

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

PATRICIA FONSECA PEREIRA

INVESTIGAÇÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR
LATENTE-1 DO HERPESVÍRUS HUMANO TIPO-8 NO
SARCOMA DE KAPOSÍ EPIDÊMICO CUTÂNEO E
SEUS SIMULADORES HISTOLÓGICOS

Rio de Janeiro
2011

**Investigação do antígeno nuclear latente-1 do
herpesvirus humano Tipo-8 no sarcoma de Kaposi
epidêmico cutâneo e seus simuladores histológicos**

PATRICIA FONSECA PEREIRA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação do Instituto Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, sob a orientação dos Prof^ª Dr^ª Tullia Cuzzi e Prof^ª Dr^ª Maria Clara Gutierrez Galhardo

Rio de Janeiro
2011

DISSERTAÇÃO MPCDI – IPEC P.F. PEREIRA 2011

PATRICIA FONSECA PEREIRA

**Investigação do antígeno nuclear latente-1 do
herpesvirus humano Tipo-8 no sarcoma de Kaposi
epidêmico cutâneo e seus simuladores histológicos**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado do Programa de Pós-graduação do
Instituto Evandro Chagas para obtenção do
grau de Mestre em Ciências em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientação: Dr^a Tullia Cuzzi e Prof^a Dr^a Maria Clara Gutierrez Galhardo

Aprovado em 15/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Luciana Wernersbach Pinto – IPEC/Fiocruz (Presidente e Revisora)

Dr. Antonio Carlos Francesconi do Valle – IPEC/Fiocruz

Dr^a. Mayra Carrijo Rochael – UFF

Dr. Leonardo Pereira Quintella – IPEC/Fiocruz (Suplente)

“Só sei que nada sei”.
(Sócrates)

DEDICATÓRIA

A minha família por todo apoio e carinho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ocupação da derme alta por proliferação de vasos ou fendas vasculares, por vezes irregulares. Presença de hemácias extravasadas e células inflamatórias. (H&E, 40x).....	31
Figura 2a	Proliferação vascular discreta com fenda revestida por células endoteliais achatadas e configurando “sinal do promontório”. Discreto infiltrado inflamatório e poucas hemácias extravasadas. (H&E,40x).....	31
Figura 2b	Sinal do Promontório. (H&E,40x).....	32
Figura 3	Glóbulos hialinos intra e extracelulares.(H&E,100x).....	32
Figura 4	Canais vasculares irregulares na proximidade de glândula sebácea. (H&E, 40x).....	33
Figura 5	Numerosos canais vasculares e feixes curtos de células fusiformes. Presença de hemácias extravasadas e infiltrado inflamatório mononuclear. (H&E,40x).....	33
Figura 6	Proliferação de células fusiformes formando feixes alongados. (H&E,40x).....	34
Figura 7	Aumento da celularidade na derme alta acompanhado por espaços vasculares, extravasamento de hemácias e infiltrado inflamatório moderado e arquitetura dérmica geral preservada. (H&E, 10x).....	34
Figura 8	Derme superior ocupada por proliferação vascular e celular. Notar discreto abaulamento da superfície epidérmica. (H&E,4x).....	35

Figura 9a	Derme ocupada lesão densamente celular com pouca proliferação vascular. (H&E, 4x).....	35
Figura 9b	Visão aproximada de 9a mostrando feixes entrelaçados de células fusiformes. (H&E,10x).....	36
Figura 10	SK telangiectásico. Espaços vasculares dilatados e congestionados em localização subepitelial e na periferia do tumor. (H&E, 4x).....	36
Figura 11a	SK queloidal. Fibras colágenas espessadas em meio às células tumorais. (H&E,4x).....	37
Figura 11b	SK queloidal. Notar fibras colágenas espessadas e hialinizadas. (H&E,40x).....	37
Figura 12	SK linfangiectásico. Vasos periféricos grandes e dilatados em posição subepitelial e na periferia do tumor. (H&E, 10x).....	38
Figura 13	SK linfangiectásico. Vasos linfáticos dilatados intra e peritumorais. (H&E,10x).....	38
Figura 14a	SK anaplásico. Derme ocupada por extensa proliferação celular (H&E,4x).....	39
Figura 14b	SK anaplásico. Derme ocupada por extensa proliferação celular (H&E,4x).....	39
Figura 15a	SK linfangioma-símile. Canais vasculares irregulares, dilatados e anastomosantes dissecando as fibras colágenas da derme. (H&E,4x).....	40
Figura 15b	SK linfangioma-símile. Fendas vasculares dilatadas desprovidas de hemácias com algumas projeções tipo “papilas” para a sua luz. (H&E, 40x).....	40

Figura 16	SK granuloma piogênico-símile. Derme ocupada por proliferação celular e epiderme hiperplasiada constituindo colarete. (H&E, 4x).....	41
Figura 17	Alterações epidérmicas reminiscentes de dermatofibroma: acantose irreggular nítida pigmentação da camada basal. (H&E, 10x).....	41
Figura 18	Padrão nuclear de positividade visto em células fusiformes e endoteliais. (anticorpo anti-HHV8-LNA-1, 40x).....	42
Figura 19	Granuloma piogênico. Reação negativa para o HHV8-LNA-1. (Imuno-histoquímica, 40x).....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANGPT	Angiopietina
bFGF	Fator de crescimento basico de fibroblastos
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Control
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme
HE	Hematoxilina-eosina
HHV8	Herpesvírus Humano tipo 8
HHV8-LNA-1	Antígeno Nuclear Latente1 do Herpesvírus Humano 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INF	Interferon
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
KSHV	Herpesvírus Humano associado ao Sarcoma de Kaposi
LNA-1	Antígeno Nuclear latente1
LYVE	Receptor HÁ endotelial vascular linfático
MIP	Proteína inflamatória do macrófago
miRNA	microRNA
ORF	Open reading frame (fase de leitura aberta)
PCR	Polimerase chain reaction
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Prox-1	Prospero-related homeobox 1
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SK	Sarcoma de Kaposi
TARV	Terapia Antirretroviral altamente ativa
TNF	Fator de necrose tumoral
vCCL	Quimiocinas do ciclo lítico viral
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
vFLIP	Protein inibidora da FLICE viral
vGPCR	Receptor acoplado à proteína G viral
vIL	Interleuceina viral
vIRF	Fator regulador do interferon viral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das alterações morfológicas do SK por grupo histológico.....	27
Tabela 2	Variantes do SK identificadas na revisão dos casos.....	28
Tabela 3	Quantificação da reação imuno-histoquímica (grau) nas lesões de SK por padrão morfológico (grupo).	29
Tabela 4	Resultados na Imuno-histoquímica (HHV8-LNA-1) nos SK e seus simuladores histológicos.....	30
Tabela 5	Relação dos dados clínicos disponíveis.....	43

Pereira, P F. **Investigação do Antígeno Nuclear Latente-1 do Herpesvírus Humano tipo-8 no sarcoma de Kaposi epidêmico cutâneo e seus simuladores histológicos**. Rio de Janeiro, 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

O sarcoma de Kaposi (SK) é a neoplasia mais diagnosticada em pacientes com SIDA e a detecção do antígeno nuclear latente do herpesvirus humano 8 (HHV8-LNA-1) tem se mostrado útil no seu diagnóstico histológico. O objetivo deste estudo é investigar a expressão do antígeno do HHV8 no sarcoma de Kaposi e seus simuladores histológicos em biópsias de pele de pacientes HIV positivos acompanhados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) entre 2003 e 2010. A pesquisa do antígeno foi realizada em protocolo de imuno-histoquímica em 49 casos de SK cutâneo e em 60 casos de eventuais simuladores histológicos desta lesão (12 dermatofibromas, 17 hemangiomas, 8 granulomas piogênicos e 23 dermatites de estase). Dados clínico-epidemiológicos foram coletados a partir da revisão dos prontuários. O diagnóstico de SK foi confirmado por dois patologistas. A expressão nuclear do antígeno HHV-8 foi detectada em todos os casos de SK independentemente do estágio clínico da doença, e nenhuma positividade foi encontrada nos demais casos. Nossos resultados confirmam o valor diagnóstico do antígeno nuclear latente do HHV8 (HHV8-LNA-1) para diferenciar o SK de seus simuladores e consolidam sua utilização na rotina do laboratório de Anatomia Patológica do IPEC.

Palavras-chave: 1. Sarcoma de Kaposi, 2. SIDA, 3. Herpesvírus Humano 8, 4. Imuno-histoquímica, 5. Simuladores

Pereira, P F. Investigation of Human herpes virus 8 latent nuclear antigen 1 in cutaneous lesions in epidemic Kaposi sarcoma and its histological simulators.

Rio de Janeiro, 2010. 54 p. Dissertation (Mater's degree in Clinical Research in Infectious Disease) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Kaposi sarcoma is the most diagnosed neoplasia in AIDS patients and detection of human herpes virus 8 latent nuclear antigen (HHV8-LNA-1) has been shown to be an useful histological diagnostic test. The goal of this study is to investigate the expression of HHV8 antigen in Kaposi sarcoma and its histological simulators on skin biopsies from HIV positive patients followed in the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) between 2003 and 2010. Immunohistochemistry protocol for the antigen was applied in 49 cases of cutaneous KS and in 60 cases of occasional histological simulators of this lesion (12 dermatofibromas, 17 hemangiomas, 8 pyogenic granulomas and 23 stasis dermatitis). Clinical and epidemiological data were obtained from clinical files. The diagnosis of KS was confirmed by two pathologists. Expression to HHV8-LNA-1 was detected in all cases of KS despite its clinical stage and no positivity was observed in the remainder cases. Our results confirm the diagnostic value of HHV8 latent nuclear antigen to distinguish KS from its simulators and consolidate its use in IPEC's pathology laboratory daily practice.

Keywords: 1. Kaposi Sarcoma, 2. AIDS, 3. Human herpes virus 8, 4. Immunohistochemistry, 5. Simulators

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	LISTA DE SIGLAS	
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
	LISTA DE QUADROS	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1	HISTÓRICO.....	2
2.2	SARCOMA DE KAPOSÍ E SIDA.....	3
2.3	ETIOPATOGENIA.....	6
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	11
2.5	HISTOPATOLOGIA DO SK E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	13
2.6	DETECÇÃO DO HHV8 EM TECIDOS.....	20
3	OBJETIVO GERAL.....	22
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	DESENHO E DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	23
4.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	23
4.2.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
4.2.2	MATERIAL DE ESTUDO.....	23
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	23
4.4	REAÇÃO E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24
4.5	MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	24
4.6	REVISÃO DOS DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS.....	25
5	RESULTADOS.....	26

5.1	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA AMOSTRA ESTUDADA	26
5.1.1	VARIANTES HISTOLÓGICAS OBSERVADAS.....	28
5,2	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	29
5.3	DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS.....	43
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O sarcoma de Kaposi (SK) é neoplasia endotelial que se apresenta tipicamente com lesões cutâneas cujos estágios de desenvolvimento compreendem máculas, placas e nódulos podendo, ainda, envolver linfonodos e vísceras. Apresenta forma mais agressiva quando associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) sendo mais frequente em indivíduos homossexuais e bissexuais do sexo masculino. Apesar da redução de sua ocorrência com a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV), permanece como a neoplasia mais comum associada à SIDA e é a única malignidade incluída como definidora de SIDA pelo Centro de Controle de Doenças (Center for Disease Control-CDC) [1-3].

As características epidemiológicas do sarcoma de Kaposi representadas pelo acometimento de grupos populacionais específicos e por uma distribuição geográfica peculiar sugeriam uma etiologia infecciosa, o que foi confirmado pela identificação de um herpesvírus humano novo chamado Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) ou Herpesvírus humano 8 (HHV8). Este vírus tem sido uniformemente encontrado nas células do SK em todas as formas da doença, independentemente do estágio clínico das lesões [2, 4, 5].

O espectro histopatológico do SK cutâneo varia com o estágio e apresentação clínica das lesões e, por isso, o seu diagnóstico diferencial considera uma variedade de doenças desde alterações proliferativas vasculares benignas, condições inflamatórias e neoplasias malignas [2].

Muitos estudos têm demonstrado a alta especificidade e sensibilidade do anticorpo antiantígeno nuclear latente-1 do HHV8 (HHV8-LNA-1) no diagnóstico do sarcoma de Kaposi. Portanto, a utilização da técnica de imuno-histoquímica para detectar este antígeno viral conferiu aos patologistas a habilidade de emitir, com maior grau de confiança, o diagnóstico de sarcoma de Kaposi, especialmente em lesões iniciais pouco proliferativas ou ainda “fortuitas”, quando amostras são examinadas fora de um contexto epidemiológico estabelecido. Assim, implementar e padronizar a técnica de utilização do anticorpo monoclonal anti-HHV8 em protocolo de imuno-histoquímica confere aos laboratórios de anatomia patológica ferramenta diagnóstica adicional, útil e eficaz.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico:

Em 1872, Moritz Kaposi, dermatologista húngaro, descreveu nódulos eritemato-violáceos nos membros inferiores de cinco homens com mais de 40 anos de idade e chamou esta condição de “sarcomas pigmentados múltiplos idiopáticos”. O epônimo sarcoma de Kaposi só surgiu em 1912. No final do século XIX e nas primeiras décadas do século XX foram relatados vários casos e acreditava-se que o sarcoma de Kaposi afetasse exclusivamente homens idosos do leste europeu e da região do Mediterrâneo [1, 4].

Na década de 50, foi reconhecido que o SK ocorria comumente em regiões da África, apresentava-se clinicamente mais agressivo e afetava crianças e jovens. A era dos transplantes, iniciada na década de 70, foi acompanhada por aumento do número de casos deste tumor, especialmente em transplantados renais. A partir da década de 80, com a epidemia de SIDA, o SK tornou-se muito frequente em indivíduos homossexuais e bissexuais do sexo masculino [1, 4, 6].

Hoje, sabemos que a doença apresenta quatro formas clínicas diferentes com características histológicas idênticas e com locais de envolvimento e ritmos de progressão distintos, representando, mais provavelmente, manifestações diferentes do mesmo processo patológico [1].

A primeira variante clínica descrita foi o SK clássico afetando homens idosos de origem mediterrânea e do leste europeu, com idade média de 64 anos. É muito mais comum em homens do que em mulheres com relação homem/mulher de até 15/1 [1] Nesse grupo, o tumor tem progressão lenta iniciando-se nas extremidades, progredindo, em anos ou décadas, para braços e pernas, acometendo vísceras ou mucosa em cerca de 10% dos pacientes.

