

JAILA DIAS BORGES

**Estudo epidemiológico da infecção por herpesvírus 8 humano  
(HHV-8) em população indígena da Amazônia brasileira**

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

Área de concentração: Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

São Paulo  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borges, Jaila Dias

Estudo epidemiológico da infecção por herpesvírus 8 humano (HHV-8)  
em população indígena da Amazônia brasileira / Jaila Dias Borges. --  
São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Cláudio Sérgio Pannuti.

Descritores: 1.Herpessvirus humano 8 2.Estudos soroe epidemiológicos

3.Epidemiologia molecular 4.Evolução 5.Tipagem de HLA

6.População indígena

USP/FM/SBD-282/09

## **Dedicatória**

*Ao povo indígena do Brasil*

*Que antes eram muitos*

*Que agora são escassos*

*Ao povo Wai Wai*

*Povo de riso raso*

*Que acolhe fácil*

## **Encontro com os Wai Wai**

Até chegar ao campo muito aconteceu pelas águas do Tapajós, do Amazonas, seguido do Trombetas e por fim o Mapuera. Os dois últimos são rios espelho, curva após curva, sempre um cenário inédito e encantador.

As borboletas pareciam querer nos acompanhar, quem sabe nos dá as boas vindas se para o bem nos destinamos.

Na companhia daqueles que tão íntimos são destas águas, a singela canoa perde a sua fragilidade e torna-se imponente em meio àquela imensidão. Fomos parando em cada Aldeia amiga, e todas eram. Sem pressa de chegar ao destino, no tempo dos Wai Wai.

A floresta estava de portas abertas para um pouso noturno é só acender uma fogueira e atar a rede. Ah! A rede, amiga inseparável de embalos e aconchego.

E seguimos alegres, falando com sorrisos, olhares, gestos fazendo com que a língua desconhecida não fosse necessário verbalizar. E passou-se o sol, a lua, o sol, a lua, o sol...Mapuera! Dias longos, intensos, radiantes, desafiadores... com recompensas incomparáveis.

Tornamo-nos amigos e o relógio, a distância, nada há de separar. As fotos, as letras, os presentes podem se perder. Mas, as imagens, os sentimentos, os ensinamentos e a escultura que fora lapidada serão permanentes, inalteradas e indizíveis. Oh! Rainha Ciência, a majestade, também, serve.

Este é um breve retrato da primeira viagem de campo à Aldeia indígena Mapuera.

## **Agradecimentos**

Fácil e prazeroso para mim é agradecer.

A começar pelo Senhor, meu Deus, sem o qual eu não sou, por seu amor, por sua fidelidade, por ter me presenteado e capacitado a participar deste doce trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio S. Pannuti por ter me concedido a oportunidade de trabalharmos juntos e por suas belas e íntegras atitudes que muito acrescentaram à minha pessoa.

À Dra. Vanda Ueda por todo o acompanhamento durante a realização deste trabalho.

Aos infectologistas: Mariana Quiroga, Melissa Mascheretti, Pasesa Torrez, Renata D'Avila e Fábio Crespo, pelo imenso apoio durante a realização do trabalho de campo.

A toda a equipe da casa do índio (CASAI) da cidade de Oriximiná, na pessoa da diretora Elian Freitas, por todo o apoio logístico durante as viagens de campo.

À missão evangélica da Amazônia (MEVA), na pessoa da missionária I. Irene, pelas informações demográficas e históricas a respeito da população da Aldeia Mapuera.

Aos queridos colaboradores Maria Cláudia Nascimento e Philippe Mayaud.

Ao laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (INCOR) do HCFMUSP, especialmente, ao Dr. Jorge Kalil, Dr. Rajendranath Ramasawmy, Dr. Hélcio Rodrigues, Germano Preuhs e Célia Junko Yamaguti.

Ao laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT), especialmente, ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto, Ruth Alarcon e Érika por possibilitarem a realização do estudo de parasitoses intestinais na população de Mapuera.

Às secretárias do Departamento de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias: Roseli, Rosemeire e Vânia, sempre dispostas a ajudar. Muito obrigada.

À Adriana Tateno, Cris Oliveira e Camila Romano, que me ajudaram de sobremodo na realização do estudo filogenético.

A todos os amigos do laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP: Adrianinha, Anderson, Carol Bernal, Cris Trotter, Cris Funico, Dr. Aluísio Segurado, Dra. Clarisse, Dra. Deise, Dudi, Eduardo, Jussara, Karina, Laura Nunes, Leo, Luís, Maria, Mariana, Marli, Paulinho, Renato, Sílvia, Sônia, Tânia, Vera e Vick.

À querida Laura Masami pelo zelo, cuidado e amizade.

Ao Luciano por facilitar a nossa vida no lab!

Aos queridos amigos: Júnior, Daniel, José de Paula, Wilton, Cris Fink, Cyntia, Débora e Lucy.

Às amigas que muito me fazem sorrir: Celinha, Carol Mamana e Synara.

Ao querido amigo Shinai, grande ajudador durante a viagem de campo e na bancada, também!

Aos amigos Rodrigo Melin e Marcelo por sempre me socorrerem diante dos “problemas técnicos” (computadores!).

D. Betty pela amizade verdadeira.

Joelle e Luara pela convivência tão agradável.

Às irmãs que ganhei de presente em São Paulo: Kátia e Alessandra. Agradeço a Deus pela existência de vocês.

Ao Misael por cultivar tão bem a nossa amizade.

Aos amigos de sempre: Lis, André, Juciane, Sandra, Rodrigo Ribeiro e Elba.

Elias e Fabiana, que acabaram de chegar a minha vida e já fazem a diferença.

À minha querida família, denominada Igreja Batista em Pinheiros, na pessoa do Pr. Hélder Ticou Didoff, o meu imensurável agradecimento e amor.

I. Neide, Tereza, I. Lourival e Hildete, I. Noel e Flor por me sustentarem com amor e oração.

Ao meu papai, infelizmente, os seus olhos não puderam contemplar a finalização desta etapa da minha vida.

À mamãe, meus irmãos e meus sobrinhos pelo amor e o apoio perene desde o meu nascimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado.

À Wellcome trust, fundação de apoio à pesquisa situada em Londres, pela subvenção financeira ao projeto que originou esta tese.

*“Não que possamos reivindicar qualquer coisa baseado em nossos próprios méritos, mas a nossa capacidade vem de Deus.*

(II Coríntios 3.5)



## Sumário

**Lista de siglas**

**Lista de símbolos**

**Lista de figuras**

**Lista de tabelas**

**Resumo**

**Summary**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Herpesvirus 8 humano	2
1.1.1 Ciclo de vida do HHV-8	3
1.2. Epidemiologia	4
1.3 Epidemiologia Molecular	7
1.4 Epidemiologia do HHV-8 em população indígena	10
1.5 Transmissão	13
1.6 Diagnóstico da infecção por HHV-8	16
1.6.1 Diagnóstico sorológico	16
1.6.2 Diagnóstico molecular	18
1.7 Infecção por HHV-8 e resposta imune celular	19
1.8 Infecção por HHV-8 e fatores genéticos	21
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3. CASUÍSTICA e MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 Desenho do estudo	29
3.1.1 Área em estudo	30
3.1.2 População	32
3.1.3 Amostragem	33
3.1.4 Coleta	33
3.2 Inquérito de prevalência de marcadores sorológicos da	35

	infecção pelo HHV-8	
3.2.1	Diagnóstico sorológico	35
3.2.1.1	Imunofluorescência Indireta (IFI) para antígenos da fase latente e lítica do HHV-8	35
3.3	Epidemiologia molecular do HHV-8	38
3.3.1	Deteção de DNA do HHV-8 em amostras de saliva	38
3.3.1.1	Extração do DNA	38
3.3.2	<i>Nested</i> PCR para as regiões VR1 e VR2 em amostras de saliva	39
3.4	Sequenciamento	41
3.5	Análises Moleculares	41
3.5.1	Alinhamento e reconstruções filogenéticas	41
3.5.2	Parâmetros populacionais e demográficos	44
3.6	Tipagem de HLA	47
3.6.1	Seleção da amostra	47
3.6.2	Tipagem dos genes de HLA-A, -B, -DQB1 e -DRB1 por PCR-SSO	47
3.6.2.1	Extração do DNA do sangue	48
3.6.3	Extração do DNA	48
3.6.4	PCR-SSO	48
3.6.4.1	Etapas da reação	49
3.7	Aspectos éticos	53
3.8	Análise estatística	53
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1	Descrição da população estudada	55
4.2	Soroprevalência da infecção por HHV-8	57
4.3	Dinâmica de transmissão do HHV-8 de acordo com o grau de parentesco	59
4.4	Excreção do vírus na saliva	62
4.5	Análises Moleculares	64
4.5.1	Reconstruções filogenéticas	64
4.5.2	Análises demográficas e populacionais	69
4.6	Tipagem de HLA	71

4.6.1	Amostragem	71
4.6.2	Tipagem dos genes de HLA-A, -B, -DQB1 e -DRB1	71
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
5.1	Epidemiologia do HHV-8	79
5.2	Estudo filogenético	86
5.2.1	Parâmetros populacionais e demográficos	87
5.3	HLA e infecção por HHV-8	92
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS</b>		
Anexo I	Termo de consentimento	
Anexo II	Aprovação CaPPesq	

### **Lista de siglas**

aids	acquired immunodeficiency syndrome
BCBL-1	Linhagens celulares de linfomas de células B de cavidade
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control
CMV	Citomegalovirus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EBNA-1	Nuclear antigen 1
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HHV-7	Herpesvirus 7 humano
HHV-8	Herpesvirus 8 humano
HIV	Human immunodeficiency virus
HSV-1	Herpesvirus simples 1
HSV-2	Herpesvirus simples 2
HLA	Human leukocyte antigen
HSH	Homens que fazem sexo com homens

HVS	Herpesvirus Saimiri
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFA	Imunofluorescência indireta
LANA	Latency associated nuclear antigen
MEVA	Missão evangélica da Amazônia
MHC	Major histocompatibility complex
NK	Natural killer
ORF	Open reading frame
Pb	Pares de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SAPE	Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina
SSO	Sequence-Specific Oligonucleotide probe
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SK	Sarcoma de Kaposi
TMRCA	Time of the most recent common ancestor

### Lista de símbolos

μL	Microlitro
μM	Micromolar
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
s	Segundo
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade

## Lista de Figuras

Figura 1	Desenho do estudo	29
Figura 2	Localização da reserva indígena Nhamundá-Mapuera	31
Figura 3	Árvore Filogenética, não enraizada, da região VR1 do HHV-8, obtida com o método de reconstrução filogenética “Neighbor Joining”, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica K80+G. As amostras do estudo estão em azul, as demais amostras são sequências de referências obtidas no GenBank. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós.	65
Figura 4	Árvore Filogenética, não enraizada, da região VR2 do HHV-8, obtida com o método de reconstrução filogenética “Neighbor Joining”, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica K80. As amostras do estudo estão em azul, as demais amostras são sequências de referências obtidas no GenBank. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 70% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós.	66
Figura 5	Genealogia reconstruída por máxima verossimilhança, a partir da região VR1 do HHV-8, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G. As amostras deste estudo estão em azul, as demais são sequências obtidas no trabalho de Souza <i>et al.</i> (2007) e sequências de referência de outros grupos indígenas da América do Sul (Hua1, 2 e 3, Sio1 e 2 e Tupi1 e 2), obtidas no GenBank. Os valores de <i>bootstrap</i> acima de 50% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós. Em vermelho e verde estão destacados os dois principais <i>clusters</i> que foram recuperados.	68
Figura 6	Famílias inclusas no estudo. As setas indicam os componentes do grupo caso (com preenchimento) e controle (sem preenchimento).	73

### Lista de Tabelas

Tabela 1	Condições da amplificação para a realização da PCR-SSO para tipagem de HLA	52
Tabela 2	Características da amostra estudada quanto ao sexo, faixas etárias, grupos étnicos e número de indivíduos por casa.	56
Tabela 3	Soroprevalência de anticorpos anti-HHV-8 (LANA ou lítico) por IFI de acordo com o sexo, idade e grupo étnico	58
Tabela 4	Associação entre o estado sorológico para a infecção por HHV-8 dos pais e de seus filhos em 129 famílias	60
Tabela 5	Distribuição dos pares de acordo com a relação familiar e o estado sorológico para a infecção por HHV-8	61
Tabela 6	Excreção do vírus na saliva de acordo com a idade, o sexo e grupo étnico	63
Tabela 7	Frequência dos grupos de alelos de HLA-A e HLA-B na amostra estudada	74
Tabela 8	Frequência dos grupos de alelos de HLA-DQB1 e HLA-DRB1 na amostra estudada	75
Tabela 9	Frequência genotípica de HLA-A e HLA-B dos grupos caso e controle	76
Tabela 10	Frequência genotípica de HLA-DQB1 e DRB1 dos grupos caso e controle	77



## Resumo

**Borges, JD. Estudo epidemiológico da infecção por herpesvírus 8 humano (HHV-8) em população indígena da Amazônia brasileira. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

O Herpesvírus 8 humano (HHV-8) é endêmico em populações africanas e indígenas da região Amazônica. A infecção nestas populações acontece durante a infância e, na África, envolve o contato íntimo no ambiente intrafamiliar. Diversos estudos confirmam a distribuição geográfica dos diferentes subtipos de HHV-8, sendo que o subtipo E é típico das populações indígenas.

**Objetivos:** 1. Caracterizar o(s) subtipo(s) de HHV-8 que circula(m) em população indígena da Amazônia brasileira baseado na análise da região ORF K1 do vírus; 2. Construir a árvore filogenética dos subtipos virais encontrados; 3. Comparar filogeneticamente os subtipos encontrados com os subtipos prevalentes em outras populações indígenas do Brasil e de outros países da América do Sul; 4. Calcular a taxa de substituição para a região VR1 do HHV-8 para as amostras estudadas; 5. Estimar a data de entrada do vírus na população do estudo; 6. Investigar a dinâmica de transmissão do vírus no ambiente intrafamiliar; 7. Averiguar se há correlação entre os alelos de HLA classe I (A e B) e II (DQB1 e DRB1) e suscetibilidade à infecção por HHV-8.

**Casuística e métodos:** Estudo de soroprevalência da infecção por HHV-8 em

amostra de população indígena da Amazônia brasileira utilizando IFI para detecção de antígenos da fase latente (LANA) e lítica (Lítico) do vírus. Análise filogenética das amostras encontradas utilizando-se o DNA/HHV-8 extraído de amostras de saliva, submetidas à reação de *nested* PCR para amplificar as regiões hipervariáveis VR1 e VR2. Cálculo da taxa de substituição do HHV-8, utilizando-se os métodos de distância e técnica bayesiana. Estimar a data do ancestral comum mais recente para as amostras em estudo, utilizando-se o programa BEAST. Tipagem de HLA de indivíduos positivos e negativos para a infecção por HHV-8, utilizando-se a técnica de PCR-SSO. **Resultados:** A soroprevalência geral da infecção por HHV-8 na população em estudo foi de 75,3% (399/530). Observou-se que a soropositividade dos filhos está correlacionada com a soropositividade materna. O único subtipo viral encontrado foi o subtipo E. A taxa de substituição de nucleotídeos do HHV-8 utilizando a região VR1 foi da ordem de  $6 \times 10^{-4}$  substituições por sítio por ano (s/s/a). Ao analisar todas as seqüências estudadas o ancestral comum mais recente está em torno de 138 anos. Não houve correlação entre a susceptibilidade à infecção por HHV-8 e alelos de HLA classe I ou II.

**Conclusões:** A população estudada é endêmica para a infecção por HHV-8. A infecção ocorre principalmente na infância, por via horizontal não-sexual, e a transmissão se dá provavelmente pela saliva. Assim como em outras populações endêmicas da África, a soropositividade dos filhos está correlacionada com a soropositividade das mães. Confirmando achados anteriores, o único subtipo do HHV-8 circulante na população estudada, foi o

subtipo E. Nossos dados sugerem que a região do gene VR1 do HHV-8 evoluiu com uma taxa de  $6 \times 10^{-4}$  substituições por sítio por ano (s/s/a), e que o ancestral comum mais recente do vírus, a partir das amostras analisadas está em torno de 138 anos. Os dados sugerem, também, que não há correlação entre a susceptibilidade à infecção por HHV-8 e os alelos de HLA classe I ou II.

**Descritores:** 1. Herpesvírus 8 humano (HHV-8) 2. Soroprevalência 3. Epidemiologia molecular 4. Evolução 5. Tipagem de HLA 6. População indígena

## Summary

**Borges, JD. Epidemiological study of Human herpesvirus 8 infection (HHV-8) in the Amerindian population from Brazilian Amazon. Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 2009.**

The human herpesvirus 8 (HHV-8) is endemic in Africa and Amerindian populations from Amazon region. The infection in those populations occurs during childhood and, in Africa, involves a close contact in intrafamilial environment. Several studies confirm the geographical distribution of different subtypes of HHV-8, and the subtype E is typical of the Amerindian population.

**Objectives:** 1. To characterize the HHV-8 subtypes circulating in Amerindian population from Brazilian Amazon, based on the analysis of ORF K1 region of the virus. 2. To construct a phylogenetic tree of viral subtypes found among Amerindians 3. To compare by phylogenetic methods the subtypes found in Mapuera Amerindians with the subtypes prevalent in others Amerindians populations of Brazil and South America 4. To determine the substitution rate of VR1 region of HHV-8 for the sequences obtained in the present study 5. To estimate the date of entry of the viruses in the Mapuera population 6. To investigate the dynamic of transmission of the virus in the intrafamilial environment 7. To investigate if there is a correlation between susceptibility to HHV-8-infection and HLA class I (A and B) and II (DQB1 and DRB1) alleles.

**Patients and methods:** The seroprevalence of HHV-8 infection in a sample of the indigenous population of the Brazilian Amazon was carried out using IFA to detect antibodies to latent (LANA) and lytic phase antigens of HHV-8. Phylogenetic analysis of the sequences was performed by using the DNA extracted from samples of saliva, using a nested PCR to amplify the hypervariable regions VR1/ VR2 of HHV-8. Estimation of the substitution rate of HHV-8 nucleotides was performed by using the method of distance and the Bayesian technique. Estimates of the time of the most recent common ancestor (TMRCA) for all samples studied were done by using the BEAST program. HLA typing of positive and negative subjects for HHV-8 infection was performed by using the PCR-SSO technique. **Results:** The overall HHV-8 seroprevalence was 75.3% (399/530). There was a positive correlation between seropositivity of children and maternal seropositivity. The only viral subtype found was subtype E. The substitution rate of HHV-8 using the VR1 region was estimated around  $6 \times 10^{-4}$  substitutions per site per year (s / s / y). By using this rate of substitution, the TMRCA of the Mapuera viruses sequences was estimated to be around 138 years. There was no correlation between susceptibility to HHV-8-infection and HLA class I or II alleles.

**Conclusions:** The population studied is endemic for HHV-8 infection. The infection occurs mainly in childhood, by horizontal, nonsexual transmission, probably by saliva. As in endemic populations of Africa, the seropositivity of children is positively correlated with the seropositivity of the mothers. In

agreement with previous reports, the subtype E was the only HHV-8 subtype found in Mapuera Amerindians. Our data suggest that the VR1 gene region of HHV-8 evolves with a rate of  $6 \times 10^{-4}$  substitutions per site per year (s / s / y), which results in a time of the most recent common ancestor for Mapuera HHV-8 sequences of 138 years. There was no correlation between susceptibility to HHV-8-infection and HLA class I or II alleles.

Key words: 1. Human Herpesvirus 8 (HHV-8) 2. Seroprevalence 3. Molecular epidemiology 4. Evolution 5. HLA typing 6. Indigenous population

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Herpesvírus 8 humano

O herpesvirus 8 humano (HHV-8), descoberto por Chang *et al.*, em 1994, é membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus*.

Chang *et al.* detectaram em pacientes com aids seqüências de DNA específicas de lesões de Sarcoma de Kaposi (SK) que eram homólogas ao *Herpesvirus saimiri* (HVS) e vírus Epstein-Barr (EBV). Este novo herpesvirus, denominado herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi ou herpesvirus 8 humano (HHV-8), foi rapidamente encontrado em todas as formas epidemiológicas de Sarcoma de Kaposi, indicando ser o agente etiológico do SK (Boshoff & Weiss, 1998; Blauvelt A, 1999). Este vírus também está associado ao linfoma primário de cavidades e doença de Castleman. (Soulier *et al.*, 1995; Shulz, 2000).

Dentro do gênero *Rhadinovirus*, o HHV-8 é o único capaz de infectar o homem (Edelman, 2005).

O genoma do HHV-8 tem uma extensão de 170 Kb (Renne *et al.*, 1996), com aproximadamente 81 regiões de leitura aberta (Open Reading Frame - ORF). Sessenta e seis ORFs do HHV-8 possuem homologia com o *Herpesvirus saimiri* (HVS). As ORFs que não apresentam homologia com outros herpesvirus



são identificadas com a letra K e sequencialmente numeradas de K1 até K15 (Jenner & Boshoff, 2002).

