desempenhar função imunológica.

O termo SALT – tecido linfóide associado à pele (do inglês, “skin associated lymphoid tissue”), foi proposto para designar um sistema integrado de vigilância imunológica próprio. De acordo com o autor, esse sistema é constituído de um grupo de células da epiderme, especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos (células de Langerhans), uma população distinta de linfócitos T com tropismo preferencial pela pele, queratinócitos, vasos sanguíneos dérmicos e linfonodos periféricos que drenam a mesma (Streilein, 1978; Streilein, 1983).

O termo SIS – sistema imune da pele (do inglês, “skin immune system”) inclui, além dos elementos do SALT, macrófagos teciduais, células indeterminadas, neutrófilos, mastócitos e células endoteliais (Bos, Kapsenberg, 1986).

As células de Langerhans (CLs) são células dendríticas epidérmicas com localização suprabasal e derivadas da medula óssea (Reid *et al.*, 1990). Estão presentes em pequena quantidade na derme normal e são regularmente encontradas nas mucosas: oral, de tonsilas, do esôfago, do estômago e de cérvix uterina (Silberberg-Sinakin *et al.*, 1980). Exibem atividade de ATPase positiva e expressão de proteína S100 citoplasmática e nuclear, CD1a, CD1c (Romani *et al.*, 1991; McNutt, 1998), e-caderina (Tang *et al.*, 1993), langerina (CD207) (Valladeau *et al.*, 2000). Têm como papel desempenhar função de sentinelas, capturando antígenos e processando-os, sendo desse modo definidas como células apresentadoras de antígeno profissionais (Romani *et al.*, 2003). Além disso, essa população celular possui capacidade migratória, transportam antígenos da epiderme para os linfonodos regionais, de modo que os mesmos, são apresentados aos linfócitos T para desencadeamento da resposta imune específica (Valladeau e Saeland, 2005). As citocinas como o TNF- α e a IL-1 β , os receptores de quimiocinas, as moléculas de adesão e as metaloproteinases da matriz celular parecem estar envolvidos na capacidade migratória das CLs (Koch *et al.*, 2006). Possivelmente, outros componentes responsáveis por desencadear a liberação de TNF- α pelos queratinócitos, parecem também atuar nesse processo de migração (Cumberbatch *et al.*, 1999; 2003). Angel

---

et al. (2007) definiram um marcador específico (CD208) para as CLs em migração da epiderme para derme em direção aos linfonodos e que constituem uma subpopulação distinta daquelas células CD1a+ presentes na derme.

Estudos sobre o comportamento das células de Langerhans no SK são limitados. Valcuende-Cavero *et al.* (1994) ao estudar as CLs pela técnica imuno-histoquímica em biópsias de pacientes com lesão associada ao HIV, verificaram diminuição em seu número, além de alterações funcionais, quando comparado ao grupo controle. Essas observações foram consideradas como sendo o reflexo da imunodeficiência causada pelo HIV. Interessantemente, em lesões cutâneas de indivíduos transplantados renais que fizeram uso de ciclosporina A, Bedani *et al.* (1997) relatam que ao diminuir a dose ou interromper a medicação, ocorreu a re-população das CLs na epiderme.

Um outro grupo de células dendríticas da pele são os dendrócitos dérmicos Fator XIIIa+ (DD FXIIIa+), que também possuem funções de fagocitose e apresentação de antígenos (Cerio *et al.*, 1989; Pagliari e Sotto, 2002; Sotto *et al.*, 2004). Essas também se originam da família de monócitos/macrófagos, derivadas de células precursoras CD34+ da medula óssea. O seu perfil imuno-fenotípico caracteriza-se por expressarem no seu citoplasma, o fator de coagulação XIIIa+ e serem negativos para marcadores de CL, como a proteína S100 e CD1a (Cerio *et al.*, 1989) e CD-207 (Valladeau *et al.*, 2000). A presença dos DD FXIIIa+ tem sido relatada nas lesões de SK associado ou não à infecção pelo HIV (Nickoloff e Griffiths,

1989a,b ; Kanitakis e Roca-Miralles, 1992). Segundo Gray *et al.* (1991), as lesões de SK apresentam maior número dessa população celular quando comparadas à derme normal. Além disso, estas células não foram observadas em lesões de SK extracutâneo, sugerindo assim que os DD FXIIIa+ participem da resposta tecidual própria da pele ao tumor (Kumar *et al.*, 1992).

Dentro do contexto da imunidade cutânea as células dendríticas promovem também a tolerância através da indução de anergia, apoptose de células T “naive” ou por estimulação de células T regulatórias (T_{reg}) (Morelli *et al.*, 2001; Larregina e Falo, 2005).

Assim como as células dendríticas, os linfócitos também apresentam características especiais na pele. No tecido cutâneo normal, os linfócitos B não são encontrados (Streilein, 1983).

As células T intra-epidérmicas constituem menos de 2% do número total de células T aí localizadas. Na derme sua frequência é maior, com as células T distribuindo-se em duas a três filas, em torno das vênulas do plexo vascular superficial, das vênulas pós-capilares e das vênulas dos anexos da pele (Bos *et al.*, 1987).

3.9. HAART e o sarcoma de Kaposi

Desde o advento da terapia antiretroviral combinada (HAART) houve uma diminuição da incidência de SK-AIDS, no entanto, esse tumor ainda é considerado o mais prevalente em indivíduos com AIDS (Leão *et al.*, 2002;

Monini *et al.*, 2004, Torre *et al.*, 2005). Essa terapia compreende a combinação de drogas que incluem os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRNs) com um inibidor da protease (IP), dois ITRNs e um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN) e outras associações (National Institute of Health, 2003).

A HAART tem fundamentalmente um impacto na morbidade e mortalidade de indivíduos com HIV, contribuindo para a menor incidência de infecções oportunistas e doenças malignas associadas à queda da vigilância imune (Sgadari *et al.*, 2003). Essa terapêutica tem como objetivo retardar a progressão da imunodeficiência e/ou restaurar, tanto quanto possível, a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida do paciente. Entretanto, a evolução natural da infecção pelo HIV caracteriza-se por intensa e contínua replicação viral em diversos compartimentos celulares e anatômicos, que resulta principalmente na destruição e/ou disfunção de linfócitos T CD4(+) em conjunto com outras células do sistema imune, levando à imunodeficiência (Sempere *et al.*, 2007). Em sua forma mais grave essa imunodeficiência manifesta-se por meio das infecções oportunistas e neoplasias que caracterizam a AIDS. Portanto, a diminuição da replicação viral é desejável para que seja possível diminuir ou reverter o dano imunológico causado (Brasil - Ministério da Saúde, 2008).

Logo no início da epidemia da AIDS, alguns autores descreveram a regressão do SK durante a monoterapia com o uso da zidovudina, que é um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (Langford *et al.*,

---

1989). Posteriormente, Rarick *et al.* (1990) constataram regressão completa da lesão de SK-AIDS após a associação da zidovudina com a quimioterapia.

Casos de regressão parcial ou completa das lesões de SK-AIDS têm sido freqüentemente observados após o uso da associação de HAART e quimioterapia ou radioterapia, e também somente com o uso de HAART (Cattelan *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2008).

Permanece ainda controverso o mecanismo pelo qual a HAART leva à regressão do SK, mas sabe-se que o uso dessa terapêutica proporciona um quadro de melhora geral da função imune, além de diminuir a concentração da proteína Tat do HIV (Stebbing *et al.*, 2003; Stebbing *et al.*, 2006).

Em decorrência dos inibidores de protease e da transcriptase reversa, foi observado aumento no número de linfócitos T CD4(+) periférico e diminuição plasmática do RNA do HIV e dos anticorpos para a proteína do HHV-8 codificada pela ORF-65, o que reforça a hipótese que a HAART é efetiva para o SK-AIDS (Cattelan *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a regressão da lesão ocorre independentemente do aumento de linfócitos T CD4+ periférico e níveis da carga viral do HIV diminuídos ou indetectáveis (Benfield *et al.*, 1998, De Millo *et al.*, 1999; Nunez *et al.*, 2000; Torre-Cisneros *et al.*, 2000).

No que tange aos efeitos da HAART no controle da replicação do HHV-8, parece estar relacionado à reconstituição imunológica, uma vez que esse herpesvírus não tem atividade de transcriptase reversa e também não se conseguiu demonstrar inibição direta da replicação do HHV-8 com inibidores de protease (Kedes e Ganem, 1997). Leão *et al.* (2000) relatam que o

---

aumento de linfócitos T CD4+ coincide com o clareamento do HHV-8 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com SK-AIDS após o início da HAART. Desse modo, sugerem que a melhora do sistema imune influencie no controle da replicação do HHV-8 e conseqüente regressão do SK.

A diminuição da carga viral do HHV-8 no sangue tem sido demonstrada naqueles pacientes tratados com HAART em conjunto à quimioterapia, entretanto, não foi constatada naqueles pacientes que não usaram a quimioterapia associada (Bihl *et al.*, 2007). O mesmo estudo também demonstrou a reconstituição imune geral e específica para o HHV-8.

Vale ressaltar que as diferentes combinações de HAART têm efeitos semelhantes no impacto da incidência de SK-AIDS, no entanto, a regressão completa da lesão ocorre mais freqüentemente em pacientes tratados com o esquema contendo inibidores de protease do que aqueles tratados com inibidores de transcriptase reversa (Gill *et al.*, 2002). Por outro lado, Martinez *et al.* (2006), relatam que a regressão da lesão de SK-AIDS está associada à diminuição da replicação do HIV, e isso ocorre independentemente de inibidor de protease no esquema HAART. Assim sendo, talvez outras avaliações sejam necessárias para definir de forma precisa os efeitos das diferentes classes de drogas que compõem a HAART sobre o SK.

Outro ponto a ser considerado é o aparecimento de cepas do HIV resistentes às drogas, o que poderia se refletir numa possível reincidência dos casos de SK-AIDS.

A hipótese dos efeitos potentes dos inibidores de protease como agentes anti-angiogênicos e anti-tumorais no SK tem sido considerada (Sgadari *et al.*, 2003; Monini *et al.*, 2004). Nesse contexto, ensaios clínicos estão sendo realizados com a finalidade da aplicação dessas drogas inclusive para o tratamento do SK clássico (Monini *et al.*, 2004).

Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

O material estudado foi composto por 56 biópsias cutâneas de pacientes com diagnóstico de sarcoma de Kaposi. Onze biópsias corresponderam às lesões de sarcoma de Kaposi clássico (SKC), 22 biópsias de sarcoma de Kaposi associado à AIDS (SK-AIDS) e 23 biópsias de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de pacientes em uso de terapia anti-retroviral combinada (SK-AIDS/HAART). As biópsias foram selecionadas dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1997 a 2006. Das 22 biópsias de SK-AIDS e das 11 biópsias de SKC, seis e duas biópsias respectivamente, fizeram parte excedente da casuística utilizada na dissertação de mestrado da Dra. Cristiane Alonso, sendo o material de responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Maria Irma Seixas Duarte.

O termo HAART adotado no presente estudo significa regimes terapêuticos combinados de anti-retrovirais, usualmente usando-se três ou mais drogas, tais como dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRNs) e um inibidor da protease (IP), dois ITRNs e um inibidor

da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN) e outras associações (National Institute of Health, 2003).

Os espécimes estudados corresponderam à primeira biópsia cutânea realizada nos pacientes para confirmação diagnóstica da doença.

Foi utilizado um grupo controle composto por 10 biópsias de pele normal com a finalidade de comparar as populações de células dendríticas. Estas biópsias foram obtidas dos locais de incisão de cirurgia cardíaca e de cirurgia ortopédica de joelho.

4.1.1. Critérios de inclusão

Foram preenchidos os seguintes critérios:

- diagnóstico clínico e histopatológico de sarcoma de Kaposi
- uso de esquema HAART ao menos 15 dias antes da biópsia no grupo SK-AIDS/HAART
- representatividade e adequação da amostra

4.1.2. Critérios de exclusão

- Uso prévio de monoterapia anti-retroviral para tratamento da AIDS
- Uso de tratamento específico para as lesões de sarcoma de Kaposi
- Amostra não representativa para o estudo
- SK de pacientes transplantados

Os dados referentes à forma clínico-epidemiológica, idade, sexo, local da biópsia e esquema de terapia anti-retroviral/tempo utilizado estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sarcoma de Kaposi cutâneo: forma clínico-epidemiológica, idade, sexo, local da biópsia e esquema de terapia anti-retroviral/tempo utilizado.

Casos	Exame	Idade	Sexo	Localização	Terapia anti-retroviral/tempo
1	SKC	70	M	NC	-
2	SKC	72	M	NC	-
3	SKC	71	M	Região palmar	-
4	SKC	67	M	Perna	-
5	SKC	74	M	Maléolo medial E	-
6	SKC	50	M	Perna E	-
7	SKC	86	M	Região plantar	-
8	SKC	81	F	Perna	-
9	SKC	79	M	Perna E	-
10	SKC	83	F	Antebraço	-
11	SKC	85	F	Perna	-
12	SK-AIDS	39	M	NC	-
13	SK-AIDS	30	M	NC	-
14	SK-AIDS	40	M	NC	-
15	SK-AIDS	63	F	NC	-
16	SK-AIDS	32	M	NC	-
17	SK-AIDS	47	M	NC	-
18	SK-AIDS	54	M	Região escapular	-
19	SK-AIDS	23	F	Região lombo-sacra	-
20	SK-AIDS	37	M	Braço D	-
21	SK-AIDS	34	M	Mão	-
22	SK-AIDS	42	M	Região mandibular	-
23	SK-AIDS	40	M	Braço	-
24	SK-AIDS	30	F	Joelho D	-
25	SK-AIDS	34	M	Região deltoídea	-
26	SK-AIDS	38	M	Braço	-
27	SK-AIDS	47	M	Tórax	-
28	SK-AIDS	24	M	Perna	-
29	SK-AIDS	48	M	Braço	-
30	SK-AIDS	30	M	Braço E	-
31	SK-AIDS	36	M	Braço	-
32	SK-AIDS	42	M	Região plantar	-
33	SK-AIDS	35	M	Tronco	-
34	SK-AIDS /HAART	37	M	Pé	AZT + 3TC + IDV / 23 d
35	SK-AIDS /HAART	29	M	Perna E	BIOVIR® + d4T / 68 d
36	SK-AIDS /HAART	28	M	Antebraço E	BIOVIR® + IDV / 305 d
37	SK-AIDS /HAART	34	M	Antebraço D	BIOVIR® + IDV / 163 d
38	SK-AIDS /HAART	44	M	Antebraço E	BIOVIR® + IDV / 41 d
39	SK-AIDS /HAART	43	M	Mão	AZT + 3TC + IDV / 20 d
40	SK-AIDS /HAART	45	M	Pé	d4T + ddl + AZT / 16 d
41	SK-AIDS /HAART	39	M	Coxa	3TC+ d4T + NFV / 195 d
42	SK-AIDS /HAART	27	M	Tornozelo D	AZT+ ddl + NFV / 195 d
43	SK-AIDS /HAART	38	M	Região escapular	d4T + 3TC + NFV / 15 d
44	SK-AIDS /HAART	34	M	Tronco	3TC+ d4T + NFV / 15 d
45	SK-AIDS /HAART	51	M	Pé E	ddl + NVP + NFV / 920 d
46	SK-AIDS /HAART	41	M	Perna E	AZT + ddl + EFZ / 34 d
47	SK-AIDS /HAART	42	M	Abdômen	AZT + ddl + NVP + NFV / 540 d
48	SK-AIDS /HAART	34	M	Braço	AZT + 3TC + NFV / 15 d
49	SK-AIDS /HAART	34	M	Braço E	BIOVIR® + EFZ / 138 d
50	SK-AIDS /HAART	57	M	Pênis	d4T + 3TC + EFZ / 414 d
51	SK-AIDS /HAART	55	M	Pé D	d4T + 3TC + NFV / 894 d
52	SK-AIDS /HAART	35	M	Perna E	BIOVIR® + NFV / 69 d
53	SK-AIDS /HAART	35	M	Perna	BIOVIR® + IDV / 180 d
54	SK-AIDS /HAART	59	M	Perna	ddl + d4T + EFZ / 1400 d
55	SK-AIDS /HAART	30	M	Região plantar E	BIOVIR® + ATV / 17 d
56	SK-AIDS /HAART	24	M	Braço E	BIOVIR® + RTV / 38 d