O SK endêmico é o tumor mais frequente na África central em pacientes tanto HIV positivos quanto negativos chegando a representar 50% dos tumores relatados em alguns países desse continente. Crianças africanas são particularmente afetadas por uma forma linfadenopática agressiva do SK, com ou sem envolvimento cutâneo. Nas regiões leste e sul da África, o SK corresponde a 25-50% dos sarcomas de partes moles em crianças e 2-10% de todos os tumores infantis [1, 7].

O SK iatrogênico ocorre com frequência elevada em pacientes transplantados e naqueles submetidos à terapia imunossupressora por várias causas, especialmente em indivíduos dos grupos étnicos com risco aumentado para o SK clássico. A população masculina é mais afetada com relação homem/mulher variando de 2/1 a 4/1. A reversão da imunossupressão pela diminuição dos níveis dos agentes imunomoduladores, nestes pacientes, tem sido associada à regressão das lesões [1, 8-10].

O SK associado à SIDA ou epidêmico foi descrito em 1981 por Friedman-Kien et al. [11] em 50 homossexuais jovens do sexo masculino previamente saudáveis. As lesões acometiam pele, mucosas, linfonodos e vísceras, e mostravam-se agressivas e frequentemente fatais. Antes da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV), o SK era 20 vezes mais frequente em homossexuais e bissexuais masculinos quando comparados a pacientes HIV positivos pertencentes a outros grupos de risco com graus semelhantes de imunossupressão (p.ex. hemofílicos com SIDA). Apesar de mostrar queda expressiva depois da introdução da TARV, o sarcoma de Kaposi permanece como o tumor mais comum associado à SIDA [1].

2.2 Sarcoma de Kaposi e SIDA

Como mencionado anteriormente, a instalação da epidemia de SIDA foi acompanhada por aumento acentuado da frequência do SK entre homossexuais masculinos, por isto, esta neoplasia foi rapidamente identificada como marcador clínico da infecção pelo HIV/SIDA. Durante o início da década de 90, em países desenvolvidos, houve uma diminuição da proporção de novos casos de SIDA apresentando-se com SK. Esta queda ocorreu paralelamente ao declínio das taxas de soroconversão do HHV-8, provavelmente secundário à redução da transmissão deste vírus, atribuída à alteração de comportamento entre os indivíduos de alto risco. A queda acentuada dos casos de SK associados à SIDA, ao longo dessa mesma década, resultou do uso mais disseminado das drogas antirretrovirais sugerindo que a terapia antirretroviral agressiva impede uma maior deterioração da função imunológica, evitando a reativação da infecção latente do HHV8 [12].

A associação SK/SIDA é observada com maior frequência no sexo masculino do que no feminino, sendo que parceiras sexuais HIV positivas de homens

bissexuais com SK apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da neoplasia quando comparadas com outros grupos de mulheres também HIV positivas. A forma de contágio da infecção pelo HIV por via sexual relaciona-se ao risco aumentado para desenvolver SK; indivíduos que contraíram a infecção pelo HIV por via sanguínea têm risco menor de desenvolver a neoplasia, como é o caso em hemofílicos e usuários de drogas injetáveis [7]. Na África, desde a disseminação do HIV, o SK tornou-se mais comum em ambos os sexos, com queda dramática da relação homem/mulher, especialmente na África ocidental [13].

O SK pode desenvolver-se em qualquer fase da infecção pelo HIV, independentemente do grau de imunossupressão e do número de células CD4 positivas. Entretanto, estudos mostram que a baixa contagem destas células, no momento do diagnóstico de SIDA, prevê um risco aumentado para o seu desenvolvimento [7, 14, 15].

Em relação à progressão da doença, estudo recente em Uganda [16] em pacientes acometidos por SK/SIDA demonstrou que a carga viral do HHV8 no sangue periférico possuía associação positiva e significativa com a taxa de progressão do sarcoma de Kaposi, mas não com a extensão da doença ou com a contagem de linfócitos CD4, sugerindo que a carga do HHV8 no sangue periférico possa ser um marcador para o desenvolvimento de novas lesões de SK.

Embora a infecção pelo HIV não seja necessária nem suficiente para o desenvolvimento do SK, está associada ao aumento da incidência e ao curso mais agressivo da neoplasia. O HIV, além de contribuir, de uma forma mais geral, para o desenvolvimento e progressão do SK através da depressão dos mecanismos imunológicos, contribui também através da liberação do produto do gene tat do HIV (a proteína tat) pelos linfócitos CD4 e monócitos infectados pelo HIV. Esta proteína liga-se às proteínas de adesão expressas nas células fusiformes do SK estimulando sua proliferação e induzindo-as a produzirem citocinas inflamatórias que, por sua vez, estimulam a proliferação e a angiogênese por vias autócrinas e parácrinas [7, 17, 18]. A proteína tat tem também efeito antiapoptótico nas células fusiformes infectadas e capacidade de ativar o HHV8, aumentando, desta forma, a carga viral nessas células e a expressão de vários genes virais com potencial oncogênico [17, 19-21].

O SK, em pacientes com SIDA, tem a pele como local de acometimento inicial, na maioria dos casos, porém, este pode não existir ou ser precedido por

lesões orais, viscerais ou ganglionares. Na pele, acomete preferencialmente a cabeça, pescoço e tronco, apresentando os mesmos estágios de desenvolvimento (mácula, placa e nódulo) observados nas formas clínicas do SK não relacionados à SIDA. As lesões podem ser isoladas ou disseminadas. Pode-se observar edema de membros inferiores, periorbital e de genitália externa, podendo sua gravidade ser desproporcional ao número de lesões cutâneas presentes [22].

A orofaringe apresenta-se acometida em um terço dos casos, sendo o palato duro a região mais comprometida. Os linfonodos são acometidos em mais da metade dos pacientes com SIDA. O trato gastrointestinal também é acometido com frequência, principalmente o duodeno, sendo na maioria das vezes, assintomático, porém, obstrução, sangramento e dor podem ocorrer [23-25]. O pulmão é outro órgão acometido com frequência e o envolvimento é mais comum na pleura (70%) podendo causar derrame pleural hemorrágico [26-28]. Apesar do SK/SIDA ser uma doença agressiva, a maioria dos pacientes vai ao óbito por outras causas [7]. Em 1987, Lemlich et al. [29] revisaram autópsias de 24 pacientes com SK/SIDA e relataram que 29% dos pacientes apresentavam evidências de SK visceral sem lesões cutâneas. Os órgãos mais comumente afetados pela neoplasia foram: trato gastrointestinal (50%), linfonodos (50%), pulmões (37%), somente 25% dos pacientes apresentaram evidências de doença cutânea isolada.

A ocorrência do SK tem se mostrado constante ao longo do tempo, mas tem sido associada à imunossupressão mais acentuada. Segundo Lee Kyoung-Bun et al. (2006) [30] a prevalência de SK permanece alta em pacientes HIV positivos não tratados, especialmente africanos. É uma doença com amplo espectro de gravidade, variando de lesão única pele ou mucosa até doença cutânea extensa e/ou visceral rapidamente progressiva [6]. Pacientes em uso de TARV obtêm regressão das suas lesões, definindo o SK como uma das poucas neoplasias que podem ser controladas por medicamentos, embora, o tratamento tenha pouco ou nenhum efeito sobre o HHV8 propriamente dito, e sim na melhora da imunossupressão característica dos pacientes HIV positivos [31-33]. Por outro lado, o papel da imunossupressão e dos determinantes de risco para o SK desde a introdução da TARV permanece desconhecido, uma vez que há estudos que descrevem lesões de SK em pacientes tratados com TARV exibindo carga viral do HIV indetectável e alta contagem de células CD4. Embora o SK não seja uma ocorrência rara entre os indivíduos HIV positivos tratados com TARV, permanece a dúvida em relação à persistência do

risco, mesmo quando a infecção pelo HIV encontra-se controlada [34]. Estudo conduzido por Nguyen et al. (2008) [35] em 64 pacientes KS/SIDA avaliou a resposta clínica destes ao uso de TARV e quimioterapia, e relatou resolução completa da doença (SK) em metade dos pacientes em 36 meses desde o diagnóstico. Este resultado sugere que mesmo na era de tratamentos extremamente eficientes para infecção pelo HIV, o SK permanece como doença persistente. Segundo Mesri et al. (2010) [13], embora a incidência do SK tenha diminuído desde a introdução da TARV, até 50% dos pacientes nunca atingem remissão completa e não existem tratamentos curativos. Pacientes com doença avançada são submetidos à terapia sistêmica, e apesar da efetividade dos agentes terapêuticos utilizados, estes pacientes apresentam progressão da neoplasia em seis a onze meses de tratamento, necessitando de terapia adicional. Embora, inicialmente, os pacientes se beneficiem de ciclos adicionais de quimioterapia, remissões tendem a ser mais curtas a cada regime terapêutico sucessivo, denotando a necessidade de estratégias terapêuticas novas [10, 36].

2.3 Etiopatogenia

As características epidemiológicas do SK como a distribuição geográfica peculiar e o acometimento de grupos populacionais específicos sugeriram uma causa infecciosa. Em 1994, Chang e colaboradores [12] identificaram fragmentos de DNA de um herpesvírus até então desconhecido, o KSHV ou HHV8, no SK cutâneo de um paciente com SIDA. A partir de então, foi demonstrado em diversos estudos que mais de 95% das lesões de SK, independentemente do subtipo clínico, mostra infecção pelo HHV8 [13, 31, 37, 38]. Hoje, são conhecidos oito tipos de herpesvírus humanos distribuídos em três subfamílias: alfa (α), beta (β) e gama (γ), e o HHV8, juntamente com o Epstein Barr vírus (EBV), pertence à subfamília γ -herpesviridae, fortemente associada ao desenvolvimento de neoplasias. A maior parte da população humana apresenta-se infectada por um ou mais dos diferentes tipos de herpesvírus e esses raramente causam doença grave no hospedeiro, a não ser que ele apresente comprometimento do sistema imune [1, 31]. Os herpesvírus humanos apresentam em comum a habilidade de adaptação ao ambiente celular do

hospedeiro e capacidade de alterar sua resposta imune, estabelecendo com ele uma infecção latente permanente. Apesar da ampla distribuição dos herpesvírus humanos nas populações em geral, o HHV8 constitui uma exceção devido a sua distribuição limitada e desigual dentre os diversos grupos populacionais. Na África subsaariana, os anticorpos anti-HHV8 podem ser detectados em até 30% da população geral; na região do Mediterrâneo, 10-25% das pessoas são soropositivas para o HHV8 e no restante do mundo, a soroprevalência é baixa, 2-5% [31]. Títulos de anticorpo específico para o HHV8 correlacionam-se com a carga viral, e indivíduos com carga viral baixa apresentam conseqüentemente, títulos mais baixos de anticorpos que podem não ser detectados em exames sorológicos. Deste modo, é possível que a prevalência geral esteja subestimada [13, 39].

Segundo Mancuso, em 1999, Zong et al. analisaram a região da fase de leitura aberta K1 (ORF K1) e identificaram quatro subtipos principais do HHV8 (A,B,C,D) com distribuição geográfica característica: os subtipos A e C predominam na Europa e Estados Unidos enquanto o subtipo B predomina na África e o D, nas ilhas do Pacífico. Outros subtipos foram identificados mais recentemente em grupos populacionais específicos: subtipo E em ameríndios brasileiros, Z em crianças na Zâmbia e, o subtipo F foi identificado em uma tribo Bantu em Uganda [40]. Embora os subtipos específicos não tenham sido associados a diferentes processos patológicos, a grande variabilidade do HHV8 pode ter implicações na biologia e manifestação de doenças associadas a este vírus [31]. O estudo de Mancuso et al.(2008) [40] em 38 pacientes italianos HIV negativos com SK clássico, demonstrou que o subtipo A do HHV8 estava presente em 71% daqueles que apresentavam doença de progressão mais rápida, enquanto que o subtipo C foi observado apenas em 29% destes. Por outro lado, nos pacientes que apresentavam doença de progressão lenta, o subtipo A foi observado em apenas 14%, enquanto que o subtipo C mostrou-se altamente prevalente, observado em 86% destes pacientes.

O HHV8 pode ser transmitido pela via sexual ou outras. A transmissão sexual predomina nos países desenvolvidos com baixa prevalência do vírus, principalmente através da atividade sexual homossexual. Outras vias de transmissão predominam em países africanos onde a infecção pode ocorrer na infância. A transmissão materno-infantil, através da placenta ou durante o parto, é responsável por parte das infecções nas áreas altamente endêmicas. A infecção pelo HHV8 também pode ocorrer em crianças mais velhas e adolescentes nessas áreas, sugerindo

transmissão viral por contato não sexual, provavelmente pela saliva. Em receptores de transplante, o SK resulta predominantemente da reativação do vírus, porém, pode representar também uma infecção primária transmitida pelo órgão transplantado [1]. Indivíduos infectados pelo HIV que adquirem a infecção pelo HHV8 apresentam risco significativamente maior de desenvolver SK e aproximadamente 50% desenvolvem a neoplasia, sugerindo que um sistema imune já comprometido predisponha a uma carga viral mais alta com subsequente desenvolvimento do tumor [13, 16].

Desde sua descoberta inicial, o HHV8 tem sido demonstrado em todas as formas de SK e técnicas de hibridização *in situ* têm demonstrado a localização do HHV8 em células endoteliais vasculares e células fusiformes perivasculares nas lesões de SK, associação confirmada por análises moleculares e estudos soropidemiológicos. Embora a técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR) possa detectar o ácido desoxirribonucleico (DNA) do HHV8 no sangue periférico de cerca de metade das pessoas infectadas, o DNA viral pode ser detectado em praticamente todas as lesões de SK [31]. Apesar disso, o HHV8 representa fator de risco baixo para o desenvolvimento do SK, uma vez que a maioria dos trabalhos sugere que a soroprevalência global do HHV8 varia de 2-10%, podendo ser maior em algumas áreas e que as taxas de soroprevalência em áreas geográficas diferentes nem sempre se correlacionam com o desenvolvimento do SK. O HHV8 é prevalente em muitos países africanos incluindo lugares onde o SK era desconhecido antes do HIV. A observação de que a maioria dos indivíduos HIV negativos infectados pelo HHV8, em áreas endêmicas, nunca desenvolve a neoplasia sugere que fatores do hospedeiro desempenhem papel importante. A contribuição potencial de fatores genéticos do hospedeiro, como os polimorfismos genéticos dos genes da resposta inflamatória e imune tem sido explorada em estudos recentes, porém, estes estudos são pequenos e mostraram, até agora, risco geral apenas discretamente aumentado [13].