Até hoje já foram identificados 12 genes do HHV-8 que são homólogos aos genes do hospedeiro humano (Russo *et al.*, 1996). A este fenômeno dá-se o nome de pirataria molecular. Estes genes pirateados, por não apresentarem introns, provavelmente foram adquiridos de cDNA da célula humana. Muitos destes genes codificados pelo HHV-8 são compartilhados por outros herpesvírus, especialmente, o vírus Epstein-Barr (EBV) (Arvanitakis *et al.*, 1995).

A aquisição de genes do hospedeiro capacita o vírus a modular a resposta imune do hospedeiro.

### **1.1.1 Ciclo de vida do HHV-8**

O HHV-8 é capaz de infectar vários tipos de células: linfócitos B, monócitos, células da mucosa oral, células epiteliais e endoteliais (Edelman, 2005). Mas, o reservatório natural para o HHV-8 são as células B CD19<sup>+</sup> (Ambroziak *et al.*, 1995).

Como todos os herpesvírus, o HHV-8 torna-se latente na maioria das células que infecta. Durante a fase latente o vírus permanece no núcleo na forma episomal. A latência é caracterizada por grande restrição na expressão gênica, e apenas uma quantidade mínima de genes são expressos. Esta característica diminui o número de epitopos virais que são apresentados por células infectadas aos linfócitos T citolíticos (TCD8<sup>+</sup>) (Jenner & Bossof, 2002).

LANA é o principal marcador da fase latente do HHV-8. É uma proteína multifuncional, que possui um papel primordial para a persistência viral, pois facilita a ligação do episoma viral aos cromossomos celulares durante a mitose, permitindo a segregação eficiente destes episomas para as células filhas (Ballestas *et al.*, 1999; Cotter & Robertson, 1999; Lan *et al.*, 2004, 2005).

O vírus na fase latente é capaz de reativar-se e iniciar o ciclo lítico, em que há produção das progenes virais e lise da célula hospedeira (Jenner & Boshoff, 2002). A proteína (Rta) codificada pela ORF 50 é necessária para ativação do ciclo lítico. Entretanto, acredita-se que fatores celulares também seriam importantes para a reativação do HHV-8. Sabe-se que o promotor da ORF 50 está metilado durante a fase latente e, *in vivo*, ainda é desconhecido o que promove a sua desmetilação e conseqüente ativação, mas provavelmente deve estar associado ao estresse celular (Chen *et al.*, 2001)

## 1.2. Epidemiologia

Embora o HHV-8 tenha sido descoberto como conseqüência do enorme aumento de KS entre indivíduos infectados pelo HIV, ele é um antigo agente viral que estava presente na Europa antes do advento da aids, provavelmente desde os primórdios do *Homo sapiens* (Shulz, 1999, 2000; Hengge *et al.*, 2002).

A distribuição da infecção por HHV-8 não é ubíqua como os demais herpesvírus, sendo muito diferente em várias partes do mundo. A prevalência

de anticorpos anti-HHV-8 é, em parte, correlacionada com a prevalência de SK. Deve ser considerado que a epidemiologia da infecção por HHV-8 é baseada em dados sorológicos, gerados por testes diagnósticos cujo desempenho pode diferir e resultar em um subdiagnóstico (De Paoli, 2004). Além disso, a utilização de diferentes antígenos e testes sorológicos dificulta a comparação entre os dados de prevalência obtidos em diferentes regiões (Edelman, 2005).

Na América do Norte a prevalência da infecção na população em geral é de aproximadamente 5%, porém em indivíduos infectados com HIV esta prevalência varia entre 30% a 48% (Gao *et al.*, 1996; Martin *et al.* 1998; Ablashi *et al.*, 1999). Em homens que fazem sexo com homens a prevalência também é alta (20% a 38%) (Martin *et al.* 1998; O'Brien *et al.*, 1999).

Na Europa a prevalência varia de acordo com o país e o grupo estudado. A prevalência da infecção em indivíduos saudáveis da Suíça, Grécia e Albânia é de 13%, 12% e 20%, respectivamente. Na Itália a prevalência varia de acordo com a região, sendo menor que 10% no norte e consideravelmente mais alta na região sul, onde atinge taxas acima de 20% (Shulz, 1999, 2000; Hengge *et al.*, 2002). Na Espanha, em homens que fazem sexo com homens (HSH), HIV positivos, a prevalência alcança 87% (Gambus *et al.*, 2001).

Em indivíduos saudáveis de Israel foi constatada uma prevalência de 4,8% (Iscoyich *et al.*, 2000).

Na Índia a prevalência geral é de 3,7%. Na Tailândia, Malásia e Sri Lanka a prevalência não é maior que 4,4% (Ablashi *et al.*, 1999).

Em Nova Guiné, foi observada uma alta prevalência na população indígena, na qual 25% das 150 pessoas testadas possuíam anticorpos anti-HHV-8 (Rezza *et al.*, 2001).

No continente Africano, as soroprevalências são significativamente mais altas do que nas outras regiões do mundo. Na África sub-saariana, a soroprevalência para HHV-8 é superior a 36% na população em geral. Em Botswana a prevalência varia entre 54,7% e 97%, dependendo do teste sorológico utilizado (Engels *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2004). Em indivíduos com aids e SK a prevalência da infecção é de 83% e 92,3% na África do Sul e Zâmbia, respectivamente.

Na América do Sul uma baixa soroprevalência de HHV-8 foi encontrada em doadores de sangue do Chile e Argentina, respectivamente, 3% e 4% (Pérez *et al.*, 2004). No Brasil a soroprevalência da infecção por HHV-8 varia de acordo com a região e a população estudada. No sudeste do país, a prevalência é baixa (2,4 a 7,4%) entre adolescentes e adultos (Caterino-de-Araújo *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004). Entretanto, situação diferente é vista na região norte, que apresenta soroprevalência de 33% em adultos saudáveis com 40 anos ou mais de idade provenientes de área urbana de Belém, no Estado do Pará (Freitas *et al.* 2002).

Contudo, em 2000, Biggar *et al.* alteraram de forma expressiva o panorama da epidemiologia do HHV-8 no Brasil ao demonstrar uma prevalência muito alta (53%) da infecção por HHV-8 em índios de diferentes etnias da Amazônia brasileira. Os achados iniciais de Biggar foram confirmados por

outros estudos publicados nos anos seguintes (Whitby *et al.*, 2004; Kazanji *et al.*, 2005; Ishak *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007), comprovando que a infecção pelo HHV-8 é endêmica nestas populações.

### 1.3 Epidemiologia Molecular

Os estudos de caracterização molecular do HHV-8, em sua maioria, são baseados em seqüências da ORF 26, ORF 75, ORF K1 e ORFK 15.

A ORF 26 e ORF 75 são regiões conservadas do genoma viral que codificam proteínas, as quais compartilham, respectivamente, 60% e 30% de similaridade com outros membros da sub-família *Gammaherpesvirinae* (Zong *et al.*, 1997).

As ORFs K1 e K15 são regiões extremamente variáveis do genoma viral. A ORF K1 possui dois locus, VR1 e VR2, que divergem em 40% em sua seqüência de aminoácidos e são responsáveis pela maior variabilidade desta região. Esta variabilidade é uma consequência das altas taxas (85%) de substituições nucleotídicas não sinônimas que ocorrem (Hayward, 1999).

No estudo pioneiro em caracterização genética do HHV-8, baseado na ORF 26, foram examinadas 12 amostras de indivíduos com SK e constatou-se que o o HHV-8 poderia ser classificado em três grupos: A, B e C. Utilizando-se uma outra região do genoma viral, ORF 75, estes resultados foram confirmados (Zong *et al.* 1997). Ainda nesse estudo, observou-se que o subtipo A foi encontrado em indivíduos com aids e SK dos EUA e SK clássico do

mediterrâneo, o subtipo B foi encontrado em africanos com SK endêmico e o subtipo C foi restrito aos indivíduos com aids avançado procedentes de Nova York.

Comparando-se as seqüências de aminoácidos dos subtipos de HHV-8 existentes, observa-se que os subtipos A e C são evolucionariamente mais próximos e os subtipos A e B são mais distantes (Hayward, 1999).

Diversos estudos confirmam a distribuição geográfica dos diferentes subtipos de HHV-8. Na Europa os subtipos A e C são predominantes (Cook *et al.* 1999). Nos Estados Unidos e Austrália também prevalecem estes subtipos. Na África o subtipo B é o mais encontrado, juntamente com variante A5, menos freqüente que também é encontrada (Kasolo *et al.* 1998, Lacoste *et al.* 2000, Kamiyama *et al.* 2004). Nas Ilhas do Pacífico, Ásia e Austrália encontramos o subtipo D (Meng *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 1999).

Zong *et al.* (1999) ao examinarem 63 amostras de biópsias obtidas de pacientes com diferentes formas de SK, provenientes dos EUA, África Central, Arábia Saudita, Taiwan e Nova Zelândia, utilizaram a ORF K1 para a genotipagem do vírus e encontraram quatro subtipos: A,B,C e D. Dentre estes quatro subtipos foram identificados 13 diferentes subgrupos (A1-5, C1-5, C3` e D1-2). Também foi observado que havia uma associação entre o subtipo de HHV-8 e a região geográfica, confirmando os achados prévios.

No Brasil alguns estudos envolvendo a caracterização genética do HHV-8 demonstram a existência dos subtipos A, B e C. Assim, Caterino-Araujo *et al.*

(1998), ao analisarem 7 amostras de biópsias de SK procedentes de indivíduos com aids da cidade de São Paulo, com base na ORF26, constataram os subtipos B e C, enquanto Nascimento *et al.* (2005), utilizando a ORF K1 para a caracterização genética do HHV-8, observaram, em 33 amostras de indivíduos com SK e aids da cidade de São Paulo, a presença dos subtipos A, B e C. Estes dados confirmam o achado de Zong *et al.* (2002), que além de K1 analisou também a ORF K15 e outras regiões conservadas do genoma viral (ORF26, T0.7 e ORF75) e identificaram, em três amostras de indivíduos brasileiros com SK e aids, os subtipos A e C.

Em população indígena da Amazônia Brasileira o subtipo de HHV-8 circulante mostrou ser diferente dos demais subtipos até então identificados e foi denominado subtipo E (Biggar *et al.*, 2000). Este subtipo é encontrado em outras populações indígenas da América do Sul como observado em alguns estudos (Whitby *et al.* 2004; Karanji *et al.* 2005). Teoricamente o subtipo E é exclusivo de população indígena. Contudo, Kouri *et al.* (2005) ao realizarem a caracterização genética de 27 amostras de indivíduos com SK procedentes de Cuba, baseados na análise de K1 classificaram uma única amostra como sendo subtipo E, as demais pertenciam aos subtipos A e B. Na literatura, este é o único relato de infecção pelo subtipo E do HHV-8 em indivíduo não ameríndio.

Um novo subtipo de HHV-8, F, foi descrito em um indivíduo membro da tribo Bantu Ganda, proveniente de Uganda (Kajumbula *et al.*, 2006). Deste modo, até o momento foram descritos 6 diferentes subtipos de HHV-8.

A separação dos 4 principais subtipos do HHV-8 (A/C, B e D), provavelmente, é explicada pelo isolamento e efeito fundador associados às migrações do homem moderno. A primeira migração propagada através da África Sub-Saariana deu-se há 100 000 anos atrás (B), a segunda ocorreu no sul da Ásia e por último Austrália, Taiwan e Ilhas do Pacífico por volta de 60 000 a 70.000 anos atrás (D). A terceira, com ramos separados para a Europa e norte da Ásia ocorreu há 35.000 anos atrás (A e C), com expansão tardia nas Américas e norte da Europa ao fim da era glacial (Zong *et al.*, 2002).

Existe uma divergência de 25 a 30% entre seqüências derivadas do subtipo E e os demais subtipos de HHV-8. Observa-se que o subtipo E, na escala evolutiva, está mais relacionado ao subtipo D que predomina nas Ilhas do Pacífico, Ásia e Austrália (Biggar *et al.*, 2000).

#### **1.4 Epidemiologia do HHV-8 em populações indígenas**

Após o relato inicial de Biggar, outros estudos envolvendo populações indígenas sul-americanas, também constataram alta prevalência da infecção por HHV-8 e a presença do subtipo E.

Whitby *et al.* (2004) relataram em índios equatorianos uma prevalência que variou de acordo com o grupo étnico. No grupo Huaorani a prevalência alcançou 63%, enquanto o grupo Siona exibiu 24%. A caracterização genética das amostras positivas foi baseada na análise de K15, T0.7/K12, ORF 75 e K1. A análise da seqüência de K15 de seis índios demonstrou que todos



apresentavam o alelo P. Todas as seqüências de T0.7 do subtipo E de K1 exibiram mudanças específicas na seqüência de aminoácidos que não são encontradas nos demais subtipos de HHV-8, e foram designadas como tipo E de T0.7.

Kazanji *et al.* (2005) avaliaram a presença da infecção por HHV-8 entre grupos indígenas da Guiana Francesa e observaram uma soroprevalência geral de 23.3 %. Esta foi maior entre os índios das tribos Wayampi (30.8%) e Wayana (28.5%), residentes em áreas remotas, quando comparado às tribos Palikour (15.4%) e Emerillons (12.2%), residentes na região costeira. Neste estudo foi possível isolar o DNA viral de apenas uma amostra de um indivíduo da tribo Waiampi, e a análise dos fragmentos amplificados da região K1 caracterizou o subtipo E. Esta cepa foi mais relacionada àquelas encontradas em índios equatorianos que em índios brasileiros.

Ishak *et al.* (2005) ao estudar população indígena da Amazônia brasileira pertencente às tribos Karao, Arara Laranjal, Tiryo e Zo`e observaram a presença de anticorpos anti-HHV-8 em 66 amostras de 221 analisadas. A prevalência variou de acordo com o grupo étnico: 6 (25%) Karao, 18 (19.6%) Arara Laranjal, 24 (42.9%) Tiryo e 18 (36.7%) Zo`e. A ORF26 foi amplificada em 4 amostras, demonstrando existência dos subtipos C (Zo`e) e E (Tiryó). Até o momento este é o único relato da presença do subtipo C em indígenas.

Cunha *et al.* (2005), também investigaram a presença da infecção por HHV-8 em ameríndios da Amazônia brasileira e confirmaram a alta prevalência (56.8%) nesta população. Foi possível detectar o material genético do vírus em

13 indivíduos, e a análise do gene K1 demonstrou a existência dos subtipos A e E, sendo este o único relato da presença do subtipo A em ameríndios.

Souza *et al.* (2007) constataram uma prevalência de anticorpos anti-HHV-8 de 79% entre índios da Aldeia Mapuera, localizada no Estado do Pará. Foi detectado DNA do HHV-8 na saliva de 47 indivíduos de diferentes faixas etárias, e destas amostras 36 puderam ser sequenciadas, sendo todas classificadas como subtipo E. Neste estudo também foi demonstrado que a prevalência de anticorpos anti-HHV-8 aumentava de acordo com a idade.

No estudo de Souza *et al.* (2007) além da pesquisa para anticorpos anti-HHV-8 nos ameríndios, também foram realizadas provas sorológicas para doenças virais transmitidas sexualmente. Interessantemente, a prevalência para estas foi extremamente baixa, o que sugere que a transmissão sexual do HHV-8 não é a via predominante nesta população. Neste estudo, ao comparar-se a prevalência de HHV-8 em ameríndios e ribeirinhos não-índigenas da comunidade mais próxima à Aldeia indígena, observou-se que a prevalência em população ribeirinha foi de apenas 6,1%.

Uma ressalva deve ser feita no que diz respeito à infecção por HHV-8 em índios versus sarcoma de Kaposi. Em todos os estudos supracitados não há relatos de casos de sarcoma de Kaposi em índios. Uma exceção a esta afirmativa é o achado de Mohanna *et al.* que, em 2006, constataram em um índio da etnia Quéchuá (Peru), de 53 anos, a presença de lesões nodulares purpúricas nas extremidades inferiores caracterizadas como SK. A sorologia

para HIV foi negativa e a imunohistoquímica em tecido foi positiva para HHV-8. Embora, neste caso, não tenha sido identificado o genotipo do HHV-8 envolvido, pôde-se comprovar que o SK ocorre em indígenas e que eventualmente o subtipo E, altamente prevalente nestas populações, poderia ser o causador desta neoplasia maligna. Este dado reforça a relevância de estudos moleculares do subtipo E do HHV-8, amplamente distribuído em população indígena.

### **1.5 Transmissão**

Embora os mecanismos de transmissão do HHV-8 ainda não estejam completamente elucidados, os dados epidemiológicos sugerem que o modo de transmissão pode diferir entre as regiões onde a infecção é endêmica e aquelas onde a mesma, é esporádica (Dukers & Rezza, 2003).

A soroprevalência de anticorpos anti-HHV8 é sistematicamente mais elevada em grupos de maior risco para doenças sexualmente transmissíveis, particularmente em homens que fazem sexo com homens (HSH) (Kedes *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1996). Evidências mais diretas da transmissão sexual foram obtidas a partir de estudos que compararam comportamento sexual e risco de infecção por HHV-8 (Whitby *et al.*, 1998; Melbye *et al.*, 1998, Martin *et al.*, 1998; Blackbourn *et al.*, 1999).

Martin *et al.*, (1998) observaram que a soroprevalência para HHV-8 no grupo de HSH aumentava linearmente com o número de parceiros sexuais.

Outros estudos epidemiológicos demonstram fortes evidências de transmissão orogenital do HHV-8 no grupo de HSH (Dukers *et al.*, 2000, Grulich *et al.*, 1997, Melbye *et al.*, 1998).

A detecção do HHV-8 por PCR em sêmen, secreções vaginais e saliva realça o potencial de disseminação deste vírus por diferentes práticas sexuais (La Duca *et al.*, 1998; Lampinen *et al.*, 2000).

Por outro lado, Na África, onde a infecção é endêmica, há grandes indícios de que a transmissão do HHV-8 se dá, também, por via horizontal, não sexual (Mayama *et al.*, 1998; Rezza *et al.*, 2000). Dados de diferentes estudos mostram que, nestas áreas a prevalência de anticorpos anti-HHV-8 é alta em crianças (Mayama *et al.*, 1998; Whitby *et al.*, 2000).

As correlações observadas entre as taxas de soroprevalência em crianças com agregação familiar (mãe-filho e irmão-irmão) e com o número de moradores de uma mesma casa sugerem que a transmissão ocorra por contato íntimo e interpessoal, provavelmente através da saliva (Mbulaiteye *et al.*, 2004). Dedicoat *et al.*, em 2004, observaram que a carga viral alta na saliva de mães estava relacionada com o aumento da soroprevalência em crianças.

A saliva de mães positivas para HHV-8 pode ser um importante veículo de transmissão do HHV-8, uma vez que o DNA de HHV-8 não foi detectado em nenhuma das 75 amostras de leite materno e em somente duas amostras de

colostro, enquanto que o DNA de EBV e HIV-1 foi detectado em 16 e 22 amostras de leite materno, respectivamente. Por outro lado, ao analisarem 65 amostras de saliva destas mães, em 19 amostras foi detectada a presença do DNA do HHV-8, e este evento era independente do sorostatus materno para o HIV-1 (Brayfiel *et al.* 2004).

Em outro estudo, observou-se que DNA de HHV-8 foi mais freqüentemente detectado na saliva, que em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de membros da família de um indivíduo com SK. Além disso, sequências virais similares foram detectadas na saliva de alguns dos membros da família, indicando uma possível transmissão via saliva (Cook *et al.* 2002).

A carga viral de HHV-8 na saliva pode alcançar  $10^6$  cópias/mL em HSH infectados, ou não, pelo HIV e sem SK. Dentre todos os compartimentos corpóreos a mucosa oral é o local onde mais frequentemente é encontrado o DNA do HHV-8, e a carga viral na saliva é a maior, comparado a outros fluidos corporais. (La Duca *et al.*, 1998; Brayfiel *et al.*, 2004).

Ao contrário do citomegalovirus (CMV) e herpesvirus 6 humano (HHV-6), os dados sugerem que não há replicação do HHV-8 nas glândulas salivares (Corey *et al.*, 2002; Pauk *et al.*, 2000). Johnson *et al.*, em 2005, demonstraram que a ativação do ciclo lítico viral ocorre em queratinócitos diferenciados no epitélio maturo das amígdalas, o que explicaria a presença do vírus na saliva.

## 1.6 Diagnóstico da infecção por HHV-8

### 1.6.1 Diagnóstico sorológico

Os ensaios sorológicos disponíveis para HHV-8 são utilizados em estudos de prevalência do vírus nas populações e são úteis para prever o diagnóstico de SK e outras doenças associadas ao HHV-8 (Tedeschi *et al.*, 2002).

A primeira geração de ensaios sorológicos utilizou linhagens de células derivadas de linfoma de efusão primário imortalizadas pelo EBV e co-infectadas com HHV-8 para obtenção de antígeno para as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e *immunoblotting* (Gao *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1996). O antígeno LANA, relacionado à fase latente do HHV-8, é expresso nas células infectadas mantidas na cultura *in vitro*. Por outro lado, para obtenção de antígenos do ciclo lítico do HHV-8, é necessário tratar as culturas celulares com forbol acetato, após o qual 10% a 30% das células entram no ciclo lítico e produzem antígenos citoplasmáticos denominados “antígenos líticos”.