SKC - sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS - sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART - sarcoma de Kaposi associado à AIDS em uso de HAART

M - masculino; F - feminino; D - direito; E - esquerdo; NC - não consta; d - dias

AZT - Zidovudina; **3TC** - Lamivudina; **IDV** - Indinavir; **d4T** - Estavudina; **ddl** - Didanosina; **NFV** - Nelfinavir; **EFZ** - Efavirenz; **NVP** - Nevirapina; **ATV** - Atazanavir; **RTV** - Ritonavir; **BIOVIR®** - AZT + 3TC

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Avaliação histopatológica das lesões

A partir dos blocos de parafina resultantes das biópsias foram obtidos cortes histológicos através de procedimentos habituais e que foram corados pela Hematoxilina-eosina (HE). Foi efetuada a avaliação histopatológica das lesões e na derme foram analisados de modo semiquantitativo os seguintes eventos:

- Proliferação de células fusiformes
- Infiltrado inflamatório
- Mitose das células fusiformes
- Atipia celular
- Extravasamento de hemácias
- Pigmento de Hemossiderina
- Glóbulos hialinos

A avaliação semiquantitativa dos eventos considerou a seguinte escala:

0= ausente   1= discreto   2= moderado   3= intenso

4.2.2. Processamento do material para estudo imuno-histoquímico

Cortes histológicos de quatro μm 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 Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos, e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, foram hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

4.2.3 Demonstração imuno-histoquímica de Linfócitos T CD4+, T CD8+, Células de Langerhans CD1a+, Dendrócitos dérmicos FXIIIa+, Macrófagos CD68+ e Células S100+

Foi utilizado o método imuno-histoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês *Streptavidin-Biotin Peroxidase*). A tabela 2 mostra os anticorpos primários empregados, códigos, diluições e tratamentos utilizados para exposição antigênica.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com cinco incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada, em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada sendo então submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Para a pesquisa de linfócitos T CD4, T CD8 e células de Langerhans (CD1a+) não foi necessário realizar a exposição antigênica. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2) diluído em solução de albumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, “over-night” a 4°C. A reação foi melhor visualizada através do sistema de amplificação CSA I (*Catalysed Signal Amplification*, , DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K1497). Este sistema consiste da utilização do reagente biotil tiramida após a incubação com o complexo SABC, durante 15 minutos. O reagente tem por finalidade a multiplicação da biotina presente no sistema. A seguir as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada à enzima peroxidase. Os tempos de lavagem com tampão e incubações foram seguidos rigorosamente de acordo com as instruções do fabricante (Bobrow *et al.*, 1989).

Os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação.

Os cortes assim processados foram lavados em água corrente por cinco minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris 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/USA, cód. SP15-100).

Para pesquisa de dendrócitos dérmicos FXIIIa+, fez-se a exposição antigênica com solução contendo tripsina 0,020% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. T7409) em PBS pH 7.4, durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Para pesquisa de macrófagos CD68+, a exposição antigênica foi realizada em panela de pressão com tampão citrato 1mM pH 6.0, por um minuto. Posteriormente, as lâminas foram mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7.4.

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

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em BSA 1%, “over-night” a 4°C (Tabela 2).

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário: anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra (DAKO K492) diluído 1:500 em PBS pH 7.4 durante 30 minutos a 37°C.

As lâminas foram lavadas por duas vezes em PBS pH 7.4 e incubadas com o complexo SABC (DAKO K492) diluído 1:500 em PBS pH 7.4, durante 30 minutos a 37°C.

Após serem lavadas em PBS pH 7.4 as reações foram reveladas como descrito anteriormente.

Para pesquisa de células S100+ não foi necessário fazer a exposição antigênica. Após a incubação com anticorpo primário, seguiu-se conforme o protocolo descrito para dendrócitos dérmicos FXIIIa+ e macrófagos CD68+.

Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos aos antígenos estudados: tonsilas para os linfócitos T, os macrófagos CD68+ e as células S100+, dermatofibroma para os DD FXIIIa+ e pele normal para as células de Langerhans. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

4.2.4 Demonstração imuno-histoquímica de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e do HHV-8 através do *Antígeno Nuclear associado à Latência - LANA*

Após desparafinização, hidratação dos cortes e bloqueio de peroxidase endógena, fez-se a exposição antigênica em banho-maria (calor úmido) com tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9.0 com 0.05% de Tween 20 (Sigma®, Saint Louis, MO, USA), durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C. As lâminas foram então mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7.4.

Após o procedimento de exposição antigênica, fez-se o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite

---

desnatado (Molico®, Nestle®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em BSA 1%, “over-night” a 4°C (Quadro 2).

Após serem lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotinilado (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpenteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpenteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

Procedeu-se a lavagem das lâminas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada. A seguir a revelação da reação foi realizada como descrita anteriormente.

Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos aos antígenos estudados: tonsilas para citocinas e SK para HHV-8/LANA. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

4.2.5 Reação imuno-histoquímica de dupla-marcação para estudo da interação do HHV-8 com dendrócitos dérmicos FXIIIa+

Para detecção do antígeno HHV-8/LANA seguiu-se o protocolo como descrito anteriormente até a etapa da revelação com o cromógeno DAB. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada.

Após a lavagem em PBS pH 7.4, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-FXIIIa diluído em BSA 1%, durante 60 minutos a 37°C (Tabela 2).

Após serem lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotilado (LSAB+system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o complexo Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina (LSAB+system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

Após serem lavadas em PBS pH 7.4, os sítios de ligações foram revelados com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0640). A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris,

lavadas novamente em água corrente por cinco minutos e depois de secas, montadas com resina Permount.

4.2.6 Reação imuno-histoquímica de dupla-marcação para estudo de linfócitos T CD4+ e T CD8+ expressando IFN- γ

Para verificar a possível expressão de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi realizada a reação imuno-histoquímica de dupla-marcação. Seguiu-se o protocolo como descrito anteriormente para detecção do IFN- γ até a etapa da incubação com o anticorpo primário. Após a lavagem os preparados foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de fosfatase alcalina (EnVision™ AP, coelho/camundongo, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K4017) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4 e os sítios de ligações foram revelados com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0640).

Após a lavagem em água corrente, água destilada e PBS pH 7.4, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD4 ou anti-CD8 diluído em BSA 1%, “over-night” a 4°C (Tabela 2), tendo sua demonstração seguido o descrito anteriormente para essas populações celulares.

Tabela 2: Anticorpos primários para reação imuno-histoquímica.

Anticorpo	Marca/código	Exposição antigênica	Diluição
Ig de camundongo anti-CD1a humano	IMMUNOTECH/1590	-	Puro
Ig de camundongo anti-linfócitos TCD4+	DAKO/M834	-	1:1000
Ig de camundongo anti-linfócitos TCD8+	DAKO/M7103	-	1:50
Ig de camundongo anti-macrófagos CD68+	DAKO/M876	Panela de pressão	1:30
Ig de coelho anti-proteína S100	DAKO/Z311	-	1:1000
Ig de coelho anti-Fator XIIIa	CALBIOCHEM/233502	Tripsina 0,015%	1:200
Ig de cabra anti-IL1- β	R&D Systems/AF201-NA	Banho-maria a 95°C	1:30
Ig de cabra anti-IL4	R&D Systems/AF204-NA	Banho-maria a 95°C	1:40
Ig de cabra anti-IL6	R&D Systems/AF206-NA	Banho-maria a 95°C	1:20
Ig de camundongo anti-IFN- γ	R&D Systems/MAB 285	Banho-maria a 95°C	1:200
Ig de cabra anti-TNF- α	GENZYME/AF210-NA	Banho-maria a 95°C	1:200
Ig de camundongo anti- HHV8/LANA	NOVOCASTRA/13B10	Banho-maria a 95°C	1:200

Ig – imunoglobulina   - sem recuperação antigênica

Todas as reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A padronização da reação imuno-histoquímica para o HHV-8 foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica da Seção de Anatomia Patológica do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2.7 Análise morfométrica

As diferentes populações de células inflamatórias, as células com expressão de citocinas e de HHV-8/LANA foram avaliadas de forma quantitativa, utilizando-se ocular de 10x com graticulo e objetiva de 40x que nesse aumento apresenta 0,25mm de lado ($0,0625\text{mm}^2$ de área). Três campos foram sorteados no aumento de 400x. As células foram contadas em três profundidades dérmicas: derme papilar, derme reticular média e derme profunda, totalizando nove campos para cada caso analisado.

A população de células de Langerhans epidérmicas foi avaliada pela determinação da fração de área epidérmica com expressão positiva de antígeno CD1a. Com o mesmo graticulo e aumento de 400x, foi contado o número de pontos do graticulo (cruzamento de duas retas do graticulo) que coincidiram sobre imuno-marcação positiva e o número de pontos do graticulo que coincidiram sobre a epiderme, excluída a camada córnea. Da razão do número de pontos sobre a imuno-marcação e o número total de pontos sobre a epiderme, obteve-se a fração de área epidérmica que expressa a positividade para o antígeno CD1a (Bieber et al., 1988).

A quantificação das células $\text{S100}^+\text{CD1a}^-$ na derme foi feita pela contagem diferencial entres o número total de células S100^+ subtraindo-se o número total de células CD1a^+ .

A avaliação das reações de dupla-marcação foi efetuada de maneira qualitativa, sendo considerado nos resultados apenas a presença ou ausência do evento.

4.2.8 Aprovação da Comissão de Ética

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pela 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, sob o nº 914/04 (Anexo A).

4.2.9 Análise estatística

Para a realização da análise estatística dos dados, foi utilizado o “Graph Pad Prism”, versão 4.00 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA), com o nível de significância estabelecido em 95% ($p \leq 0.05$).

Os resultados da quantificação das diferentes populações celulares, das células com expressão de citocinas e das células HHV-8/LANA (+) dos três grupos estudados de sarcoma de Kaposi foram submetidos à análise estatística através do método não paramétrico de Kruskal-Wallis. A comparação dos grupos dois a dois foi feita pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Foram ainda comparadas as populações de células S100+ com células CD1a+ dérmicas entre os grupos de sarcoma de Kaposi estudados, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos dos pacientes

Os dados referentes à faixa etária e sexo dos pacientes estão apresentados nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

Gráfico 1 - Distribuição dos casos de acordo com o sexo. **A)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi clássico. **B)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS em uso de HAART.

Gráfico 2 - Distribuição dos casos de acordo com a faixa etária. **A)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi clássico. **B)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Pacientes com lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS em uso de HAART.

5.2. Avaliação histopatológica das lesões

O quadro histopatológico das lesões de SK caracterizou-se pela proliferação vascular, sendo observado vasos irregulares (Figura 3A) e extravasamento de hemácias no interstício (Figura 3B). As células fusiformes por vezes estavam dispostas em feixes com localização difusa (Figuras 3C e D). A presença de atipia celular não acentuada e de mitose foram observadas principalmente nas lesões nodulares (Figuras 3E e F). O infiltrado inflamatório linfomononuclear esteve localizado em áreas multifocais na derme e/ou ao redor dos capilares do plexo vascular profundo

(Figuras 4A e B), tendo os plasmócitos (Figura 4C) e o pigmento de hemossiderina (Figura 4D) a mesma distribuição.

As figuras 4E e F mostram o estágio inicial (mácula ou pápula) da lesão de SK-AIDS e o estágio tardio (nódulo) da lesão de SKC.

Não houve diferenças marcantes entre as alterações histopatológicas entre os grupos de SK.

Figura 3 - Aspectos histopatológicos da lesão cutânea de sarcoma de Kaposi – A) Proliferação vascular - aumento de 200x; **B)** Hemácias extravasadas no interstício - aumento de 400x; **C e D)** Células fusiformes dispostas em feixes - aumento de 400x; **E)** Atipia celular – (—►) aumento de 630x; **F)** Presença de mitose - aumento de 400x. (Hematoxilina-eosina).

Figura 4 - Aspectos histopatológicos da lesão cutânea de sarcoma de Kaposi – A) Infiltrado inflamatório linfomononuclear presente na derme - aumento de 100x; **B)** Infiltrado inflamatório ao redor do plexo vascular profundo - aumento de 400x; **C)** Presença de plasmócitos na derme - aumento de 630x; **D)** Pigmento de hemossiderina - aumento de 400x. **E)** Estágio inicial da lesão de SK-AIDS - aumento de 50x; **F)** Estágio nodular da lesão de SKC - aumento de 100x. (Hematoxilina-eosina)

A tabela 3 apresenta as alterações histopatológicas verificadas com a respectiva frequência e o grau de intensidade.

Tabela 3 - **Sarcoma de Kaposi** – Características das lesões cutâneas

CÉLULAS FUSIFORMES				
	Atipia		Mitose	
Intensa	5/56 (8,93%)		0/56	
Moderada	9/56 (16,07%)		1/56 (1,79%)	
Discreta	31/56 (55,36%)		15/56 (26,78%)	
Ausente	11/56 (19,64%)		40/56 (71,43%)	

Infiltrado inflamatório na derme				
	Linfócitos	Macrófagos	Plasmócitos	Neutrófilos
Intenso	39/56 (69,64%)	7/56 (12,50%)	0/56	0/56
Moderado	15/56 (26,79%)	37/56 (66,07%)	5/56 (8,93%)	0/56
Discreto	2/56 (3,57%)	12/56 (21,43%)	49/56 (87,50%)	17/56 (30,36%)
Ausente	0/56	0/56	2/56 (3,57%)	39/56 (69,64%)

	Hemácias extravasadas	Pigmento de hemossiderina	Glóbulos hialinos
Intenso	8/56 (14,29%)		
Moderado	14/56 (25,00%)		
Discreto	32/56 (57,14%)		
Ausente	2/56 (3,57%)		
Positivo		54/56 (96,43%)	39/56 (69,64%)
Negativo		2/56 (3,57%)	17/56 (30,36%)

O gráfico 3 demonstra as lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi de acordo os estágios histológicos.