De acordo com Simonart (2006) [41], a distribuição do SK na África antes da disseminação do HIV não é simples reflexo da distribuição do HHV8 e sugere que fatores ambientais possam ser relevantes no desenvolvimento do tumor. Chama atenção, especialmente, para a exposição ao ferro presente em solos vulcânicos e seu papel na patogênese de várias neoplasias, especialmente, na patogênese do SK: estimulação do crescimento das células neoplásicas, aumento da expressão das

citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da neoplasia e indução da expressão de sinais antiapoptóticos nas células endoteliais da vasculatura dérmica [42, 43].

A presença do HHV8 não é por si só suficiente para transformar as células endoteliais infectadas e iniciar o desenvolvimento da neoplasia. A patogênese do SK é complexa e envolve vários mecanismos dependentes tanto do vírus quanto das células do hospedeiro, ressaltando a existência de cofatores, como imunossupressão induzida por drogas ou pelo HIV [7, 12, 13, 42, 44].

O genoma completo do HHV8 foi sequenciado dois anos após sua descoberta e estudos das fases de leitura aberta têm levado à descoberta de novos mecanismos da oncogênese e de novas funções dos homólogos celulares codificados por este vírus [13, 18, 21, 45-49].

O HHV8 incorporou vários genes da célula hospedeira durante sua evolução, possibilitando a codificação de proteínas homólogas às oncoproteínas humanas capazes de interferir na proliferação celular e apoptose, e estimular a angiogênese [1, 20, 44, 50].

Segundo Mesri et al.(2010) [13], a infecção pelo HHV8 de células endoteliais ou células progenitoras hematopoiéticas e/ou endoteliais circulantes resulta em alterações morfológicas, alterações no metabolismo da glicose, no ritmo de crescimento, tempo de vida e expressão genética destas células, levando ao desenvolvimento do SK. A oncogenicidade do HHV8 reflete-se pela indução de numerosas moléculas pró-angiogênicas após a infecção das células endoteliais, incluindo membros da família fator de crescimento endotelial vascular/receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-VEGFR), família angiopoietina (ANGPT), ciclooxigenase 2 (COX2) e angiogenina.

A expressão do gene do HHV8 ocorre em duas fases: a fase latente facilita a permanência do genoma viral, e a fase lítica caracteriza-se pela replicação viral, destruição da célula hospedeira e liberação do vírus. Durante os estágios iniciais da infecção pelo HHV8, a expressão dos genes celulares domina, porém, à medida que a infecção progride e o DNA viral penetra no núcleo, a expressão dos genes virais latentes e líticos se superpõe aos do hospedeiro. A partir de então, inicia-se uma cascata complexa de sinalização intra e extracelular envolvendo vírus e hospedeiro [18, 51].

Embora a grande maioria das células fusiformes do SK apresente infecção viral latente, uma pequena parte destas apresenta replicação lítica. Os principais transcritos da latência viral expressos nas células fusiformes do SK originam-se na mesma região genômica e incluem: antígeno nuclear latente (LNA), ciclina viral (vCiclina), proteína inibidora FLICE viral (vFLIP), microRNA (miRNA) e kaposina. Estes transcritos geram sinais de crescimento e proliferação, evasão da apoptose, sinais pró-angiogênicos e inflamatórios, assim como potencial replicativo ilimitado. Entretanto, juntos, não se mostraram capazes de transformar células endoteliais ou qualquer outra célula *in vitro* [13, 52, 53].

Muitas proteínas líticas virais como K1, fator viral regulador do interferon (vIRF), interleucina 6 viral (vIL-6), quimiocinas codificadas pelo vírus (vCCL), receptor acoplado a proteína G viral (vGPCR) e K15, expressas por pequena parte das células nas lesões de SK apresentam atividades tumorigênicas e poderiam contribuir para o fenótipo angiogênico e inflamatório das lesões. Por outro lado, é improvável que a infecção lítica desempenhe papel direto no crescimento celular endotelial autônomo, transformação ou imortalização, uma vez que a expressão do gene lítico está geralmente associada à replicação viral e lise celular [13].

Acredita-se que a interação entre infecção lítica e latente contribua para o fenótipo maligno da neoplasia. Para que os genes latentes iniciem a proliferação celular, precisam ser amplificados por fatores de crescimento virais e celulares e citocinas expressas por pequena parte das células infectadas liticamente nas lesões de SK. Fatores com ação parácrina como VEGF, ANGPT2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-6, induzidos por genes líticos como vGPCR, K1, K15, vIL-6 e vCCL, poderiam ser necessários para incitar a proliferação de células infectadas latentemente, induzir angiogênese e inflamação, além de auxiliar o recrutamento de células não infectadas, a manutenção da sobrevivência e a evasão imune destas células, que constituem a maior parte da neoplasia [13].

A lesão inicial do SK é provavelmente iniciada pela produção, induzida pelo HHV8, das citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL) -1, IL-6, do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e fatores de crescimento como o fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que causa ativação das células endoteliais seguido por angiogênese [18].

Nas lesões avançadas de SK, os oncogenes do HHV8 podem alterar a regulação das vias de transdução dos sinais intracelulares, da progressão do ciclo celular e da apoptose através da expressão de uma série de oncoproteínas que são homólogas aos proto-oncogenes celulares, incluindo vIL-6, receptor do vIL-8, proteína inflamatória do macrófago (MIP) e proteínas anti-apoptóticas da família *bcl-2* [54]. Portanto, a expressão complexa combinada dos oncogenes virais e do hospedeiro altera os mecanismos regulatórios da proliferação, da diferenciação e sobrevivência celular normal, contribuindo para o desenvolvimento tumoral [18].

2.4 Manifestações Clínicas

O sarcoma de Kaposi apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de acordo com o subtipo da doença.

O SK clássico inicia-se, em geral, como uma mácula eritemato-azulada nas porções distais dos membros inferiores. Na maioria das vezes, as lesões progridem lentamente podendo coalescer formando grandes placas; lesões solitárias podem progredir formando nódulos. Inicialmente, o envolvimento é unilateral tornando-se bilateral com a progressão da doença e, finalmente, assume padrão mais disseminado em direção centrípeta. À medida que as lesões envelhecem, tornam-se acastanhadas podendo apresentar superfície hiperkeratósica e verrucosa. Alterações eczematosas podem estar presentes se houver dermatite de estase concomitante, e as lesões podem sofrer erosão e ulceração. Grandes placas ou tumores parcialmente erodados e ulcerados podem comprometer pés, mãos ou mesmo todo o membro. A consistência das lesões varia com a duração da doença; as lesões iniciais são macias e esponjosas à palpação, enquanto que os tumores antigos têm consistência firme. Edema do tecido circundante é observado com frequência, podendo até preceder as lesões cutâneas e envolver todo o membro. Embora a maioria das lesões esteja limitada à pele das extremidades, particularmente à porção inferior das pernas e pés, linfonodos e outros órgãos também podem estar envolvidos. A incidência do comprometimento visceral varia em diferentes partes do mundo refletindo, possivelmente, a incidência dos diferentes sorotipos do vírus HHV8 [22].

O SK endêmico apresenta três subtipos principais. A forma mais comum é representada por lesões cutâneas nodulares semelhantes ao SK clássico. Um subtipo mais agressivo caracteriza-se por lesões infiltrativas podendo se estender para a derme, subcutâneo, músculo e osso. A forma linfadenopática, de mau prognóstico, afeta mais crianças e, em geral, compromete linfonodos sem a presença de lesões cutâneas.

O SK iatrogênico exhibe lesões cutâneas semelhantes ao clássico, podendo apresentar curso mais agressivo e morte por doença disseminada, particularmente, por hemorragia gastrointestinal [22].

Quando associado ao HIV, apresenta características clínicas que podem ser diferentes daquelas observadas nas outras formas da doença. As lesões iniciais são máculas rosadas ou avermelhadas semelhantes a picada de inseto ou pápulas acastanhadas e tensas semelhantes ao dermatofibroma. Diferentemente das demais formas de SK, as lesões iniciais neste grupo podem se desenvolver em locais não usuais, tais como face e tronco. Embora as extremidades possam estar comprometidas, este comprometimento não é tão acentuado quanto no tronco. Na doença avançada, pode-se observar lesões disseminadas pela face, cabeça e tronco, podendo coalescer formando grandes placas [55]. Há envolvimento frequente das superfícies mucosas e órgãos internos, e o sistema musculoesquelético também pode ser acometido. O envolvimento de linfonodos e intestinos ocorre relativamente cedo e o SK é a neoplasia gastrointestinal mais comum, observada em cerca de 40% dos pacientes com SIDA. Embora o SK gastrointestinal seja usualmente assintomático, tem sido relatada hemorragia na cavidade oral, esôfago, estômago e intestino grosso. Alguns pacientes apresentam dor abdominal, perda de peso, náusea, vômitos e diarreia. Perfuração ou obstrução intestinal são complicações que podem ser observadas na doença avançada. O diagnóstico de SK gastrointestinal deve ser considerado não apenas em pacientes com SIDA ou imunossuprimidos, mas também em idosos do leste europeu e região mediterrânea. Em geral, o envolvimento visceral do SK está associado a mau prognóstico [23].

2.5 Histopatologia do SK e diagnóstico diferencial

Apesar das diferenças clínicas e epidemiológicas, as quatro formas do SK apresentam histopatologia semelhante em estágios comparáveis, indistinguíveis do ponto de vista histológico e imunofenotípico [39, 52]. Dentro do contexto geral de angiogênese com proliferação e inflamação, as lesões do SK apresentam uma variedade de tipos celulares: células endoteliais, células fusiformes, células inflamatórias e hemácias extravasadas, cujas porcentagens relativas variam de acordo com o estágio de desenvolvimento da neoplasia. Deste modo, enquanto as lesões iniciais caracterizam-se por proliferação vascular discreta e elementos celulares escassos, as lesões mais avançadas exibem grande celularidade com proliferação de células fusiformes, características desta neoplasia [39, 52].

O sarcoma de Kaposi cutâneo apresenta três variantes usuais relacionadas à progressão. A mácula, de natureza predominantemente vascular, representa a fase mais inicial do SK cutâneo e é considerada, por alguns, como a variante histológica que causa maior dificuldade diagnóstica. A impressão, ao pequeno aumento (10x), é de uma derme com celularidade discretamente aumentada ou de uma dermatite inflamatória leve. Muitas vezes, as alterações são tão discretas que geram dificuldades para se estabelecer a presença de lesão. Assim sendo, observa-se, em geral, sinais de um processo proliferativo sutil representado por fendas ou espaços vasculares irregulares, que tendem a ser mais bem definidos ao redor dos vasos dérmicos pré-existentes e na proximidade de anexos cutâneos. A presença de canais vasculares neoplásicos neoformados ao redor de estruturas vasculares pré-existentes resulta no característico sinal do promontório. A derme mostra dissecação muito discreta dos feixes de colágeno por fendas vasculares revestidas por camada única de células endoteliais achatadas, com extravasamento de hemácias muito focal. Há infiltrado inflamatório discreto e focal constituído por linfócitos e plasmócitos acompanhados por macrófagos contendo hemossiderina concentrados ao redor dos vasos e anexos cutâneos [56]. Com esta descrição histopatológica geral, considera-se, nesta fase, como diagnóstico diferencial, a dermatite de estase. Nesta entidade observam-se alterações dérmicas, em geral, proeminentes incluindo proliferação de pequenos vasos sanguíneos na derme papilar, a qual pode produzir uma pápula bem definida. Presença de fibrose variável podendo ser proeminente em

lesões de longa duração e hemossiderina abundante por toda a derme. Devido à sutileza das alterações vasculares iniciais, estas lesões devem ser também diferenciadas da telangiectasia, dermatose purpúrica pigmentada e acroangiodermatite. Os vasos no sarcoma de Kaposi são, em geral, mais irregulares, e o infiltrado inflamatório inclui plasmócitos [22].

A lesão em placa mostra proliferação vascular e celular com óbvia ocupação da derme com constituintes celulares já mencionados e mostrando células fusiformes organizadas em feixes curtos intimamente relacionados a fendas vasculares mal definidas, com extensão ocasional para o tecido adiposo subjacente. A proporção de vasos e células fusiformes é variável e vasos dilatados estão presentes na periferia da neoplasia. As figuras de mitose são raras e não há pleomorfismo nuclear ou citológico significativo. Glóbulos hialinos são encontrados com frequência no interior de células fusiformes e macrófagos ou em localização extracelular. Estes podem ser vistos também em algumas lesões maculares iniciais e, acredita-se que representem fragmentos de hemácias fagocitadas. Vacúolos paranucleares contendo hemácias são encontrados no citoplasma das células endoteliais fusiformes. A derme contém numerosos canais vasculares preenchidos por hemácias. Observam-se ainda células inflamatórias mononucleares com predomínio de plasmócitos, siderófagos e hemossiderina livre. Nesta fase, o diagnóstico diferencial inclui o hemangioma lobular, hemangioma hemossiderótico e a acroangiodermatite [56]. Embora o hemangioma lobular apresente padrão de nódulos celulares com canais dilatados periféricos semelhante ao SK, em geral, não apresenta feixes entrelaçados de células fusiformes, espaços vasculares em fenda ou plasmócitos no infiltrado inflamatório. Da mesma forma, estas células são incomuns no hemangioma hemossiderótico. Nesta neoplasia, diferentemente do SK, podem ser observados trombos de fibrina nos vasos superficiais e glóbulos hialinos não foram relatados. A proliferação de pequenos vasos dilatados, observados na acroangiodermatite, não exhibe a irregularidade dos espaços vasculares do SK nem o sinal do promontório, e plasmócitos estão usualmente ausentes [22].

O nódulo, que corresponde à lesão do estágio mais avançado do SK, caracteriza-se por uma expansão da derme por proliferação celular variável circunscrita de células fusiformes neoplásicas relativamente monomórficas dispostas em feixes. Observam-se hemácias dentro dos canais vasculares e entre as células fusiformes individuais, além de figuras de mitose ocasionais. Glóbulos hialinos são

vistos com facilidade, assim como vacúolos paranucleares contendo hemácias. A derme afastada do tumor mostra frequentemente alterações associadas ao estágio em placa, o que fala a favor da idéia de que as lesões, mácula, placa e nódulo, façam parte de um contínuo morfológico. O diagnóstico diferencial, neste estágio, é vasto e inclui: granuloma piogênico; angiomatose bacilar; vários tumores vasculares como o hemangioma de células fusiformes, hemangioendotelioma kaposiforme; tumores fibro-histiocíticos como o dermatofibroma, dermatofibrossarcoma protuberante; melanoma de células fusiformes; leiomiossarcoma cutâneo entre outros [56]. Os tumores de músculo liso não apresentam relação íntima entre as células fusiformes, espaços vasculares em fenda ou glóbulos hialinos. Os fibro-histiocitomas podem ser diferenciados do SK pela presença de macrófagos xantomatosos, células multinucleadas e alterações da epiderme sobrejacente que variam de hiperplasia a brotamentos basais semelhantes à diferenciação pilosa. Apesar da semelhança com o SK, o hemangioendotelioma de células fusiformes apresenta componente vascular mais cavernoso e, focalmente, as células endoteliais são epitelióides e vacuoladas. Glóbulos hialinos não foram relatados neste tumor. A angiomatose bacilar é diferenciada do SK pela presença de células endoteliais epitelióides, neutrófilos e cocobacilos Gram-negativos [22].