Na segunda geração de ensaios foram utilizadas células BCBL-1 sem co-infecção pelo EBV. Nesta fase foram identificadas as janelas de leitura aberta que codificavam os principais antígenos imunogênicos do vírus, a saber: ORF 73 (ciclo latente), 65 e k8.1 (ciclo lítico), propiciando a obtenção de antígenos

recombinantes de fase latente e lítica a serem utilizados em ensaios de ELISA e Western blot. (Tedeschi *et al.*, 2002).

Os ensaios sorológicos disponíveis atualmente diferem quanto à sensibilidade e especificidade, na dependência do método empregado (IFI, ELISA), do tipo de antígeno (LANA ou lítico) e do critério utilizado para definir a reatividade contra antígenos do HHV-8 (Tedeschi *et al.*, 2002).

Em um estudo multicêntrico em que diferentes ensaios sorológicos foram avaliados constatou-se que a IFI para detecção conjunta de antígenos LANA e lítico exibia a maior sensibilidade (89,1%) e especificidade (94,9%). (Schatz *et al.* 2001)

Em 2007, Nascimento *et al.* avaliaram 5 testes sorológicos artesanais e 2 comerciais para detecção de anticorpos anti-proteínas da fase latente (LANA) e lítica (LÍTICO) do HHV-8, em amostras de soro provenientes de populações com baixa, intermediária e alta prevalência da infecção no território brasileiro. Os resultados demonstraram que IFI para antígenos LANA apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade. A reação de ELISA artesanal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo obteve o melhor desempenho, 87% de sensibilidade e 100% de especificidade. Porém os testes de ELISA comerciais apresentaram baixa especificidade.

O desempenho de um ensaio sorológico influencia sobretudo as taxas de prevalência, particularmente em populações onde o risco de adquirir a infecção

é baixo. Até o momento, não existe um ensaio sorológico padrão ouro para detecção de anticorpos anti-HHV-8 que possa ser usado para definir a sensibilidade e especificidade de novos ensaios (Tedeschi *et al.*, 2002).

### 1.6.2 Diagnóstico molecular

Métodos moleculares têm grande relevância no diagnóstico viral. Várias técnicas qualitativas de amplificação do DNA do HHV-8 em diferentes amostras biológicas foram desenvolvidas. A técnica de PCR é particularmente útil para demonstrar a associação causal entre HHV-8 e SK e outras neoplasias, elucidar o modo de transmissão do vírus, bem como prever o desenvolvimento de SK em pacientes HIV positivos assintomáticos (Tedeschi *et al.*, 2002)

Pan *et al.* (2001) utilizaram uma série amostras sabidamente positivas para a infecção por HHV-8 e controles negativos, para analisar a sensibilidade de vários *primers* usados para a detecção do DNA viral por PCR convencional, neste estudo os primers da ORFK1 exibiram a menor sensibilidade, os *primers* das ORFs 74 e K9 falharam na detecção de alguns controles positivos. Entretanto, os *primers* das ORFs 26 e 72 detectaram todas as amostras positivas e foram considerados os mais sensíveis.



O PCR em tempo real também é utilizado para detecção de HHV-8 e apresenta grande sensibilidade e especificidade (Lallemant *et al.*, 2000; Polstra *et al.* 2003)

### **1.7 Infecção por HHV-8 e resposta imune celular**

O HHV-8 estabelece uma infecção persistente que é, normalmente, controlada pelo sistema imunológico. Quando este controle é perdido, devido a uma imunodepressão, o número de células infectadas aumenta, com subsequente proliferação desenfreada destas células e o desenvolvimento de neoplasias relacionadas ao HHV-8 (Osman *et al.*, 1999).

Linfócitos TCD8+ são as principais células de defesa contra infecções virais, as quais reconhecem antígenos virais na superfície de células infectadas apresentados via MHC classe I. Entretanto os herpesvírus, em particular, codificam uma variedade de proteínas que funcionam diminuindo a expressão de MHC classe I, através de diversos mecanismos (Coscoy & Ganem, 1997).

As ORFs K3 e K5 do HHV-8 codificam duas proteínas (MIR1 e MIR2) que agem diminuindo de sobremodo a expressão de MHC classe I na superfície celular, sendo este um mecanismo de evasão da resposta imune (Coscoy & Ganem, 1997). Apesar da similaridade de seqüências e função, K3 e K5 possuem especificidades diferentes, uma vez que a primeira age na regulação da expressão de HLA-A, -B, -C e -E e a última diminui a expressão, exclusivamente, de HLA-A e -B. A baixa expressão de HLA-C e -E estimula o

ataque via células NK, e para evitar este fenômeno K5 é capaz de diminuir a expressão de ICAM 1 e B7-2, que são moléculas de adesão necessárias para a reação de citotoxicidade mediada por células NK (Ishido *et al.*, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que a proteína de latência LANA do HHV-8 tem mecanismo de evasão do sistema imune semelhante ao antígeno EBNA-1 do vírus de Epstein-Barr e pode inibir a sua apresentação ao sistema imune através do sistema HLA de classe I por dois mecanismos diferentes. Assim, além de retardar a síntese de LANA durante a tradução inicial da ORF73, ela também inibe o processamento da proteína madura pelos proteossomas. (Hyun *et al.* 2007)

Osman *et al.*, em 1999, demonstraram que as células TCD8<sup>+</sup> contra antígenos da fase latente do HHV-8 são essenciais para prevenir o crescimento desenfreado de células infectadas. Neste estudo, observou-se, também, resposta imune celular contra antígenos da fase lítica.

Wang *et al.*, em 2001, observaram que havia aumento de células TCD8<sup>+</sup> e produção de INF- $\gamma$  em resposta a proteínas do ciclo lítico do HHV-8, associado à infecção primária, confirmando o papel destas células no controle da infecção primária. No mesmo estudo, foi demonstrado que os níveis destas células reativas contra antígenos da fase lítica diminuía drasticamente anos após a infecção primária. Este fato deve estar relacionado à diminuição da replicação lítica do vírus.

## 1.8 Infecção por HHV-8 e fatores genéticos

Em regiões onde a infecção por HHV-8 é endêmica, como na população indígena, parte-se do pressuposto que todos os indivíduos estão expostos ao vírus. Entretanto, há aqueles que não adquirem a infecção. Esta evidência conduz à hipótese de que possa haver uma diferença genética entre os indivíduos no que diz respeito à suscetibilidade à infecção pelo vírus.

Plancoulaine *et al.*, em 2003, postularam a presença de um gene recessivo relacionado à suscetibilidade ou resistência à infecção por HHV-8 em população de área endêmica. Este gene poderia ter um papel importante durante a infância, onde quase todos os indivíduos homocigotos teriam sido infectados por volta dos 15 anos de idade.

A presença de DNA viral na saliva de indivíduos infectados provenientes de área endêmica na África está relacionada à transmissão do vírus de mãe para filho. Na tentativa de investigar a excreção de HHV-8 na saliva de mães no Sul da África, foi observado que dois alelos HLA-A, A\*6801 e A\*4301 e um alelo HLA-DRB1, DRB1\*04, estavam associados com a excreção do vírus na saliva (Alkharsah *et al.*, 2007).

Apenas uma parcela dos indivíduos infectados por HHV-8 desenvolvem SK ou outras neoplasias. Em pacientes com SK oriundos da Sardenha foi observado uma associação positiva entre os alelos HLA- Cw7, DRB1\*1104,

DRB1\*1302, DQA1\*0302, e DQB1\*0604 e o desenvolvimento da doença (Masala *et al.*, 2005). Estes dados evidenciam a possibilidade de uma predisposição genética ao desenvolvimento de Sarcoma de Kaposi.

Fatores genéticos são apontados como um dos principais determinantes de suscetibilidade a doenças infecciosas humanas (Hill, 1998). O mesmo agente infeccioso pode ser capaz de induzir diferentes respostas imunes em diferentes indivíduos infectados.

Do ponto de vista genético o HLA (Human Leukocytes Antigens) torna-se um dos principais candidatos responsáveis pelas diversas formas clínicas de algumas doenças infecciosas (Marcos *et al.*, 2000). Isto se deve ao fato de que diferentes alelos de HLA possuem um importante papel no controle da resistência ou suscetibilidade à infecção por determinado agente (Singh *et al.*, 1997).

Na literatura há diversos estudos de associação entre HLA e suscetibilidade a doenças infecciosas. Ravikumar *et al.* (1999) observaram associações do antígeno HLA-DPB1\*04 com proteção contra tuberculose, enquanto o alelo DQB1\*0601 está associado à suscetibilidade. O haplótipo HLA-DRB1\*01-DQB1\*0501-DPB1\*0401 é um marcador de suscetibilidade à doença de Chagas na Venezuela (Fenández-Mestre *et al.*, 2002), enquanto que HLA-DRB1\*14-DQB1\*0301 foi associado com resistência à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em região hiperendêmica no Peru (Overtvelt *et al.*, 2002). Price *et al.* constataram que antígenos de HLA-A1, B8 e DR3 são protetores contra infecções por CMV em pacientes HIV com imunodeficiência grave e que

ainda não tinham sido submetidos à terapia antiretroviral ( Price *et al.* (2001). Em estudos com população africana infectada com o vírus HTLV, antígenos HLA-DR15 e DQ1 foram encontrados com maior frequência em pacientes infectados quando comparados aos controles saudáveis (La Grenade *et al.*, 1998).

A identificação de genes que conferem susceptibilidade à infecção pelo HHV-8 seria de grande importância na elucidação da dinâmica de transmissão do HHV-8 em população endêmica, como a população indígena.

**JUSTIFICATIVA**

### **Justificativa**

A prevalência de anticorpos anti-HHV-8 em população indígena é extremamente alta comparada à população em geral, como demonstrado em alguns estudos.

Contudo, ainda há muitos questionamentos a respeito da infecção pelo HHV-8 em indígenas da Amazônia brasileira, principalmente em relação à dinâmica de transmissão do vírus.

Ao comparar a prevalência de HHV-8 em população indígena e ribeirinha da mesma região amazônica Souza *et al.* (2007), observaram uma baixa prevalência na população ribeirinha indicando que a localização geográfica não é o fator que determina a suscetibilidade à infecção, e que, portanto pode haver outros fatores relacionados ao indivíduo ou ao vírus que seriam determinantes neste processo.

Portanto estudos de caracterização molecular do HHV-8 isolado desta população, bem como estudo de possíveis fatores genéticos que predisponham à infecção pelo HHV-8 são necessários para a elucidação da dinâmica de transmissão do HHV-8 entre os Ameríndios, especialmente no ambiente intrafamiliar.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

- Investigar a dinâmica de transmissão do vírus no ambiente intrafamiliar;
- Caracterizar o(s) subtipo(s) de HHV-8 que circula(m) na população indígena baseado na análise da ORF K1;
- Construir a árvore filogenética dos subtipos virais encontrados;
- Comparar filogeneticamente os subtipos encontrados com os subtipos prevalentes em outras populações indígenas do Brasil e de outros países da América do Sul;
- Calcular a taxa de substituição para a região VR1 do HHV-8 para as amostras estudadas;
- Estimar a data de entrada do vírus na população do estudo;
- Averiguar se há correlação entre os alelos de HLA classe I (A e B) e II (DQB1 e DRB1) e suscetibilidade à infecção por HHV-8.

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### 3. CASUÍSTICA e MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do estudo

O estudo epidemiológico foi realizado como descrito no fluxograma abaixo:

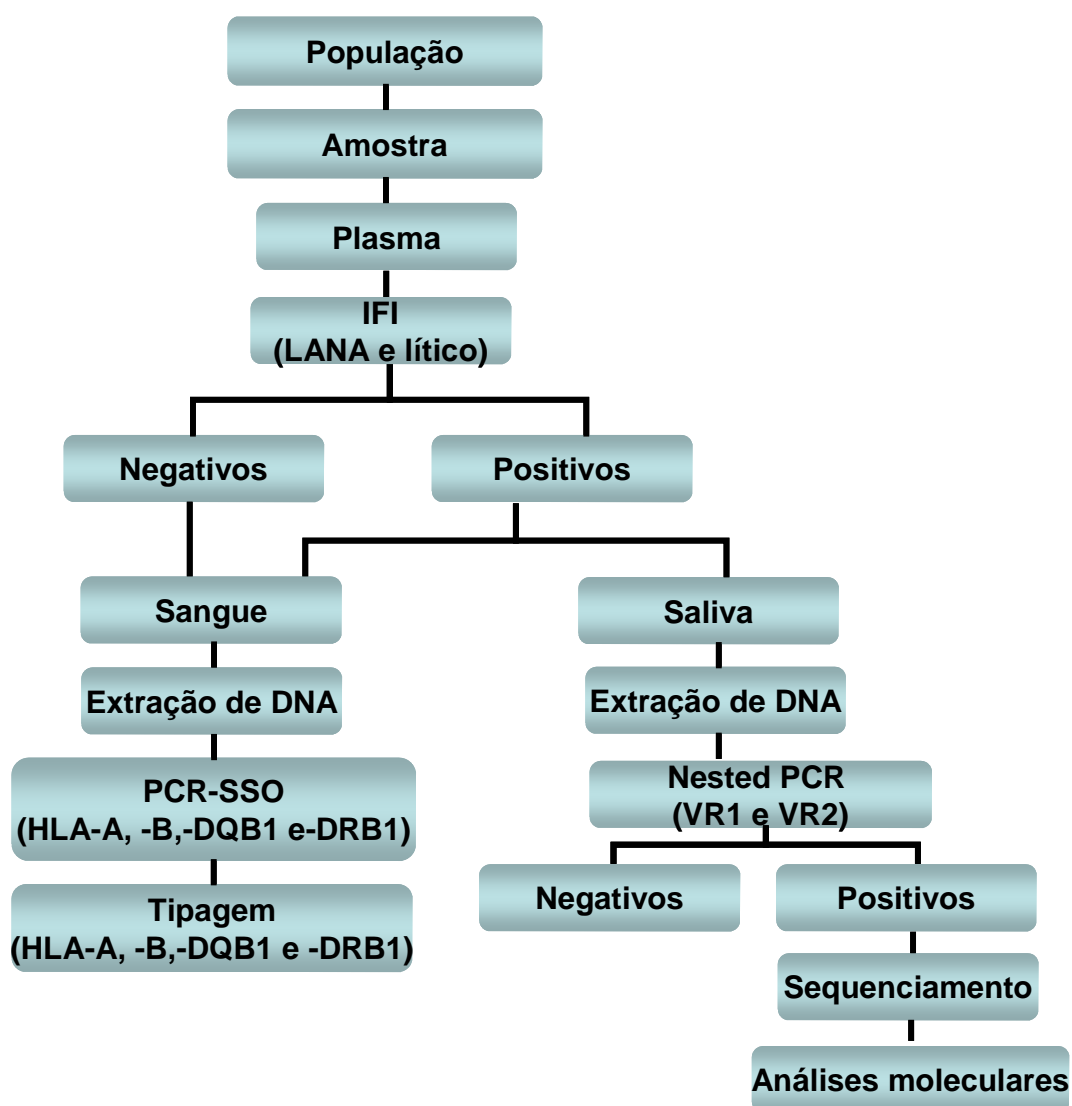
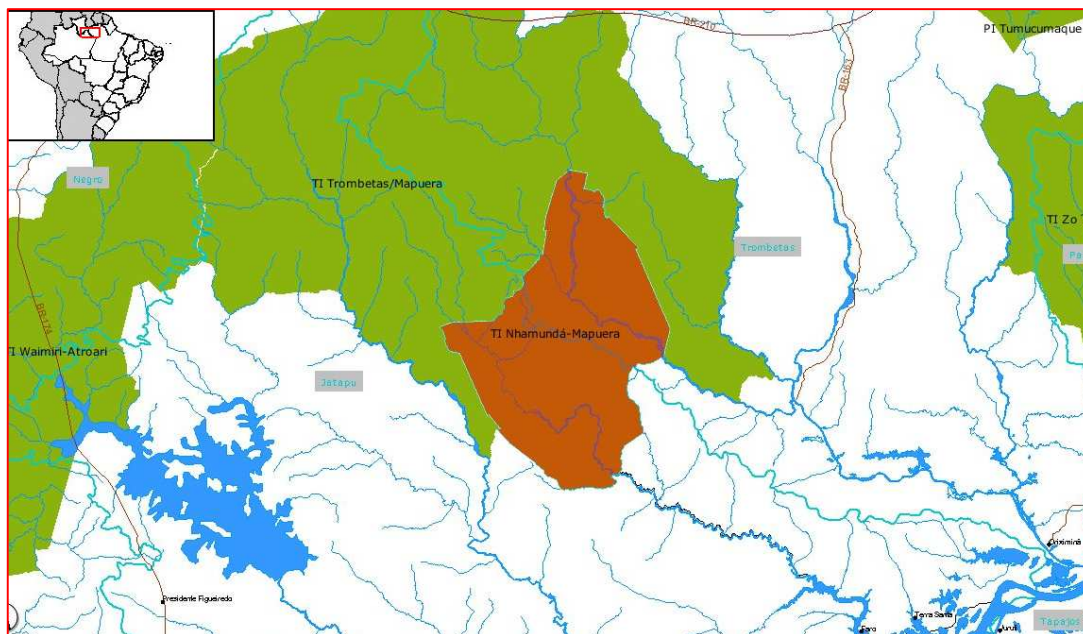


Figura 1. Desenho do estudo.

### 3.1.1 Área em estudo

A área ocupada pelos povos que vivem na aldeia Mapuera corresponde ao curso médio-alto do rio Mapuera, afluente do Trombetas, que tem sua nascente na serra Acaraí, fronteira com a Guiana. A área indígena pertence ao Município de Oriximiná, Estado do Pará, e está localizada na Reserva indígena Nhamundá-Mapuera (Figura 2). A aldeia propriamente dita, situa-se na margem esquerda do Mapuera, no ponto aproximado de 58°00'W e 0°40'S, em região de difícil acesso. A comunidade ribeirinha mais próxima é Cachoeira Porteira. O tempo de viagem, utilizando-se transporte fluvial, de Oriximiná até a Aldeia Mapuera é de 4 dias.



**Figura 2:** Localização da reserva indígena Nhamundá-Mapuera.

FONTE: <http://www.socioambiental.org>

### 3.1.2 População

Na aldeia Mapuera, os índios são mais conhecidos atualmente pela designação genérica de Wai Wai. Do ponto de vista dos próprios índios dessa aldeia, entretanto, Wai Wai é o nome próprio de apenas uma parte, majoritária, de seus habitantes. Ali vivem, também, indivíduos das etnias: Xeréw, Mawayana, Katwena, Hixkaryana, Tiryó e Twnayana.

A língua falada pelos índios da aldeia Mapuera é o wai wai, da família Parukoto-Charumã, do tronco Carib, que tornou-se a língua dominante por circunstâncias históricas: foi a língua utilizada na Guiana por missionários que ali evangelizaram, nos anos 50, praticamente toda a população indígena de Mapuera. Porém, os habitantes da aldeia continuam usando, no círculo familiar, as demais línguas ali representadas.

Os índios falam muito pouco o português, os homens que geralmente vão às cidades do baixo Trombetas para comercializar artesanato e os Agentes Indígenas de Saúde costumam falar o português. Alguns adultos falam um pouco de inglês, aprendido com a Missão evangélica na Guiana.

Segundo o censo realizado pela Missão Evangélica da Amazônia (MEVA), em 2006 havia em Mapuera 987 indivíduos e 193 famílias.

### **3.1.3 Amostragem**

A Igreja evangélica presente na tribo é o local frequentado, semanalmente, por todos os moradores da aldeia. Durante um culto dominical foi anunciado em púlpito que entre os meses de maio e junho de 2007 aconteceria, no Posto de saúde da aldeia, a coleta de amostras de saliva e sangue dos indivíduos que desejassem, espontaneamente, participar do estudo.

As coletas foram agendadas de acordo com o número da casa, pelo agente indígena de saúde que foi de casa em casa perguntando quem gostaria de participar.

### **3.1.4 Coleta**

A coleta de sangue e saliva foi realizada por dois estudantes do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM 52), que permaneceram na área indígena, em estudo, durante 20 dias do ano de 2007.

Antes da coleta os indivíduos assinaram o termo de consentimento (Anexo I) do estudo. O termo de consentimento, dos menores de idade, foi assinado por seus pais ou responsáveis.

Durante a coleta foram adquiridas informações a respeito do grau de parentesco entre os participantes, número de indivíduos que moram na casa, etnia, sexo e idade.

O sangue foi coletado por punção venosa em tubo estéril de 5mL, a vácuo, contendo heparina. Após sedimentação espontânea, à temperatura ambiente, o plasma foi separado e acondicionado em tubo eppendorf (1,7mL) e o creme leucocitário recuperado e, acondicionado em tubo eppendorf (1,7mL) contendo 1,5 µL da solução de RNAholder® (BioAgency). O plasma foi abrigado sob refrigeração e o creme leucocitário permaneceu em temperatura ambiente durante toda a estada na Aldeia.

A saliva, por sua vez foi coletada com *swab* de algodão estéril, o qual foi esfregado delicadamente sobre a mucosa oral e, em seguida, acondicionado em tubo eppendorf (1,5mL) contendo 500µL de solução de RNAholder®. As amostras assim acondicionadas permaneceram em temperatura ambiente durante toda a estada na Aldeia.

Ao chegar ao laboratório de Virologia (LIM 52) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, as amostras de plasma, creme leucocitário e saliva foram acondicionadas a -20<sup>0</sup> C, até serem processadas.