Gráfico 3 - Distribuição dos casos de acordo com o estágio histológico das lesões. **A)** Lesões de sarcoma de Kaposi clássico. **B)** Lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de pacientes em uso de HAART.

5.3. Caracterização imuno-histoquímica de células inflamatórias

5.3.1. Análise morfológica de linfócitos T CD4+

Os linfócitos T CD4+ distribuíram-se irregularmente por toda a camada da derme em meio ao infiltrado inflamatório. A morfologia dessa população celular não se mostrou diferente entre as lesões de SK estudadas (Figura 5).

Figura 5 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de linfócitos T CD4+ na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

Verificou-se um aumento estatisticamente significativo no número de linfócitos T CD4+ nas lesões de SKC em relação às lesões de SK-AIDS ($p < 0.01$). Não houve diferença da população de células T CD4+ nas lesões de SKC e SK-AIDS/HAART ($p > 0.05$). As lesões de SK-AIDS e SK-AIDS/HAART não mostraram diferenças entre si (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição de linfócitos T CD4+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (Teste estatístico - Kruskal-Wallis)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

5.3.2. Análise morfológica de linfócitos T CD8+

A distribuição dos linfócitos T CD8+ foi observada por toda a camada da derme em meio ao infiltrado inflamatório. A morfologia dessa população celular foi semelhante em todas as lesões SK estudadas (Figura 6).

Figura 6 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de linfócitos T CD8+ na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

Ao compararmos quantitativamente os linfócitos T CD8+, observou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre as lesões de SK estudadas ($p > 0.05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Distribuição de linfócitos T CD8+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (Teste estatístico - Kruskal-Wallis)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

5.3.3. Análise morfológica de macrófagos CD68+

Os macrófagos CD68+ distribuíram-se em meio ao infiltrado inflamatório por toda a derme. Algumas células imuno-marcadas apresentaram morfologia dendrítica. A morfologia celular mostrou-se semelhante entre as lesões de SK estudadas (Figura 7).

Figura 7 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de macrófagos CD68+ na derme. A) Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

As lesões de SKC e SK-AIDS/HAART apresentaram um número mais elevado de macrófagos estatisticamente significante quando comparadas às lesões de SK-AIDS ($p < 0.05$ e $p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significante entre as lesões de SKC e SK-AIDS/HAART (Gráfico 6).

5.3.4. Análise morfológica de células de Langerhans CD1a+

As células CD1a+ foram também observadas na derme, especialmente na derme superficial (Figuras 8E e F).

O número de células de Langerhans epidérmicas foi maior na pele normal comparado àquele das lesões de SK-AIDS ($p < 0.01$). Não houve diferença estatisticamente entre as lesões de SKC, SK-AIDS/HAART e a pele normal. Verificou-se maior número dessa população celular nas lesões de SKC e SK-AIDS/HAART em relação às lesões de SK-AIDS ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente) (Gráfico 7).

Não houve diferença estatisticamente significativa no número de células dérmicas CD1a+ nas lesões de SKC, SK-AIDS e SK-AIDS/HAART em relação à pele normal ($p > 0.05$, $p > 0.05$ e $p > 0.05$). As lesões de SK não diferiram entre si (Gráfico 8).

Figura 8 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células de Langerhans (CD1a+) epidérmicas. **A)** Pele normal; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **D)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. **E - F)** Células CD1a+ na derme em lesão de sarcoma de Kaposi clássico e sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

Gráfico 7 - Distribuição de células de Langerhans CD1a+ na epiderme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART, ● Pele normal

Gráfico 8 - Distribuição de células CD1a+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART, ● Pele normal

5.3.5. Análise morfológica de células S100+ dérmicas

As células S100+ distribuíram-se por toda a camada da derme em meio ao infiltrado inflamatório. Na pele normal, observaram-se raras células imuno-marcadas para o anticorpo anti-S100 (Figura 9A). Verificou-se morfologia semelhante em todas as lesões de SK (Figuras 9B, C e D).

Figura 9 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células S100+ na derme. **A)** Pele normal; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **D)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

O número de células S100+ na derme foi maior nos três grupos de lesões de SK do que na pele normal. Não se verificou diferença estatisticamente significativa das células S100+ entre os três grupos de SK (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Distribuição de células S100+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART, ● Pele normal

Foi observado que o número de células S100+ na derme, excedeu ao número de células que apresentaram imuno-marcação para o anticorpo anti-CD1a na derme em todas as lesões de SK avaliadas, o que não foi verificado na pele normal (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Distribuição de células S100+ ● e células CD1a+ ● na derme.
(Teste estatístico - Mann-Whitney)

5.3.6. Células dérmicas S100⁺ CD1a⁻

Verificou-se um aumento estatisticamente significativo no número de células S100⁺CD1a⁻ nos três grupos de SK quando comparado à pele normal. A população de células S100⁺CD1a⁻ não diferiu entre os grupos de SK (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Distribuição de células S100⁺CD1a⁻ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (Teste estatístico - Kruskal-Wallis)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART, ● Pele normal

5.3.7. Análise morfológica de dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺

Na pele normal os dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺ apresentaram morfologia fusiforme e distribuição preferencial na derme papilar (Figura 10A). Em todos os grupos de lesões de SK, essa população celular mostrou-se hipertrófica, hiperplásica com distribuição mais difusa na derme, todavia mantendo adensamento principalmente na derme superficial e reticular média (Figuras 10B, C e D), ao redor dos vasos.

Figura 10 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ na derme. **A)** Pele normal; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **D)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

O número de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ foi maior nos três grupos de lesões de SK quando comparado à pele normal. Seu número não diferiu entre as lesões de SK (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Distribuição de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART, ● Pele normal

5.4. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de citocinas

5.4.1. Análise morfológica de células com expressão de IFN- γ

As células com expressão de IFN- γ distribuíram-se em meio ao infiltrado inflamatório. Apresentaram imuno-marcação para o anticorpo anti-IFN- γ as células endoteliais e células mononucleares em todos os grupos de SK (Figura 11).

As Figuras 12A e B demonstram a dupla marcação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando IFN- γ nas lesões de SK.

Figura 11 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de IFN- γ na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **D)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

Figura 12 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Reação imuno-histoquímica de dupla marcação evidenciando linfócitos T CD4+ (**A**) e linfócitos T CD8+ (**B**) (corado em marron) expressando IFN- γ (corado em vermelho). (aumento original de 630x).

As lesões de SKC e SK-AIDS/HAART apresentaram um número mais elevado de células com expressão de IFN- γ estatisticamente significativa quando comparadas às lesões de SK-AIDS ($p < 0.05$ e $p < 0,01$). Não foram evidenciadas diferenças na expressão de IFN- γ entre as lesões de SKC e SK-AIDS/HAART (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Distribuição de células com expressão de IFN- γ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (Teste estatístico - Kruskal-Wallis)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

5.4.2. Análise morfológica de células com expressão de TNF- α

A pesquisa imuno-histoquímica de células com expressão de TNF- α evidenciou células imuno-marcadas com morfologia semelhante à de macrófagos e linfócitos, distribuídos ao longo de toda a derme nas lesões de SK estudadas (Figura 13).

Figura 13 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de TNF- α na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS; **D)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

A avaliação quantitativa de células com expressão de TNF- α não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de lesão de SK (Gráfico 14).

5.4.3. Análise morfológica de células com expressão de IL-1 β

Quando avaliada a expressão de IL-1 β na derme, observou-se que as células mononucleares do infiltrado inflamatório e raras células fusiformes foram positivas para o antígeno IL-1 β nas lesões de SK estudadas (Figura 14).

Figura 14 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de IL-1 β na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

As lesões de SKC e SK-AIDS/HAART apresentaram um número mais elevado de células com expressão de IL-1 β estatisticamente significativa quando comparadas às lesões de SK-AIDS ($p < 0.05$ e $p < 0.001$). Não foram evidenciadas diferenças na expressão dessa citocina entre as lesões de SKC e SK-AIDS/HAART (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Distribuição de células com expressão de IL-1 β na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

5.4.4. Análise morfológica de células com expressão de IL-4

O anticorpo anti-IL4 marcou células mononucleares pequenas com morfologia semelhante à de linfócitos e raras células com morfologia fusiforme. Essas observações foram semelhantes em todas as lesões de SK avaliadas (Figura 15).

Figura 15 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de IL-4 na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

A avaliação quantitativa de células com expressão de IL-4 não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de lesão de SK (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Distribuição de células com expressão de IL-4 na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (*Teste estatístico - Kruskal-Wallis*)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

5.4.5. Análise morfológica de células com expressão de IL-6

Quando avaliada a expressão de IL-6 na derme, observou-se que as células mononucleares do infiltrado inflamatório e raras células fusiformes foram positivas para o antígeno IL-6 nas lesões de SK estudadas (Figura 16).

Figura 16 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de IL-6 na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

A avaliação quantitativa de células com expressão de IL-6 não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de lesão de SK (Gráfico 17).

5.5. Análise morfológica de células com expressão de HHV-8/LANA

As células com expressão do HHV-8/LANA apresentaram morfologia fusiforme na grande maioria das vezes, especialmente nas lesões nodulares. Houve também imuno-marcação nas células endoteliais e células mononucleares. O padrão de imuno-marcação foi nuclear, puntiforme e por vezes homogêneo em algumas células (Figura 17).

Figura 17 - Sarcoma de Kaposi cutâneo – Demonstração de células com expressão de HHV-8/LANA na derme. **A)** Lesão de sarcoma de Kaposi clássico; **B)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS. **C)** Lesão de sarcoma de Kaposi associado à AIDS de paciente em uso de HAART. Aumento original de 400x. Reação imuno-histoquímica (streptavidina-biotina peroxidase).

As lesões de SKC apresentaram um número maior estatisticamente significativo de células HHV-8/LANA+ quando comparadas às lesões de SK-AIDS e SK-AIDS/HAART ($p < 0.001$ e $p < 0.01$). Não houve diferença estatisticamente significativa de células HHV-8/LANA+ entre SK-AIDS e SK-AIDS/HAART (Gráfico 18). Do total de 23 casos de SK-AIDS/HAART, dois foram negativos para o antígeno HHV-8/LANA.

Gráfico 18 - Distribuição de células HHV-8/LANA+ na derme de lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi. (Teste estatístico - Kruskal-Wallis)

● SKC, ● SK-AIDS, ● SK-AIDS/HAART

A distribuição do HHV-8/LANA nas diferentes células pode ser evidenciada no gráfico 19.

Gráfico 19 - Distribuição de HHV-8/LANA+ nas diferentes células.

5.6. Dupla-marcação dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ com o HHV-8/LANA

Através da reação imuno-histoquímica de dupla-marcação foi possível observar a presença do HHV-8/LANA no núcleo dos DD FXIIIa+ (Figura 18).

O anticorpo anti-HHV-8/LANA marcou o núcleo de células infectadas através da reação de imuno-peroxidase, enquanto que o anticorpo anti - FXIIIa+ marcou em vermelho o citoplasma do DD com a fosfatase alcalina.

A dupla-marcação ocorreu em 37,03% dos casos de SK.

Figura 18 – Sarcoma de Kaposi cutâneo. Reação imuno-histoquímica de dupla marcação evidenciando o HHV-8 no núcleo (corado em marron) do dendrócito dérmico FXIIIa+ (corado em vermelho - →). (Reação imuno-peroxidase/fosfatase alcalina; aumento original de 630x).

Discussão

---

6. DISCUSSÃO

As características demográficas dos pacientes deste estudo assemelham-se aos dados da literatura (Safai, 1984; Friedman-Kien, 1981; Nasti *et al.*, 2003; Ramos da Silva *et al.*, 2007). A maioria dos pacientes com SK clássico apresentou lesões nodulares, enquanto pacientes com AIDS tiveram predominantemente lesões em mácula e/ou pápula. O aparente predomínio em relação aos estágios histológicos da lesão de SK observada entre essas duas formas clínico-epidemiológicas, foi relatado anteriormente por Ramos da Silva *et al.* (2007). Esse achado resulta da suspeita e identificação precoce do SK em indivíduos com AIDS e porque os mesmos apresentam geralmente múltiplas lesões cutâneas. Desse modo, estes fatos associados aos dados clínicos dos indivíduos levam aos procedimentos que permitem o diagnóstico de SK-AIDS em seu estágio mais inicial.

O sarcoma de Kaposi vem sendo estudado por muitos anos, principalmente após a descoberta da infecção pelo HIV e posteriormente a associação com o HHV-8. Apesar do grande esforço na tentativa de compreender como ocorre a interação dos diversos fatores ou co-fatores na promoção e progressão do SK, pouco se conhece sobre a resposta imune “in situ” na lesão em qualquer que seja a forma clínico-epidemiológica da doença. Mais obscuro ainda é, se a terapia anti-retroviral combinada confere mudança no microambiente da lesão.

A infecção pelo HIV predispõe o desenvolvimento de tipos específicos de câncer (Aoki e Tosato, 2006). A maioria das neoplasias que ocorrem durante um estado de imunodeficiência está associada às infecções causadas por vírus oncogênicos, como por exemplo, o HHV-8, o Epstein-Barr vírus e o Papilomavírus humano (Aoki e Tosato, 2006). Por esta razão, acredita-se que a vigilância imune comprometida contra o agente viral e/ou as células neoplásicas contribua para a formação da lesão. Por outro lado, o papel da imunodeficiência no desenvolvimento da forma clássica do SK merece melhor esclarecimento. O número limitado de estudos nessa variante clínico-epidemiológica tem proporcionado resultados controversos (Marining *et al.*, 1985, Touloumi *et al.*, 1999; Pellet *et al.*, 2006).

Comportamento dos linfócitos TCD4+ nas lesões de sarcoma de Kaposi

Os achados da presente pesquisa evidenciaram “in situ” nas lesões cutâneas de pacientes com SK-AIDS, uma diminuição estatisticamente significativa no número de linfócitos T CD4+ mensurados por metodologia quantitativa, quando comparados aos das lesões de SKC. Esse achado poderia estar relacionado ao fato de que, no curso da AIDS há uma perda progressiva de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, a qual é responsável pela disfunção imunológica (Sempere *et al.*, 2007; Appay e Sauce, 2008).

Na literatura consultada encontramos o trabalho de Fiorelli *et al.* (1998) que apesar de não ter realizado análise quantitativa demonstrou a presença de linfócitos T CD4+ “in situ” nas lesões de SK-AIDS e SKC.