As lesões do SK podem demonstrar grande variabilidade histológica independentemente do aspecto clínico característico, podendo em alguns casos obscurecer as alterações morfológicas características dessa neoplasia [57].

Em trabalho publicado em 2008, Grayson e Pantanowitz [56] relatam que além das variantes usuais já descritas relacionadas à progressão (mácula, placa e nódulo), outras variantes foram descritas nas últimas décadas. Algumas merecem menção pelo seu significado prognóstico e outras pela maior frequência com que são observadas, como o SK anaplásico, granuloma piogênico-símile e o linfangioma-símile. Assim, a variante anaplásica é rara com poucos casos descritos na literatura nas formas clássica, africana e associada à SIDA; apresenta comportamento agressivo local, propensão à invasão profunda e capacidade de originar metástases. Histologicamente exhibe proliferação de células fusiformes com graus variados de pleomorfismo nuclear e celular formando fascículos. Observa-se atividade mitótica aumentada (5-20 por 10 campos de grande aumento) com presença ocasional de mitoses atípicas e áreas de necrose. Sua natureza vascular não é evidente, portanto, o diagnóstico diferencial inclui várias neoplasias fusiformes como sarcomas

(p.ex. leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma de células fusiformes, tumor maligno da bainha do nervo periférico), melanoma amelanótico de células fusiformes e o carcinoma de células fusiformes. Em 2009 Yu et al. [58] relataram um caso de SK anaplásico cuja histologia mostrava, além das alterações já mencionadas, proliferação celular com predomínio de células epitelióides.

O SK linfangioma-símile é incomum ocorrendo em menos de 5% de todos os casos e pode ser encontrado nas quatro formas clínicas da neoplasia, em todos os estágios de lesão. Duas formas microscópicas desta lesão são descritas. A primeira é constituída por canais vasculares irregulares, ectasiados e anastomosantes que dissecam as fibras colágenas da derme, muito semelhante às neoplasias linfáticas como o linfangioendotelioma benigno. Papilas delgadas podem se projetar para dentro dos vasos, usualmente desprovidos de hemácias. Nestes casos, o sinal do promontório é particularmente evidente. A segunda forma exhibe espaços maiores e mais bem formados revestidos por endotélio ocupando a derme papilar e reticular superior, podendo comprimir a epiderme sobrejacente semelhante ao linfangioma circunscrito. Abaixo destes canais podem-se observar alterações típicas do estágio de placa do SK. Clinicamente, estas lesões podem se assemelhar a bolhas. Observa-se reatividade forte do antígeno nuclear latente-1 (LNA-1) do HHV8 nas células tumorais [56].

O SK linfangiectásico mostra vasos linfáticos de parede fina, grandes e dilatados, intra e peritumorais. Nestes casos, a ectasia é mais pronunciada do que aquela observada na variante descrita anteriormente [56].

A variante queloidal do SK foi descrita apenas em três casos em 1994. Observa-se expansão da derme por colágeno denso e hialinizado semelhante ao quelóide, o qual pode obscurecer a proliferação de células fusiformes da neoplasia. O diagnóstico diferencial deve ser feito com cicatriz dérmica em local de biópsia prévia de lesão de SK [56].

O SK granuloma piogênico-símile corresponde à lesão pequena e superficial exibindo, além das alterações típicas do SK, colarete epidérmico periférico com ulceração e inflamação ocasional. O diagnóstico diferencial principal é o granuloma piogênico propriamente dito, uma vez que este pode exhibir áreas “kaposiformes” além de ulceração e inflamação. Em grande parte das vezes, a distinção só pode ser feita pela presença do LNA-1 do HHV8 [56].

A variante intravascular do SK foi descrita apenas em seis casos, quatro da forma clássica e dois associados à SIDA. Caracteriza-se por proliferação sólida de células fusiformes exclusivamente intravasculares. O diagnóstico diferencial inclui: hiperplasia endotelial intravascular papilífera, granuloma piogênico intravascular, fasciíte intravascular, angioendotelioma intralinfático papilífero [56].

O SK micronodular caracteriza-se por pequena proliferação circunscrita e não encapsulada de células fusiformes localizada na derme reticular. Esta variante foi descrita em pacientes com a forma clássica da doença e associada à SIDA [59].

Cabe ainda mencionar que o quadro histológico do SK pode ser modificado pela terapia oferecida. Assim, podem-se observar alterações associadas à regressão ou, em menor frequência, à exacerbação da neoplasia. Foi observada, após terapia antirretroviral, maior circunscrição das lesões nodulares mostrando menor celularidade e estroma esclerótico circundante. Em alguns casos, o aumento da densidade capilar dérmica ao redor de vasos pré-existentes e anexos, acompanhados por infiltrado inflamatório com predomínio de plasmócitos foi a única anormalidade observada. Pode-se ainda obter regressão parcial ou completa das lesões. Aquelas que apresentam regressão parcial mostram células fusiformes residuais ao redor de vasos pré-existentes na derme alta e média com redução significativa de células fusiformes no restante da derme. Nas lesões com regressão completa, por outro lado, não se observam células fusiformes, apenas aumento discreto da microvasculatura, macrófagos contendo hemossiderina e infiltrado linfocítico perivascular superficial [56, 60].

Em 2010, O'Donnell e Pantanowitz [57] revisaram biópsias cutâneas com diagnóstico de sarcoma de Kaposi em seis pacientes africanos com SIDA resultando na descrição histológica de cinco variantes adicionais da neoplasia: glomerulóide, equimótica, com nódulos mióides, pigmentado e telangiectásico.

O SK telangiectásico exhibe espaços vasculares ectasiados, grandes e extremamente congestionados mostrando áreas focais de fascículos constituídos por células fusiformes, típicos do estágio nodular da neoplasia. Embora o hemangioma sinusoidal possa ser considerado no diagnóstico diferencial, apresenta arquitetura lobular bem demarcada em relação ao tecido circundante e ausência de crescimento sólido, como na lesão nodular típica do SK [56, 57, 60].

A variante glomerulóide apresenta, além das alterações típicas do SK, estruturas vasculares glomerulóides congestionadas relativamente bem circunscritas na

periferia da lesão. Este aspecto foi atribuído pelos autores à visualização de pequenos fascículos e canais vasculares congestionados relacionados à incidência do corte e não ao crescimento intravascular na luz de vasos sanguíneos ou canais linfáticos pré-existentes. Nestes casos, deve-se considerar o hemangioma glomerulóide no diagnóstico diferencial, embora, nestes observe-se o aspecto típico de crescimento de “vaso dentro de vaso” dos capilares. [57]

O SK com nódulos mióides apresenta achados histológicos clássicos da lesão nodular do SK acompanhados por agregados bem definidos de células fusiformes sem atipia, com citoplasma eosinofílico abundante e núcleos afilados, semelhantes ao músculo liso, podendo estar relacionados às paredes de vasos sanguíneos espessos contidos nos tumores. Segundo os autores, estes nódulos não representam diferenciação miofibroblástica verdadeira das células neoplásicas, mas, mais provavelmente, hiperplasia de miofibroblastos estromais. O diagnóstico diferencial a ser considerado é dermatofibrossarcoma protuberante, uma vez que nódulos semelhantes podem ser observados nesta entidade. [57]

O SK pigmentado exibe crescimento sólido típico do estágio nodular com células epitelióides e fusiformes mostrando atipia celular acentuada e figuras de mitose. Por entre estas células observam-se outras de aspecto dendrítico, de origem desconhecida, contendo pigmento castanho granular correspondendo à melanina. O diagnóstico diferencial inclui melanoma e dermatofibrossarcoma protuberante pigmentado. [57]

A variante equimótica exibe proliferação intradérmica típica da neoplasia acompanhada por extravasamento extenso de hemácias, o qual pode obscurecer as alterações histológicas subjacentes do SK. O diagnóstico diferencial inclui hemorragia intralesional resultante do próprio procedimento cirúrgico. [57]

Há décadas, pesquisadores vêm discutindo a origem da célula fusiforme característica do SK, principalmente no estágio avançado.

Em 1989, Nickoloff et al [61] sugeriram os dendrócitos da derme fator XIIIa positivos como precursores do SK. Estudos posteriores como o de Gray et al [62] não confirmaram este fato. Neste estudo, foi realizada imuno-histoquímica demonstrando número aumentado de dendrócitos positivos para o fator XIIIa na derme das lesões maculares e em placas do SK, assim como na derme não comprometida e na periferia dos nódulos tumorais. As células fusiformes tumorais,

por sua vez, mostraram-se negativas para este antígeno. Portanto, a hiperplasia de dendrócitos dérmicos, de acordo com este autor, seria um mecanismo reativo ao SK.

Estudos de microscopia eletrônica mostraram várias características semelhantes as das células endoteliais, porém, alguns de seus marcadores específicos em vasos sanguíneos, como o corpúsculo de Weible-Palade e o Fator von Willebrand, só estavam presentes em poucas células. Apesar disso, a maioria dos pesquisadores concluiu que as células fusiformes tinham origem em linhagem endotelial [52].

Estudos posteriores investigaram se a origem endotelial derivava de precursores endoteliais sanguíneos ou linfáticos. A origem linfática foi apoiada pela forte expressão de antígenos específicos de linhagem endotelial linfática, como podoplanina e fator de crescimento endotelial vascular-3 (VEGFR-3), nas células fusiformes em todos os estágios do SK. A reação ao anticorpo monoclonal D2-40, marcador de endotélio linfático, e ao CD206 somada à ausência de reação nas células fusiformes para marcadores específicos de vasos sanguíneos reforçaram a idéia de que o SK originava-se de um tipo celular capaz de sofrer diferenciação linfática [52].

Gessain e Duprez [52] citam três estudos moleculares, realizados em 2004, que associam as células fusiformes do SK à linhagem celular linfática. O primeiro desses estudos, por Wang et al. mostra que o perfil de expressão genética das células tumorais do SK é mais semelhante ao das células endoteliais linfáticas do que ao das células endoteliais sanguíneas, baseado tanto na assinatura de expressão do SK quanto na seleção de 114 genes que diferenciam as células endoteliais linfáticas das células endoteliais sanguíneas. Hong et al., em um segundo estudo, demonstraram que a infecção pelo HHV8 de células endoteliais sanguíneas diferenciadas leva à reprogramação linfática destas células com a indução de 70% dos principais genes específicos da linhagem linfática, como o Prox-1 que é o principal regulador do desenvolvimento linfático, e à supressão dos genes vasculares sanguíneos. O terceiro estudo citado, realizado por Carroll, Brazeau e Lagunoff demonstrou que a expressão de vários genes específicos do endotélio linfático, como VEGFR3, podoplanina, LYVE-1 e Prox-1, mostrava-se acentuadamente aumentada nas células endoteliais da microvasculatura dérmica após infecção pelo HHV8. Portanto, é possível que as células endoteliais vasculares

sanguíneas tenham seu fenótipo convertido em fenótipo linfático pela a infecção latente do HHV8.

2.6. Detecção do HHV-8 em tecidos

Na literatura, a porcentagem de detecção do vírus nos casos de SK varia de 80 a 100% utilizando diferentes técnicas. Embora as técnicas de PCR sejam confiáveis para avaliar a infecção pelo HHV8 em amostras biológicas e dados indiquem alta sensibilidade desta técnica, Pan e colaboradores demonstraram que a detecção do HHV8 por essa técnica envolve altas taxas de resultados falso-negativos que podem resultar de vários fatores como, pequena quantidade ou grande fragmentação do DNA extraído dos blocos de parafina, pequena carga viral nos tecidos biopsiados e presença de pouca lesão nas amostras como ocorre, por exemplo, nas lesões iniciais do SK [63, 64].

Segundo Robin et al., 2004 [64], a detecção de produtos do HHV8 pela PCR não é sinônimo de SK uma vez que células infectadas circulantes ou contaminação também podem representar fontes potenciais de resultados falso-positivos. Em trabalho publicado por Cheuk et al. [65], os autores sugerem que a PCR seja realizada sempre em combinação com a imuno-histoquímica para permitir a identificação precisa dos tipos celulares (células neoplásicas versus linfócitos circulantes) positivos para o HHV8, uma vez que este método permite a interpretação dos resultados no contexto das alterações morfológicas.

Por outro lado, a utilização da imuno-histoquímica na compreensão e no diagnóstico preciso do SK tem aumentado nas últimas décadas [38, 54, 61]. O anticorpo monoclonal mais utilizado para localizar o HHV8 no SK é direcionado contra o antígeno nuclear latente-1 (LNA-1), uma proteína codificada pela ORF73 do genoma do vírus, a qual é expressa predominantemente durante a latência viral [38]. Esta proteína é facilmente detectada pela imuno-histoquímica e expressa no núcleo da maioria das células fusiformes nas lesões iniciais e tardias de todas as formas clínicas do SK, por isso, é usada como marcador diagnóstico [17]. O LNA-1 é um marcador altamente sensível e específico para o SK tanto na população HIV negativa quanto HIV positiva, e é especialmente útil para diagnóstico de lesões

iniciais sutis no estágio de mácula e lesões de SK em localizações não usuais, assim como para diferenciá-lo dos seus mimetizadores histológicos [38, 64-66]. O estudo de Kyoung-Bun L et al. [30], demonstrou reação nuclear forte e difusa para HHV8 em 16 casos de SK resultando em 100% de sensibilidade e especificidade. Patel et al, em 2004 [38], obtiveram os mesmos resultados nos 21 casos de SK estudados e reação negativa em todos os casos não-SK. Assim como estes estudos já citados, outros obtiveram resultados semelhantes, Cheuk et al [65] e Robin et al. [64], validando a utilização da imuno-histoquímica como técnica confiável de detecção do HHV8 nas lesões de SK.