## **3.2 Inquérito de prevalência de marcadores sorológicos da infecção pelo HHV-8**

A prevalência da infecção pelo HHV-8 na população em estudo foi realizada com o objetivo de verificar se havia associação entre soropositividade e o grau de parentesco, no ambiente intrafamiliar. Os indivíduos incluídos no estudo tiveram amostras de sangue coletadas para pesquisa de anticorpos da classe IgG contra antígenos da fase latente (LANA) e lítica (lítico) do HHV-8, no plasma, utilizando-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFI).

### **3.2.1 Diagnóstico sorológico**

#### **3.2.1.1 Imunofluorescência Indireta (IFI) para antígenos da fase latente e lítica do HHV-8**

Para a realização da técnica de IFI utilizou-se como fonte de antígenos do HHV-8 células da linhagem BCBL-1 mantidas em cultura. Trata-se de uma linhagem celular proveniente de linfoma de células B de cavidade, infectada de forma latente pelo HHV-8, fornecidas pelo *Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore*, Estados Unidos.

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

Para a detecção dos anticorpos contra antígeno da fase lítica, as células foram mantidas em meio de cultura contendo 20ng/mL de acetato de o-tetradecanoil forbol (TPA; Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 96 horas para indução da transcrição do genoma viral. As células não submetidas ao tratamento com TPA foram utilizadas para detecção de anticorpos anti-antígenos da fase latente (LANA) (Lennette *et al.*, 1996; Pierrotti *et al.* 2000).

A mistura de células BCBL-1, tratadas e não tratadas com TPA, foram lavadas 2 vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) por centrifugações a 800g durante 10 minutos e ressuspensas em PBS. A seguir, 10µL deste antígeno foram distribuídos em cada área demarcada da lâmina, a qual foi mantida à temperatura ambiente para secar, e fixada em acetona gelada por 20 min. Após a fixação das lâminas, estas foram armazenadas a –80°C para uso.

Antes de serem utilizadas, as lâminas foram descongeladas e o antígeno foi re-hidratado, aplicando-se 30µL de solução de leite desnatado (Molico®) a 1% em cada círculo da lâmina, e posterior incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após aspiração do leite, as amostras de soro dos indivíduos, diluídas na proporção 1:80 em solução de leite a 1%, foram colocadas na lâmina. Em seguida,

as lâminas foram abrigadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 min. Passado este período, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, com duração de 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído a 1:100 em solução de azul de Evans. Prosseguiu-se com nova incubação por 30 min à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 9,2. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência Zeiss com 400X de aumento.

Em todas as lâminas foram colocados controles negativos e positivos para anticorpos anti-HHV-8, e para cada reação foi testado um controle positivo em diluições seriadas de 1:50 a 1:12.500 para averiguar a sensibilidade do teste. Como controle negativo foi utilizado o soro de um indivíduo saudável que, repetidamente, apresentou sorologia negativa na reação de IFI para detecção de anticorpos anti-HHV-8. Como controle positivo foi utilizado o soro de um paciente com aids e SK que apresentava alto título de anticorpo contra antígenos da fase latente e lítica do HHV-8, quando submetido ao diagnóstico por IFI.

Quando utilizado o teste de IFI para detecção de anticorpos anti-antígeno LANA, foram consideradas soropositivas as amostras, cujas células apresentaram fluorescência pontilhada no núcleo, e para a detecção de anticorpos anti-antígeno lítico, foram consideradas soropositivas as amostras, cujas células exibiam fluorescência citoplasmática.

### **3.3 Epidemiologia molecular do HHV-8**

Para a determinação dos genótipos de HHV-8 circulantes na população em estudo, foram processadas amostras de saliva, dos indivíduos previamente positivos na sorologia.

Através da amplificação das regiões hipervariáveis VR1 e VR2 da ORF K.1 por *nested* PCR, sequenciamento das amostras positivas e posterior análise filogenética, foram conhecidos os genótipos de HHV-8 presentes na população infectada. Foi possível averiguar também, o ambiente intrafamiliar no qual o genótipo estava circulando. Além disso, os genótipos encontrados foram comparados àqueles descritos em outras populações indígenas da América do Sul através de análise filogenética.

#### **3.3.1 Detecção de DNA do HHV-8 em amostras de saliva**

##### **3.3.1.1 Extração do DNA**

Foi utilizado o kit da Qiagen (*mini blood*) para a extração de DNA de amostras de saliva. Em 200µL da amostra foram adicionados 200µL de tampão de lise (AL) e 20µL de proteinase K. Esta mistura, foi mantida por 10min a uma temperatura de 56°C. Em seguida, foi transferida para a coluna e centrifugada,

seguindo-se as instruções do fabricante. Ao final, a amostra foi eluída com o tampão de eluição, em um volume de 100µL.

### 3.3.2 *Nested* PCR para as regiões VR1 e VR2 em amostras de saliva

Antes de efetuar a reação de *Nested* PCR para HHV-8 foi realizado PCR para detecção de Betaglobina em todas as amostras de saliva provenientes de indivíduos previamente positivos na reação de IFI, para testar a viabilidade do DNA na saliva.

A reação de *nested* foi realizada a partir da amplificação de dois fragmentos diferentes da região variável da ORF K.1, a VR1 (380bp) e a VR2 (336bp), utilizando-se *primers* descritos por Cook *et al.* (1999) e utilizados por Nascimento *et al.* (2005).

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

5'GTT CTG CCA GGC ATA GTC 3'

5'GTA ACA TGC TGA CCA CAA G 3'

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

5' CTG GCG GCC CTT GTG TAA AC 3'

5' GAC TGT GTT TGA TGG CTG TGC 3'

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

5' CGT CTC GCC TGT CAA ATC 3'

5' ACT GGT TGC GTA TAG TCT TCC 3'

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

5' GTA TAT GTT TTT GGG CGC GTT G3'

5'CCG TGC ACA AAT CGT GTA GGG 3'

A reação foi padronizada para um volume final de 50µL, contendo 5µL da amostra, tampão 10X (50mM de KCl, 10mM de Tris pH= 9.0), 200µM de dNTPs, 0,5µM de cada *primer*, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carisbad, CA, USA).

Ciclos: Os tubos de reação contendo as amostras e a mistura de reagentes foram submetidos à amplificação em termociclador Eppendorf Mastercycler de gradiente. Para VR1, realizou-se uma denaturação inicial a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 30s a 94°C para denaturação do DNA, 45s a 61°C para anelamento do *primer* e 1min a 72°C para extensão da seqüência. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final a 72°C por 10min. Para a segunda etapa, 2,5µl do produto de PCR da primeira etapa foram utilizados sob as mesmas condições de ciclagem. Quanto à ciclagem para VR2, esta variou na temperatura de anelamento de 56°C na primeira etapa, para 59°C na segunda etapa.

Os produtos de PCR obtidos com a amplificação foram revelados em gel de agarose a 1,5%.

### **3.4 Sequenciamento**

Os produtos das amostras positivas na reação de *Nested* foram purificados para a realização do sequenciamento, utilizando-se o kit Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. Quando da presença de bandas inespecíficas ou de difícil visualização foi empregado um kit de purificação a partir do gel.

O sequenciamento foi realizado, utilizando-se o *kit Big dye Terminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e a análise das seqüências (*forward* e *reverse*) foi feita no seqüenciador de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **3.5 Análises Moleculares**

#### **3.5.1 Alinhamento e Reconstruções filogenéticas das seqüências**

Os cromatogramas obtidos com o sequenciamento foram editados e posteriormente alinhados no computador Apple Macintosh acoplado ao ABI377 DNA *Sequencer* utilizando o programa Sequence Navigator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Dois reconstruções filogenéticas foram realizadas a partir das seqüências coletadas neste trabalho. A primeira foi feita para a subtipagem dos vírus. Para a isso, os arquivos no formato fasta gerados pela edição foram

alinhados com seqüências de referência do HHV-8 obtidas no Genbank, utilizando-se o software Clustal W. Os alinhamentos foram verificados manualmente através do programa BioEdit.

As seqüências de referência utilizadas estão disponíveis no *Genbank*, sob os seguintes números de acesso: AF130266; AF130259; AF130278; AF133042; AF133041; AF278836; AF178807; AF133039; AF133038; AF171057; AF171058; AF220292; AF220293; AY329025; AY329024; AY329027; AY329028; AF178822; AF133044; AF133043; AY329014; AF130280; AF130285; AF130305; AY378013; AY378012; AY378004; AY377995; AY377993; AY377997; AY378005; AY378010; AY378015; AY378011; AF130290; AF178792; AF178791; EF204999-EF205001; EF209410-EF209421; EF755000-EF375513; AF 178810.

Para as análises, os alinhamentos foram exportados em formato nexus e utilizados como entrada para os programas de reconstrução. As inferências foram realizadas utilizando o critério de máxima verossimilhança (maximum likelihood). Esse método permite o uso de matrizes de probabilidade de substituições de nucleotídeos, que explicitam modelos evolutivos para a inferência dos estados ancestrais a partir dos estados observados. As reconstruções ótimas obtidas maximizam a verossimilhança para todos os caracteres ao longo de uma topologia.

Para a escolha do melhor modelo filogenético de substituição de DNA, foi utilizado o programa Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998). Este programa compara de forma hierárquica diferentes modelos de substituição de



nucleotídeos, onde 56 modelos evolucionários são testados e matrizes de distância filogenética são construídas a partir destes modelos. Um arquivo denominado *modelscore* é então gerado, e um valor de verossimilhança (*likelihood value*) é atribuído para cada um dos 56 modelos testados. O programa interpreta esse resultado e a escolha é feita com base no melhor valor de *P* obtido entre os modelos.

As reconstruções foram feitas no programa PAUP\* versão 4.0b10 (Swofford, 1999). Com o modelo evolucionário adequado para o conjunto de sequências, foram geradas topologias pelo método de distância de agrupamento de vizinhos (Neighbor Joining-NJ). O índice de sustentabilidade dos ramos foi testado pelo método de *bootstrapping* com 1000 réplicas. Para a visualização das reconstruções, o programa Tree View foi utilizado.

A segunda parte das reconstruções incluiu além das amostras do presente estudo, sequências de amostras coletadas na mesma população indígena, no ano de 2003 (Souza *et al.*, 2007). Nesta etapa, embora a metodologia tenha sido a mesma descrita acima, algumas modificações foram feitas com o objetivo de minimizar o tempo gasto.

Os alinhamentos em formato nexus foram utilizados como entrada para o programa de reconstrução filogenética Garli (*Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*). Este programa utiliza um algoritmo que otimiza os parâmetros iniciais a cada geração, o que leva a um incremento ou queda no valor de probabilidade. As topologias que obtêm valores cada vez melhores são salvas, e o programa automaticamente pára de gerar novas topologias quando

após um determinado número de gerações (fornecido pelo usuário) ocorreu, sem incremento no valor de probabilidade.

Os rearranjos topológicos são baseados nos algoritmos: (i) NNI (*nearest neighbor interchange*, ou troca de vizinhos mais próximos). Esse algoritmo de decomposição e escolha da melhor árvore consiste em trocar de lugar as taxas que aparecem separadas por apenas um ramo interno e reconstruir a topologia, atribuindo um valor de probabilidade. Ao final, a topologia escolhida será a que apresenta o melhor valor de probabilidade dentre todas; e (ii) SPR (*Subtree Pruning Regrafting*), que consiste em “quebrar” partes da topologia e rearranjá-las em outra posição. Atribuindo valores de probabilidade para essas topologias, uma topologia ótima é encontrada.

É importante ressaltar que as topologias encontradas utilizando o programa PAUP são extremamente similares, quando não idênticas às encontradas pelo programa Garli.

### **3.5.2 Parâmetros populacionais e demográficos.**

Uma vez que não existe na literatura uma taxa de substituições estimada para o HHV-8, e mais precisamente, para as regiões do genoma que foram amplificadas neste trabalho, fez parte dos objetivos estimar uma taxa de substituição aproximada para a região VR1. Conseqüentemente, uma data aproximada para a entrada do vírus HHV-8 na Aldeia Mapuera também poderia

ser estimada. Para isso, utilizamos basicamente dois métodos: de distância e técnica bayesiana.

As amostras das sequências de HHV-8 utilizadas para estimar a taxa de substituições foram coletadas em dois tempos distintos (2003 e 2006). Infelizmente, essa é uma variação muito pequena para que se estime com precisão qualquer parâmetro, por isso, para uma estimativa de taxa de substituição utilizamos o método de distância pareada. Uma vez que algumas sequências amostradas em 2003 e 2006 foram coletadas do mesmo indivíduo, esperávamos encontrar alguma variabilidade entre os vírus amostrados nos diferentes tempos.

Para estimar a taxa de substituição de nucleotídeos utilizamos a fórmula  $T = K/2r$ , onde  $T$  é o tempo entre as duas coletas,  $K$  é a distância entre as duas sequências e  $r$  é a taxa de substituição de nucleotídeos. A distância pareada 'K' entre as duas sequências foi estimada através do programa PAUP\* versão 4.0b10, empregando-se o método de máxima verossimilhança como critério de otimização. Este método calcula a relação entre o tamanho da sequência e a quantidade de substituições encontrada.

A partir da taxa de substituições, estimamos a data do ancestral comum mais recente (TMRCA) para aquele grupo de sequências utilizando o programa BEAST (Drummond & Rambaut, 2007).

A técnica bayesiana, implementada no programa, utiliza a técnica de amostragem de Monte Carlo via cadeia de Markov para a exploração dos dados permitindo a incorporação de informações previamente conhecidas para a

estimativa dos parâmetros populacionais. Além disso, é possível estimar os parâmetros desejados incluindo a incerteza associada aos mesmos. A técnica utiliza as informações de uma reconstrução filogenética dos dados amostrados para inferir processos demográficos ocorridos no passado. As sequências foram analisadas sob o modelo de substituição GTR+I+G, assumindo relógio molecular relaxado, com a variação na taxa de substituição seguindo uma distribuição normal (valor estimado por método de distância, e desvio padrão na mesma ordem de grandeza).

Para o cálculo do TMRCA, além da taxa de substituição encontrada neste trabalho utilizamos, também, para comparação, a taxa de substituição para o vírus herpes 1 estimada previamente por Sakaoka et al., (1994).

Para otimizar a estabilização do espaço de amostragem a ser explorado na cada cadeia de Markov, foram realizadas 10 milhões de cadeias, com uma pré-corrida de 5 milhões de cadeias. A convergência dos parâmetros, bem como os valores médio, máximo e mínimo de cada um foram verificados no programa Tracer, parte do pacote BEAST.

### **3.6 Tipagem de HLA**

#### **3.6.1 Seleção da amostra**

A seleção da amostra para o estudo do HLA foi realizada de acordo com o estado sorológico para infecção pelo HHV-8. Deste modo foram formados os grupos caso, os quais eram soropositivos para a infecção por HHV-8, e controle, os quais eram soronegativos.

Os indivíduos do grupo caso e controle, individualmente, eram não aparentados e foram selecionados aleatoriamente.

#### **3.6.2 Tipagem dos genes de HLA-A, -B, -DQB1 e -DRB1 por PCR-SSO**

A tipagem do HLA foi realizada no laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (INCOR) do HCFMUSP, utilizando-se o *kit* comercial LABType® SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide probe, One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA).

A pesquisa de HLA foi realizada a partir de amostras de DNA extraídas do sangue.

### 3.6.3 Extração do DNA do sangue

Foi utilizado o kit da Qiagen (*mini blood*) para a extração de DNA de amostras de sangue. Em 200µL da amostra foram adicionados 200µL de tampão de lise (AL) e 20µL de proteinase K. Esta mistura foi mantida por 10min a uma temperatura de 56°C. Em seguida, foi transferida para a coluna e centrifugada, seguindo-se as instruções do fabricante. Ao final a amostra foi eluída com o tampão de eluição, em um volume de 100µL.

### 3.6.4 PCR-SSO

O kit utilizado para a tipagem aplica a tecnologia Luminex<sup>®</sup> ao método de tipagem SSO. Inicialmente o DNA alvo é amplificado na PCR utilizando um primer específico para o grupo. O produto de PCR é marcado com biotina, o que permite a sua detecção pela estreptavidina conjugada a R-ficoeritrina.

O produto de PCR é desnaturado, em seguida sofre neutralização e posterior hibridização com sondas oligo-específicas. Tais sondas estão pré-conjugadas em micro-esferas (“pérolas”), sendo que cada micro-esfera possui um tipo de sonda específico. Após a hibridização, as sondas que hibridizaram são marcadas com um produto fluorescente; a solução SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina).

A leitura das micro-esferas marcadas é realizada com a ajuda de um citômetro de fluxo (LABScan<sup>®</sup>). A interpretação dos resultados é feita através do programa HLA VISUAL versão 2.2 (cedido pela empresa) que analisa as combinações de sondas nas micro-esferas detectadas pelo aparelho, o qual consulta um banco de dados interno e sugere quais alelos estão presentes. O *kit* e o *software* para realização dos testes são desenvolvidos pela empresa One Lambda Inc. Todos os procedimentos para seu uso foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

#### **3.6.4.1 Etapas da reação**

A metodologia empregada pode ser resumida em 4 etapas: 1. Amplificação do DNA; 2. Desnaturação e Neutralização do produto do PCR; 3. Hibridização e 4. Análise e aquisição dos dados.

##### **1. Amplificação do DNA**

O DNA extraído de amostras de sangue foi submetido a uma reação de PCR-SSO, segundo instruções do fabricante, em que o DNA é amplificado usando-se grupos de *primers* específicos para a detecção de HLA-A, B, DQ e DR.

Para a amplificação foi utilizada a enzima Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e, os demais reagentes da reação (dNTPs, tampão e cofatores da enzima), que estão presentes no *kit* de tipagem.

As placas da reação contendo as amostras e a mistura de reagentes foram submetidos à amplificação em termociclador *Applied Biosystems* e as condições de amplificação estão descritas na tabela 1.

Após a amplificação foi corrido um gel de agarose 2,5% para averiguar se houve amplificação.

## 2. Desnaturação e Neutralização do produto de PCR

Após a etapa 1, 2,5µL do DNA amplificado foi transferido para uma placa de PCR, em seguida foi adicionado 1,3µL de tampão de desnaturação. Prosseguiu-se com centrifugação, agitação em vórtex por 20s e posterior incubação por 10min a temperatura ambiente.

Após a incubação, foi adicionado 2,5µL de tampão de neutralização, a placa foi agitada por 20s em vórtex, houve mudança de cor para amarelo e a placa foi mantida em banho de gelo até o início da próxima etapa.

## 3. Hibridização

A hibridização foi realizada com sondas complementares ao DNA desnaturado, conjugadas a microesferas fluorescentes (pérolas). Para cada amostra foi pipetado 2µL de pérolas e 17µL de tampão de hibridização. Após adição das pérolas às amostras, a placa foi agitada em vórtex por 20s, e depois incubada a 60°C por 15min. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com adição 40µL de tampão de lavagem, seguido de centrifugação por 5min a 2500rpm. A cada lavagem o sobrenadante foi descartado.

Após a última centrifugação foi adicionada solução SAPE, preparada na seguinte proporção: 0,25µL de solução SAPE e 24,75µL de tampão SAPE para



cada amostra. Após adição da solução SAPE, a placa foi incubada a 60°C por 5min. Posteriormente, a placa foi lavada uma vez com adição de 40µL de tampão de lavagem seguido de centrifugação por 5min a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 70µL de tampão de lavagem. O produto foi homogeneizado, delicadamente, e transferido para uma placa de ELISA com fundo em V, para ser analisado.

#### 4. Aquisição e análise dos dados

A aquisição e análise dos dados foi feita, respectivamente pela metodologia de citometria de fluxo, utilizando-se o Labscan 100, e pelo programa HLA Visual 2.2.

**Tabela 1** - Condições da amplificação para a realização da PCR-SSO para tipagem de HLA

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>96°C</b>	<b>3 minutos</b>	<b>1</b>
<b>96°C</b>	<b>20 segundos</b>	<b>5</b>
<b>60°C</b>	<b>20 segundos</b>	
<b>72°C</b>	<b>20 segundos</b>	
<b>96°C</b>	<b>10 segundos</b>	<b>30</b>
<b>60°C</b>	<b>15 segundos</b>	
<b>72°C</b>	<b>20 segundos</b>	
<b>72°C</b>	<b>10 segundos</b>	<b>1</b>
<b>4°C</b>	<b>∞</b>	<b>1</b>

### 3.7 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado, em 2006, pela CAPPesq (Anexoll), como um adendo ao protocolo de pesquisa 577/02. O referido protocolo inclui o estudo intitulado “Prevalência de infecção por herpesvírus sexualmente transmissíveis (HSV-2 e HHV-8) em comunidades ribeirinhas do Rio Trombetas e indígenas da Aldeia Mapuera”.

### 3.8 Análise estatística

Para a análise dos dados epidemiológicos, utilizou-se o teste de  $X^2$ ,  $X^2$  de tendência e *Odds ratio*.

As frequências dos alelos de HLA dos indivíduos positivos e negativos para a infecção por HHV-8 foram comparadas utilizando-se o teste de  $X^2$  com a correção de continuidade de Yates ou o teste exato de Fisher, quando apropriado, isto é, quando os valores esperados forem inferiores a 5.