Já está bem estabelecido que o uso da HAART promove diminuição da carga viral do HIV e homeostase de linfócitos T CD4+ (Carcelain *et al.*, 2001; Sgadari *et al.*, 2003). Kaufmann *et al.* (1999) sugerem que não só o número de linfócitos T CD4+ melhora, mas também sua função é ao menos restabelecida parcialmente em resposta ao tratamento. De fato, o restauro dos linfócitos T CD4+ específicos para o HIV e o HHV-8 em pacientes tratados com HAART associada ou não à quimioterapia foi demonstrado por Bihl *et al.* (2007).

A não diferença encontrada por nós, no número de linfócitos TCD4+ entre as lesões de SK-AIDS e SK-AIDS/HAART poderia decorrer do fato que, os pacientes em vigência de HAART estivessem distribuídos em bons e maus respondedores ao tratamento. Tal distribuição heterogênea poderia se refletir na concentração de linfócitos nas lesões. É possível que estudos posteriores comparando grupos de pacientes bons e maus respondedores poderiam responder a esta questão.

Os linfócitos TCD8+ nas lesões de sarcoma de Kaposi

Na imunidade contra agentes infecciosos virais, os linfócitos T CD8+ representam importantes células na defesa do hospedeiro principalmente por possuir capacidade citotóxica (Guidotti e Chisari, 2001). O mecanismo

---

pelo qual a resposta imune controla a replicação do HHV-8 e previne o desenvolvimento do SK é, ainda hoje, pouco conhecido na literatura. Como nas lesões de SK a maioria das células é infectada latentemente pelo HHV-8 e o padrão de expressão desses genes é limitado, isso implica que somente uma pequena fração de peptídeos virais estaria disponível para ser reconhecida pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Além do mais, o desenvolvimento da lesão de SKC e SK-AIDS tem sido associado à perda da resposta de linfócitos T CD8⁺ específicos contra o HHV-8 (Guihot *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006). Vale enfatizar, que os linfócitos T CD8⁺ também estão envolvidos na resposta anti-tumoral, porém no SK estas células têm tal função prejudicada, pois o HHV8 possui estratégias de evasão imune representada pela “down-regulation” da expressão de MHC de classe I e de moléculas co-estimulatórias (Coscoy, Ganem, 2000; 2001).

Em nossa pesquisa, considerando que a expressão “in situ” de linfócitos T CD8⁺ nas lesões de SK foi similar nos grupos analisados, podemos supor que essa população celular não se correlaciona com a forma clínico-epidemiológica da doença, todavia são participantes da resposta imune no microambiente da lesão.

Os macrófagos no sítio das lesões de sarcoma de Kaposi

A respeito da população de macrófagos CD68⁺, estudos em sangue periférico de indivíduos com SK-AIDS demonstram diminuição da atividade quimiotática e fagocítica de monócitos/macrófagos ocasionada pela

---

presença do HIV (Smith *et al.*, 1984; D'Souza e Fauci, 1999; Crowne *et al.*, 2003). Encontramos em nossa pesquisa número diminuído de macrófagos nas lesões de SK-AIDS quando comparado ao SKC e SK-AIDS/HAART. Tal achado deve estar refletindo a disfunção na quimiotaxia dessa população celular, fato que constitui uma possível explicação para seu número reduzido nos indivíduos com AIDS não tratados.

A participação dessas células na patogênese do SK tem sido demonstrada por outros autores (Pyakurel *et al.*, 2004; Hussein, 2007), entretanto, o nosso estudo foi o primeiro a fazer uma avaliação quantitativa entre formas diversas de SK e demonstrar entre as mesmas, diferenças na população local de macrófagos. Pioneiramente, também demonstramos que a HAART induz aumento do número de macrófagos nas lesões dos pacientes tratados quando comparados com aqueles com AIDS, isentos do uso de terapia anti-retroviral combinada. Além disso, o número de macrófagos presentes nas lesões dos pacientes com AIDS submetidos à terapia anti-retroviral combinada estiveram próximos dos níveis detectados nas lesões de SKC. Esse aspecto provavelmente diz respeito à recuperação imune parcial determinada pelo tratamento com HAART.

Comportamento das células de Langerhans nas lesões de sarcoma de Kaposi

Enquanto alguns trabalhos têm reportado redução no número de células dendríticas tanto de origem mielóide quanto de origem plasmocitóide

---

no sangue periférico de indivíduos infectados com o HIV (Donaghy *et al.*, 2001; Pacanowski *et al.*, 2001), outros demonstraram que essa diminuição de populações celulares de origem distinta não ocorre concomitantemente (Grassi *et al.*, 1999; Soumelis *et al.*, 2001).

O comportamento das células de Langerhans (um tipo particular de célula dendrítica de origem mielóide) no SK-AIDS foi demonstrado por Valcuende-Cavero *et al.* (1994). Esses autores empregando método semi-quantitativo observaram número reduzido dessa população celular “in situ” nas lesões de SK-AIDS em relação à pele normal.

Em nosso trabalho, as células de Langerhans epidérmicas apresentaram alterações qualitativas como dendritos curtos quando cotejadas com os casos controles. Ao fazermos a avaliação quantitativa por metodologia morfométrica, verificamos que as mesmas estiveram diminuídas em número nas lesões de SK-AIDS quando comparadas àquelas da pele normal. A redução no número dessa população celular pode ser o resultado da influência do HIV, pois se sabe que esse retrovírus é capaz de infectar e se replicar no interior dessas células (Donaghy *et al.*, 2004). Poderia também sua redução estar associada ao comprometimento da resposta imune vista nesses pacientes. Interessantemente, Bedani *et al.* (1997) evidenciaram “in situ” número diminuído das células de Langerhans em lesões de SK iatrogênico de pacientes que fizeram uso de ciclosporina A. Nesses pacientes, quando a terapia imunossupressora foi retirada, as lesões de SK regrediram e as células de Langerhans re-popularam na epiderme. Outras doenças infecciosas que comprometem o sistema imune também levam à

---

diminuição das células de Langherans no sítio das lesões como verificado em casos de hanseníase multibacilar (Tapia *et al.*, 2000) e paracoccidiodomicose (Pagliari e Sotto, 2003).

O impacto da HAART sobre as células dendríticas tem sido pouco avaliado. Estudos referentes ao sangue periférico têm mostrado que o tratamento anti-retroviral recupera o número de células dendríticas plasmocitóides em adultos e crianças infectadas pelo HIV (Barron *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2004). Desconhecemos avaliações do comportamento das células de Langerhans “in situ” em pacientes com SK-AIDS após o tratamento com HAART.

Nossos resultados mostraram aumento significativo do número das células de Langerhans epidérmicas nas lesões de SK-AIDS/HAART quando comparado às lesões de SK-AIDS sem tratamento. Tal dado aponta para a influência marcante do tratamento com HAART para induzir a re-população dessas células na epiderme dos pacientes em uso de terapia combinada, contribuindo dessa maneira para o restauro da imunovigilância cutânea.

Não encontramos diferenças na quantificação das células de Langerhans epidérmicas no SKC quando confrontado com a pele normal. Uma possibilidade para explicação desse dado poderia ser aquela de que indivíduos com SKC têm um grau de comprometimento imune de teor menos acentuado que aquele encontrado na AIDS e que não se refletiria de modo evidente na população das células de Langerhans no local das lesões.

Por outro lado, o aspecto semelhante dessa população de células dendríticas detectada entre os indivíduos normais e os com SKC,

---

sabidamente portadores do HHV8, parece apontar para a não influência direta deste herpesvírus no comportamento das células de Langerhans no local das lesões. Não temos informes da literatura para que possamos cotejar essa hipótese.

Ainda, verificamos que as células dérmicas CD1a+ em provável migração para apresentar antígenos aos linfócitos T “naive” nos linfonodos não mostraram diferenças quantitativas entre os grupos estudados e o controle.

Dendrócitos dérmicos Fator XIIIa+ e sarcoma de Kaposi

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos que têm capacidade para estimular as células T “naive” e iniciar a resposta imune adquirida (Valladeau, Saeland, 2005). As diversas funções das células dendríticas na regulação imune dependem da diversidade das suas subpopulações e linhagens, bem como da plasticidade das mesmas no estágio imaturo (Yong-Jen, 2001; Nestle e Nickoloff, 2007).

Uma população de células dendríticas analisada, no presente estudo, é representado pelas células dendríticas Fator XIIIa+. É sabido que essas células além de sua capacidade de apresentação de antígeno, também têm competência fagocítica, tendo como base a presença de vacúolos no seu citoplasma contendo melanina e hemossiderina (Headington, 1986; Cerio *et al.*, 1990; Nestle *et al.*, 1998; Pagliari e Sotto; 2002; Sotto *et al.*, 2004). A localização preferencial perivascular dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ na

---

derme propicia sua interação com os demais elementos celulares envolvidos na resposta imune cutânea (células endoteliais, linfócitos T, mastócitos e o sangue circulando nos vasos), o que sugere sua participação na imunobiologia da unidade microvascular dérmica. A interação entre os DD FXIIIa⁺ e os linfócitos T promoveria a liberação pelas mesmas de citocinas, tais como a IL-1 e o TNF- α , que agiriam sobre as células endoteliais facilitando a entrada de neutrófilos e linfócitos para a derme. Nesse momento cabe lembrar que a estimulação de linfócitos T, componente chave da imunidade adaptativa, e suas características de resposta aos antígenos dependem dos sinais que recebem das células apresentadoras de antígenos (Kadowaki, 2007). A apresentação de antígenos ocorre mediante a diferenciação dessas células do seu estado inativo para o ativado, no contexto de molécula MHC-II e de sinais co-estimulatórios (Moll, 2003).

O papel desempenhado pelos DD FXIIIa⁺ no SK não está bem estabelecido. A esse respeito Nickoloff e Griffiths (1989b) demonstraram que os DD FXIIIa⁺ estavam aumentados em SKC e SK/AIDS quando comparados com a pele normal e estavam relacionados com focos do infiltrado inflamatório.

Em nossa casuística detectamos sinais de hipertrofia e aumento do número DD FXIIIa⁺ em relação aos casos controles, nos três grupos estudados em nossa pesquisa. Além disso, o aumento de tais células nos grupos de SK avaliados mostraram valores semelhantes quando quantificadas por metodologia morfométrica. Foi também observado que os DD FXIIIa⁺ apresentaram-se com prolongamentos dendríticos arborescentes

---

em todas as lesões de SK, diferenciando-se dos casos controles, o que seria provavelmente expressão de seu estado de ativação na resposta tecidual cutânea frente ao HHV-8 e/ou HIV. Os dados do presente estudo, interpretados em conjunto com aqueles da literatura ressaltam a participação dos DD FXIIIa+ na patogênese do SK. Verificamos ainda, que seu comportamento foi independente da forma clínico-epidemiológica do SK, inclusive após o uso de terapia antiretroviral combinada.

Através da reação imuno-histoquímica de dupla marcação utilizando-se anticorpos para detecção de DD FXIIIa+ e de antígenos HHV8/LANA encontramos reações positivas concomitantes em 37,03% dos casos de SK, independente de sua forma, uso ou não de tratamento para o HIV. A demonstração original da presença de material antigênico HHV-8/LANA nos DD FXIIIa+ evidencia seu papel de célula apresentadora de antígeno para esse herpesvírus.

Outrossim, a identificação de imuno-marcação do HHV-8/LANA nos núcleos dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ poderia sugerir as mesmas também como células alvo para infecção pelo HHV8.

Células dendríticas S100+ e células S100+ CD1a- no sarcoma de Kaposi

O marcador S100 não é uma única proteína, mas sim uma família de proteínas ligantes de cálcio compostas de diferentes unidades com diversas funções (McNutt, 1998). Está presente em núcleo e citoplasma de células de Schwann células gliais, melanócitos, condrócitos, adipócitos, células mioepiteliais e em células dendríticas apresentadoras de antígenos (Rosai J, 2004).

Em relação ao sistema imune, o marcador S100 é expresso em células dendríticas interdigitantes, células foliculares dendríticas e células de Langerhans (Miettinen *et al.*, 1987; Rosai J, 2004).

Na presente investigação observamos que a expressão de células S100+ na derme foi maior nos casos de SK que nos casos controles e não diferiu de modo significativo, quando foram cotejados os três grupos de SK entre si. Esse aspecto deve refletir o afluxo de células apresentadoras de antígeno para o local das lesões de SK, que poderia decorrer dos estímulos dos vírus HIV e/ou HHV8.

Um fato que nos chamou a atenção quando do processamento dos dados relacionados às células S100+ presentes na derme, foi a ocorrência das mesmas em número maior que as células de Langerhans, propriamente ditas, caracterizadas por seu marcador específico CD1a. Assim sendo, verificamos na derme uma população celular **S100+ CD1a-**. O número dessa população celular foi obtido ao subtraímos do total de células S100+

---

as células que expressavam o marcador específico para células de Langerhans.

Considerando os achados acima dispostos se torna necessário ressaltar que na derme pudemos caracterizar três tipos de células dendríticas com diferentes fenótipos, a saber: células **CD1a+ S100+**, células **S100+ CD1a-** e células **FXIIIa+ S100- CD1a-**.

As células **S100+ CD1a-** apresentaram expressão quantitativa diversa quando se comparou os grupos estudados e os casos controles. Assim, constatamos que essa população celular compareceu em maior quantidade nos casos de SKC, SK-AIDS e SK-AIDS/HAART que na pele normal. Esse comportamento deve, portanto, refletir sua participação diferenciada como APC nas lesões do SK.

Outros estudos serão necessários para melhor definição da função das diferentes células dendríticas na pele, em particular das células com fenótipo **S100+ CD1a-** que poderiam ter origem mielóide e serem representantes das células dendríticas intersticiais (Yong-Jun, 2001). Do ponto de vista de procedimento imuno-histoquímico, essas células exibem o mesmo tipo de imuno-marcação que àquelas características da doença de Rosai-Dorfman (Rosai J, 2004). Além do mais, estas últimas têm intensa atividade fagocítica e sua proliferação até o momento não tem bem estabelecidos os seus fatores etiológicos determinantes (Rosai J, 2004).

Citocinas no sítio das lesões de sarcoma de Kaposi

Citocinas têm importante papel na defesa contra infecções virais, quer seja diretamente através da inibição da replicação viral ou de forma indireta, ao atuar na orientação do padrão predominante da resposta do hospedeiro (Asadullah *et al.*, 2002).

As publicações da expressão de citocinas no SK são raras e estão dirigidas principalmente para sua avaliação no sangue periférico ou em cultura de células (Touloumi *et al.*, 1999; Pellet *et al.*, 2006). A expressão das mesmas nos locais de lesão do SK é ainda mais escassa, têm sido evidenciadas por metodologia não quantitativa (Fiorelli *et al.*, 1998; Barillari *et al.*, 1999) e não tem sido avaliadas sob o uso de terapia antiretroviral combinada.

Em pele humana com lesão de SKC, SK-AIDS e SK-AIDS/HAART caracterizamos e quantificamos o perfil de imuno-expressão de citocinas “in situ” o que nos possibilitou analisar o papel de cada uma dessas na patogênese da doença.