3. OBJETIVO GERAL

Implantar protocolo de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-HHV8 e verificar a eventual presença do antígeno em casos de sarcoma de Kaposi em pacientes HIV positivos avaliados no Serviço de Anatomia Patológica do IPEC, e comparar estes resultados com aqueles obtidos em simuladores histológicos da neoplasia.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Revisar os aspectos histopatológicos dos casos de sarcoma de Kaposi.
2. Estabelecer o protocolo de imuno-histoquímica para utilização do anticorpo anti-HHV8.
3. Verificar e quantificar a reação imuno-histoquímica em função dos diferentes aspectos histológicos da neoplasia.
4. Descrever a população estudada de acordo com dados sócio-demográficos e terapêuticos (uso ou não de TARV), idade e níveis de CD4.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho e delineamento do estudo

Trata-se de um estudo descritivo no qual foram analisadas biópsias de pele com diagnóstico de SK provenientes de pacientes infectados pelo HIV atendidos no IPEC do período de 2003 a 2010. As biópsias cutâneas analisadas corresponderam a 44 pacientes do sexo masculino e cinco do feminino com idade entre 25 e 46 anos, todos residentes na cidade do Rio de Janeiro, sendo um proveniente do estado da Paraíba e um de Minas Gerais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC número 0072.0.009.000-09.

4.2 Seleção da amostra

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os casos identificados com disponibilidade de informações clínicas e blocos de tecido para a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos sarcomas de Kaposi e de lesões incluídas no seu diagnóstico diferencial.

4.2.2 Material de estudo

Através do sistema de informação do serviço de Anatomia patológica, incluímos 49 casos com diagnóstico de sarcoma de Kaposi e de 60 casos de lesões que o simulam microscopicamente. Dentre as lesões simuladoras do sarcoma de Kaposi descritas na literatura, levantamos em nosso arquivo: 12 dermatofibromas, 17 hemangiomas, 8 granulomas piogênicos e 23 dermatites de estase.

4.3 Análise histopatológica

Todos os casos identificados e incluídos neste estudo foram submetidos à revisão histológica por dois patologistas nos cortes corados pela hematoxilina e

eosina para confirmação diagnóstica. Foram aplicados os critérios clássicos da literatura para o reconhecimento desta neoplasia: celularidade intersticial aumentada, proliferação vascular, vasos ao redor de anexos e por entre fibras colágenas, infiltrado inflamatório predominantemente de linfócitos e plasmócitos, hemorragia antiga, sinal do promontório e glóbulos hialinos. [67].

A variação com a qual estes diversos aspectos histológicos estavam presentes nos diferentes casos, determinou a classificação da nossa amostra em três grupos histológicos (grupos 1, 2 e 3), o que foi feito com a finalidade de se encontrar a correlação com a lesão elementar dermatológica e suposto estágio clínico de desenvolvimento da lesão.

4.4 Reação e análise Imuno-histoquímica

Utilizamos o anticorpo monoclonal NCL-HHV8-LNA (Novocastra, Newcastle upon Tyne,UK) para o estudo imuno-histoquímico das biópsias selecionadas.

Os resultados da imuno-histoquímica foram graduados pela utilização de um sistema semi-quantitativo e a porcentagem de células positivas foi graduada de 1 a 4 (1. 1%-25%; 2. 26%-50%; 3. 51%-75%; 4. 76%-100%). [30]

Comparou-se o número de casos positivos pela técnica de imuno-histoquímica entre SK e seus simuladores histopatológicos.

4.5 Método imuno-histoquímico

Os cortes histológicos foram colocados em estufa a 56°C por 20 minutos. Foi realizada, a seguir, a desparafinização em xilol em duas etapas de 20 minutos com posterior rehidratação em soluções alcoólicas e água. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de 55ml metanol e 45ml peridrol (peróxido de hidrogênio) a 13%. A recuperação antigênica foi obtida com tampão citrato 10mM, pH 6 em panela de pressão por 3,5 minutos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Proteína Bloqueadora (Novocastra, Leica Biosystem New Castle) por 30 minutos e, em seguida, as lâminas foram incubadas adicionando o anticorpo anti-HHV8, clone NCL-HHV8-LNA (Novocastra, Newcastle upon Tyne,UK) na diluição de 1/200 por 16 horas overnight

a 4°C. Em seguida foi adicionado o anticorpo Post Primary Block (Novocastra, Leica Biosystem New Castle) por 30 minutos e incubado o Polímero (Novolink Polímero ref 7112) por mais 30 minutos.

As lâminas foram reveladas com diaminobenzidina – DAB (DakoCytomation Ref S3000, Carpinteria, CA, USA) e contra-coradas com a hematoxilina de Harris. Foi considerada positiva a coloração castanha, difusa ou pontilhada, nos núcleos das células lesionais.

Entre as incubações, as lâminas foram lavadas em tampão TBS – Tris Buffered Solution (Wash Buffer 10x, DakoCytomation Ref S3006, Carpinteria, CA, USA) por 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado um caso de SK em linfonodo.

4.6 Revisão dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais

Foi realizada a revisão dos prontuários para documentar idade, sexo, procedência, contagem de CD4, tempo de HIV e presença ou ausência de tratamento antirretroviral (TARV). Foi registrada, ainda, a descrição da lesão dermatológica elementar.

5. RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica da amostra estudada

As características histológicas descritas no SK foram observadas nas 49 biópsias cutâneas analisadas e incluíram proliferação vascular (Figura 1), presença de fendas vasculares ao redor de vasos pré-existentes, alteração conhecida como sinal do promontório (Figura 2a e 2b), glóbulos hialinos (Figura 3), presença de vasos nas proximidades de anexos (Figura 4), canais vasculares em fenda permeando fibras de colágeno, infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e plasmócitos, hemorragia recente representada por hemácias extravasadas e hemorragia antiga representada pela presença de hemossiderina, e proliferação celular fusiforme (Figuras 5 e 6). A presença de cada uma destas alterações morfológicas e sua intensidade variou de acordo com o grupo histológico conferido a todas as biópsias cutâneas examinadas (Tabela 1). Alterações como proliferação vascular e presença de infiltrado inflamatório mostraram-se constantes em todas as lesões, independentemente do seu estágio de desenvolvimento ou classificação histológica, variando apenas a intensidade destas alterações. Lesões classificadas como grupo 1 (n=5) se caracterizavam por proliferação vascular bastante focal, em geral, percebida na proximidade de anexos, com manutenção da arquitetura dérmica e sem formação de feixes fusiformes. (Figura 7) O infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos variou de leve a moderado predominando, porém, o infiltrado de intensidade leve, focalmente distribuído. Lesões deste grupo possivelmente correspondem clinicamente à máculas e, portanto, à formas iniciais de lesão. Lesões histologicamente classificadas como grupo 2 (n=31) se caracterizavam pela pronta identificação de grupamentos tumorais dérmicos de tamanhos variados, com distorção da arquitetura da derme em maior ou menor proporção na amostra. Observou-se nítida formação de vasos ou fendas vasculares e proliferação de células fusiformes com formação de feixes. (Figura 8) As lesões incluídas no grupo 2, mostraram alterações de intensidade intermediária entre as iniciais e avançadas. Lesões deste grupo possivelmente correspondem clinicamente a pápulas e placas. Lesões histologicamente classificadas como grupo 3 (n=13) se caracterizavam por proliferação celular com arquitetura nodular formando agregado

expansivo de células na derme ou lesões exofíticas como o SK granuloma piogênico-símile. Observou-se proliferação acentuada de células fusiformes formando feixes bem constituídos com figuras de mitose ocasionais (Figuras 9a e 9b) Nestas lesões, predominou o infiltrado inflamatório de intensidade acentuada com presença de linfócitos e plasmócitos. Lesões deste tipo, possivelmente, correspondem clinicamente a nódulos e, portanto às lesões avançadas.

Tabela 1: Distribuição das alterações morfológicas do SK por grupo histológico

Grupo histológico Alteração morfológica	1	2	3	Total
Proliferação vascular	5	31	11	47
Promontório	2	19	3	24
Proliferação vascular anexos	3	16	2	18
Fendas vasculares entre fibras colágenas	5	31	9	45
Infiltrado inflamatório	5	30	12	47
Hemorragia recente	2	25	10	37
Hemorragia antiga	1	20	4	25
Glóbulos hialinos	2	29	12	43
Células fusiformes	-	24	13	36
Número total de casos por grupo	5	31	13	49

5.1.1 Variantes histológicas observadas

A revisão histológica dos 49 casos resultou também na identificação de seis variantes histológicas do SK. (Tabela 2) Identificamos quatro variantes linfangiectásicas (Figuras 12 e 13), três variantes telangiectásicas (Figura 10), duas queloidais (Figuras 11a e 11b), um anaplásico (Figuras 14a e 14b), um linfangioma-símile (Figuras 15a e 15b) e um granuloma piogênico-símile (Figura 16). Os 37 casos restantes mostraram as alterações clássicas do SK de acordo com o suposto estágio de desenvolvimento das respectivas lesões. Alguns destes mostraram alterações morfológicas pontuais que não puderam ser encaixadas nas variantes já descritas, como hiperplasia epidérmica e hiperpigmentação da camada basal semelhante ao dermatofibroma. (Figura 17)

Tabela 2: Variantes do SK identificadas na revisão dos casos.

Variantes histológicas do SK	Nº de casos
Linfangiectásica	4
Telangiectásica	3
Queloidal	2
Anaplásica	1
Linfangioma-símile	1
Granuloma piogênico-símile	1
Total	12

5.2 Análise Imuno-histoquímica

Todos os casos de SK demonstraram reação nuclear para o HHV8 (100%). (Figura 18) Das 49 biópsias, 12 apresentaram reação entre 1% e 25% das células tumorais (grau 1), 13 mostraram reação entre 26% e 50% (grau 2) , em oito biópsias, a positividade nos núcleos das células tumorais variou entre 51% e 75% (grau 3), e em 16, as células do tumor mostraram positividade variando entre 76% e 100% (grau 4). (Tabela 3) A maioria das biópsias que obtiveram reação imuno-histoquímica positiva em até 50% das células tumorais (graus 1 e 2) corresponderam às lesões caracterizadas histologicamente como estágios iniciais do SK. As células endoteliais dos vasos normais foram negativas em todos os casos de SK.

Tabela 3:Quantificação da reação imuno-histoquímica (grau) nas lesões de SK por padrão morfológico (grupo)

Padrão morfológico SK Grau IHQ	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Número de Casos
1	4	8	0	12
2	1	10	2	13
3	0	7	1	8
4	0	6	10	16
Total	5	31	13	49

Nenhuma destas lesões simuladoras do SK incluídas no estudo mostrou positividade para o HHV8. (Tabela 4) (Figura 19)

Tabela 4: Resultados na Imuno-histoquímica (HHV8-LNA-1) nos SK e seus simuladores histológicos

	<i>N °casos</i>	<i>N °(%) casos positivos</i>
Sarcoma de Kaposi	49	49 (100)
Não Sarcoma de Kaposi	60	0 (0)
Dermatite de estase	23	
Hemangioma	17	
Dermatofibroma	12	
Granuloma piogênico	8	

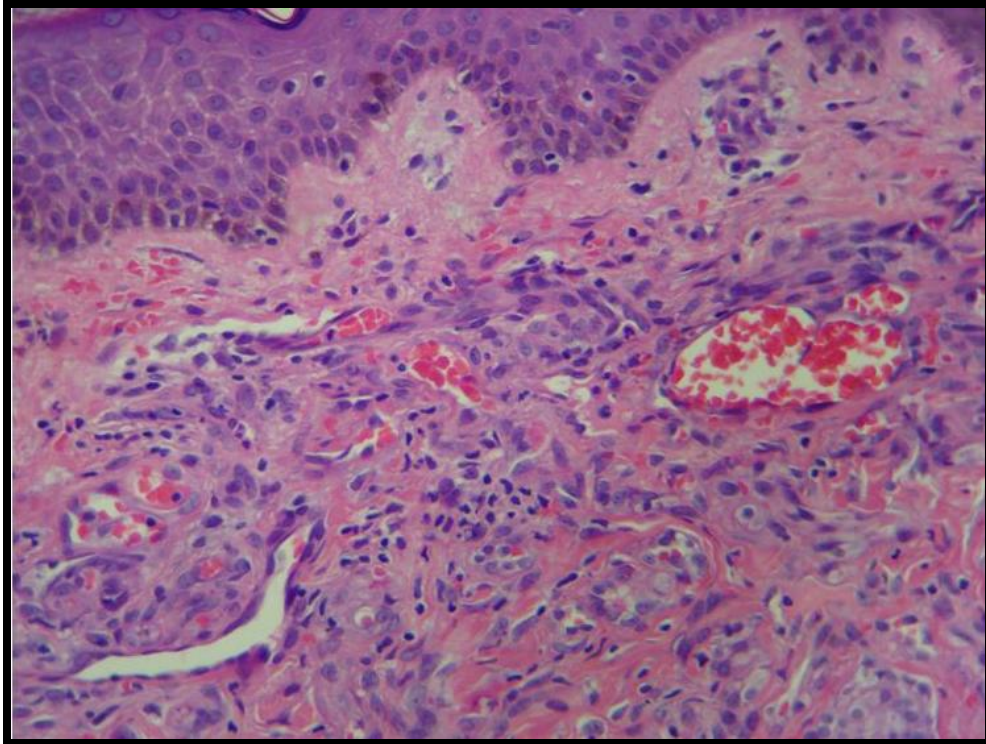


Figura 1: Ocupação da derme alta por proliferação de vasos ou fendas vasculares, por vezes irregulares. Presença de hemácias extravasadas e células inflamatórias. (H&E, 40x)

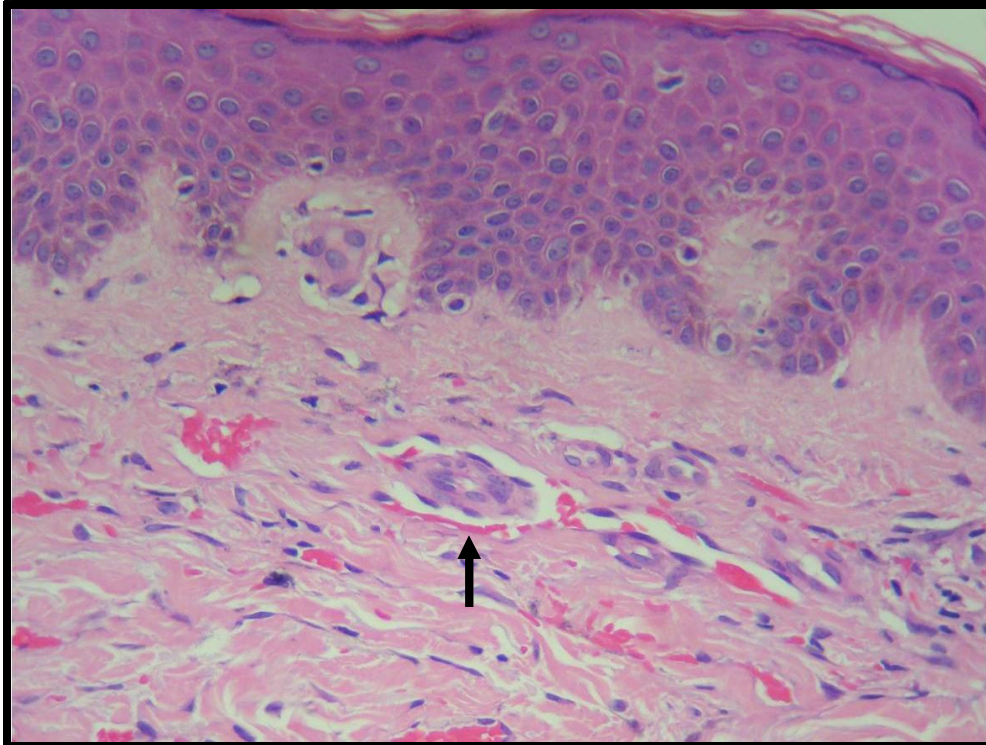


Figura 2a: Proliferação vascular discreta com fenda revestida por células endoteliais achatadas e configurando "sinal do promontório" (seta). Discreto infiltrado inflamatório e poucas hemácias extravasadas. (H&E, 40x)