Os aplicativos utilizados para a análise dos dados foram: SPSS e Epi Info (CDC, Atlanta) e o nível de significância alfa estabelecido foi de 5%.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Descrição da população estudada

Ao todo 530 indivíduos participaram do estudo, distribuídos por 131 casas. Em 40 casas todos os moradores participaram. A média do número de habitantes por casa foi de 5,3 indivíduos e a mediana foi 5.

Foi coletado sangue por punção venosa dos 530 indivíduos. Foi possível coletar a saliva de 510 destes indivíduos. Em relação ao gênero, a amostra em estudo era formada por 46% de indivíduos do sexo masculino e 54% do sexo feminino.

Participaram do estudo indivíduos com menos de 1 ano até 87 anos de idade, sendo que 30,1% dos participantes tinham idade igual ou maior que 30 anos.

No que diz respeito aos grupos étnicos, o estudo englobou indivíduos de 7 etnias diferentes: Wai Wai, Katwena, Mawaiana, Xeréw, Tyrió, Hixkariana e Tunayana. Os grupos com maior representatividade foram os Wai Wai (34,3%), Katwena (28,4%) e Mawaiana (15,0%). Ressalta-se que dois indivíduos não índios participaram do estudo, pois seus cônjuges são indígenas. Indivíduos com descendência indígena e não indígena foram classificados como mistos.

Os dados referentes à descrição da amostra estudada estão relacionados na tabela 2.

**Tabela 2** – Características da amostra estudada quanto ao sexo, faixas etárias, grupos étnicos e número de indivíduos por casa.

<b>Ameríndios (N=530)</b>	
<b>Sexo</b>	<b>N (%)</b>
Masculino	243 (46,0)
Feminino	287 (54,0)
<b>Faixas etárias</b>	
≤ 4	11 (2,1)
5-9	71 (13,4)
10-14	89 (16,8)
15-19	73 (13,7)
20-29	106 (20,0)
≥ 30	180 (34,0)
<b>Grupos étnicos</b>	
Wai Wai	182 (34,3)
Katwena	151 (28,4)
Mawaiana	79 (15,0)
Xeréw	46 (8,6)
Tyrió	20 (3,7)
Hixkariana	31 (6,0)
Tunayana	1 (0,2)
Misto	18 (3,4)
Não índio	2 (0,4)
<b>Número de Indivíduos/casa</b>	
2	14 (10,7)
3	14 (10,7)
4	28 (21,3)
5 a 7	53 (40,4)
8 a 13	22 (16,8)

#### 4.2 Soroprevalência da infecção por HHV-8

A soroprevalência geral da infecção por HHV-8 na Aldeia Mapuera foi 75,3%. No sexo masculino 73,2% dos indivíduos eram positivos para anticorpos anti-antígeno LANA ou antígeno lítico do HHV-8. No sexo feminino a soroprevalência foi de 77,7% ( $p=0,37$ ). A prevalência da infecção aumentou de acordo com a idade ( $p_{\text{trend}} < 0,001$ ), sendo que o risco de adquirir a infecção por HHV-8 foi 3 vezes maior a partir dos 10 anos de idade. O indivíduo mais jovem com sorologia positiva para a infecção por HHV-8 tinha 2 anos de idade (Tabela 3).

Entre as diferentes etnias, Wai Wai, Katwena e Hixkariana foram os grupos com maior prevalência. Entretanto, não houve diferença significativa na prevalência da infecção de acordo com a etnia ( $p=0,06$ ).

Observou-se que a prevalência da infecção manteve-se alta, independente, do número de indivíduos por casa (tabela 3).

Em relação ao marcador sorológico utilizado na reação de IFI, observou-se que a presença de anticorpos anti-LANA foi mais freqüente que anticorpos anti-lítico, 70,2% e 38,5%, respectivamente ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 3-** Soroprevalência de anticorpos anti-HHV-8 (Lana ou lítico) por IFI de acordo com o sexo, idade e grupo étnico

<b>Ameríndios (N=530)</b>		
<b>Sexo</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>
Homem	65/243 (26,7)	178/243 (73,2)
Mulher	66/287 (23,0)	221/287 (77,0)
Total	131/530 (24,7)	399/530 (75,3)
p		0,37
<b>Faixas etárias</b>		
≤ 4	6/11 (54,5)	5/11 (45,4)
5-9	40/71 (56,3)	31/71 (43,7)
10-14	24/89 (26,9)	65/89 (73,0)
15-19	21/73 (28,7)	52/73 (71,2)
20-29	23/106 (21,7)	83/106 (78,3)
≥ 30	17/180 (9,4)	163/180 (90,5)
Total	131/530 (24,7)	399/530 (75,3)
P <sub>trend</sub>		<0,001
<b>Grupos étnicos</b>		
Wai wai	40/182 (21,9)	142/182 (78,0)
Katwena	24/151 (15,9)	127/151 (84,1)
Mawaiana	25/79 (31,6)	54/79 (68,4)
Xeréw	13/46 (28,3)	33/46 (71,7)
Tyrió	7/20 (35,0)	13/20 (65,0)
Hixkariana	6/31 (19,4)	25/31 (80,6)
Tunayana	1/1 (100,0)	0
Misto	14/18 (77,8)	4/18 (22,2)
Não índio	1/2 (50,0)	1/2 (50,0)
p		0,06
<b>Aglomerado</b>		
2	5/26 (19,2)	21/26 (78,8)
3	6/26 (23,1)	20/26 (76,9)
4	14/85 (16,5)	71/85 (83,5)
5 a 7	68/240 (28,3)	172/240 (71,6)
8 a 13	38/153 (24,8)	115/153 (75,2)
p		0,26



### **4.3 Dinâmica de transmissão do HHV-8 de acordo com o grau de parentesco**

Para a avaliação da dinâmica de transmissão do HHV-8 só foram elegíveis as famílias que tinham pelo menos 1 filho. Ao todo, 129 famílias preencheram este quesito. Em 81,4% (105/129) destas famílias ambos os cônjuges apresentaram anticorpos anti-HHV-8 e, somente em duas famílias ambos os cônjuges eram soronegativos para a infecção por HHV-8.

Houve uma associação entre a soropositividade dos filhos e o estado sorológico dos pais em relação à infecção por HHV-8 ( $p=0,01$ ) (Tabela 4).

A proporção de filhos positivos foi maior quando ambos os cônjuges eram positivos. E a proporção de filhos positivos foi maior quando a mãe era soropositiva e o pai soronegativo, comparado à proporção de filhos positivos quando a mãe era soronegativa e o pai soropositivo (56,3% x 38,5%).

**Tabela 4** – Associação entre o estado sorológico para a infecção por HHV-8 dos pais e de seus filhos em 129 famílias\*

<b>Estado sorológico</b>	<b>nº total de filhos (nº de famílias)</b>	<b>Filhos positivos n(%)</b>
1 Pai positivo e mãe positiva	204(105)	151(74,0)
2 Pai negativo e mãe positiva	32(16)	18(56,3)
3 Pai positivo e mãe negativa	13(6)	5(38,5)
4 Pai negativo e mãe negativa	4(2)	2(50,0)

\*Uma família consiste em pai, mãe e pelo menos um filho.  $X^2 = 11,25$  ( $p=0,01$ ). O teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) refere-se à proporção de filhos soropositivos de acordo com os 4 tipos de pares (pai e mãe) e seus respectivos resultados sorológicos.

Ao investigarmos associações intrafamiliares, de acordo com o estado sorológico para a infecção por HHV-8, entre casais (pai e mãe), pai e filho e mãe e filho, constatou-se que havia uma alta correlação familiar em relação à soropositividade para HHV-8 entre mãe e filho ( $p=0,005$ ). Entretanto, não houve correlação entre casais ( $p=0,35$ ) e entre pai e filho ( $p=0,11$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição dos pares de acordo com a relação familiar e o estado sorológico para a infecção por HHV-8

Tipos de pares	Número de pares*				Total	Odds ratio (IC 95%)	p
	+/+	+/-	-/+	-/-			
<b>1 Pai e mãe</b>	105	6	16	2	129	2,1(0,40-11,80)	0,30
<b>2 Pai e filho</b>	165	68	22	16	271	1,7(0,87-3,56)	0,11
<b>3 Mãe e filho</b>	213	78	10	12	313	3,2(1,36-7,88)	0,005

\*Sorologia para a infecção por HHV-8 do primeiro (pai para os pares 1 e 2 e mãe para o par 3) e segundo par (mãe para o par 1 e filho para os pares 2 e 3).

+ =positivo, - =negativo

#### 4.4 Excreção do vírus na saliva

Dos 399 indivíduos que apresentaram sorologia positiva para infecção por HHV-8, 379 possuíam amostras de saliva. Todas as 379 amostras foram submetidas ao *nested* PCR para as regiões VR1 e VR2 do genoma do HHV-8. Foi detectado DNA viral na saliva de 43 indivíduos (tabela 6).

A excreção do vírus pela saliva foi mais freqüente em homens soropositivos que em mulheres, 16,7% e 6,5%, respectivamente ( $p=0,001$ ). Não houve diferença na excreção do vírus pela saliva de acordo com a idade e grupo étnico (tabela 6).

Em relação aos marcadores sorológicos utilizados na IFI, dos indivíduos que estavam excretando o vírus na saliva, 41 apresentaram anticorpos anti-LANA, 24 apresentaram anticorpos anti-lítico e 22 apresentaram anticorpos contra ambos os marcadores sorológicos.

**Tabela 6** – Excreção do vírus na saliva de acordo com a idade, o sexo e grupo étnico

<b>Variável</b>	<b>DNA viral na saliva</b>
<b>Sexo</b>	
Homem	28/167 (16,7)
Mulher	15/212 (6,5)
Total	43/379
<i>Odds ratio</i>	2,65(1,30 – 5,42)
p	0,005
<b>Faixas etárias</b>	
≤ 4	1/5 (20,0)
5-9	3/29(10,3)
10-14	12/62(16,3)
15-19	4/51 (7,8)
20-29	5/80(6,3)
≥ 30	18/152 (12,0)
Total	43/379 (11,3)
P <sub>trend</sub>	0,91
<b>Grupos étnicos</b>	
Wai Wai	16/137 (11,7)
Katwena	15/120 (12,5)
Mawaiana	3/50 (6,0)
Xeréw	3/30 (10,0)
Tyrió	2/12 (16,6)
Hixkariana	3/25 (8,0)
Misto	1/4 (25,0)
Não índio	0/1
p	0,81

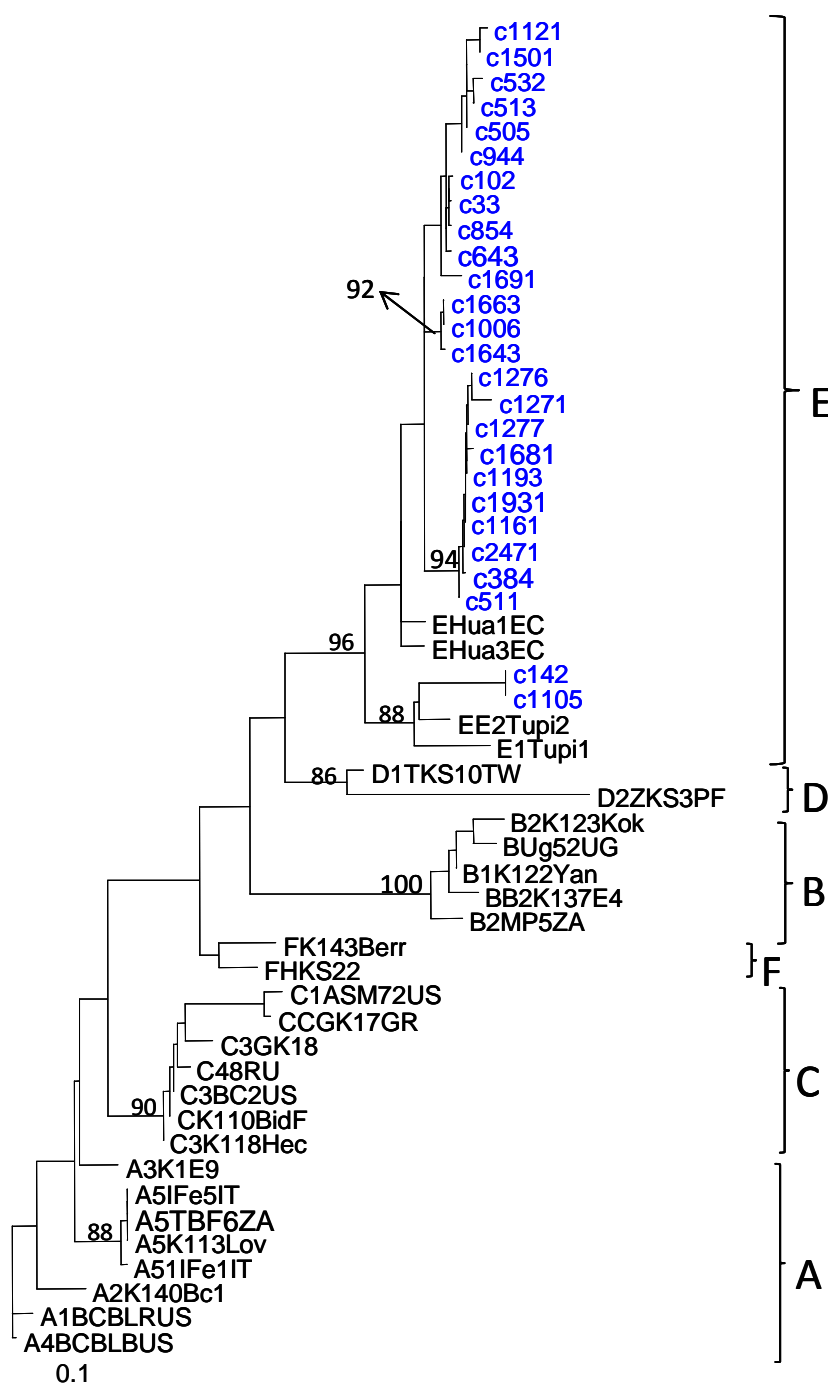
## 4.5 Análises Moleculares

Das 43 amostras amplificadas utilizando o protocolo de *nested* PCR, 26 foram positivas para a região VR1, 40 para a região VR2 e 23 para ambas as regiões.

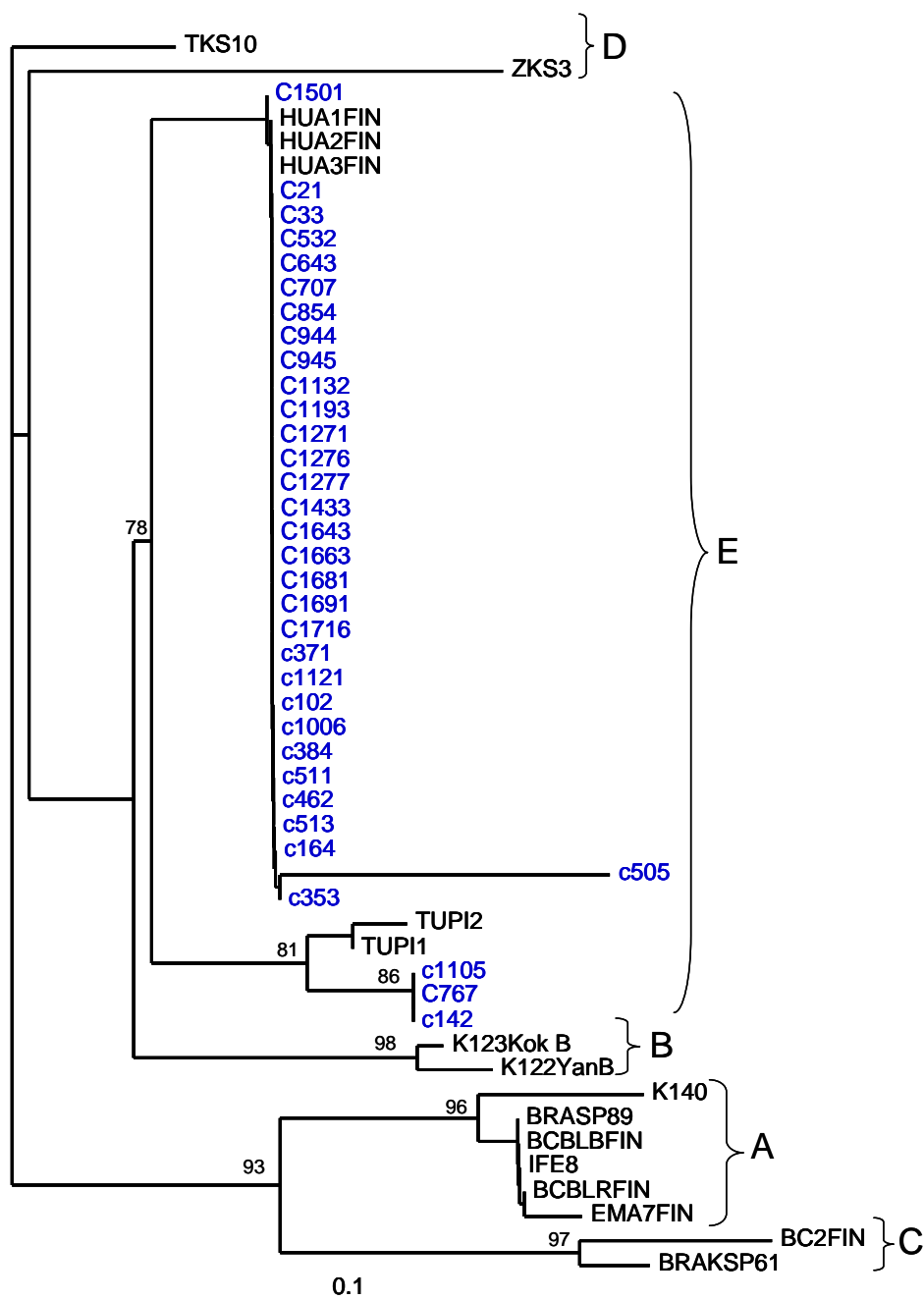
### 4.5.1 Reconstruções Filogenéticas

Inicialmente, foram construídas duas árvores filogenéticas a partir das regiões VR1 e VR2, constituídas por seqüências nucleotídicas de 26 e 34 indivíduos, respectivamente, além de seqüências de referência obtidas no Genbank com o objetivo de genotipagem das amostras. De acordo com as árvores filogenéticas obtidas, todas as seqüências do estudo pertencem ao subtipo E (Figura 3 e 4).

Em sua maioria, as seqüências nucleotídicas estudadas são relacionadas com as seqüências oriundas de ameríndios da etnia Huaoroni, provenientes do Equador. Porém, três seqüências (C142, C767 e C1105), agruparam-se em um ramo separado das demais, e estavam relacionadas com seqüências oriundas de ameríndios da etnia Tupi, provenientes da Amazônia brasileira, com um valor de *bootstrap* de 81%.



**Figura 3.** Árvore Filogenética, não enraizada, da região VR1 do HHV-8, obtida com o método de reconstrução filogenética “Neighbor Joining, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica K80+G. As amostras do estudo estão em azul, as demais amostras são sequências de referências obtidas no GenBank. Os valores de *bootstrap* acima de 70% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós.

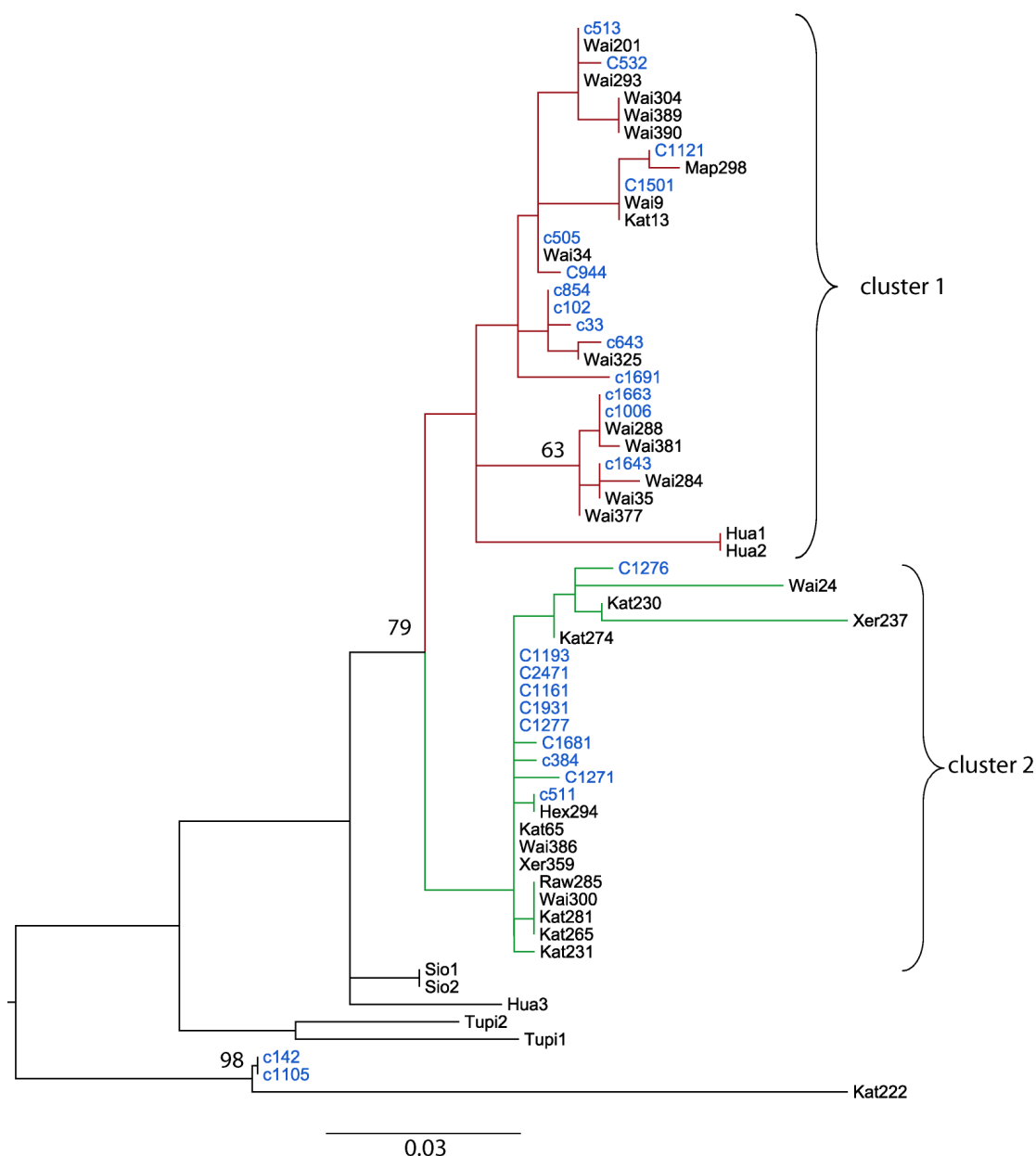


**Figura 4.** Árvore Filogenética, não enraizada, da região VR2 do HHV-8, obtida com o método de reconstrução filogenética “Neighbor Joining”, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica K80. As amostras do estudo estão em azul, as demais amostras são seqüências de referências obtidas no GenBank. Os valores de *bootstrap* acima de 70% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós.