O IFN- γ é uma citocina produzida por linfócitos T CD8+, T CD4+ e células “Natural killer” após estimulação antigênica e é identificada como citocina definidora da resposta Th1 (Guidotti e Chisari, 2001). Sua ação antiviral decorre da inibição da replicação de partículas virais. Atua como ativadora de macrófagos e no aumento da expressão de moléculas relacionadas ao MHC de classe I com conseqüente indução de linfócitos T citotóxicos (Farrar e Schreiber, 1993; Fautrel e Cherin, 2000; Yarchoan *et al.*,

2007).

Tem sido sugerido que a produção de IFN- γ na presença da infecção pelo HIV resulta na progressão da lesão de SK (Ensoli *et al.*, 2001). Nessa mesma linha de investigação, ensaios clínicos testando a eficácia do IFN- γ para o tratamento do SK mostram que os pacientes tratados com essa citocina apresentaram piora das lesões (Krigel *et al.*, 1985; Albrecht *et al.*, 1994). Por outro lado, a presença de IFN- γ nas lesões de SK em resposta a infecção pelo HIV e HHV-8 poderia representar um efeito paradoxal em relação à progressão do SK.

Em face das informações disponíveis, o papel do IFN- γ na resposta imune dos pacientes com SK permanece a ser esclarecido. Da mesma forma a relação entre as células produtoras dessa citocina e a eliminação ou reativação do HHV-8 necessita ser ainda determinada por futuras investigações.

Em nosso estudo observamos aumento no número de células com expressão de IFN- γ nas lesões de SKC e SK-AIDS/HAART em relação às lesões de SK-AIDS. Esse achado em contraposição aos relatos anteriores, poderia sustentar a hipótese de que a maior produção local dessa citocina estaria na realidade exercendo seu papel protetor nesses pacientes. Essa situação poderia explicar o comportamento menos agressivo respectivamente verificado no SKC (Hengge *et al.*, a;b) e também aquele relatado em pacientes com SK/AIDS em uso de HAART (Nasti *et al.*, 2003). Nesse sentido, especulamos se o IFN- γ poderia ser considerado como um marcador de melhor resposta imune no SK (Guedes *et al.*, 2008).

Foi possível observar em nossa pesquisa, através de reação de dupla-marcação para linfócitos T CD4+, TCD8+ e da citocina IFN- γ , que essas duas células expressaram aquela citocina. Considerando esses resultados, ambos TCD4 e TCD8 produzem IFN- γ , embora nós não tenhamos determinado qual delas contribui de maneira mais acentuada para a produção dessa citocina. Usando sangue de pacientes com SKC, em estudo “in vitro” já foi demonstrada produção de IFN- γ tanto por células T CD4+ com T CD8+ (Pellet *et al.*, 2006).

A observação de que no grupo de pacientes com SK/AIDS/HAART houve maior produção local de IFN- γ que nos pacientes com SK/AIDS não tratados mostrou que o tratamento proporcionou melhora da resposta imune pelas células T CD8 e/ou TCD4.

Outra citocina avaliada em nossa investigação foi o TNF- α . Classicamente essa citocina é definida como pró-inflamatória, multipotencial atuando na ativação, recrutamento, diferenciação de células, nos mecanismos de apoptose, na geração dos efeitos deletérios teciduais e na ativação do endotélio vascular (Old, 1988; Cavaillon, 1993; Papadakis e Targan, 2000; Sedgwick *et al.* 2000).

Dados da literatura apontam que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão em concentração aumentadas em pacientes com SK-AIDS (Ensoli *et al.*, 1999; Sgadari *et al.*, 2003; Feller e Lemmer, 2008). As mesmas atuariam favorecendo a ativação das células endoteliais, o aumento das moléculas de adesão, a migração de células inflamatórias para o local da lesão, a reativação do HHV8 e a angiogênese.

A constatação da expressão semelhante de TNF- α nos três grupos de SK avaliados parece indicar que a expressão local dessa citocina não é determinada predominantemente pelo HIV, visto que valores semelhantes da mesma estiveram presentes no grupo de SKC. Como corolário, deve-se considerar a contribuição do HHV-8 na indução de TNF- α no microambiente do SK.

É sabido que a citocina IL-1 aumenta a ativação, maturação e migração das DCs, assim induzindo a resposta imune adaptativa (Belardelli *et al.*, 1989; Jonuleit *et al.*, 1996). Assim sendo, a IL-1 é considerada como uma citocina importante para o desenvolvimento da imunidade protetora anti-tumoral (Belardelli e Ferrantini, 2002). Essa citocina é descrita na literatura como intensamente inflamatória onde são estreitos os limites entre os seus efeitos benéficos e a toxicidade (Dinarello, 1996).

Nos pacientes do nosso estudo que foram tratados com HAART detectamos uma maior expressão de IL-1 β nas lesões de SK quando comparados com sua expressão nos pacientes não tratados. Por outro lado, o comportamento análogo da expressão de IL-1 β em lesões de SKC e SK-AIDS/HAART poderia indicar estar essa citocina relacionada a um grau menor de agressividade da lesão em comparação com o SK-AIDS.

Observamos que o aumento da IL-1 β constatada nos pacientes em uso de HAART esteve associado a maior expressão local de IFN- γ , maior número de células de Langerhans e de macrófagos, fatos estes indicativos de melhora da resposta imune conferida pelo tratamento. Supomos, assim, que a demonstração de valores mais elevados de IL-1 β nos pacientes em

---

uso de HAART represente um elemento relevante a ser considerado. Novas pesquisas precisariam ser desenvolvidas tendo como foco a possível utilização da IL-1 β como adjuvante de estratégias para o tratamento do SK.

A IL-6 é uma citocina pluripotente sendo considerada a maior mediadora da resposta inflamatória aguda, com indução de síntese de proteínas de fase aguda e de anticorpos. Tem papel na diferenciação de linfócitos B, de macrófagos, de células Th 17, de células CD34+, na ativação de NK e de linfócitos T citotóxicos.

Já foi demonstrado em humanos que a IL-6 está presente nas lesões de SKC e SK-AIDS (Fiorelli *et al.*, 1998; Ensoli *et al.*, 2001). Estudos experimentais têm evidenciado que a IL-6 induz as células endoteliais a adquirirem o fenótipo e funções de células fusiformes e promovem angiogênese (Fiorelli *et al.*, 1998; Barillari *et al.*, 1999).

Desconhecemos estudos que avaliem a expressão de IL-6 em pacientes submetidos à terapia antiretroviral combinada.

Quando comparamos a participação de IL-6 nas lesões de SKC, SK-AIDS e SK-AIDS/HAART verificamos que a expressão dessa citocina, embora detectada nos três grupos de SK, não mostrou diferença significativa entre os mesmos.

A IL-6 presente nas lesões pode estar exercendo seu papel no desenvolvimento do SK através de suas ações angiogênica, indutora de diferenciação para células fusiformes e de reativação do HHV8. No SK a expressão de IL-6 parece ser independente do grau de comprometimento imune do paciente.

A citocina considerada de padrão Th2, avaliada em nosso estudo foi a IL-4. A mesma atua como uma citocina pleiotrópica capaz de influenciar a diferenciação de células T, sendo sua secreção inicial responsável pela polarização para uma resposta imune tipo Th2. Essa citocina media a ativação e recrutamento do mastócitos, estimula a produção de anticorpos IgE através da diferenciação de células B. Adicionalmente, tem comprovado efeito inibitório na produção das citocinas pró-inflamatórias, é capaz de inibir a atividade citotóxica de macrófagos e a produção de NO. Essa citocina ainda predispõe a proliferação de células endoteliais e de fibroblastos, possuindo importante ação citotóxica contra tumores.

Os pacientes com SKC, SK-AIDS e SK/AIDS/HAART mostraram expressão de IL-4 no local das lesões, todavia, não houve diferenças significativas quanto a sua expressão entre os grupos. A identificação de IL-4 fazendo parte do microambiente inflamatório do SK seria, portanto, a representação local de uma resposta de tipo Th2 paralela e que reflete o comprometimento imune de base desses pacientes.

É sabido que pacientes com AIDS apresentam expressão predominante de IL-4 no sangue periférico e também “in situ” nos tecidos (Becker, 2004). Observamos, entretanto que no microambiente das lesões de SK ocorreu uma situação diversa daquela descrita no sangue periférico, pois verificamos haver nas lesões expressão concomitante de citocinas de padrão Th1.

Por outro lado, devemos ressaltar ainda que os pacientes com SKC apresentaram o mesmo padrão de expressão local de citocinas que os

---

indivíduos com SK-AIDS. Esse fato poderia sinalizar para o possível papel do HHV-8 no estabelecimento da resposta citocínica local.

Expressão do HHV-8/LANA no sítio das lesões de sarcoma de Kaposi

A infecção pelo HHV-8 é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do SK, independente da forma clínico-epidemiológica da doença (Ensoli *et al.*, 2001; Hengge *et al.*, 2002). Apesar do grande número de estudos em relação ao HHV-8, o papel desse herpesvírus na patogênese do SK não está ainda totalmente esclarecido (Ganem, 2006; Pyakurel *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que altos níveis de HHV-8 nas células mononucleares do sangue periférico que se correlacionam com o grau de imunossupressão apresentado pelos pacientes e com a progressão da lesão de SK. Os autores sugerem, então, que a alta carga viral do HHV-8 seria decorrente da diminuição da imunovigilância (Pellet *et al.*, 2001; Pellet *et al.*, 2002). O estudo mais recente sobre a associação da carga viral do HHV-8 e a progressão das lesões de SK-AIDS foi publicado por Nsubuga *et al.* (2008) os quais demonstraram que o aparecimento de novas lesões ocorreu concomitante o aumento da carga viral no sangue.

Pugliese *et al.*, (2002) observaram no sangue de indivíduos co-infectados HIV e HHV-8 que o grau de células positivas para o HHV-8 estava associado com a produção diminuída de IL-18.

Em nosso estudo através de avaliação quantitativa pudemos observar que as lesões de SKC apresentaram maior densidade de células infectadas pelo HHV-8/LANA quando comparadas às lesões de SK-AIDS e SK-AIDS/HAART. Esse dado poderia sugerir que a maior densidade de células infectadas pelo HHV8/LANA não estaria associada ao quadro de maior agressividade do sarcoma de Kaposi. Poder-se-ia ainda supor que a promoção do SKC em contraposição ao SK/AIDS poderia estar relacionada à alta virulência ou à maior densidade da expressão do HHV8 no tecido.

O resultado da alta expressão do HHV-8/LANA “in situ” nas lesões de SKC corrobora um recente estudo, o qual mostrou que a progressão do SKC esteve associada ao aumento da carga viral do HHV-8 no soro (Pellet *et al.*, 2006).

Foi também possível detectar em nossa avaliação que apenas dois casos de SK-AIDS/HAART foram negativos para o marcador LANA do HHV-8. Uma probabilidade seria que tal fato ocorreu em virtude de fixação inadequada do fragmento do tecido.

Em decorrência da HAART já foi demonstrado redução da incidência de casos de SK-AIDS assim como regressão parcial ou completa das lesões após o uso dessa terapia associada ou não à quimioterapia específica para o SK (Bihl *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2008).

Nosso estudo demonstrou que o uso de HAART determina diferenças marcantes no microambiente da lesão cutânea do SKC e SK associado a AIDS. Desse modo, possivelmente as diferenças quantitativas fenotípicas e citocínicas verificadas no sítio das lesões refletem um comportamento que

se relaciona a um padrão de melhor resposta imune, em especial nos indivíduos tratados com HAART.

A melhor compreensão da imunopatogênese do SK permitirá ao meio científico buscar novas opções terapêuticas para esse tumor que continua a ser o mais prevalente em indivíduos com AIDS.

Considerando-se os resultados da presente pesquisa pôde-se integrar o perfil da resposta imune tecidual “in situ” nos diferentes grupos de SK conforme demonstrado na página 109.

Resposta tecidual “in situ” em lesões de sarcoma de Kaposi

Fernanda Guedes Luiz

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1- Nas lesões teciduais “in situ” de sarcoma de Kaposi associada à AIDS ocorre diminuição da população de linfócitos TCD4+ quando comparada à observada no sarcoma de Kaposi clássico, o que deve refletir a severidade da imunodeficiência causada pelo HIV.

2- Não foi detectada diferença no número de linfócitos TCD8+ “in situ” nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi clássico e de sarcoma de Kaposi associado à AIDS submetidos ou não ao tratamento com HAART, indicando que essa população celular não se correlaciona com as respectivas formas clínico-epidemiológicas.

3- A população de macrófagos quantificada nas lesões de sarcoma de Kaposi clássico é maior que aquela observada no sarcoma de Kaposi associada à AIDS. Por outro lado, a terapia anti-retroviral combinada levou ao aumento dessas células nas lesões aproximando-as dos níveis encontrados no sarcoma de Kaposi clássico, provavelmente devido a recuperação imune parcial determinada pelo tratamento com HAART.

4- A avaliação quantitativa e qualitativa das células de Langerhans da epiderme nos pacientes com sarcoma de Kaposi clássico e nos controles normais não evidenciou diferença significativa, provavelmente revelando que o HHV8 não estaria influenciando diretamente o comportamento dessas células nos locais das lesões.

5- No local das lesões do sarcoma de Kaposi associado a AIDS verificaram-se alterações qualitativas acompanhadas de diminuição significativa das células de Langerhans da epiderme. Verificou-se ainda que o uso da terapia anti-retroviral combinada induz restauro e repopulação das células de Langerhans da epiderme.

6- A demonstração de hipertrofia e hiperplasia dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ nos diferentes sarcoma de Kaposi estudados quando comparados à sua expressão na pele normal aponta para a sua participação na imunopatogênese das lesões do sarcoma de Kaposi, independente da sua respectiva forma clínico-epidemiológica, inclusive após o uso de terapia antiretroviral combinada.

7- Comprovou-se originalmente que os dendrócitos dérmicos FXIIIa+ apresentam antígeno HHV8/LANA, fato observado através da reação imuno-histoquímica de dupla-marcação. Outrossim, a identificação de imunomarcação do HHV8/LANA nos núcleos dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ poderia sugerir as mesmas como células alvo para infecção pelo HHV8.

8- A apresentação de antígenos aferida pela expressão de células S100+ mostrou-se aumentada no sítio das lesões de sarcoma de Kaposi, cujo aumento é mantido nas mesmas proporções quando se considera o sarcoma de Kaposi clássico e associado a AIDS, tratado ou não com a terapia anti-retroviral combinada.

9- A partir da análise comparativa da população de células dendríticas S100+ e CD1a+ presentes na derme pudemos identificar um contingente particular de células **S100⁺ CD1a⁻** que estiveram aumentadas no sarcoma de Kaposi clássico e associado a AIDS (tratados ou não). Essas células diferem das células de Langerhans por não apresentar seu marcador específico e podem estar envolvidas na imunopatogênese do sarcoma de Kaposi, entretanto seu verdadeiro papel ainda necessitará ser definido.