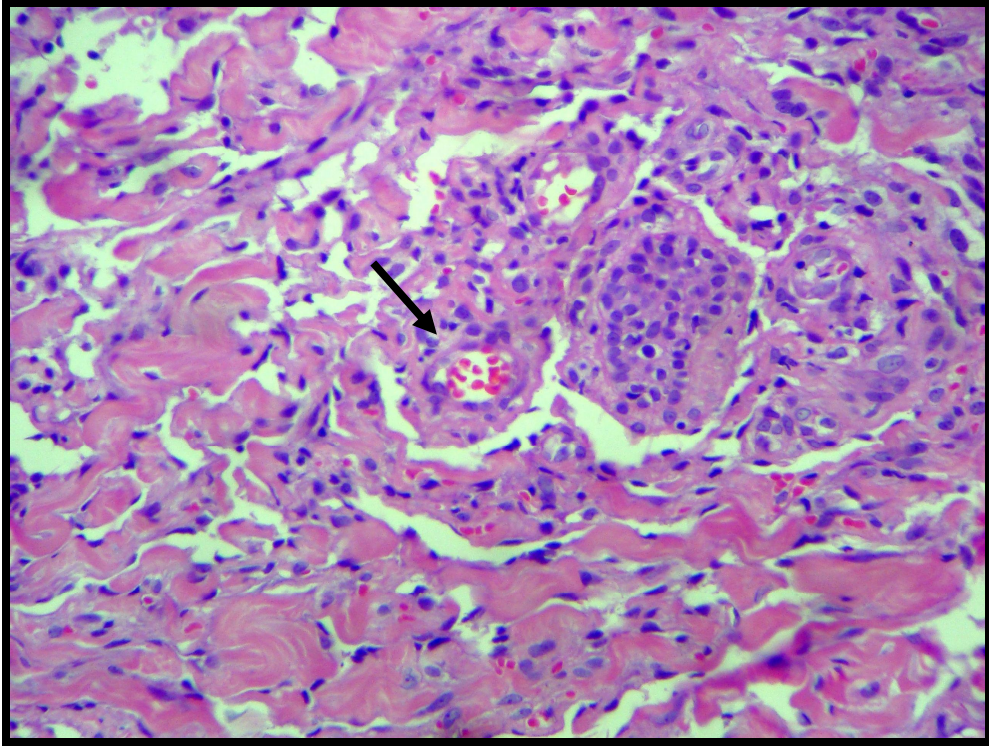


Figura 2b: Sinal do Promontório (seta). (H&E, 40x)

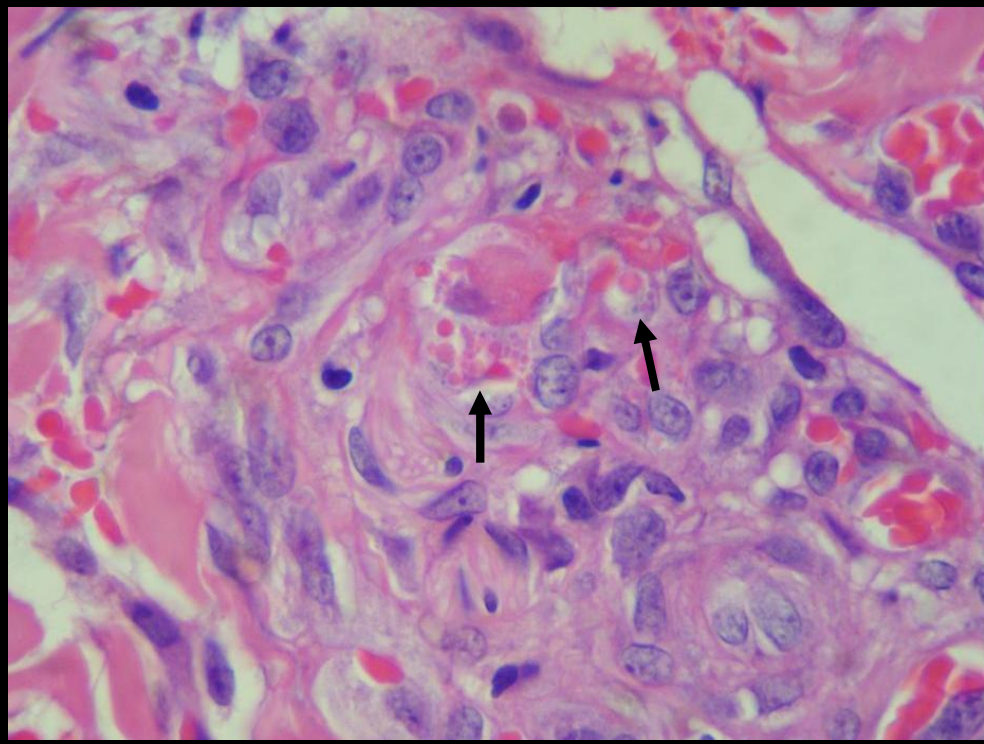


Figura 3: Glóbulos hialinos intra e extracelulares (setas). (H&E, 100x)

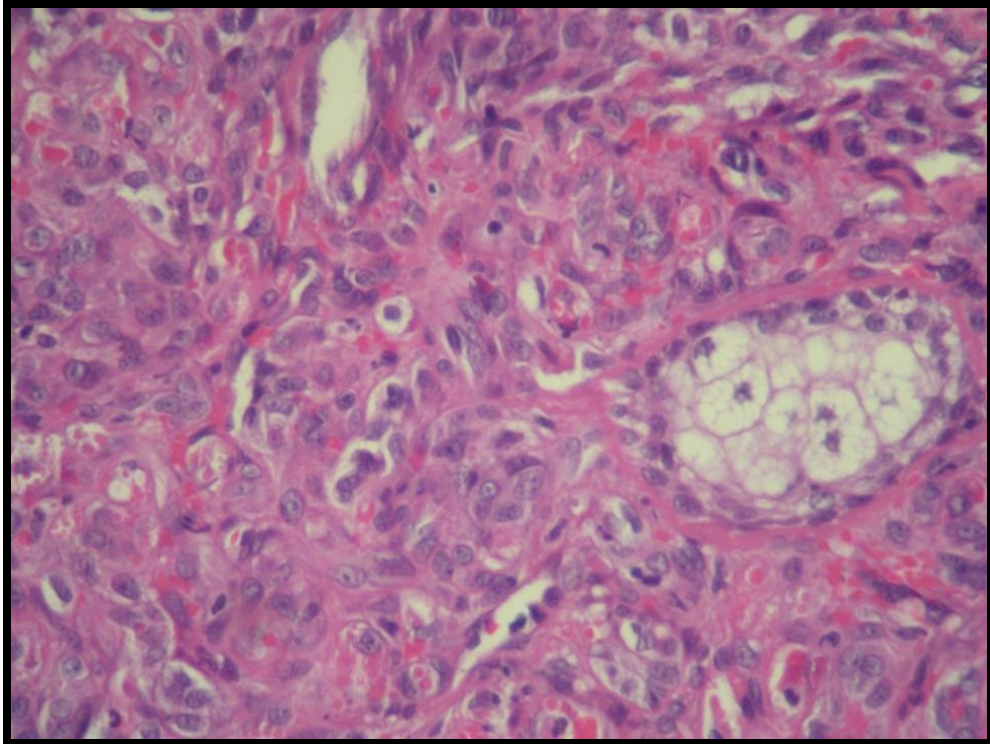


Figura 4: Canais vasculares irregulares na proximidade de glândula sebácea. (H&E, 40x)

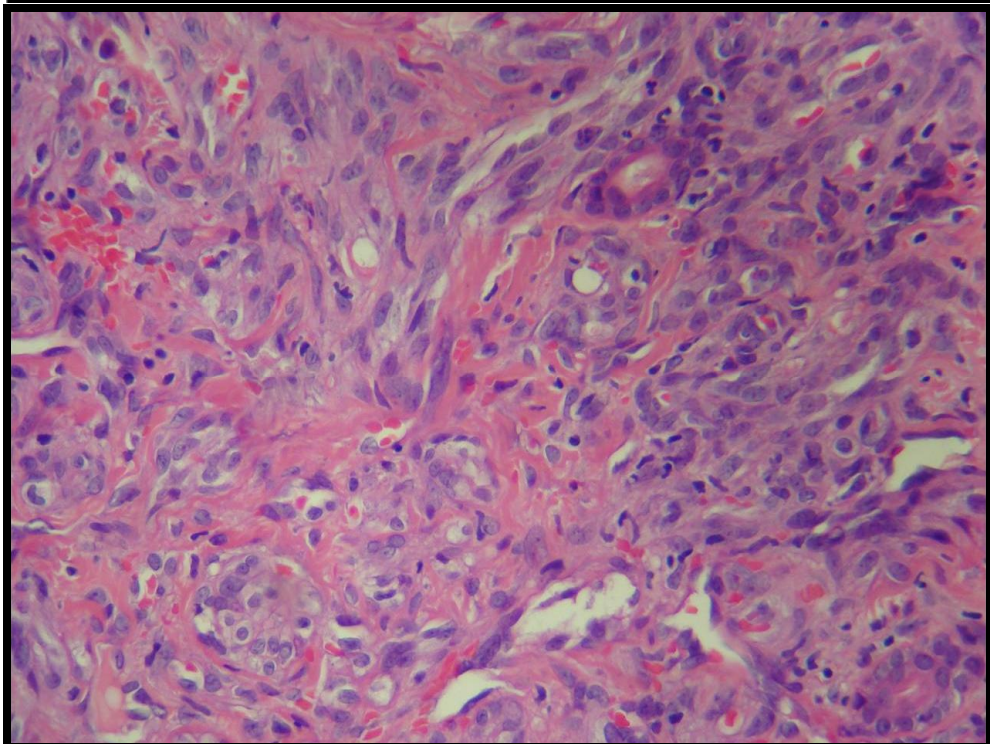


Figura 5: Numerosos canais vasculares e feixes curtos de células fusiformes. Presença de hemácias extravasadas e infiltrado inflamatório mononuclear. (H&E, 40x)

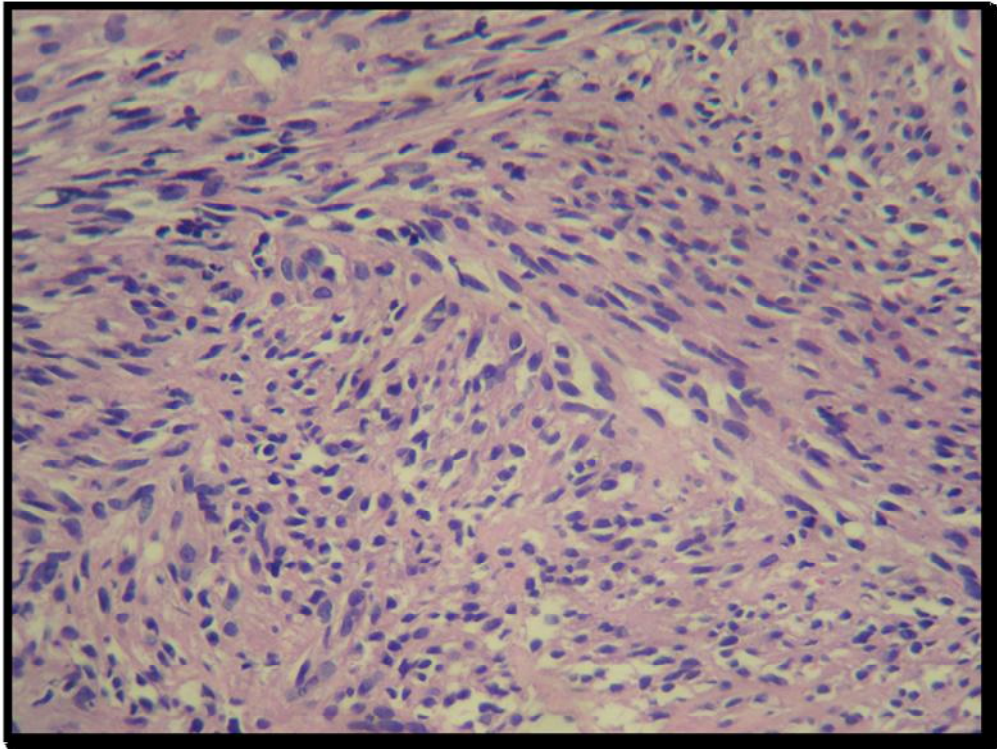


Figura 6: Proliferação de células fusiformes formando feixes alongados. (H&E, 40x)