Utilizando-se as seqüências (29) de Souza *et al.* (2007), juntamente, com as obtidas neste trabalho (26 seqüências) e aquelas provenientes de outros grupos indígenas da América do Sul, realizamos reconstrução filogenética para a região VR1 (Figura 5).

A reconstrução da figura 5 mostra que, aparentemente, houve mais de uma entrada do vírus na população. Dois principais *clusters* são observados. Um deles possui 29 seqüências provenientes de índios da aldeia Mapuera, e apresenta maior variabilidade que o segundo *cluster*, que contém 23 seqüências, também obtidas da mesma população. Isso pode sugerir que o primeiro *cluster* é composto de seqüências que entraram na população há mais tempo, e portanto apresentam maior variabilidade. Três seqüências agruparam sozinhas, separadas dos dois grupos principais.



**Figura 5.** Genealogia reconstruída por máxima verossimilhança, a partir da região VR1 do HHV-8, utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G. As amostras deste estudo estão em azul, as demais são sequências obtidas no trabalho de Souza *et al.* (2007) e sequências de referência de outros grupos indígenas da América do Sul (Hua1, 2 e 3, Sio1 e 2 e Tupi1 e 2), obtidas no GenBank. Os valores de *bootstrap* acima de 50% obtidos a partir de 1000 réplicas estão indicados nos respectivos nós. Em vermelho e verde estão destacados os dois principais *clusters* que foram recuperados.

#### 4.5.2 Análises demográficas e populacionais

A taxa de substituição de nucleotídeos foi estimada a partir de um par de amostras coletadas de um mesmo indivíduo em tempos diferentes (2003 e 2006), e sequenciadas utilizando a região VR1.

Após alinhadas as sequências, a distância pareada (K) foi estimada. Isto resultou em um valor de 0.0036. A partir deste valor, e empregando a fórmula  $T=K/2r$ , obtivemos para a região VR1, uma taxa de  $6 \times 10^{-4}$  substituições de nucleotídeos por sítio por ano (s/s/a). Infelizmente, contamos apenas com um indivíduo cujas amostras coletadas temporalmente eram disponíveis. Por isso, a taxa foi estimada apenas com um par de sequências.

Com a taxa de substituição encontrada, calculamos o tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA) para as amostras analisadas. Utilizando o programa BEAST, o TMRCA estimado para as sequências provenientes da população da aldeia Mapuera foi de 138 anos. Para averiguar se os dois *clusters* observados na filogenia, de fato, tiveram origens temporalmente distintas, realizamos a mesma análise para as sequências das amostras dos *clusters* 1 e 2, separadamente.

O *cluster* 1, que apresentava maior variabilidade, tinha um TMRCA de 80 anos, enquanto que o *cluster* 2, com menor variabilidade, apresentou um TMRCA de 20 anos.

O cálculo de TMRCA para as amostras da população total também foram realizados utilizando a taxa de substituições estimada por Sakaoka *et al.* (1994), e o tempo estimado foi em torno de 40 mil anos.

## **4.6 Tipagem de HLA**

### **4.6.1 Amostragem**

Ao todo foram selecionados 54 indivíduos. Destes, 35 formaram o grupo caso (infectados pelo HHV-8) e 19, o grupo controle (soronegativos para o HHV-8). Dentro dos 54 indivíduos havia representantes de 6 etnias, com uma preponderância das etnias Wai-wai e Katwena.

Os habitantes da Aldeia Mapuera são extremamente relacionados. Os indivíduos selecionados para os grupos caso e controle pertenciam a 25 famílias não relacionadas (Figura 6).

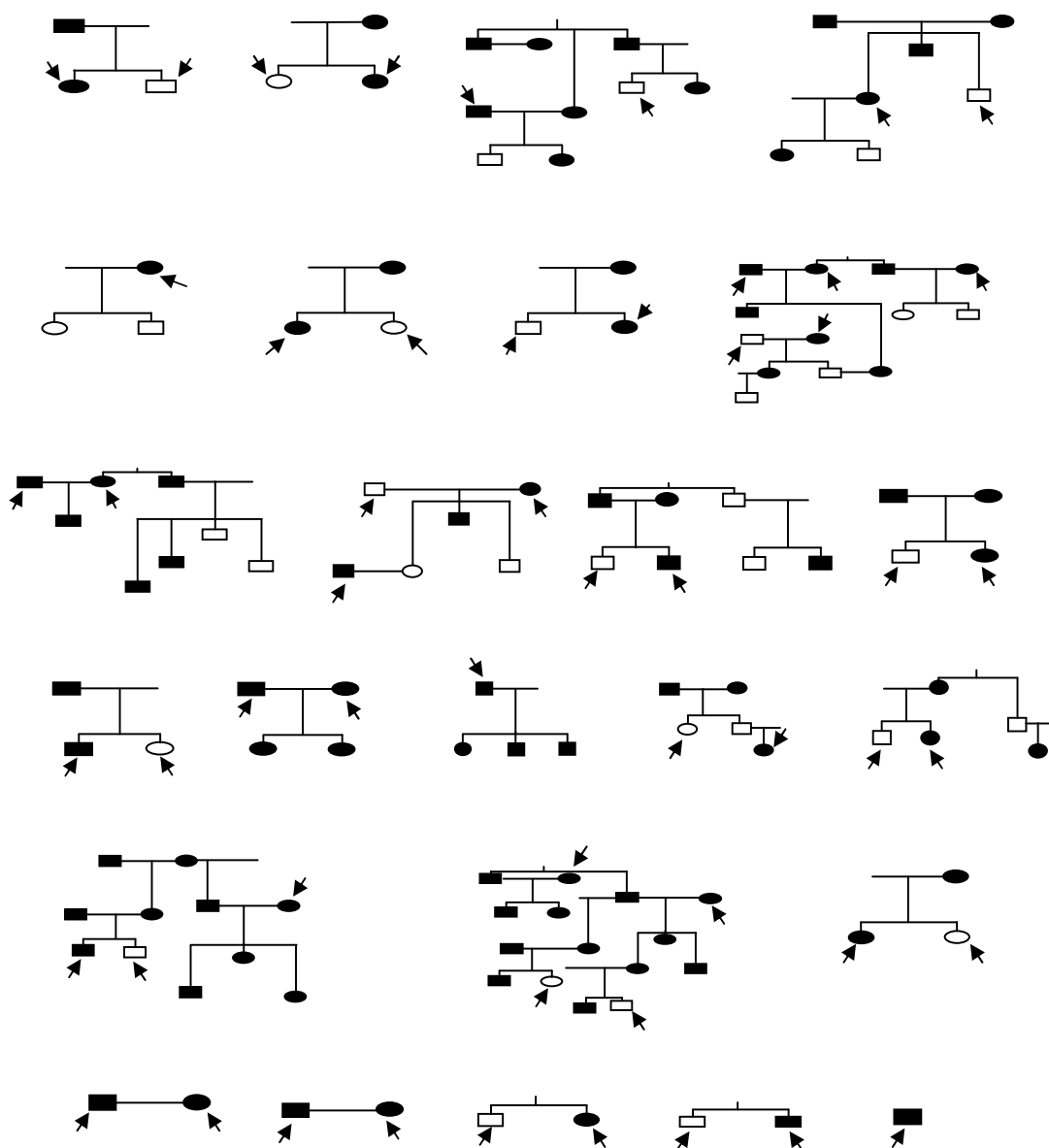
Em relação ao sexo o grupo caso foi constituído por 14 homens e 21 mulheres, o grupo controle, por sua vez foi constituído por 14 homens e 5 mulheres.

### **4.6.2 Tipagem dos genes de HLA-A, -B, -DQB1 e -DRB1**

Dos 54 indivíduos que formaram os grupos caso e controle, em 45 indivíduos foi possível tipificar todos os alelos de HLA-A, -B, -DQB1 e -DRB1.

As frequências alélicas de HLA classe I estão expostas na tabela 7. Os alelos do locus HLA-A observados foram: A\*02 (19%), A\*24 (11%), A\*31 (61%) e A\*68 (8%), onde o mais prevalente foi o alelo A\*31. Os alelos dos locos HLA-B observados foram 7 ao todo e o mais prevalente foi B\*39 (38,0%).

As freqüências alélicas de HLA classe II estão descritas na tabela 8. Os alelos do locus HLA-DQB1 observados foram somente: DQB1\*03 (76,3%), e DQB1\*0402 (23,7%). Dos 5 alelos de HLA-DRB1 encontrados na amostra estudada, o mais freqüente foi: DRB1\*04 (39,5%).



**Figura 6.** Famílias incluídas no estudo. As setas indicam os componentes do grupo caso (com preenchimento) e controle (sem preenchimento).

**Tabela 7** – Frequência dos grupos de alelos de HLA-A e HLA-B na amostra estudada

<b>Grupo</b>	<b>N de controles(%)</b>
<b>HLA-A</b>	
A*02	7 (19,0)
A*24	4 (11,0)
A*31	22 (61,0)
A*68	3 (8,0)
Total de alelos	36 (100)
Total de indivíduos	18
<b>HLA-B</b>	
B*15	3 (9,0)
B*35	3 (9,0)
B*39	13 (38,0)
B*40	1 (3,0)
B*48	6 (17,6)
B*51	6 (17,6)
B*52	2 (5,8)
Total de alelos	34 (100)
Total de indivíduos	17



**Tabela 8** – Frequência dos grupos de alelos de HLA-DQB1 e HLA-DRB1 na amostra estudada

<b>Grupo</b>	<b>N de controles(%)</b>
<b>HLA-DQB1</b>	
DQB1*03	29 (76,3)
DQB1*0402	9 (23,7)
Total de alelos	38 (100)
Total de indivíduos	19
<b>HLA-DRB1</b>	
DRB1*04	15 (39,5)
DRB1*08	8 (21,0)
DRB1*09	1 (2,6)
DRB1*14	9 (23,7)
DRB1*16	8 (13,2)
Total de alelos	38 (100)
Total de indivíduos	19

Ao comparar-se o grupo caso e controle em relação à frequência genotípica dos alelos de HLA classe I (tabela 9) e II (tabela 10), não foi observado associação entre os diversos alelos de HLA encontrados e a presença ou ausência da infecção por HHV-8.

**Tabela 9 – Frequência genotípica de HLA-A e HLA-B dos grupos caso e controle**

<b>Grupo</b>	<b>N de casos (%)</b>	<b>N de controles (%)</b>	<b>p</b>
<b>HLA-A</b>			
A*02	12 (38,7)	6 (33,3)	0,9
A*24	10 (32,3)	4 (22,2)	0,6
A*31	25 (81,6)	15 (83,3)	1,0
A*68	4 (13,0)	3 (16,6)	0,7
Total de indivíduos	31	18	
<b>HLA-B</b>			
B*15	0	3 (17,6)	
B*35	9 (30,0)	3 (17,6)	0,5
B*39	15 (50,0)	11 (64,7)	0,5
B*40	3 (10,0)	1 (5,8)	1,0
B*48	11 (36,6)	4 (23,5)	0,4
B*51	10 (33,3)	6 (35,5)	0,8
B*52	6 (20,0)	2 (11,7)	0,7
Total de indivíduos	30	17	

**Tabela 10** – Frequência genotípica de HLA-DQB1 e HLA-DRB1 dos grupos **caso e controle**

<b>Grupo</b>	<b>N de casos (%)</b>	<b>N de controles(%)</b>	<b>p</b>
<b>HLA-DQB1</b>			
DQB1*03	30 (93,7)	17 (89,4)	0,6
DQB1*0402	16 (50,0)	7 (36,8)	0,5
Total de indivíduos	32	19	
<b>HLA-DRB1</b>			
DRB1*04	22 (64,7)	13 (68,4)	0,9
DRB1*08	15 (44,1)	7 (36,8)	0,8
DRB1*09	5 (14,7)	1 (5,2)	0,4
DRB1*14	9 (26,5)	7 (36,8)	0,6
DRB1*16	8 (23,5)	4 (21,0)	1,0
Total de indivíduos	34	19	

**Discussão**

## 5. Discussão

### 5.1 Epidemiologia e dinâmica de transmissão do HHV-8

No presente estudo a prevalência geral da infecção por HHV-8 foi de 75,3%, o que está em concordância com estudo prévio de soroprevalência, realizado na mesma população, no ano de 2003, no qual observou-se soroprevalência de 79,1% (Souza *et al.*, 2007). Esta prevalência alta em população indígena também foi constatada por outros estudos envolvendo grupos indígenas da Amazônia brasileira e outros países como Equador e Guina Francesa (Biggar *et al.*, 2000; Whitiby *et al.*, 2004; Kazanji *et al.*, 2005; Ishak *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2005).

No estudo de soroprevalência do HHV-8 na população da Aldeia Mapuera, houve uma diferença nos resultados da sorologia por IFI de acordo com o antígeno utilizado. A prevalência de anticorpos anti-LANA foi maior que anti-Lítico. Este resultado está em concordância com Souza *et al.* (2007), porém diverge da maioria dos estudos de soroprevalência para detecção de anticorpos anti-HHV-8 em populações não-ameríndias. É importante ressaltar que não há um padrão ouro para o diagnóstico sorológico da infecção por HHV-8 e este fato impossibilita a comparação de nossos resultados com outros trabalhos em que foram utilizadas outras técnicas sorológicas e/ou antígenos virais. Os testes sorológicos utilizados em nosso estudo foram avaliados por Nascimento *et al.* (2007) que concluíram que o teste de IFI para detecção de anticorpos anti-

LANA e anti-Lítico apresentaram 100% e 92% de especificidade e 72 % e 85% de sensibilidade, respectivamente. Este trabalho sustenta a fidedignidade de nossos resultados.

Um ponto importante que deve ser destacado é o fato de que dos 18 indivíduos considerados mistos, ou seja, de descendência indígena e não indígena, somente 22,3% apresentaram sorologia positiva para HHV-8, um número 3,4 vezes menor quando comparado à prevalência geral. Este resultado nos conduz ao seguinte questionamento: o que justificaria esta prevalência menor, uma vez que estes indivíduos vivem sob as mesmas condições dos demais habitantes da aldeia? Ressalta-se ainda que 66,6% destes indivíduos apresentam idade maior que 10 anos.

No estudo anterior, de Souza *et al.* (2007), observou-se que em indivíduos não-indígenas, que habitavam na mesma região do rio Trombetas, sob condições de vida muito semelhantes à dos indígenas, a prevalência de anticorpos anti-HHV-8 foi baixa (6,1%), sugerindo que a alta prevalência de infecção nos indígenas deveria estar relacionada a fatores de risco genéticos ou comportamentais específicos ainda não elucidados, mas certamente, não relacionados ao meio ambiente. Esta menor prevalência de anticorpos em descendentes mestiços de brancos e índios sugere que fatores genéticos ligados à população indígena poderiam estar implicados na maior susceptibilidade à infecção.

Na aldeia Mapuera a soroprevalência da infecção por HHV-8 não apresentou diferença de acordo com o sexo ou número de indivíduos que

moram em uma mesma casa. E estes resultados também foram observados em outras regiões, como o continente Africano, em que a infecção por HHV-8, também, é endêmica (Mayama *et al.*, 1998; Rezza *et al.*, 2000; De Santis *et al.*, 2002).

Entretanto, observou-se um aumento da prevalência da infecção de acordo com a idade e, o risco de adquirir a infecção por HHV-8 foi três vezes maior em crianças a partir dos 10 anos de idade. Observamos, também que 44% das crianças abaixo de 10 anos de idade eram soropositivas para a esta infecção viral. Adicionalmente, constatamos na Aldeia Mapuera crianças com 2 anos de idade que apresentavam anticorpos anti-HHV-8. Estes dados sugerem uma via de transmissão não sexual na população por nós estudada.

Este resultado é similar ao estudo de Biggar *et al.* (2000) que constatou uma prevalência de 41% em crianças abaixo de 10 anos em tribos indígenas da Amazônia brasileira. Este quadro também foi visto, em outras populações ameríndias onde a aquisição da infecção ocorre, geralmente, durante a infância e a detecção de anticorpos anti-HHV-8 aumenta com a idade (kazanji *et al.*, 2005, Cunha *et al.*, 2005, Souza *et al.*, 2007).

Em população não indígena, porém endêmica para a infecção por HHV-8, também, foi observada alta prevalência (aproximadamente 50%) de anticorpos anti-HHV-8 em crianças abaixo de 10 anos de idade (Andreoni *et al.*, 1999; Mayama *et al.*, 1998; Rezza *et al.*, 2000; De Santis *et al.*, 2002; Mbulaiteye *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a soropositividade na infância está associada com a presença de um membro da família, também soropositivo (Mbulaiteye *et al.*, 2003; Plancoulaine *et al.*, 2000, Brayfield *et al.* 2004; Dedicoat *et al.* 2004). Em nosso estudo, observou-se que em 81,4% das famílias estudadas, ambos os cônjuges foram positivos para a infecção por HHV-8. Porém, não houve uma associação entre a soropositividade entre cônjuges. Plancoulaine *et al.* (2000), ao estudar uma população negra da Guina Francesa, também não observaram dependência da soropositividade entre casais, porém Davidovici *et al.* (2004) ao estudar população judaica de Israel, observaram que tanto para homens quanto para mulheres um dos principais fatores de risco para a infecção por HHV-8 é o estado sorológico do cônjuge. Mbulaiteye *et al.* (2003) também constataram que mulheres casadas com homens com sorologia positiva para a infecção por HHV-8 possuíam risco 7 vezes maior de adquirir a infecção. Estes dados sugerem que em diferentes populações os fatores de risco para a infecção por HHV-8 podem diferir.

Ao averiguarmos se havia associação entre o estado sorológico dos pais e dos filhos em relação à infecção por HHV-8, constatamos que esta associação ocorria ( $p=0,01$ ). A soropositividade entre os filhos estava estavassociada ao estado sorológico dos seus pais. E observamos que a soropositividade materna era o principal fator associado à soropositividade dos filhos ( $p=0,005$ ). Estes resultados estão em concordância com estudos prévios, em população endêmica para a infecção por HHV-8, onde foi observado que mães com sorologia positiva para HHV-8 constituem o principal fator de risco à



aquisição da infecção viral por seus filhos (Plancoulaine *et al.*, 2000; Davidovici *et al.*, 2001; Mbulaiteye *et al.*, 2003; Mbulaiteye *et al.*, 2004; Brayfield *et al.*, 2004; Dedicoat *et al.*, 2004; Mbulaiteye *et al.*, 2006).

Os nossos resultados sugerem que o contato intrafamiliar pode ser a fonte de infecção para HHV-8. Entretanto, outros fatores fora do ambiente familiar também podem estar envolvidos. Uma vez que 75% dos indivíduos estudados são positivos, a probabilidade do indivíduo se infectar no ambiente extra familiar também deve ser considerada.

A pergunta que segue a estes resultados é: qual a via de transmissão do herpesvirus 8 humano de mães para filhos?

Nós propomos que a transmissão viral a crianças ocorra principalmente através da exposição à saliva infectada, tanto no ambiente familiar quanto fora deste. Durante nossa estada na Aldeia Mapuera pudemos constatar que um mesmo recipiente contendo água, suco ou outro tipo de bebida líquida é compartilhado por todos simultaneamente até que o seu conteúdo se finde. Ressalta-se que este compartilhamento ocorre entre familiares, amigos, vizinhos, visitas, ou seja, também entre não parentes. Acreditamos que esta prática cultural possa facilitar a disseminação do vírus através de contato com a saliva de indivíduos infectados.