10- A expressão local de IFN- γ nas lesões de pacientes com sarcoma de Kaposi clássico e no sarcoma de Kaposi associado à AIDS tratado com HAART é maior que aquela verificada nos pacientes AIDS. Assim sendo, a expressão dessa citocina nas lesões deve ser considerada como um indicador de resposta imune mais eficaz.

11- O comportamento similar da expressão “in situ” de TNF- α e IL-6 nos três grupos de sarcoma de Kaposi (clássico, associado a AIDS e associado a AIDS e tratado com HAART) deve refletir seu papel imunopatogênico (reativação do HHV-8, proliferação das células endoteliais, aumento das

---

moléculas de adesão endotelial, ação angiogênica), independente do grau de comprometimento imune do paciente.

12- A maior expressão de IL-1 β verificada no sarcoma de Kaposi clássico e SK-AIDS/HAART quando comparada àquela evidenciada nas lesões do sarcoma de Kaposi/AIDS pode estar relacionada ao efeito anti-tumoral dessa citocina, que seria expressa em menor quantidade nos casos mais agressivos do tumor.

13- Nas lesões de sarcoma de Kaposi, apesar da demonstração de expressão local de IFN- γ ocorreu concomitantemente expressão de IL-4 cuja quantificação foi similar nos três grupos de sarcoma estudados. A identificação de IL-4 estaria, portanto relacionada a uma resposta de tipo Th2 paralela que reflete o comprometimento imune de base dos pacientes.

14- A expressão aumentada do número de células HHV-8/LANA nas lesões de SK clássico comparado àquele das lesões de SK-AIDS, independente da HAART, poderia sugerir que a maior densidade de células infectadas pelo HHV8/LANA não estaria associada ao quadro de maior agressividade do sarcoma de Kaposi.

Anexos

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética

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 25.11.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **966/04**, intitulado: "Avaliação da resposta tecidual "in situ" do fenótipo e das citocinas em pacientes com sarcoma de Kaposi cutâneo na era pré e pós terapêutica anti-retroviral altamente ativa e a relação com a expressão do HHV-8" 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. Maria Irma Seixas Duarte**

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Fernanda Guedes Luiz**

CAPPesq, 25 de Novembro de 2004.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice - 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, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

ANEXO B – Análise quantitativa de células inflamatórias

Número de células por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi clássico

Casos	LT CD4+	LT CD8+	M CD68+	CL CD1a+ epidérmicas	CD1a+ dérmicas	S100+ dérmicas	S100+ CD1a ⁻ dérmicas	DD FXIIIa+
1	366,2	49,8	120,9	0,0156	0	161,8	161,8	172,4
2	199,1	23,1	24,9	0,0770	0	94,2	94,2	17,8
3	302,2	24,9	1,8	0,0360	1,8	76,4	74,6	87,1
4	168,9	328,9	19,5	0,1147	0	1,8	1,8	92,4
5	37,3	163,5	72,9	0,0616	0	46,2	46,2	94,2
6	302,2	170,7	33,8	0,1334	5,3	48,0	42,7	145,8
7	184,9	65,8	76,4	0,0160	0	87,1	87,1	94,2
8	359,1	295,1	199,1	0,2246	5,3	71,1	65,8	103,1
9	58,7	85,3	122,7	0,0962	0	10,7	10,7	279,1
10	427,0	23,1	0	0,2203	0	5,3	5,3	39,1
11	337,8	346,7	58,7	0,1697	7,1	39,1	32,0	101,3

LT = Linfócitos T   M = Macrófagos   CL = Células de Langerhans   DD = Dendrócitos dérmicos

Número de células por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS

Casos	LT CD4+	LT CD8+	M CD68+	CL CD1a+ epidérmicas	CD1a+ dérmicas	S100+ dérmicas	S100+ CD1a ⁻ dérmicas	DD FXIIIa+
1	67,5	58,7	10,7	0	0	0	0	0
2	224,0	192,0	0	0,0020	0	106,7	106,7	71,1
3	231,0	229,3	8,0	0,0475	0	113,8	113,8	53,3
4	3,6	906,7	40,9	0,0068	0	104,9	104,9	236,4
5	3,6	56,9	17,8	0,0433	0	26,7	26,7	19,5
6	7,1	7,1	1,8	0,0354	0	5,3	5,3	7,1
7	8,9	46,2	7,1	0,0120	0	44,4	44,4	42,7
8	24,9	382,2	3,5	0,0428	0	8,9	8,9	71,1
9	28,4	90,7	14,2	0,0239	1,8	16,0	14,2	51,5
10	69,3	483,5	10,7	0,0669	0	10,7	10,7	80,0
11	46,2	225,8	5,3	0,0222	0	12,4	12,4	40,9
12	17,8	158,2	0	0,0156	0	32,0	32,0	81,8
13	35,5	21,3	5,3	0,0134	0	62,2	62,2	184,9
14	51,5	104,9	14,2	0,0191	0	14,2	14,2	147,5
15	367,7	997,3	5,3	0,0603	5,3	74,7	69,4	104,9
16	115,6	1257,0	21,3	0,1535	3,5	80,0	76,5	174,2
17	30,2	208,0	62,2	0,0265	0	8,9	8,9	222,2
18	112,0	316,4	60,4	0,0737	0	37,3	37,3	23,1
19	67,5	202,7	0	0,0265	0	26,7	26,7	48,0
20	19,5	284,4	48,0	0,0931	1,8	28,4	26,6	149,3
21	60,0	360,0	10,7	0,0831	7,1	19,5	12,4	35,5
22	33,8	165,3	17,8	0,0382	0	5,3	5,3	87,1

LT = Linfócitos T   M = Macrófagos   CL = Células de Langerhans   DD = Dendrócitos dérmicos

Número de células por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS/HAART

Casos	LT CD4+	LT CD8+	M CD68+	CL CD1a+ epidérmicas	CD1a+ dérmicas	S100+ dérmicas	S100+ CD1a ⁻ dérmicas	DD FXIIIa+
1	144,0	318,2	81,8	0,1130	0	26,7	26,7	67,3
2	307,5	744,9	62,2	0,1506	1,8	56,9	55,1	94,2
3	56,9	216,9	1,8	0,1464	3,5	5,3	1,8	122,7
4	174,2	1326,0	26,7	0,0880	7,1	46,2	39,1	199,1
5	16,0	152,9	49,8	0,1573	0	3,5	3,5	279,1
6	8,9	309,3	32,0	0,1181	0	5,3	5,3	51,5
7	60,4	40,9	1,8	0,0551	0	5,3	5,3	21,3
8	302,2	236,4	154,7	0,0191	0	16,0	16,0	197,3
9	48,0	448,0	46,2	0,0790	5,3	44,4	39,1	184,9
10	567,1	229,0	37,3	0,1536	0	28,4	28,4	101,3
11	7,1	238,2	17,8	0,0092	0	5,3	5,3	24,9
12	445,5	554,7	76,4	0,1502	0	19,5	19,5	76,4
13	263,0	135,1	10,7	0,1814	0	17,8	17,8	17,8
14	10,7	49,8	1,8	0,0970	0	5,3	5,3	0
15	103,1	220,4	67,3	0,1884	12,4	16,0	3,6	0
16	146,0	144,0	1,8	0,1429	1,8	78,2	76,4	14,2
17	208,0	856,9	183,1	0,0520	1,8	46,2	44,4	78,9
18	12,4	112,0	60,4	0,1772	0	1,8	1,8	56,9
19	56,9	90,7	72,9	0,0307	3,5	1,8	1,7	72,9
20	62,2	216,9	17,8	0,0692	0	10,7	10,7	10,7
21	56,9	154,7	48,0	0,0208	1,8	12,4	10,6	48,0
22	76,4	35,5	1,7	0,0328	0	1,8	1,8	42,7
23	117,3	225,8	67,5	0,0726	0	28,4	28,4	101,3

LT = Linfócitos T M = Macrófagos CL = Células de Langerhans DD = Dendrócitos dérmicos

Número de células por mm² na pele normal

Casos	CL CD1a+ epidérmicas	CD1a+ dérmicas	S100+ dérmicas	S100+ CD1a ⁻ dérmicas	DD FXIIIa+
1	0,2474	1,8	1,8	0	43,6
2	0,0597	3,5	7,1	3,6	9,6
3	0,2230	0	8,9	8,9	32,0
4	0,1028	5,3	5,3	0	30,9
5	0,0815	0	0	0	21,3
6	0,1014	0	0	0	25,6
7	0,0325	0	0	0	0
8	0,0678	3,5	16,0	12,5	8,5
9	0,1691	0	0	0	1,8
10	0,0970	0	0	0	0

CL = Células de Langerhans DD = Dendrócitos dérmicos

ANEXO C – Análise quantitativa de células com expressão de citocinas e do HHV-8

Número de células com expressão de citocinas e do HHV-8 por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi clássico

Casos	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-6	HHV8/LANA
1	3,5	1,8	3,5	0	0	560,0
2	19,5	1,8	1,8	0	0	1233,8
3	10,7	8,9	0	3,5	0	154,7
4	0	28,4	0	10,7	17,8	154,7
5	12,4	10,7	0	3,5	12,4	462,2
6	21,3	17,8	19,5	1,8	3,5	1050,0
7	3,5	76,4	16,0	16,0	12,4	316,4
8	7,1	5,3	1,8	19,5	1,8	1880,9
9	23,1	8,9	0	5,3	16,0	2469,3
10	40,9	1,8	3,5	5,3	19,5	35,5
11	19,5	10,7	5,3	8,9	3,5	248,9

Número de células com expressão de citocinas e do HHV-8 por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS

Casos	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-6	HHV8/LANA
1	0	1,8	0	12,4	56,0	423,1
2	1,8	0	0	0	0	30,2
3	8,9	24,9	0	0	10,7	3,5
4	0	23,1	0	0	0	40,9
5	1,8	7,1	0	0	23,1	3,5
6	16,0	1,8	0	7,1	0	381,3
7	0	7,1	0	16,0	40,9	1,8
8	1,8	1,8	0	8,9	8,9	12,4
9	3,5	7,1	0	1,8	1,8	30,2
10	0	5,3	3,5	16,0	0	32,0
11	1,8	7,1	0	3,5	12,4	65,8
12	5,3	5,3	0	3,5	1,8	88,9
13	3,5	3,5	0	3,5	30,2	0
14	5,3	8,9	0	0	26,7	26,7
15	3,5	10,7	0	1,8	16,0	69,3
16	14,2	42,7	3,5	12,4	8,9	122,7
17	10,7	0	0	3,5	49,9	263,1
18	0	33,8	0	5,3	3,5	18,3
19	0	21,3	0	3,5	0	19,5
20	8,9	5,3	0	5,3	19,5	8,9
21	1,8	6	0	10,7	1,8	67,5
22	21,3	10,7	3,5	1,8	14,2	10,7

Número de células com expressão de citocinas e do HHV-8 por mm² em lesões de sarcoma de Kaposi associado à AIDS/HAART

Casos	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-6	HHV8/LANA
1	10,7	5,3	17,8	23,1	12,4	48,0
2	1,8	3,5	7,1	7,1	5,3	0
3	7,1	7,1	0	1,8	19,5	7,1
4	14,2	44,4	7,1	26,7	8,9	87,1
5	17,8	39,1	3,5	8,9	7,1	414,0
6	5,3	16,0	5,3	1,8	3,5	113,8
7	53,3	32,0	0	1,8	24,9	44,4
8	33,8	0	5,3	1,8	40,9	218,7
9	42,7	12,4	35,5	0	1,8	74,7
10	12,4	19,5	0	17,8	19,5	1,8
11	7,1	1,8	0	1,8	49,8	28,4
12	14,2	32,0	1,8	7,1	3,5	65,8
13	3,5	24,9	0	0	0	0
14	0	0	0	0	3,5	0
15	8,9	0	17,8	10,7	1,8	0
16	7,1	21,3	8,9	1,8	1,8	0
17	8,9	24,9	16,0	39,1	10,7	2113,8
18	16,0	5,3	10,7	0	8,9	10,7
19	17,8	60,4	5,3	3,5	5,3	2026,7
20	0	0	0	1,8	21,3	273,8
21	14,2	1,8	0	1,8	1,8	199,1
22	17,8	24,9	1,8	0	42,7	97,8
23	40,9	65,8	3,5	1,8	0	12,4

ANEXO D – Dados estatísticos de células inflamatórias e células HHV8-LANA+

Comparação do número de linfócitos T CD4+/mm² em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	249,40 ± 128,50 37,30 – 427,00 302,20	1 x 2 x 3	* p = 0,0022
2. SK-AIDS (22)	73,89 ± 90,61 3,60 – 367,70 40,85	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p<0,01 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	141,30 ± 148,00 7,10 – 567,10 76,40		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de linfócitos T CD8+/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	143,40 ± 126,90 23,10 – 346,70 85,30	1 x 2 x 3	* p = 0,1987
2. SK-AIDS (22)	307,00 ± 332,30 7,10 – 1257,00 205,40	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	306,80 ± 305,90 35,50 – 1326,00 220,40		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de macrófagos CD68+/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. SKC (11)	66,43 ± 61,25 0,00 – 199,10 58,70	1 x 2 x 3 * p = 0,0073
2. SK-AIDS (22)	16,60 ± 18,87 0,00 – 62,20 10,70	1 x 2 ** p<0,05 1 x 3 ** p>0,05 2 x 3 ** p<0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	48,76 ± 46,72 1,70 – 183,10 46,20	

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células de Langerhans/fração de área epidérmica nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. SKC (11)	0,1059 ± 0,0749 0,0156 – 0,2246 0,0962	1 x 2 x 3 x 4 * p = 0,0007
2. SK-AIDS (22)	0,0412 ± 0,0362 0,0000 – 0,1535 0,0310	1 x 2 ** p<0,05 1 x 3 ** p>0,05 2 x 3 ** p<0,01
3. SK-AIDS/HAART (23)	0,1002 ± 0,0577 0,0092 – 0,1884 0,0970	
4. Controle (10)	0,1182 ± 0,0714 0,0325 – 0,2474 0,0992	1 x 4 ** p>0,05 2 x 4 ** p<0,01 3 x 4 ** p>0,05

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células dérmicas CD1a+/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	1,77 ± 2,74 0,00 – 7,10 0,00	1 x 2 x 3 x 4	* p =0,6340
2. SK-AIDS (22)	0,89 ± 1,95 0,00 – 7,10 0,00	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	1,85 ± 3,22 0,00 – 12,40 0,00		
4. Controle (10)	1,41 ± 2,00 0,00 – 5,30 0,00	1 x 4 2 x 4 3 x 4	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de dendrócitos dérmicos FXIIIa+/mm² nas lesões cutâneas de Sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	111,50 ± 69,81 17,80 – 279,10 94,20	1 x 2 x 3 x 4	* p = 0,0015
2. SK-AIDS (22)	87,82 ± 68,82 0,00 – 236,40 71,10	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0.05 ** p>0.05 ** p>0.05
3. SK-AIDS/HAART (23)	81,02 ± 73,16 0,00 – 279,10 67,30		
4. Controle (10)	17,33 ± 15,48 0,00 – 43,60 15,47	1 x 4 2 x 4 3 x 4	** p<0,01 ** p<0,01 ** p<0,05