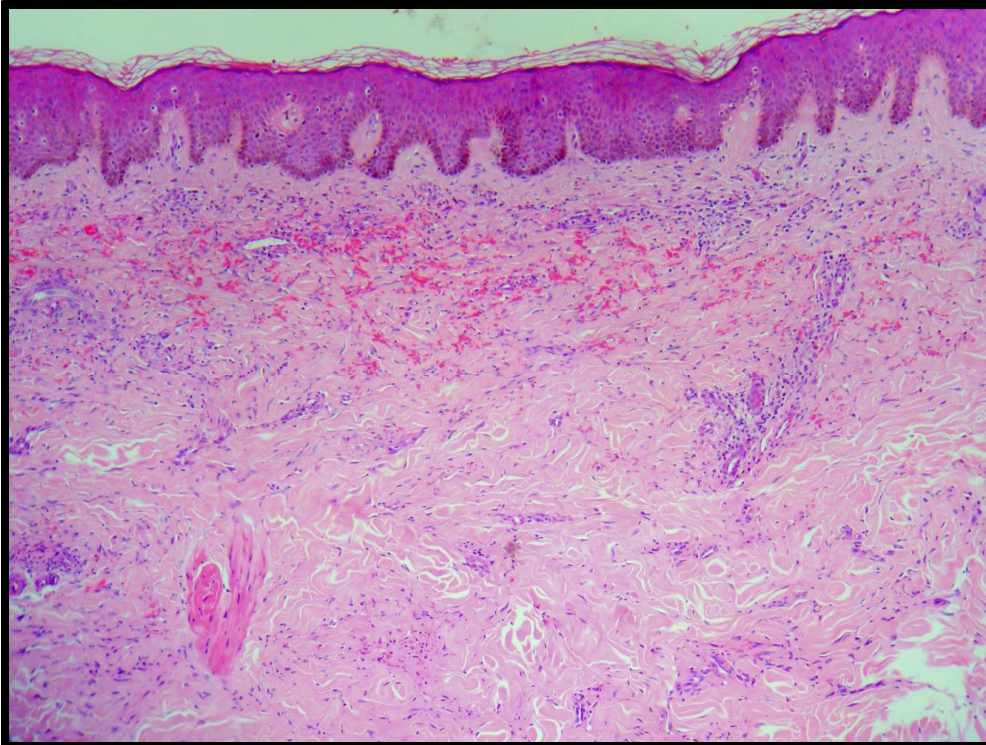


Figura 7: Aumento da celularidade na derme alta acompanhado por espaços vasculares, extravasamento de hemácias e infiltrado inflamatório moderado e arquitetura dérmica geral preservada. (H&E, 10x)

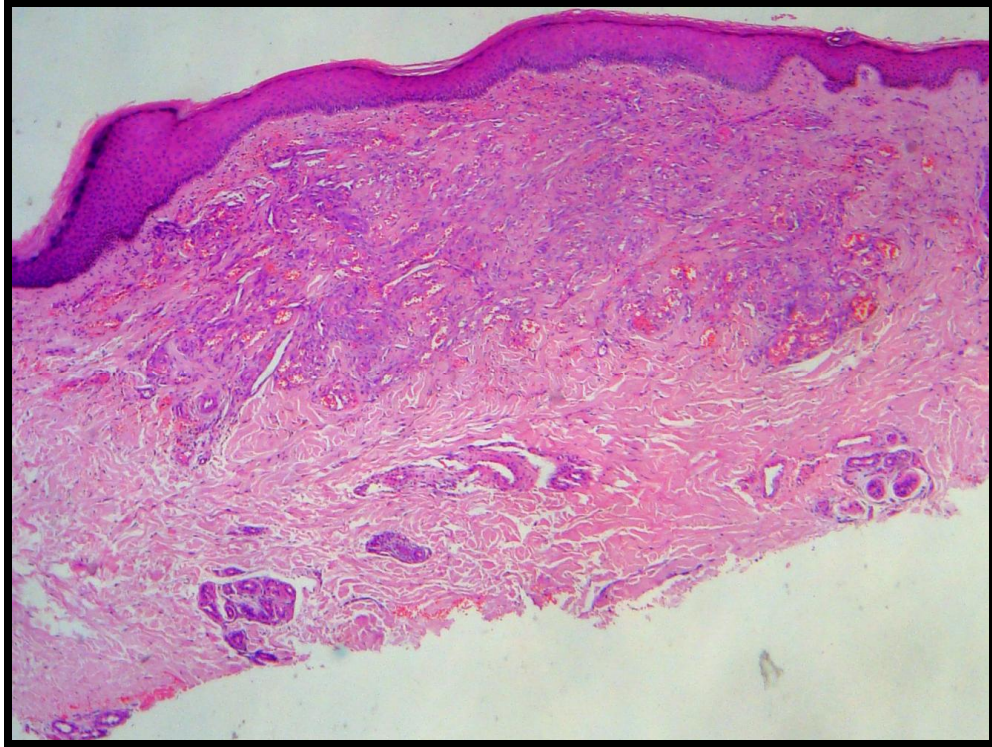


Figura 8: Deme superior ocupada por proliferação vascular e celular. Notar discreto abaulamento da superfície epidérmica. (H&E, 4x)

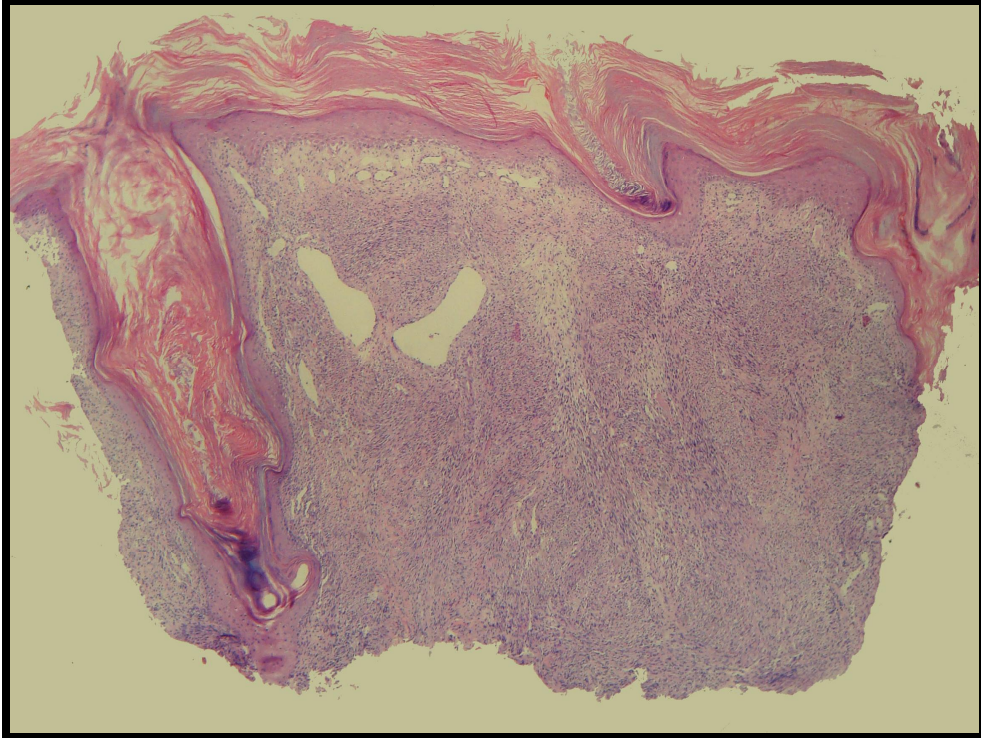


Figura 9a: Deme ocupada lesão densamente celular com pouca proliferação vascular. (H&E, 4x)

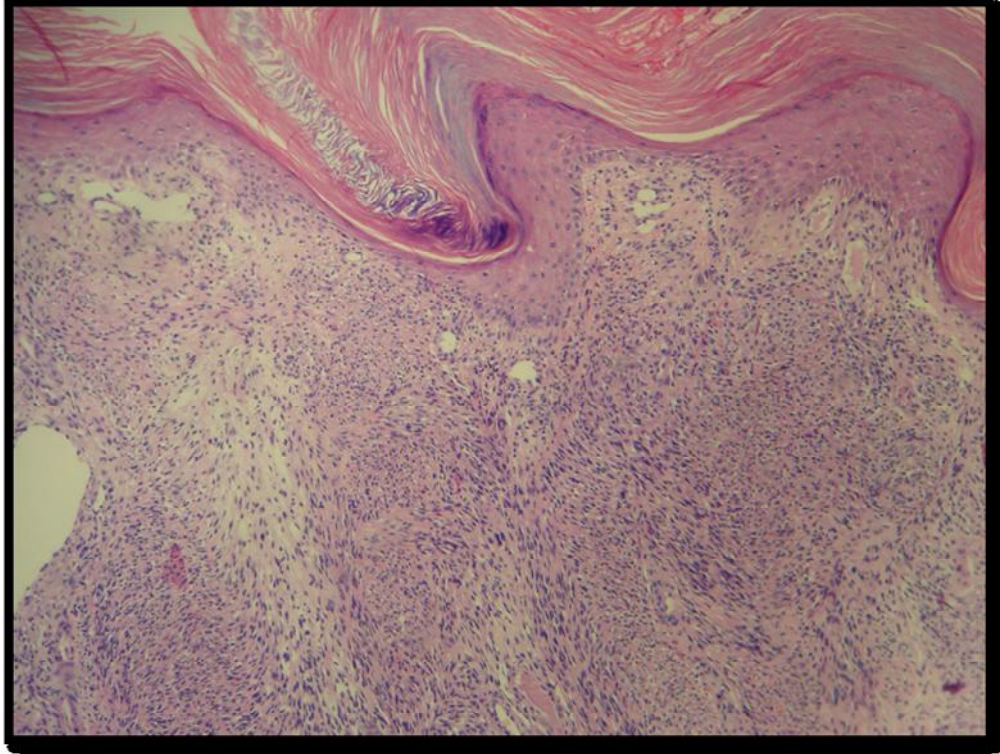


Figura 9b: Visão aproximada de 9a mostrando feixes entrelaçados de células fusiformes. (H&E, 10x)

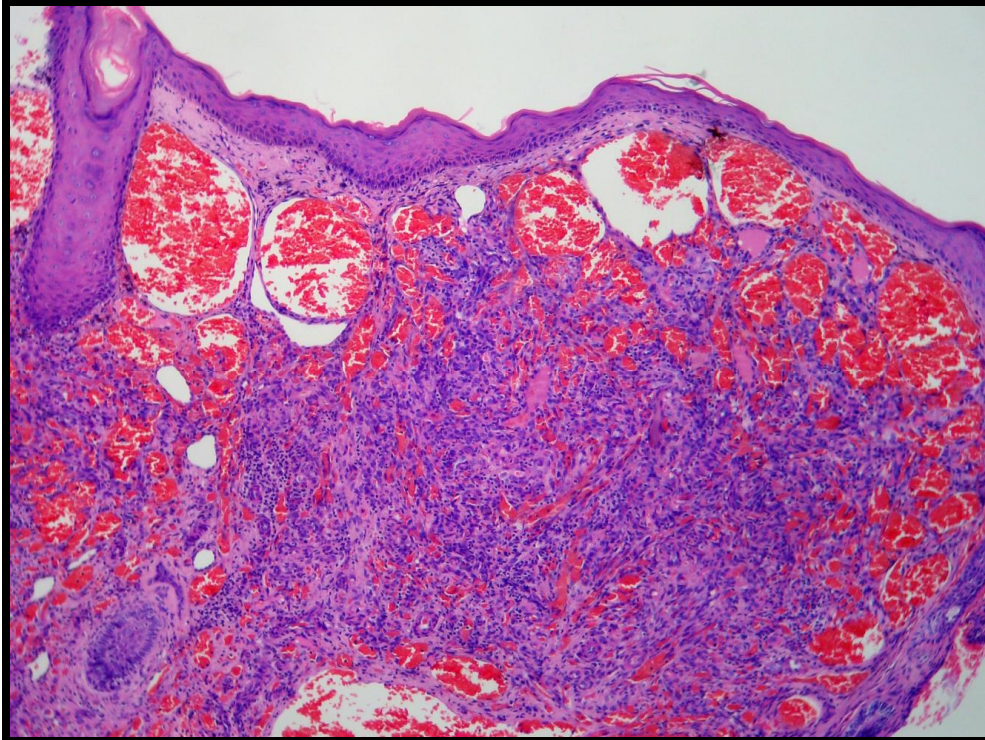


Figura 10: SK telangiectásico. Espaços vasculares dilatados e congestionados em localização subepitelial e na periferia do tumor. (H&E, 4x)

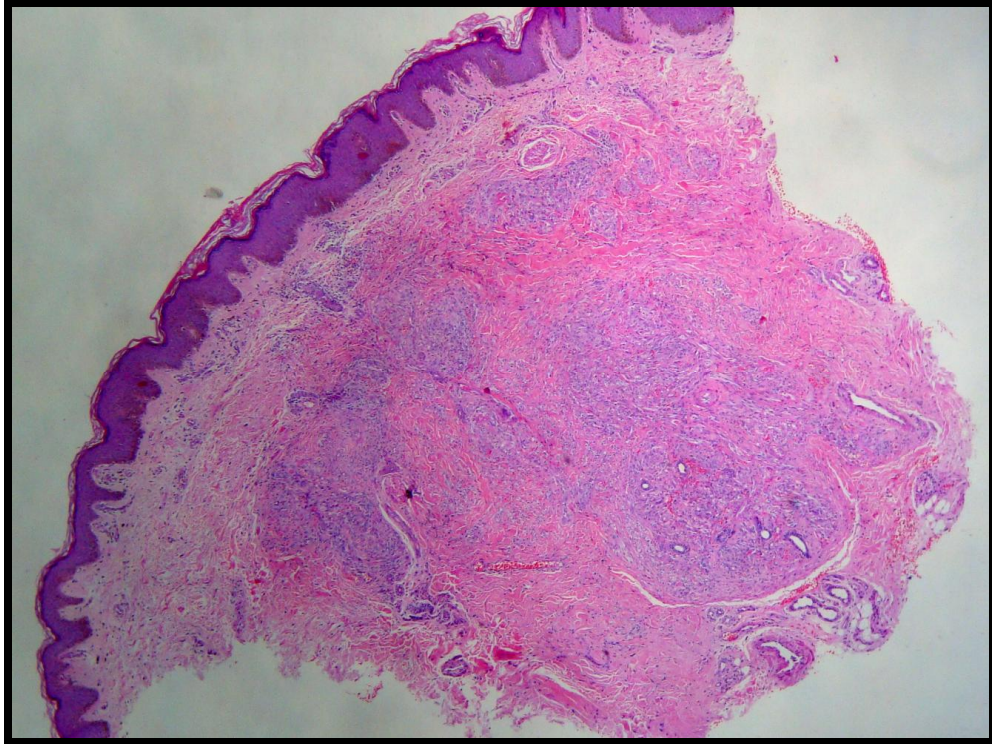


Figura 11a: SK queloidal. Fibras colágenas espessadas em meio às células tumorais. (H&E, 4x)