Em um estudo com crianças, adolescentes e adultos da Uganda observou-se que a infecção por HHV-8 ocorre principalmente em crianças antes da puberdade e sugere que a saliva seja uma possível fonte de transmissão horizontal do vírus entre crianças (Mayama *et al.* 1998).

Mbulaiteye *et al.* (2004) observaram que crianças, freqüentemente, excretam HHV-8 na saliva indicando que elas podem constituir uma importante fonte de infecção, particularmente a seus irmãos mais jovens e seus colegas.

Cook *et al.* (2002) demonstraram que o DNA do HHV-8 foi detectado com maior frequência em saliva que em amostras de sangue de membros da família de um paciente com SK. Além disso, sequências virais similares foram detectadas na saliva de alguns membros, indicando que, muito provavelmente, a transmissão ocorreu pela saliva.

Já foi demonstrado que indivíduos co-infectados com HIV e pacientes com SK apresentam carga viral elevada na cavidade oral quando comparado a CMSP, plasma, sêmen e pele; sugerindo que a cavidade oral pode ser um compartimento de reativação e replicação viral (Koelle *et al.*, 1997; LaDuca *et al.*, 1998; Pauk *et al.*, 2000)

Uma via de transmissão viral possível é a vertical. Contudo, estudos prévios sugerem que esta via não é a principal para a ocorrência da infecção por HHV-8 no primeiro ano de vida (Brayfield *et al.*, 2003; Mantina *et al.*, 2001; Sarmati *et al.*, 2004).

Tendo em vista as características de nosso estudo (tipo corte-transversal) não podemos afirmar que a ocorrência da transmissão vertical, de fato, não aconteceu na amostra estudada.

Alguns vírus da família *Hesperiviridae*, como, EBV, HHV-7, HSV-1 e CMV são detectados em leite materno e, isto sugere a transmissão materno-infantil

através desse fluido (Junker *et al.*, 1991; Fujisaki *et al.*, 1998; Kotronias & Kapranos, 1999; Hamprecht *et al.* 2003).

Nosso estudo não incluía a coleta de leite materno para averiguarmos a presença de DNA viral neste tipo de amostra. Porém, em um estudo em que foi investigado o papel do leite materno na transmissão da infecção concluiu-se que esta via parece não ser importante na transmissão. Neste trabalho, os autores não constataram DNA do HHV-8 em nenhuma das 75 amostras de leite materno. Por outro lado, foi constatado DNA do HHV-8 em 19 de 65 amostras de saliva materna, sugerindo que a saliva materna seja um importante veículo na transmissão viral (Brayfield *et al.*, 2004).

Para a detecção do DNA viral na saliva dos indivíduos que compuseram o nosso estudo, como sequência alvo da reação de PCR, foi utilizada uma região variável (ORFK1) do genoma do HHV-8, com a finalidade de realizar o estudo de genotipagem e filogenia. Deste modo, a prevalência da excreção do vírus na saliva pode ter sido subestimada, pois para este fim recomenda-se utilizar uma região conservada do genoma viral. Ainda assim, observamos uma diferença na prevalência da excreção do vírus pela saliva, de acordo com o sexo ( $p=0,005$ ), como Souza *et al.* (2007), também, observaram, utilizando uma região conservada do genoma viral (ORF 26).

Apesar dos homens da Aldeia Mapuera excretarem mais freqüentemente o vírus que as mulheres, uma ressalva deve ser feita com relação ao papel da mãe como fonte de infecção para os filhos, já que na cultura indígena as

crianças têm contato íntimo e prolongado com as mães, o que aumentaria as chances de exposição ao vírus, por uma possível via de transmissão horizontal.

## 5.2 Estudo filogenético do HHV-8

A maioria dos trabalhos sobre a filogenia do HHV-8 demonstra em que áreas geográficas as variantes do vírus estão localizadas e as mutações genômicas e recombinações que ocorreram. Os trabalhos de Hayward (1999) e Zong *et al.* (2002), respectivamente, compõem uma importante etapa para a compreensão da teoria evolucionária e processos moleculares pelos quais a distribuição viral aconteceu.

No presente estudo foi possível sequenciar 43 amostras de DNA viral extraído de amostras de saliva. Ao construir a árvore filogenética das regiões VR1 e VR2 todas as amostras foram classificadas como subtipo E. Este subtipo é, quase que exclusivamente, encontrado em populações indígenas. (Biggar *et al.* 2000; Whitiby *et al.* 2004; Kazanji *et al.* 2005, Cunha *et al.* 2005; Souza *et al.* 2007)

Na árvore construída com seqüências da região VR1, observou-se que somente duas amostras agruparam-se separadas das demais, formando um ramo separado com as amostras provenientes de índios do grupo lingüístico Tupi.

Das amostras sequenciadas três pertenciam a indivíduos de uma mesma família, eram eles o pai e seus dois filhos. Estas três seqüências agruparam-se

no mesmo ramo. Porém, não podemos afirmar quem foi a fonte de infecção naquela família.

A árvore filogenética obtida com as amostras coletadas em 2003 e 2006 revelou a existência de dois principais *clusters*, sugerindo que houve duas entradas do vírus na Aldeia. No *cluster* que possui maior variabilidade observou-se que a maioria das sequências provém de indivíduos da etnia Wai-Wai, ao passo que o *cluster* com menor variabilidade é composto por maioria Katwena.

O povo Wai-Wai por sua facilidade em assimilar outras etnias convive harmoniosamente com mais 6 diferentes etnias na Aldeia indígena Mapuera, porém mesmo convivendo em uma mesma área geográfica há um certo “isolamento” geográfico do povo Katwena em relação aos demais povos étnicos que vivem em Mapuera, pois o povo Katwena não vive no núcleo da Aldeia. O que talvez possa explicar o predomínio de seqüências oriundas de indivíduos desta etnia no *cluster* menos variável.

### **5.2.1 Parâmetros populacionais e demográficos**

Ao utilizarmos sequências provenientes de um indivíduo que participou do estudo em tempos diferentes (2003 e 2006), foi possível calcular a distância pareada e obter a taxa de substituição para a região VR1, que foi da ordem de  $10^{-4}$  substituições por sítio por ano (s/s/a). Mesmo que essa análise tenha sido a partir de duas sequências apenas, esse resultado deve ser levado em

consideração ao se trabalhar com HHV-8. Isso porque não há na literatura trabalhos que tenham estimado uma taxa de substituição de nucleotídeos especificamente para este vírus.

Os vírus de DNA normalmente são caracterizados por possuírem taxas de substituição de nucleotídeos mais lentas que vírus de RNA, mas deve-se considerar as variações entre famílias, e principalmente em relação ao tipo de vírus (fita simples ou dupla). Além disso, para a grande maioria dos vírus de DNA fita dupla as taxas de evolução são estimadas a partir da premissa de que esses vírus co-divergiram com seus hospedeiros, o que pode resultar em estimativas de  $10^{-8}$  s/s/a.

No caso dos herpesvirus, as taxas de substituições que temos disponíveis foram calculadas assumindo esta premissa. Dessa forma, as taxas para Herpesvirus, mais precisamente HSV-1 e HSV-2 são da ordem de  $10^{-8}$ . (Sakaoka *et al.*, 1994; Shackelton & Holmes, 2004).

De acordo com a literatura, a premissa de que os vírus de DNA, em geral, co-divergem com seus hospedeiros não pode ser aplicada a todos os vírus (Shackelton *et al.*, 2005; Shackelton *et al.*, 2006). Sendo assim, pareceu-nos mais interessante utilizar um método para a estimativa de taxa de substituição que não assumisse, *a priori*, co-divergência.

A limitação do nosso estudo, entretanto, é o fato de termos, somente, as sequências de um indivíduo, tendo em vista que quanto maior o número da amostra maior a fidedignidade dos resultados.

Um outro ponto discutível na metodologia que empregamos para o cálculo da taxa de substituição, é que a distância estimada entre as sequências é calculada através da relação bruta entre número de substituições e tamanho da sequência. Uma vez que foram sequenciados apenas 330 nucleotídeos da VR1, isso pode ter resultado em uma superestimativa do valor de K.

Assumindo a taxa de Sakaoka *et al.* (1994), conclui-se que o vírus chegou àquela população há mais de 40.000 anos, o que parece não condizer com a realidade, uma vez que o povo Wai-wai chegou à Amazônia brasileira em meados da década de 30. Este resultado seria confiável se as sequências amostradas nesta população tivessem origens completamente distintas. Pois, isto faria com que o ancestral comum coalescesse há muito mais tempo do que a chegada do povo à Aldeia Mapuera. Entretanto, visto que a variabilidade total das sequências não foi grande, e, o mais importante, apenas dois grandes grupos foram recuperados na filogenia, é mais parcimonioso que a data de coalescência para essas sequências seja mais próxima do presente.

A partir da taxa de substituição encontrada em nosso trabalho, foi possível obter a data do TMRCA para o vírus circulante na Aldeia, que foi mais compatível com o observado na filogenia.

Calculamos o ancestral comum mais recente para: 1) Todas as amostras coletadas na Aldeia; 2) Amostras do *cluster* de maior variabilidade e 3) Amostras do *cluster* de menor variabilidade. Deve ser levado em consideração que as análises de coalescência dos vírus partiram da premissa de uma taxa de substituição calculada apenas com um par de sequências, o que claramente

conta com certo nível de incerteza. Entretanto, ficou evidente que nossos dados de taxa de substituição, e conseqüentemente de ancestral comum para os vírus que circula na população de Mapuera estão em concordância com os dados demográficos, filogenéticos e históricos da Aldeia Mapuera.

Para todas as 55 seqüências estudadas encontramos um ancestral comum mais recente para o vírus circulante em Mapuera de, aproximadamente, 138 anos.

As primeiras notícias sobre os Wai Wai foram trazidas por R. H. Schomburgk, em 1841, que os encontrou ao sul da serra do Acaraí, localizada no Planalto das Guianas, na fronteira do Brasil com a Guiana. Anos depois, H. Coudreau, na mesma localidade diz ter encontrado entre 3.000 a 4.000 índios, o que parece muito exagerado, se comparado aos 150 habitantes vistos por Schomburgk. Em 1937, Terry-Holden afirma que os Wai Wai estavam se mudando para o Brasil para as cabeceiras do rio Mapuera (Gallois & Ricardo, 1983). Este dado vem de encontro com a data do TMRCA do vírus que circula na Aldeia.

Para as amostras do *cluster* de maior variabilidade encontramos um ancestral comum de aproximadamente 80 anos. Enquanto que para as amostras do cluster menos diverso foi de aproximadamente 20 anos. Estas duas entradas do vírus na tribo é totalmente compreensível devido ao fato dos habitantes da Aldeia Mapuera receber, com freqüência, parentes de aldeias próximas distribuídas ao longo do rio Mapuera e, também, de outros países como Suriname e Guiana.



Os Wai Wai passaram a ter contato efetivo com os os *Karaywá* (“homem branco” na língua wai wai), quando missionários da agência missionária MEVA tiveram, no início da década de cinquenta, autorização para evangelizá-los. A partir de 1971, impedidos de permanecerem na República Cooperativa da Guiana, os missionários se mudaram para o Brasil, e, com eles, vieram líderes religiosos Wai Wai de grande reputação, a ponto de atrair a maioria deles para o Brasil, sobretudo para as regiões do Caxmi e Mapuera (Gallois & Ricardo, 1983). Esta informação somado aos dados que obtivemos sobre a chegada do vírus à Aldeia, pode-se concluir que a entrada do HHV-8 é anterior ao contato efetivo desta população indígena com não índios.

Dados do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados, incluindo povos indígenas não amazônicos que habitam a região sudeste, demonstraram que existe grupo indígena que não apresenta anticorpos anti-HHV-8. Este dado inédito conduz ao seguinte questionamento: o que justificaria a ausência da infecção por HHV-8 nestes povos, uma vez que as mais variadas etnias indígenas que habitam a região Amazônica apresentam anticorpos anti-HHV-8?

Várias hipóteses já foram apresentadas para explicar os processos de origem e dispersão dos ameríndios na América do Sul, mas parece que um centro comum de origem existiu e, o mais provável é a Amazônia. Estima-se que a chegada das primeiras populações Tupi-guarani para a região costeira do sudeste do Brasil ocorreu há aproximadamente 2.920 anos (Schell Ybert-R *et al.*, 2008). Assumindo que o ancestral comum do vírus que circula na Aldeia Mapuera foi introduzido há aproximadamente 138 anos, pode-se especular que

antes da separação dos povos indígenas amazônicos o vírus ainda não havia sido introduzido naquela população.

### 5.3 HLA e a infecção por HHV-8

Estudos da variabilidade do sistema HLA em população indígena indicam que o polimorfismo de HLA é limitado, comparado a outros grupos étnicos (Fernández-Viña *et al.*, 1997; Salzano, 2002).

Em nosso estudo constatamos quatro alelos para HLA-A e 7 diferentes para HLA-B. Estes resultados estão em concordância com outros estudos de tipagem de HLA classe I em população indígena, em que os alelos A\*02, A\*24, A\*31 e A\*68, observados em nossa amostra, também, foram encontrados em outras populações indígenas (Little *et al.*, 2001; Salzano *et al.*, 2002).

O número de alelos observados para DQB1 foram dois (DQB1\*03, DQB1\*0402). Em índios sul-americanos o alelo \*0302 é prevalente (Salzano *et al.*, 2002).

A tipagem de HLA-DRB1 apresentou 5 diferentes alelos. Os alelos DRB1\*08 e DRB1\*16 foram observados na amostra estudada. Em população indígena os alelos DRB1\*08 e DRB1\*16 são muito freqüentes. Ressalta-se ainda que o alelo DRB1\*08 é um marcador de população indígena (Lázaro *et al.* 1999). Segundo Tsuneto *et al.* (2003) pelo menos um dos alelos de HLA-DRB1\*08 (\*0802, \*0804 e \*0807) está presente em todas as populações

indígenas. E destes, somente, DRB1\*0802 é amplamente distribuído e encontrado em todas as populações indígenas.

Na amostra da população de Mapuera o alelo DRB1\*09 foi observado com em uma baixa frequência (2,6%). Alelos DRB1\*09 são vistos em população indígena, nativos da América do norte e população do leste asiático (Hashimoto *et al.*, 1994). São marcadores dos ancestrais asiáticos de populações nativas da América (Tsuneto *et al.*, 2003).

Donadi *et al.* (2002) ao estudarem HLA Classe I e II de população indígena do alto Amazonas constataram os mesmos alelos que os encontrados no presente estudo, porém a diversidade alélica em ambas as classes de HLA foi maior que as observada no presente estudo.

O papel fundamental dos antígenos leucocitários humanos (HLA) na iniciação e regulação da resposta imune, juntamente com as suas características acentuadamente polimórficas, motivou numerosos estudos sobre a sua influência na susceptibilidade às doenças infecciosas.

Ao avaliarmos a ocorrência da associação entre a presença da infecção por HHV-8 e os alelos de HLA classes I e II, não foi observada nenhuma associação. Uma limitação de nosso estudo, porém, é o tamanho da amostra e, isto se justifica pelo fato de que na população da Aldeia Mapuera os indivíduos são extremamente relacionados, dificultando o recrutamento de indivíduos de famílias não-relacionadas para este tipo de análise. Somado a este fato, está a

alta prevalência da infecção por HHV-8, pois somente 25% dos indivíduos, em nosso estudo, não apresentou anticorpos anti-HHV-8.

Em relação ao desenvolvimento de SK e a associação com HLA, os estudos são controversos; Strichman-Almashanu *et al.* (1995) ao estudarem um grupo de judeus com SK não constataram nenhuma associação entre o desenvolvimento da doença e HLA, por outro lado, Gayà *et al.* (2004) observaram que havia uma associação positiva entre SK e alelos de HLA-DRB1 que possuíam fenilalanina na posição 13. Masala *et al.* (2005), por sua vez, também encontraram associação positiva entre SK e Cw7, DRB1\*1104, DRB1\*1302, DQA1\*0302 e DQB1\*0604.

Alkharsah *et al.* (2007) investigaram possíveis fatores que contribuem para a excreção de HHV-8 na saliva e os resultados mostraram que os alelos A\*6801, A\*4301 e DRB1\*04 podem estar associados com um controle deficiente da infecção por HHV-8, visto que a maioria dos indivíduos que estavam excretando o vírus apresentava estes alelos.

Outros marcadores imunogenéticos devem ser investigados para averiguar a existência de associação com a presença ou ausência da infecção por HHV-8 na população de Mapuera.

## **Referências bibliográficas**

## 6. Referências bibliográficas

Ablashi D, Chatlynne L, Cooper H, Thomas D, Yadav M, Norhanom AW, Chandana AK, Churdboonchart V, Kulpradist SA, Patnaik M, Liegmann K, Masood R, Reitz M, Cleghorn F, Manns A, Levine PH, Rabkin C, Biggar R, Jensen F, Gill P, Jack N, Edwards J, Whitman J, Boshoff C. Seroprevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. *Br J Cancer*. 1999, 81(5):893-897.

Alkharsah KR, Dediccoat M, Blasczyk R, Newton R, Schulz TF. Influence of HLA alleles on shedding of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in saliva in an African population. *J Infect Dis*. 2007;195(6):809-816.

Ambroziak JA, Blackbourn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, Lennette ET, Levy JA: Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 1995, 268(5210):582-583.

Arvanitakis L, Yaseen N, Sharma S. Latent membrane protein-1 induces cyclin D2 expression, pRb hyperphosphorylation, and loss of TGF- $\beta$ 1-mediated growth inhibition in EBV- positive B cells. *J. Immunol*. 1995;155:1047–1056.

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

641-644.

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):1562-1568.

Blackbourn DJ, Osmond D, Levy JA, Lennette ET(1999).Increased human herpesvirus 8 seroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. *J Infect Dis.* 1999;179 (1): 237-239.

Blauvelt A. The role of human herpesvirus 8 in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Adv Dermatol* 1999; 14: 167–206.

Boshoff C, Weiss RA. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus . *Adv Cancer Res* 1998; 75:57–86.

Brayfield BP, Phiri S, Kankasa C, Muyanga J, Mantina H, Kwenda G, West JT, Bhat G, Marx DB, Klaskala W, Mitchell CD, Wood C. Postnatal human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 infection in mothers and infants from Zambia. *J Infect Dis.* 2003;187(4):559-568.

Brayfield BP, Kankasa C, West JT, Muyanga J, Bhat G, Klaskala W, Mitchell

CD, Wood C: Distribution of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in maternal saliva and breast milk in Zambia: implications for transmission. *J Infect Dis.* 2004;189(12):2260-2270.

Caterino-Araújo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil (1998). *J. Infect. Dis.* 1998;177: 1136-1137.

Caterino-Araújo A, Calabro M, Santos-Fortuna, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 1999;179:1591-1592.

Chang Y, Cersaman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994; 266: 1865-1869.

Chen J, Ueda K, Sakakibara S, Okuno T, Parravicini C, Corbellino M, Yamanishi K. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:4119–4124.

Cook PM, Whitby D, Calabro MI, Luppi M, Kakoola DN, Hjalgrim H, Ariyoshi K,



Ensoli B, Davison AJ, Schulz TF. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in Europe and Africa. *AIDS*. 1999;13:1165-1176.

Cook RD, Hodgson TA, Waugh AC et al. Mixed patterns of transmission of human herpesvirus 8 (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families. *J Gen Virol*. 2002;83:1613-1619.

Corey L, Brodie S, Huang M L, Koelle DM, Wald A. HHV-8 infection: a model for reactivation and transmission. *Rev. Med. Virol*. 2002;12:47-63.

Cotter MA, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology*. 1999; 25: 254-264.

Cunha AM, Caterino-De-Araujo A, Costa SC, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NC, Goncalves MS, Costa FF, Galvao-Castro B. Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol*. 2005;86(9):2433-2437.

De Paoli P. Human herpesvirus 8: an update. *Microbes Infect*. 2004;6:328-35.

De Santis Pau CP, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Kazembe PN, Dobbie H,

Jarvis WR, Jason J. Demographic and immune correlates of human herpesvirus 8 seropositivity in Malawi, África. *Int J Infect Dis.* 2002;6(4):266-271.

Dedicoat M, Newton R, Alkharsah KR, Sheldon J, Szabados I, Ndlovu B, Page T, Casabonne D, Gilks CF, Cassol S A, Whitby D, Schulz TF. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J. Infect. Dis.* 2004;190(6):1068-1075.

Donadi EA, Rodrigues MIV, Figueiredo JFC, Deghaide, Cruz A A. HLA class I and II alleles in Brazilian Amerindians from the upper Amazon basin. *Tissue Antigens.* 2002;59(52).

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007;7:214.

Dukers NH, Renwick N, Prins M, Geskus Rb, Schulz TF, Weverling GJ, Coutinho RA, Goudsmit J. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am. J. Epidemiol.* 2000;151(3):213-224.

Dukers NT, Rezza, G. Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and what we do not know. *AIDS.* 2003;17:1717-1730.

Edelman DC. Human herpesvirus 8 - a novel human pathogen. *Virology Journal*. 2005; 78: 1-32.