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células dérmicas S100+/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	58,34 ± 47,13 1,80 – 161,80 48,00	1 x 2 x 3 x 4	* p = 0,0002
2. SK-AIDS (22)	38,14 ± 35,94 0,00 – 113,8 26,70	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	21,32 ± 20,43 1,80 – 78,20 16,00		
4. Controle (10)	3,91 ± 5,42 0,00 – 16,00 0,90	1 x 4 2 x 4 3 x 4	** p<0,001 ** p<0,01 ** p<0,05

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células dérmicas S100⁺CD1a⁺/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	56,56 ± 47,40 1,80 – 161,80 46,20	1 x 2 x 3 x 4	* p <0,0001
2. SK-AIDS (22)	37,25 ± 35,80 0,00 – 113,8 26,65	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	19,47 ± 20,05 1,80 – 76,40 10,70		
4. Controle (10)	2,5 ± 4,54 0,00 – 12,50 0	1 x 4 2 x 4 3 x 4	** p<0,001 ** p<0,001 ** p<0,05

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células positivas para HHV8-LANA/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	778,80 ± 795,40 35,50 – 2469,00 462,20	1 x 2 x 3	* p = 0,0006
2. SK-AIDS (22)	78,20 ± 119,90 0,00 – 423,10 30,20	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p<0,001 ** p<0,01 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	278,0 ± 605,5 0,00 – 2114,00 65,8		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

ANEXO E – Dados estatísticos das células com expressão de citocinas

Comparação do número de células com expressão de IFN- γ /mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média $\pm$ DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	14,68 $\pm$ 11,80 0,00 – 40,90 12,40	1 x 2 x 3	* p = 0,0023
2. SK-AIDS (22)	5,01 $\pm$ 5,95 0,00 – 21,30 2,65	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p<0,05 ** p>0,05 ** p<0,01
3. SK-AIDS/HAART (23)	15,46 $\pm$ 14,17 0,00 – 53,30 12,40		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células com expressão de TNF- α /mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média $\pm$ DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	15,68 $\pm$ 21,63 1,80 – 76,40 8,90	1 x 2 x 3	* p = 0,5551
2. SK-AIDS (22)	10,70 $\pm$ 11,36 0,00 – 42,70 7,10	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	19,23 $\pm$ 19,36 0,00 – 65,80 16,00		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células com expressão de IL-1 β /mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média $\pm$ DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. SKC (11)	4,67 $\pm$ 6,75 0,00 – 19,50 1,80	1 x 2 x 3 * p = 0,0007
2. SK-AIDS (22)	0,48 $\pm$ 1,23 0,00 – 3,50 0	1 x 2 ** p<0,05 1 x 3 ** p>0,05 2 x 3 ** p<0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	6,41 $\pm$ 8,57 0,00 – 35,50 3,50	

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

*Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células com expressão de IL-4/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média $\pm$ DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos
1. SKC (11)	6,77 $\pm$ 6,40 0,00 – 19,50 5,30	1 x 2 x 3 * p = 0,6716
2. SK-AIDS (22)	5,32 $\pm$ 5,20 0,00 – 16,00 3,50	1 x 2 ** p>0,05 1 x 3 ** p>0,05 2 x 3 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	6,97 $\pm$ 10,25 0,00 – 39,10 1,8	

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

*Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Comparação do número de células com expressão de IL-6/mm² nas lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi

Grupos	Média ± DP Variância Mediana	Comparação entre os grupos	
1. SKC (11)	7,90 ± 7,76 0,00 – 19,50 3,50	1 x 2 x 3	* p = 0,6527
2. SK-AIDS (22)	16,97 ± 24,88 0,00 – 112,00 9,80	1 x 2 1 x 3 2 x 3	** p>0,05 ** p>0,05 ** p>0,05
3. SK-AIDS/HAART (23)	12,82 ± 14,48 0,00 – 49,80 7,10		

SKC – sarcoma de Kaposi clássico; SK-AIDS – sarcoma de Kaposi associado à AIDS; SK-AIDS/HAART – sarcoma de Kaposi associado à AIDS com HAART.

* Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de comparação múltipla de Dunn

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrecht H, Stellbrink HJ, Gross G, Berg B, Helmchen V, Mensing H. Treatment of typical leishmaniasis with interferon- γ resulting in progression of Kaposi's sarcoma in a AIDS patient. *Clin Investigator* 1994;72:1041.

Ackerman AB. Subtle clues to diagnosis by conventional microscopy: the patch stage of Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol.* 1979;1(2):165-72.

Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4):211-22.

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

Angel CE, Lala A, Chen CJ, Edgar SG, Ostrovsky LL, Dunbar PR. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int Immunol* 2007;19(11):1271-9.

Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 2000;342(14):1027-38.

Aoki Y, Tosato G. HIV-1 Tat enhances Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood* 2004;104:810-814.

Aoki Y, Tosato G. Interactions between HIV-1 Tat and KSHV. *CTMI* 2006;312:309-326.

Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008;214(2):231-41.

Assadullah K, Sterry W, Trefzer U. Cytokines:interleukin and interferon therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:578-84.

Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H. Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis.* 2006;193(6):773-82.

Babal P, Péc J. Kaposi's sarcoma – still an enigma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17(4):377-80.

Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 1999;284(5414):641-4.

Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):310-26.

Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(17):7941-5.

Barillari G, Sgadari C, Fiorelli V, Samaniego F, Colombini S, Manzani V, Modesti A, Nair BC, Cafaro A, Stürzl M, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 1999;94(2):663-72.

Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, et al. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003;187:26-37.

Becker Y. The Changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers – a review and hypothesis. *Virus Genes* 2004;28:5-18.

Bedani PL, Risichella IS, Strumia R, Cavazzinni L, Gilli P, Calastrani C, Verzola A, Stabellini G. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients: pathogenetic relation between the reduced density of Langerhans cells and cyclosporina-A therapy. *J Nephrol* 1999;12(3):193-6.

Belardelli F, Ferrantini M, et al. Interleukin-1 β induces tumor necrosis and early morphology and metabolic changes in transplantable mouse tumors. Similarities with the anti-tumor effects of tumor necrosis factor α or β . *Int J Cancer* 1989;44:116-123.

Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in Immunology* 2002;23(4):201-207.

Benfield TL, Kirk O, Elbrond B, Pedersen C. Complete histological regression of Kaposi's sarcoma following treatment with protease inhibitors despite persistence of HHV-8 in lesions. *Scand J Infect Dis* 1998;30(6):613-5.

Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 1990;335(8682):123-8.

Bieber T, Ring J, Braun-Falco O. Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. *Br J Dermatol.* 1988;118(3):385-92.

Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 2000;181(5):1562-8.

Bihl F, Mosam A, Henry LN, Chisholm JV, Dollard S, Gumbi P, Cassol E, Page T, Mueller N, Kiepiela P, Martin JN, Coovadia HM, Scadden DT, Brander C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific immune reconstitution and antiviral effect of combined HAART/chemotherapy in HIV clade C-infected individuals with Kaposi's sarcoma. *AIDS* 2007;21(10):1245-52.

Blumenfeld W, Egbert BM, Sagebiel RW. Differential diagnosis of Kaposi 's sarcoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1985;109(2):123-7.

Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. 1989; 125(1-2): 279-85.

Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5):373-82.

Braathén LR, Ramirez G, Kunze RO, Mork C, Strand O. Latent infection of epidermal Langerhans cells in HIV-positive individuals. *Res Virol*. 1991; 142(2-3):119-21.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 2008. Disponível na Internet <<http://www.aids.gov.br>>

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

Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 2008; 27 [Epub ahead of print]

Carcelain G, Debré P, Autran B, Reconstitution of CD4+ lymphocytes in HIV-infected individuals following antiretroviral therapy. *Curr Opin Immunol* 2001;13:483-8.

Carroll PA, Brazeau E, Lagunoff M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of blood endothelial cells induces lymphatic differentiation. *Virology* 2004;328(1):7-18.

Caterino-De-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Carbone PH, Cibella SE, Moreira AA. Human herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies in women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Braz J Infect Dis* 2003;7(6):395-401.

Cathomas G. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus. *Herpes* 2003;10(3):72-7.

Cattelan AM, Calabro ML, Aversa SM, Zanchetta M, Meneghetti F, De-Rossi AA, Chieco-Bianchi L. Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma regression after highly active antiretroviral therapy: biological correlates of clinical outcome. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;28:44-49.

Cavaillon JM. Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms. *Pathol Biol* 1993;41(8):799-811.

Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol*. 1989;121(4):421-31.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332(18):1186-91.

Cesarman E. Kaposi's sarcoma – Associated herpesvirus – The high cost of viral survival. *N Engl J Med*. 2003;349(12):1107-9.

Chang J, Renne R, Dittmer D, Ganem D. Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology* 2000;266(1):17-25.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266(5192):1865-9.

Chor PJ, Santa Cruz DJ. Kaposi's sarcoma – A clinicopathologic review and differential diagnosis. *J Cutan Pathol*. 1992;19(1):6-20.

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;97:8051-54.

Coscoy L, Ganem D. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell co stimulation. *J Clin Invest* 2001;107:1599-1606.

Crowe S, Zhu T, Muller WA. The contribution of monocytes infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leuk Biol* 2003;74:635-41.

Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Induction by tumour necrosis factor- α of dose-related changes in Langerhans cell frequency in mice. *Arch Dermatol Res* 1999;291:453-8.

Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CEM, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* 2003;25:413-18.

Decker LL, Shankar P, Khan G, Freeman RB, Dezube BJ, Lieberman J, Thorley-Lawson DA. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear of KS patients. *J Exp Med* 1996;184:283-288.

De Mililo A, Catucci M, Venturi G, Romano L, Incandela L, Valensin PE, Zazzi M. Antiretroviral therapy with protease inhibitors in human immunodeficiency virus type 1- and human herpesvirus 8-coinfected patients. *J Med Virol* 1999;57:140-4.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87(6):2095-147.

Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, et al. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001;98:2574-76.

Donaghy H, Stebbing J, Patterson S. Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:1-6.

Douglas JL, Gustin JK, Dezube BJ, Pantanowitz L, Moses V. Kaposi's sarcoma: a model of both malignancy and chronic inflammation. *Panminerva Med.* 2007;49(3):119-39.

D'Souza MP, Fauci AS. Immunopathogenesis – In: Merigan TC, Bartlett JG, Bolognesi D. *Textbook of AIDS Medicine*, 2ªed. Editora Williams&Wilkins, USA 1999;59-85.

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

Dupin N, Diss TL, Kellam P, Tulliez M, Du MO, Sicard D, Weiss RA, Isaacson PG, Boshoff C. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 2000;95(4):1406-12

Duprez R, Lacoste V, Brière J, Couppié P, Frances C, Sainte-Marie D, Kassa-Kelembho E, Lando MJ, Oyono JLE, Nkegoum B, Hbid O, Mahé A, Lebbé C, Tortevoeye P, Huerre M, Gessain A. Evidence for a multiclonal

origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:1088-94.

Engels EA, Biggar RJ, Marshall VA et al. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* 2003;17:1847-51.

Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 2000;21(2):73-8.

Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 1993;67(1):277-87.

Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001;37(10):1251-69.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611.

Fautrel B, Cherin P. Value of anti-TNF-alpha molecules in inflammatory and infectious diseases. *Rev Med Interne* 2000;21(10):872-88.

Feller J, Lemmer J. Insights into pathogenic events of HIV-associated Kaposi sarcoma and immune reconstitution syndrome related Kaposi sarcoma. *Infect Agent Cancer* 2008; 21:3:1.

Fichtelius KE, Groth O, Lidén S. The skin, a first level lymphoid organ? *Int Arch Allergy* 1970;37:607-20.

Fiorelli V, Gendelman R, Sirianni MC, Chang HK, Colombini S, Markham PD, Monini P, Sonnabend J, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. gamma-interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 1998;91(3):956-67.

Fiorelli V, Barillari G, Toschi E, Sgadari C, Monini P, Stürzl M, Ensoli B. IFN-gamma induces endothelial cells to proliferative and to invade the extracellular matrix in response to the HIV-1 Tat protein: implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Immunol* 1999;162(2):1165-70.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;67:1-25.

Friedman-Birnbaum R, Weltfriend S, Katz I. Kaposi's sarcoma: retrospective study of 67 cases with the classical form. *Dermatologica* 1990;180(1):13-7.

Friedman-Kien AE. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol* 1981;5(4):468-71.

Gallafent JH, Buskin SE, De Turk PB, Aboulafia DM. Profile of patients with Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol*. 2005;23(6):1253-60.

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

Geraminejad P, Memar O, Aronson I, Rady PL, Hengge U, Tying SK. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(5):641-55.

Gessain A, Duprez R. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(12):2457-65.

Gibellini D, Re MC, Vitone F, Rizzo N, Maldini C, La Placa M, Zauli G. Selective up-regulation of functional CXCR-4 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, Calvez V, Gotch F, Boshoff C, Gazzard B. 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.

Gill PS, Tsai YC, Rao AP, Spruck CH, Zheng T, Harrington WA, Cheung T, Jr, Nathwani B, Jones PS. Evidence for multiclonality in multicentric Kaposi's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8257-61.

Gill PS. The origin of Kaposi sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 2007;10:1063.

Grassi F, Hosmalin A, McIlroy D, *et al.* Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS* 1999;13:759-66.

Gray MH, Trimble CL, Zirn J, McNutt NS, Smoller BR, Varghese M. Relationship of factor XIIIa-positive dermal dendrocytes to Kaposi's sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115(8):791-6.

Guedes F, Andrade Jr 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(4):839-46.

Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptative immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.

Guihot A, Dupin N, Marcelin AG, *et al.* Low T cell responses to human herpesvirus 8 in patients with AIDS-related and classic Kaposi sarcoma. *J Infect Dis* 2006;194:1078-88.

Harrington WJ Jr, Bagasra O, Sosa CE, Bobroski LE, Baum M, Wen XL. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in cell-free plasma and mononuclear cells of Kaposi's sarcoma patients. *J Infect Dis.* 1996;174:1101-5.

Headington JT. The dermal dendrocytes. *Adv Dermatol* 1986;1:159-71.

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*. 2002a; 2(5):281-92.

Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis*. 2002b;2(6):344-52.

Henry M, Uthman A, Geusau A, Rieger A, Furci L, Lazzarin A. Infection of circulating CD34+ cells by HHV-8 in patients with Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 1999;113:613-6.

Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerath JD, Detmar M. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* 2004;36(7):683-85.

Huang LM, Chao 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(16):13427-32.

Hussein MR. Immunohistological evaluation of immune cell infiltrate in cutaneous Kaposi's sarcoma. *Cell Biol Int* 2008;32(1):157-62.

Ishak Mde O, Martins RN, Machado PR, de Souza LL, Machado LF, Azevedo VN, Katano H, Sata T, Hasegawa H, Vallinoto AC, Ishak R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: evidence of an human infection. *J Med Virol* 2007;79(10):1537-44.