Engels EA, Sinclair MD, Biggar RJ, Whitby D, Ebbesen P, Goedert JJ, Gastwirth JL: Latent class analysis of human herpesvirus 8 assay performance and infection prevalence in sub-saharan Africa and Malta. *Int J Cancer*. 2000;88(6):1003-1008.

Fernández-Mestre MT, Jaraquemada D, Bruno RE, Caro J, Layrisse Z. Analysis of the T-cell receptor b –chain variable-region (V) repertoire in chronic human Chagas' disease . *Tissue Antigens*. 2002; 60:10-15.

Fernández-Viña MA, Lázaro AM, Marcos CY, Nulf C, Raimondi E, Haas EJ, Stastny P. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. *Tissue Antigens*. 1997;50(3):233-250.

Freitas RB, Freitas MR, Linhares AC. Prevalence of human herpesvirus 8 antibodies in the population of Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;44(6):309-313.

Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi

K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol.* 1998;56(3):275-279.

Gallois D & Ricardo CA (coords). Povos indígenas do Brasil. Amapá/Norte do Pará. Vol. 3. São Paulo, CEDI, 1983.

Gambus G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, Sirera G, Muga R, del Romero J, Boshoff C, Whitby D, Casabona J. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *AIDS.* 2001;15(9):1167-1174.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, *et al.*: KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Méd.* 1996; 2(8):925-928.

Gayà A, Esteve A, Casabona J, McCarthy JJ, Martorell J, Schulz TF, Whitby D; EURO-SHAKS working group. Amino acid residue at position 13 in HLA-DR beta chain plays a critical role in the development of Kaposi's sarcoma in AIDS patients. *AIDS.* 2004;18(2):199-204.

Grulich AE, Kaldor JM, Hendry O, Luo K, Bodsworth NJ, Cooper DA. Risk of

Kaposi's sarcoma and oroanal sexual contact. *Am J Epidemiol.* 1997;145(8):673-679.

Hashimoto M, Kinoshita T, Yamasaki M, Tanaka H, Imanishi T, Ihara H, Ichikawa Y, Fukunishi T. Gene frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese individuals. *Tissue Antigens.* 1994;44(3):166-173.

Hamprecht K, Witzel S, Maschmann J, Dietz K, Baumeister A, Mikeler E, Goelz R, Speer CP, Jahn G. Rapid detection and quantification of cell free cytomegalovirus by a high-speed centrifugation-based microculture assay: comparison to longitudinally analyzed viral DNA load and pp67 late transcript during lactation. *J Clin Virol.* 2003;28(3):303-316.

Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Sem. Can. Biol.* 1999;9:187-199.

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 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:344-352.

Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol.* 1998;16: 593-617.

Hyun JK, da Silva R, Shah IM, Blake N, Moore OS, Chang Y. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mimics Epstein-Barr virus EBNA1 immune evasion through central repeat domain effects on protein processing. *J Virol.* 2007;81:8225-8235.

Iscovich J, Fischbein A, Fisher-Fischbein J, Freedman LS, Eng SM, Boffetta P, Vudovich A, Glasman C, Goldschmidt R, Livingston M, *et al.*: Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in healthy adults in Israel. *Anticancer Res.* 2000;20:2119-2122.

Ishak R, Martins RN, Machado LF, Vallinoto AC, Lobato L, Satã T, Ishak MO. The descriptive and molecular epidemiology of HHV-8 among population groups of the Amazon region of Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:436.

Ishido S, Wang C, Lee BS, Cohen GB, Jung JU. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol.* 2000;74(11):5300-5309.

Jenner RG & Boshoff C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-

associated herpesvirus. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1602:1-22.

Johnson AS, Maronian N, Vieira J. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene expression during epithelial differentiation. *J Virol.* 2005;79(21):13769-13777.

Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci.* 1991;302(4):220-223.  
Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC, Hokello J, Sussman N, Simms S, Rockwell RF, Pozos R, Hayward GS, Boto W. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology.* 2006;49(3):133-143.

Kamiyama K, Kinjo T, Chinen K, Iwamasa T, Uezato H, Miyagi JI, Mori N, Yamane N. Human herpesvirus 8 (HHV8) sequence variations in HHV8 related tumours in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol.* 2004;57(5):529-535.

Kasolo FC, Monze M, Obel N, Anderson RA, French C, Gompels UA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and

high variation in the K1 glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1998;79(12):3055-3065.

Kazanji M, Dussart P, Duprez R, Tortevoeye P, Pouliquen JF, Vandekerkhove J, Couppié P, Morvan J, Talarmin A, Gessain A. Serological and molecular evidence that human herpesvirus 8 is endemic among Amerindians in French Guiana. *J Infect Dis.* 2005;192(9):1525-1529.

Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat. Med.* 1996;2(8): 918-924.

Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis.* 1997;176(1):94-102.

Kotronias D, Kapranos N. Detection of herpes simplex virus DNA in maternal breast milk by in situ hybridization with tyramide signal amplification. *In Vivo.* 1999;13(6):463-466.

Kouri V, Marini A, Doroudi R, Nambiar S, Rodriguez ME, Capo V, Resik S,



Blanco O, Martinez A, Hengge UR. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts. *Virology*. 2005;337(2):297-303.

LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz BJ. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1610-1615.

La Grenade L, Manns A, Fletcher V, Derm D, Carberry C, Hanchard B, Maloney EM, Cranston B, Williams NP, Wilks R, Kang EC, Blattner WA. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotrophic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch Dermatol*. 1998;134(4):439-444.

Lacoste V, Judde JG, Briere J, Tulliez M, Garin B, Kassa-Kelembho E, Morvan J, Couppie P, Clyti E, Forteza Vila J, Rio B, Delmer A, Mauclere P, Gessain A. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology*. 2000;278(1): 60-74.

LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz JB. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infec Dis*. 1998;178:1610-1615.

Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Micro.* 2000;38(4):1404-1408.

Lampinen TM, Kulasingam S, Min J, Borok M, Gwanzura L, Lamb J, Mahomed K, Woelk GB, Strand KB, Bosch ML, Edelman DC, Constantine NT, Katzenstein D, Williams MA. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in oral and genital secretions of zimbabwean women. *J Infect Dis.* 2000;181:1785-1790.

Lan K, Koppers DA, Verma SC, Robertson ES. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen inhibits lytic replication by targeting Rta: a potential mechanism for virus-mediated control of latency. *J Virol.* 2004;78:6585-6594.

Lan K, Koppers DA, Robertson ES. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virol.* 2005;79:1559-1568.

Lázaro AM, Moraes ME, Marcos CY, Moraes JR, Fernández-Viña MA, Stastny P. Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a

South-American Indian tribe. *Hum Immunol.* 1999;60(11):1138-1149.

Lenntte ET, Blackbourn DJ, Levy JÁ. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet.* 1996;348:858-861.

Little AM, Scott I, Pesoa S, Marsh SG, Argüello R, Cox ST, Ramon D, Vullo C, Madrigal JA. HLA class I diversity in Kolla Amerindians. *Hum Immunol.* 2001;62(2):170-179.

Mantina H, Kankasa C, Klaskala W, Brayfield B, Campbell J, Du Q, Bhat G, Kasolo F, Mitchell C, Wood C. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Int J Cancer.* 2001;94(5):749-752.

Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *An Bras Dermatol.* 2000;75(3):283-290.

Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH: Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med.* 1998;338:948-954.

Masala MV, Carcassi C, Cottoni F, Mulargia M, Contu L, Cerimele D. Classic Kaposi's sarcoma in Sardinia: HLA positive and negative associations. *Int J Dermatol.* 2005;44(9):743-745.

Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int. J. Cancer.* 1998;77(6):817-820.

Mbulaiteye SM, Pfeiffer RM, Whitby D, Brubaker GR, Shao J, Biggar RJ. Human herpesvirus 8 infection within families in rural Tanzania. *J Infect Dis.* 2003;187(11):1780-1785.

Mbulaiteye SM, Pfeiffer RM, Engels EA, Marshall V, Bakaki PM, Owor AM, Ndugwa CM, Katongole-Mbidde E, Goedert JJ, Biggar RJ, Whitby D. Detection of kaposi sarcoma-associated herpesvirus DNA in saliva and buffy-coat samples from children with sickle cell disease in Uganda. *J Infect Dis.* 2004;190(8):1382-1386.

Mbulaiteye S, Marshall V, Bagni RK, Wang CD, Mbisa G, Bakaki PM, Owor AM, Ndugwa CM, Engels EA, Katongole-Mbidde E, Biggar RJ, Whitby D. Molecular evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated

herpesvirus in Uganda and K1 gene evolution within the host. *J Infect Dis.* 2006;193(9):1250-1257.

Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, Ebbesen P, Schulz TF. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int. J. Cancer* .1998;77(4):543-548.

Meng XR, Spira TJ, Bhat GJ et al.- Individuals from North America, Australasia and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology*. 1999;261:106-119.

Mohanna S, Maco V, Gown A, Morales D, Bravo F, Gotuzzo E. Is classic Kaposi's sarcoma endemic in Peru?: report of a case in an indigenous patient. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):324-326.

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):52-59.

Nascimento MC, de Souza VA, Sumita LM, Freire W, Munoz F, Kim J, Pannuti

CS, Mayaud P. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):715-720.

O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, Goedert JJ: Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis.* 1999;180(4):1010-1017.

Osman M, Kubo T, Gill J, Neipel F, Becker M, Smith G, Weiss R, Gazzard B, Boshoff C, Gotch, F. Identification of human herpesvirus 8- specific cytotoxic T-cell responses. *J Virol.* 1999;72(7):6136-6140.

Overtvelt LV, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruysse V, Goldman M, Hosmalin A, Vray B. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8 + T lymphocytes. *Int Immunol.* 2002; 14(10):1135-1144.

Pan L, Milligan L, Michaeli J, Cesarman E, Knowles DM. Polymerase chain reaction detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-optimized protocols and their application to myeloma. *J Mol Diagn.* 2001;3(1):32-38.

Pauk, J., M. L. Huang, S. J. Brodie, A. Wald, D. M. Koelle, T. Schacker, C. Celum, S. Selke, and L. Corey. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med.* 2000;343:1369-1377.

Pérez C, Tous M, Gallego S, Zala N, Rabinovich O, Garbiero S, Martínez MJ, Cunha AM, Camino S, Cámara A, Costa SC, Larrondo M, Francalancia V, Landreau F, Bartomioli MA. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in blood donors from different geographical regions of Argentina, Brazil, and Chile. *J Med Virol.* 2004;72(4):661-667.

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

Plancoulaine S, Abel L, Van Beveren M, Tregouët Da, Joubert M, Tortevoeye P, de Thé G, Gessain A (2000). Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet.* 2000;356(9235):1062-1065.

Plancoulaine S, Gessain A, Van Beveren M, Tortevoeye P, Abel L. Evidence for a recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis.* 2003;187(12):1944-1950.

Polstra AM, Burg RVD, Goudsmit J, Cornelissen M. Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Clin Microb.* 2003;41(12): 5488-5491.

Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998; 14:817-818.

Price P, Keane NM, Stone SF, Cheong KY, French MA. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Hum Immunol.* 2001;62 (2):157-164.

Ravikumar M, Dheenadhayalan V, Rajaram K, Lakshmi SS, Kumaran PP, Paramasivan CN, Balakrishnan K, Pitchappan RM. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(5):309-317.

Renne R, Lagunoff M, Zhong W , Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J. Virol.* 1996;70:8151–8154.

Rezza G, Dorrucchi M, Serraino D, Andreoni M, Giuliani M, Zerboni R, Sarmati L, Colangeli V, Salassa B, Monini P, Ensoli B, Pezzotti P. Incidence of Kaposi's



sarcoma and HHV-8 seroprevalence among homosexual men with known dates of HIV seroconversion. Italian Seroconversion Study. *AIDS*. 2000; 14(11):1647-1653.

Rezza G, Danaya RT, Wagner TM, Sarmati L, Owen IL, Monini P, Andreoni M, Suligo B, Ensoli B, Pozio E: Human herpesvirus-8 and other viral infections, Papua New Guinea. *Emerging Infectious Dis*. 2001;7(5):893-895.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(25):14862-14867.

Sakaoka H, Kurita K, Iida Y, Takada S, Umene K, Kim YT, Ren CS, Nahmias AJ. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol*. 1994;75 (3):513-527.

Sarmati L, Carlo T, Rossella S, Montano M, Adalgisa P, Rezza G, Andreoni M. Human herpesvirus-8 infection in pregnancy and labor: lack of evidence of vertical transmission. *J Med Virol*. 2004;72(3):462-466.

Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc.* 2002;74(2):223-263.

Schatz O, Monini P, Bugarini R, Neipel F, Schulz TF, Andreoni M, Erb P, Eggers M, Haas J, Buttò S, Lukwiya M, Bogner JR, Yaguboglu S, Sheldon J, Sarmati L, Goebel FD, Hintermaier R, Enders G, Regamey N, Wernli M, Stürzl M, Rezza G, Ensoli B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serology in Europe and Uganda: multicentre study with multiple and novel assays. *J Med Virol.* 2001 ;65(1):123-132.

Schulz TF. Epidemiology of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *Adv Cancer Res.* 1999;76:121-160.

Schulz TF. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J. Antim. Chemoth.* 2000;45:15-27.

Schell-Ybert R , Macario K, Buarque A, Anjos RM, Beauclair M. A new age to an old site: the earliest Tupiguarani settlement in Rio de Janeiro State? *An Acad Bras Cienc.* 2008;80(4):763-770.

Shackelton LA, Holmes EC. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. *Trends Microbiol.*

2004;12(10):458-465.

Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):379-384.

Shackelton LA, Parrish CR, Holmes EC. Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses. *J Mol Evol*. 2006;62(5):551-563.

Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, De Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet*. 1996;348(9035):1133-1138.

Singh N, Agrawal S, Rastogi AK. Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3(1):41-49.

Soulier J. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood*.1995; 86:1276-1280.

Souza VA, Sumita LM, Freire W, Sato HK, Grandi JL, Pierrotti LC, Nascimento MC, Pannuti CS. Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in São Paulo State. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(1):123-127.

Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, Freire WS, Tateno A, Boulos M, Mayaud P, Pannuti CS. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis*. 2007;196 (6):844-852.

Strichman-Almashanu L, Weltfriend S, Gideoni O, Friedman-Birnbaum R, Pollack S. No significant association between HLA antigens and classic Kaposi sarcoma: molecular analysis of 49 Jewish patients. *J Clin Immunol*. 1995;15(4):205-209.

Swofford D., *Phylogenetic Analysis with Parsimony (and other Methods)*, version 4.0b2a. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. 1999.

Tedeschi R, Dillner J, Paoli P. Laboratory diagnosis of human herpesvirus 8 infection in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:831-844.

Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodriguez-Delfin LA, Zago MA, Hill K, Hurtado AM, Ribeiro-dos-Santos AK, Petzl-Erler ML. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens*. 2003;62(6):512-526.

Wang QJ, Jenkins FJ, Jacobson LP, Kingsley LA, Day RD, Zhang ZW, Meng YX, Pellett PE, Kousoulas KG, Baghian A, Rinaldo CR Jr. Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8(+) T-cell response to viral lytic cycle proteins. *Blood*. 2001;97(8):2366-2373.

Wang JH, Zheng X, Ke X, Dorak MT, Shen J, Boodram B, O'Gorman M, Beaman K, Cotler SJ, Hershow R, Rong L. Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection. *Virology*. 2009;6:46.

Whitby D, Luppi M, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J. Natl. Cancer Inst*. 1998;90:395-397.

Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ: Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *Journal of General Virology*. 2004;85:155-163.

Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, Kron M, Ebbesen P, Biggar RJ. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol*. 2004;85:155-163.

Zong JC, Metroka C, Reitz MS, Nicholas J, Hayward GS. Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J. Virol*. 1997;71(3):2505-2511.

Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PI, Tying SK, Orenstein JM, Rabkin CS, Su IJ, Powell KF, Croxson M, Foreman KE, Nickoloff BJ, Alkan S, Hayward GS. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol* 1999; 73(5):4156-4170.

Zong JC, Ciufu DM, Viscidi R, Alagiozoglou L, Tyring S, Rady P, Orenstein J, Boto W, Kalumbuja H, Romano N, Melbye M, Kang GH, Boshoff C, Hayward GS. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J. Clin. Virol.* 2002;23: 119-148.

**ANEXOS**



# Anexo I

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

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

---

### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO  
PACIENTE : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº

..... APTO: .....

BAIRRO: .....

CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD  
(.....) .....

### 2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador  
etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....

Nº ..... APTO: .....



## 1. JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA

Os índios, quando começaram a entrar em contato com os brancos, começaram a pegar muitas doenças que não existiam antes, quando o índio ficava isolado em sua aldeia. Entre estas doenças, estão as hepatites, que são doenças do fígado, e as doenças sexualmente transmissíveis, que são doenças que se pegam através de relações sexuais. O índio que se contamina fora da aldeia, com o homem branco, pode levar estas doenças para a aldeia, contaminando outros índios e até mesmo as crianças, já que algumas doenças que a gente pega por via sexual também podem ser transmitidas pela saliva. Nós queremos fazer um estudo para saber quantos índios da aldeia Mapuera pegaram hepatite por vírus ou outras doenças sexualmente transmissíveis, principalmente um vírus que se chama HHV-8. Para fazer isto, precisamos colher um pouco de sangue com uma seringa para poder fazer os exames no laboratório. Vamos também colher um pouco de saliva para saber se os índios estão com vírus na saliva. ***Nós também vamos usar um pouco deste sangue para tentar descobrir porque alguns índios pegam vírus e outros não.***

## 2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS, INCLUINDO A IDENTIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SÃO EXPERIMENTAIS

O único exame que a pessoa que participar da pesquisa terá que fazer será colher um pouco de sangue (dois tubos de 10 ml, equivalentes a duas colheres de sopa). Dentre os índios, serão colhidas amostras de saliva esfregando um cotonete (palito com algodão na ponta) na parte interna da bochecha.

### **3. DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS**

O único desconforto esperado é o de levar uma picada no braço para colher o sangue. Não há nenhum risco importante à saúde, fora o fato de poder aparecer uma mancha roxa (hematoma) no local da picada, que desaparece sozinha depois de alguns dias. A coleta da saliva não traz nenhum desconforto.

### **4. BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS**

Os indivíduos que tiverem alguma doença constatada no seu exame de sangue receberão orientação e, quando houver necessidade, tratamento. O tratamento será feito pela Equipe Médica do Convênio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com a Prefeitura Municipal de Santarém. Aqueles que o exame de sangue mostrar que precisam receber vacina da hepatite B serão vacinados pela mesma equipe. É importante lembrar que se os médicos descobrirem, com estes exames de sangue, alguma doença que esteja atacando muito os índios da aldeia Mapuera ou os brancos que moram na região da aldeia, eles podem organizar melhor o jeito de prevenir esta doença, explicando como evitar de pega-la ou, se existir vacina para esta doença, vacinando quem precisa.

### **5. PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS PARA O INDIVÍDUO**

#### **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:**

- 1. ACESSO, A QUALQUER TEMPO, ÀS INFORMAÇÕES SOBRE PROCEDIMENTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS RELACIONADOS À PESQUISA, INCLUSIVE PARA DIRIMIR EVENTUAIS DÚVIDAS.**

Os participantes da presente pesquisa poderão pedir esclarecimento aos pesquisadores, a qualquer tempo, sobre alguma dúvida em relação à pesquisa, ou sobre eventuais riscos, benefícios e resultados a ela relacionados.

**2. LIBERDADE DE RETIRAR SEU CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DE DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUE ISTO TRAGA PREJUÍZO À CONTINUIDADE DA ASSISTÊNCIA.**

A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se um participante da pesquisa quiser retirar seu consentimento, e deixar de participar da pesquisa, isto não vai trazer nenhum prejuízo a seu atendimento rotineiro, a que ele tem direito.

**3. SALVAGUARDA DA CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE.**

Todas as informações da pesquisa serão sigilosas, não havendo divulgação do nome dos participantes, e nem dos resultados dos exames, a não ser para o próprio indivíduo.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Não se aplica.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Não se aplica.

---

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Em caso de necessidade, contactar a ***Dra. Mariana Quiroga***, do Convênio da Secretaria Municipal da Saúde de Santarém com o Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo telefone (93) 523-3424

---

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, antes de dar o consentimento assinado para participar como voluntário do estudo “**Prevalência de infecção por herpesvírus sexualmente transmissíveis (HSV-2 e HHV-8) em comunidades ribeirinhas do rio Trombetas e indígenas da aldeia Mapuera**”, eu fui suficientemente esclarecido pelo pesquisador. Eu conversei diretamente com o médico, que respondeu todas as perguntas que eu fiz. Eu entendi o que me foi explicado, e aceito participar como voluntário do presente Protocolo de Pesquisa

Data:

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

## ANEXO II



Ref.: Carta datada de 17.11.06

Ao

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04.12.06, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 577/02 intitulado "Prevalência de infecção por herpesvírus sexualmente transmissíveis (HSV-2 e HHV-8) em comunidades ribeirinhas e indígenas da Aldeia Mapuera", apresentado pelo Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti contempla o sub-projeto intitulado "Caracterização genotípica do herpesvírus 8 humano em população indígena da Amazônia Brasileira", que será tese de doutorado do SRA. JAILA DIAS BORGES.

São Paulo, 04 de dezembro de 2006.

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