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

Jonuleit H et al. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 1996;289:1-8.

Kadowaki N. Dendritic cells – a conductor of T cell differentiation. *Allergology Inter* 2007;56:193-99.

Kanitakis J, Roca-Miralles M. Factor-XIIIa-expressing dermal dendrocytes in Kaposi's sarcoma. A comparison between classical and immunosuppression-associated types. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(3):227-31.

Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* 2000;269(2):335-44.

Kaufmann GR, Zaunders J, Cooper DA. Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy. *Sex Transm Inf*. 1999;75:218-24.

Kedes DH, Ganem D. Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. *J Clin Invest* 1997;99:2082-6.

Koch S, Kohl K, Klein E, Bubnoff DV, Bieber T. Skin homing of Langerhans cell precursors: Adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:163-8.

Krigel RL, Odajnyk CM, Laubenstein LJ, et al. Therapeutic trial of interferon-gamma in patients with epidemic Kaposi's sarcoma. *J Biol Response Mod* 1985;4:358-64.

Krown SE. Highly active antiretroviral therapy in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: Implications for the design of therapeutic trials in patients with advanced, symptomatic Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):399-402.

Kumar D, Sanchez RL, Kumar S. Dendrocyte population in cutaneous and extracutaneous Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* 1992;14(4):298-303.

Lambert M, Gannagé M, Karras A, Abel M, Legendre C, Kerob D, Agbalika F, Girard PM, Lebbe C, Caillat-Zucman S. Differences in the frequency and function of HHV-8-specific CD8 T cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi sarcoma. *Blood* 2006;108:3871-80.

Langford A, Ruf B, Kunze R, Pohle HD, Reichart P. Regression of oral Kaposi's sarcoma in a case of AIDS on zidovudine (AZT). *Br J Dermatol* 1989;120:709-13.

Larregina AT, Falo LD. Changing paradigmas in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *JID* 2005;124:1-12.

Leão JC, Kumar N, McLean KA, Porter SR, Scully CM, Swan AV, Teo CG. Effect of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors on the clearance of human herpesvirus 8 from blood of human immunodeficiency virus-1-infected patients. *J Med Virol* 2000;62:416-20.

Leão JC, Caterino-De-Araújo A, Porter SR, Scully C. Human herpesvirus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2002;57(4):175-86.

Loré K, Larsson M. The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. *APMIS* 2003;111(7-8):776-88.

Marining C, Fiorini G, Boneschi V, Melotti E, Brambilla L. Immunologic and immunogenetic features of primary Kaposi's sarcoma. *Cancer* 1985;55:1899-1901.

Martinez V, Caumes E, Gambotti L, Ittah H, Morini JP, Deleuze J, Gorin I, Katlama C, Bricaire F, Dupin N. Remission from Kaposi's sarcoma on HAART is associated with suppression of HIV replication and is independent of protease inhibitor therapy. *Br J Cancer* 2006;84(7):1000-6.

McNutt NS. The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cut Pathol*. 1998;25:521-29.

- Mercader M, Taddeo B, Panella JR, Chandran B, Nickoloff BJ, Foreman KE. Induction of HHV-8 lytic cycle replication by inflammatory cytokines produced by HIV-1-infected T cells. *Am J Pathol* 2000;156(6):1961-71.
- Miettinen M, Paljakka P, Haveri P, Saxén E. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A nodal and extranodal proliferation of S100 protein positive histiocytes? *Am J Clin Pathol* 1987;88:270-7.
- Moll H. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. *Immunol Lett* 2003;85(2):153-7.
- Moore PS, Chang Y. Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:499-516.
- Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. *Natl Rev Cancer* 2004; 4(11):861-75.
- Morelli A, Hackstein H, Thomson AW. Potential tolerogenic dendritic cells for transplantation. *Sem Immunol* 2001;13:323-35.
- 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 Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 2005;33(1):52-9.

Nasti G, Martellotta F, Beretta M, Mena M, Fasan M, Di Pierri G, Talamini R, Pagano G, Montroni M, Cinelli R, Vaccher E, D'Arminio Monforte A. Impact of highly active antiretroviral therapy on the presenting features and outcome of patients with acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma. *Cancer* 2003;98(11):2440-6.

National Institute of Health. Disponível na Internet <http://www.aidsinfo.nih.gov/> [Outubro, 2003].

Nestle FO, Filgueira L, Nickoloff BJ, Burg G. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol* 1998;110:762-6.

Nestle FO, Nickoloff BJ. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. *J Clin Invest* 2007;117(9):2382-5.

Nickoloff BJ, Griffiths CE. The spindle-shaped cells in cutaneous Kaposi's sarcoma: Histologic simulators include factor XIIIa dermal dendrocytes. *Am J Pathol.* 1989a;135(5):793-800.

Nickoloff BJ, Griffiths CE. Factor XIIIa-expressing dermal dendrocytes in AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma. *Science* 1989b; 243(4899): 1736-7.

Nguyen HQ, Magaret AS, Kitahata MM, Rompaey SEV, Wald A, Casper C. Persistent Kaposi sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy: characterizing the predictors of clinical response. *AIDS* 2008;22:937-45.

Nsubuga MM, Biggar RJ, Combs S, Vickie M, Mbisa G, Kambugu F, Mehta M, Biryahwaho B, Rabkin CS, Whitby D, Mbulaiteye, Human herpesvirus 8 load and progression of AIDS-related Kaposi sarcoma lesions. *Cancer Letters* 2008;263(2):182-8.

Nunez M, Machuca A, Soriano V, Podzamczar D, González-Lahoz J. Clearance of human herpesvirus type 8 viraemia in HIV-1 positive patients with Kaposi's sarcoma treated with liposomal doxorubicin. *AIDS* 2000;14(8):913-9.

Old LJ. Tumor necrosis factor. *Sci Am* 1988;258:59-75.

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

Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Med Mycol.* 2002; 40(4): 407-10.

Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *The Am J Dermatopathol* 2003;25(2):107-12.

Pak F, Mwakigonja AR, Kokhaei P, Hosseinzadeh N, Pyakurel P, Kaaya E, Bogdanovic G, Selivanova G, Biberfeld P. Kaposi's sarcoma herpesvirus load in biopsies of cutaneous and oral Kaposi's sarcoma lesions. *Eur J Cancer* 2007;43(12):1877-82.

Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-57.

Parravacini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, Chang Y. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol*. 2000;156(3):743-9.

Pellet C, Chevret S, Blum I, *et al*. Virologic and immunologic parameters that predict clinical response of AIDS-associated Kaposi's sarcoma to highly active antiretroviral therapy. *J Invest Dermatol* 2001;117:858-63.

Pellet C, Chevret S, Frances C *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus load in posttransplantation Kaposi sarcoma. *J Infect Dis* 2002;186:110-13.

Pellet C, Delphine K, Dupuy A, *et al*. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viremia is associated with the progression of classic and endemic Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 2006;126:621-7.

Perez A, Sanchez JL, Almodovar PI. Kaposi's sarcoma is not a neoplasm let alone a sarcoma. *Int J Dermatol*. 2003;42:844-5.

Pozharskaya VP, Weakland LL, Offermann MK. Inhibition of infectious human herpesvirus 8 production by gamma interferon and alpha interferon in BCBL-1 cells. *J Gen Virol* 2004;85(Pt10):2779-87.

Pugliese A, Torre D, Saini A, et al. Cytokine detection in HIV-1/HHV-8 co-infected subjects. *Cell Biochem Funct* 2002;20:191-4.

Pyakurel P, Massambu C, Castaños-Vélez E, Ericsson S, Kaaya E, Biberfeld P, Heiden T. Human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma herpesvirus cell association during evolution of Kaposi sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004 ;36(2) :678-83.

Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Biberfeld P. KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect Agent Cancer* 2007; 2:4.

Qunibi W, Akhtar M, Sheth K, Ginn HE, Al-Furayh O, DeVol EB, Taher S. Kaposi's sarcoma: the most common tumor after renal transplantation in Saudi Arabia. *Am J Med*. 1988;84(2):225-32.

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(5):794-802.

Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR, Piazza P, Jais M, Borowski L, Rinaldo CR Jr. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 2006;176(3):1741-9.

Rarick MU. Treatment of epidemic Kaposi's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine and bleomycin) and zidovudine. *Ann Oncol* 1990;1:147-49.

Raz E. Organ-specific regulation of innate immunity. *Nat Immunol.* 2007;8(1):3-4.

Reid CD, Fryer PR, Clifford C, Kirk A, Tikerpae J, Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* 1990;76(6):1139-49.

Rezaee SA, Cunningham C, Davison AJ, Blackbourn DJ. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 7):1781-804.

Robin YM, Guillou L, Michels JJ, Coindre JM. Human Herpesvirus 8 immunostaining: a sensitive and specific method for diagnosing Kaposi sarcoma in paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(3):330-4.

Romani N, Schuler G, Fritsch P. Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In *Epidermal Langerhans cells*. Schuler G Editor. CRC Press. Inc. Boca Raton. FL.USA. 1991;Chapter 3:49-86.

Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells – dendritic cells on the epidermis. *APMIS* 2003;111:725-40.

Rosai J. *Surgical Pathology*. Philadelphia: Mosby; 2004.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chien J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequences of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;14862-7.

Safai B., Johnson KG, Myskowski PL, Koziner B, Yang SY, Cunningham-Rundles S, Godbold JH, Dupont B. *Ann NY Acad Sci* 1985;103(5):744-50.

Sarmati L. HHV-8 infection in African children. *Herpes* 2004;11(2):50-3.

Schulz TF. Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *Adv Cancer Res* 1999;76:121-60.

Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 2006;208(2):187-98.

Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Korner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 2000;21:110-13.

Sempere JM, Soriano V, Benito JM. T regulatory cells and HIV infection. *AIDS Rev.* 2007;9(1):54-60.

Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.* 2003;4(9):537-47.

Silberberg-Sinakin I, Gigli I, Baer RE, Thorbecke GJ. Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and macrophages. *Immunol Rev* 1980;53:203-32.

Smith PD, Ohura K, Masur H, Lane HC, Fauci AS, Wahl SM. Monocyte function in the acquired immune deficiency syndrome – defective chemotaxis. *J Clin Invest* 1984;74:2121-28.

Sotto MN, De Brito T, Silva AM, Vidal M, Castro LG. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*. 2004;31(1):14-8.

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

Stebbing J, Portsmouth S, Gazzard B. How does HAART lead to the resolution of Kaposi's sarcoma? *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(5):1095-8.

Stebbing J, Sanitt A, Nelson M, Powles T, Gazzard B, Bower M. A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2006;367(9521):1495-502.

Sternbach G, Varon J. Moritz Kaposi: idiopathic pigmented sarcoma of the skin. *J Emerg Med* 1995;13(5):671-4.

Streilein JW. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *J Invest Dermatol* 1978;71:167-71.

Streilein JW. Skin associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol* 1983;93:12S-16S.

Stürzl M, Brandstetter H, Roth WK. Kaposi's sarcoma: a review of gene expression and ultrastructure of KS spindle cells *in vivo*. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992;8:1753-63.

Stürzl M, Blasig C, Schreier A, Neipel F, Hohenadl C, Cornali E, Ascherl G, Esser S, Brockmeyer NH, Ekman M, Kaaya EE, Tschachler E, Biberfeld P. Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classic and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 1997;72:68-71.

Tang A, Amagani M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993;361:82-5.

Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Acuña L, Mosca W. Epidermal Langerhans cells in infectious diseases. *Histol Histopathol* 1989;4:499-508.

Taylor JF, Templeton AC, Vogel CL, Ziegler JL, Kyalwazi SK. Kaposi's sarcoma in Uganda: a clinico-pathological study. *Int J Cancer* 1971;8(1):122-35.

Torre-Cisneros J, Pozo F, Serrano R, Vidal E, Rivero A, Tenorio A. Patterns of lymphotropic herpesvirus viraemia in HIV-infected patients with Kaposi's sarcoma treated with highly active antiretroviral therapy and liposomal daunorubicin. *AIDS* 2000;14(14): 2215-7.

Torre D, Speranza F, Martegani R. Impact of highly active antiretroviral therapy on organ-specific manifestations of HIV-1 infection. *HIV Med.* 2005;6(2):66-78.

Touloumi G, Hatzakis A, Potouridou I, Milona I, Strarigos J, Katsambas A, Giraldo G, Giraldo EB, Biggar RJ, Mueller N, Trichopoulos D. The role of immunosuppression and immune-activation in classic Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 1999;82:817-21.

Trento E, Castilletti C, Ferraro C, Lesnoni La Parola I, Mussi A, Muscardin L, Bordignon V, D'Agosto G, Amantea A, Mastroianni A, Ameglio F, Fluhr J, Cordiali-Fei P. Human herpesvirus 8 infection in patients with cutaneous lymphoproliferative diseases. *Arch Dermatol* 2005;141(10):1235-42.

Tschachler E, Groh V, Popovic M, Mann DL, Konrad K, Safai B, Eron L, diMarzo Veronese F, Wolff K, Stingl G. Epidermal Langerhans cells- a target for HTLV-III/LAV infection. *J Invest Dermatol.* 1987;88(2):233-7.

Valcuende-Cavero F, Febrer-Bosch MI, Castells-Rodellas A. Langerhans' cells and lymphocytic infiltrate in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: An immunohistochemical study. *Acta Derm Venereol.* 1994;74(3):183-7.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C. Langerin, a novel c-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000;12:71-81.

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

Vanni T, Sprinz E, Machado MW, Santana RC, Fonseca BAL, Schwartzmann G. Systemic treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma: Current status and perspectives. *Cancer Treat Rev*. 2006;32(6):445-55.

Von Roen KH. Clinical presentations and standard therapy of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(3):747-62.

Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Makinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 2004;36(7):687-93.

Weninger W, Partanen TA, Breiteneder-Geleff S, Mayer C, Kowalski H, Mildner M, Pammer J, Stürzl M, Keriaschki D, Alitalo K, Tschachler E. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 1999;79(2):243-51.

Wu W, Vieira J, Fiore N, Banerjee P, Sieburg M, Rochford R, Harrington W Jr, Feuer G. KSHV/HHV-8 infection of human hematopoietic progenitor (CD34+) cells: persistence of infection during hematopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 2006;108(1):141-51.

Yao L, Salvucci O, Cardones AR, Hwang ST, Aoki Y, De La Luz Sierra M, Sajewicz A, Pittaluga S, Yarchoan R, Tosato G. Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis. *Blood* 2003;102:3900-05.

Yarchoan R, Pluda JM, Wyvill KM, Aleman K, Rodriguez-Chavez IR, Tosato G, Catanzaro AT, Steinberg SM, Little RF. Treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoms with interleukin-12: rationale and preliminary evidence of clinical activity. *Crit Rev Immunol* 2007;27(5):401-14.

Yong-Jun L. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptative immunity. *Cell* 2001;106:259-62.

Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, Chen X, Tang Q, Lv Z, Zhang L, Lu C. 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(5):2401-17.