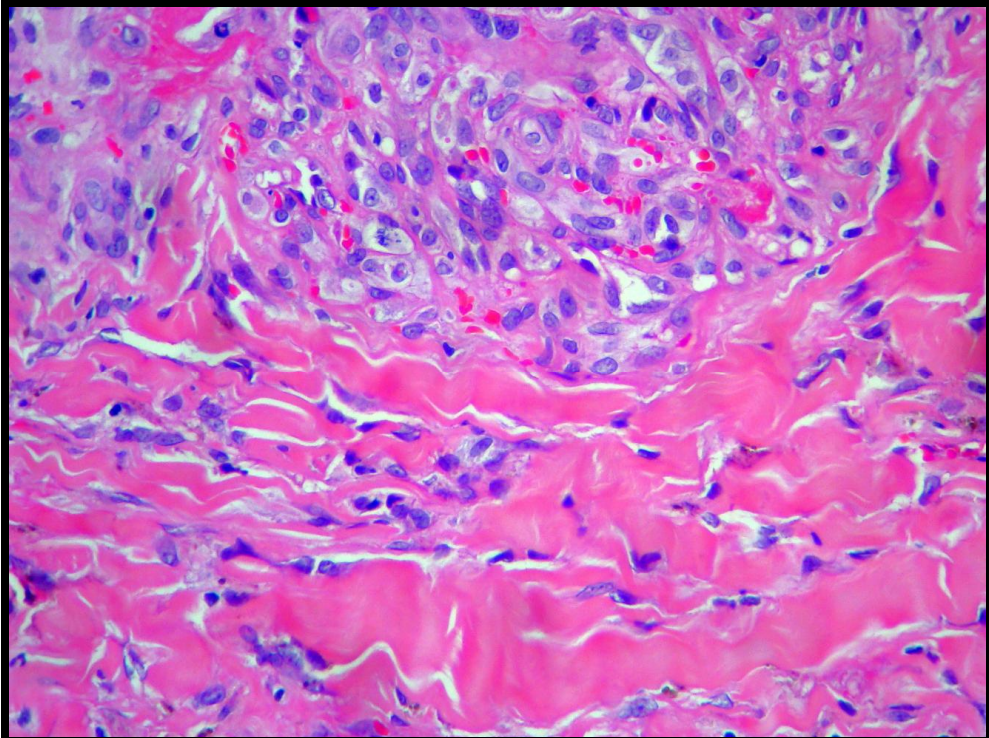


Figura 11b: SK queloidal. Notar fibras colágenas espessadas e hialinizadas. (H&E, 40x)

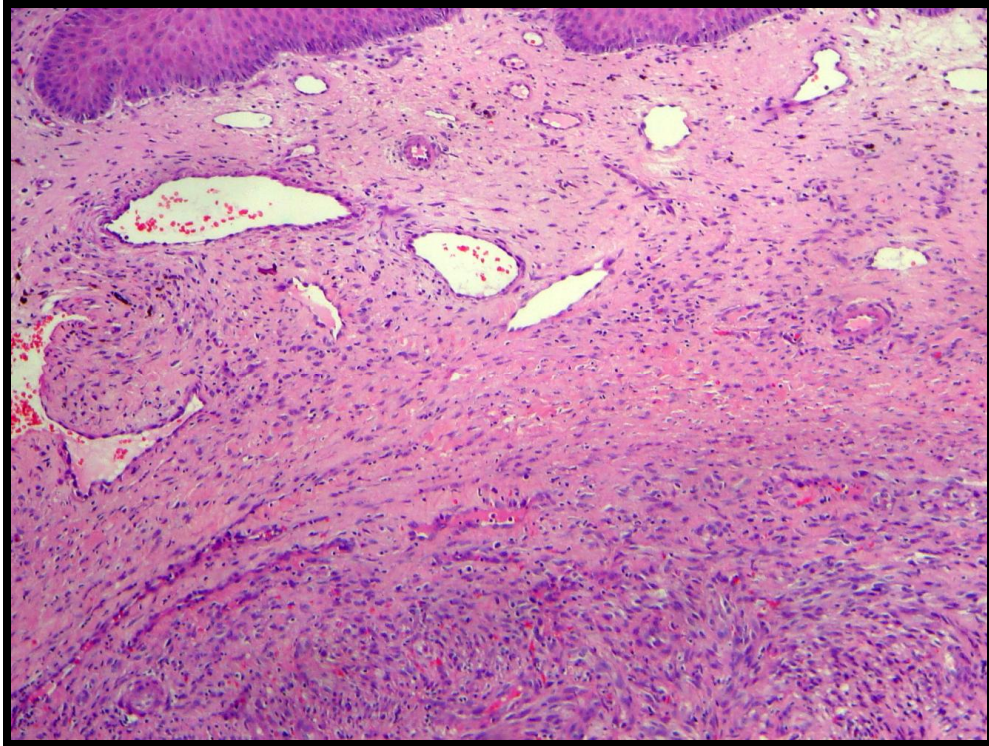


Figura 12: SK linfangiectásico. Vasos periféricos grandes e dilatados em posição subepitelial e na periferia do tumor. (H&E, 10x)

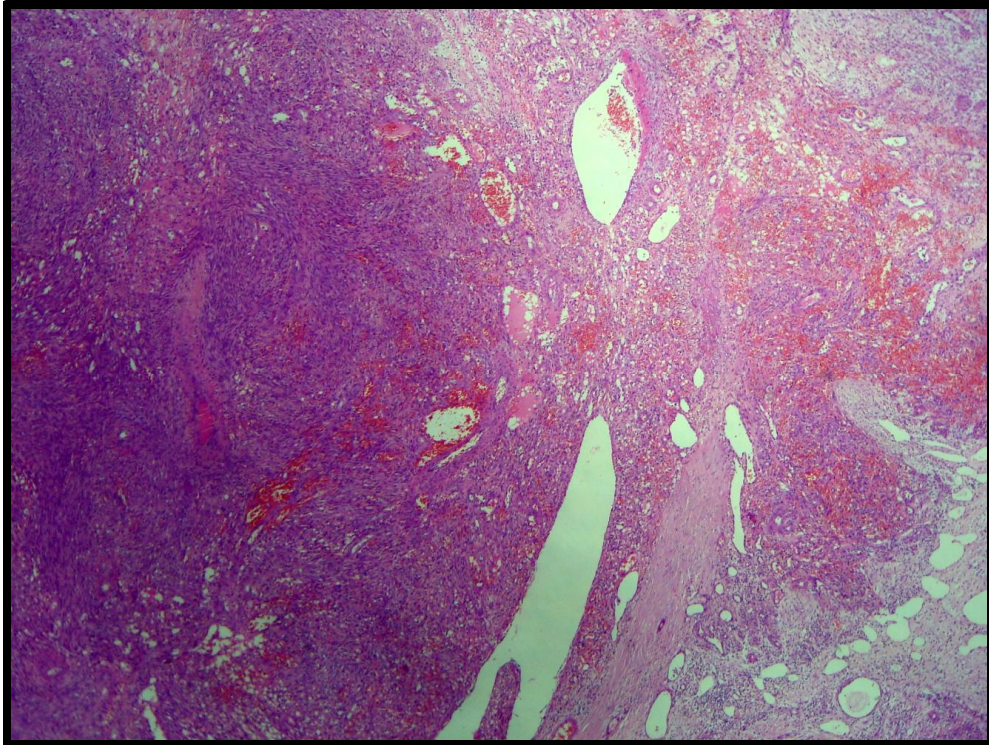


Figura 13: SK linfangiectásico. Vasos linfáticos dilatados intra e peritumorais. (H&E, 10x)

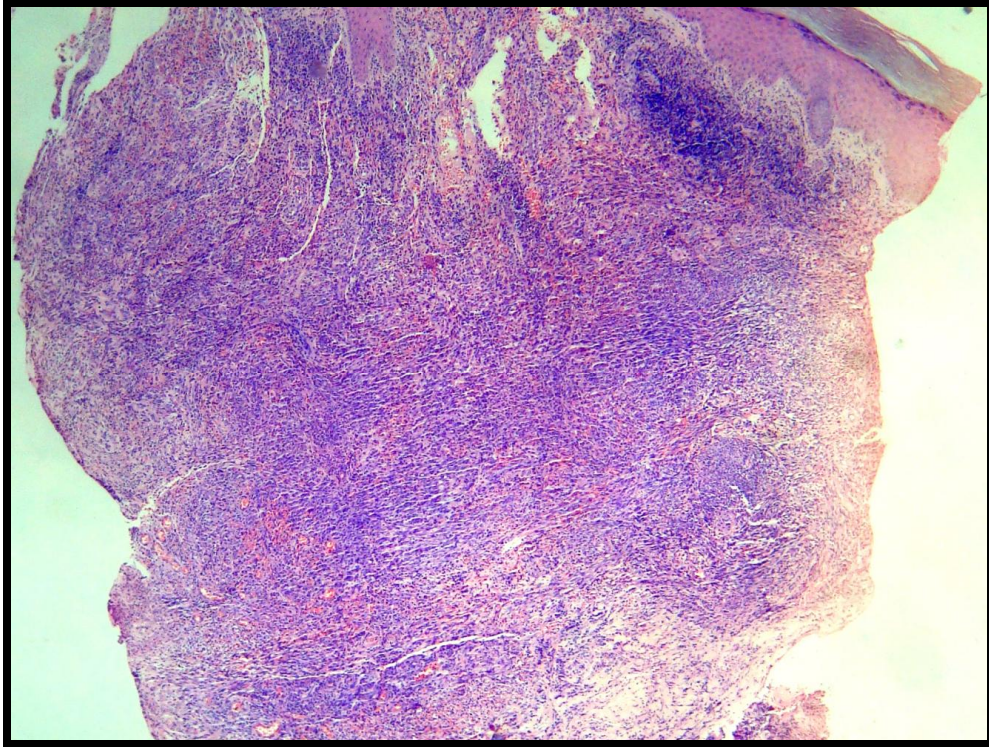


Figura 14a: SK anaplásico. Deme ocupada por extensa proliferação celular (H&E, 4x)

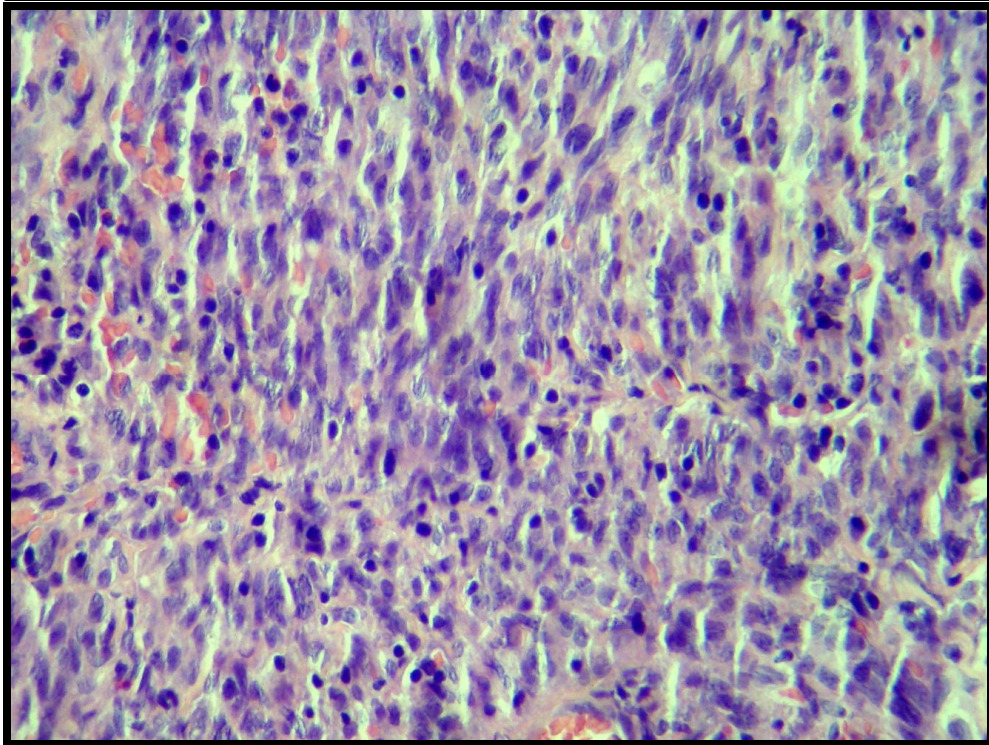


Figura 14b: SK anaplásico. Células fusiformes atípicas com núcleo pleomórfico permeadas por hemácias e células inflamatórias. (H&E, 40x)

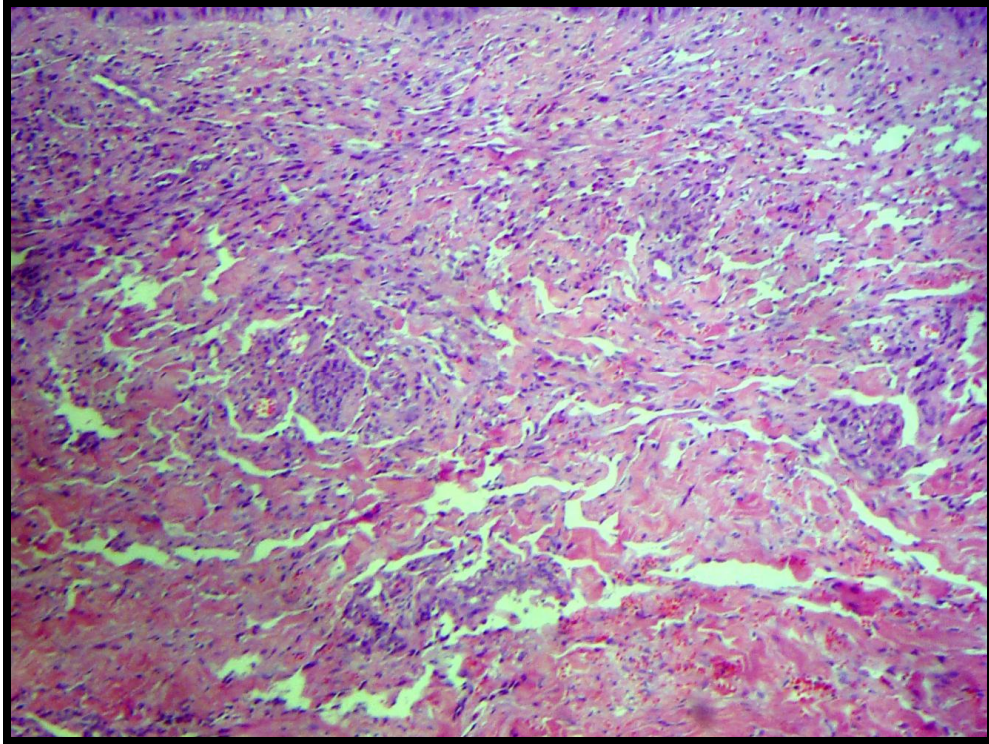


Figura 15a: SK linfangioma-símile. Canais vasculares irregulares, dilatados e anastomosantes dissecando as fibras colágenas da derme. (H&E, 4x)

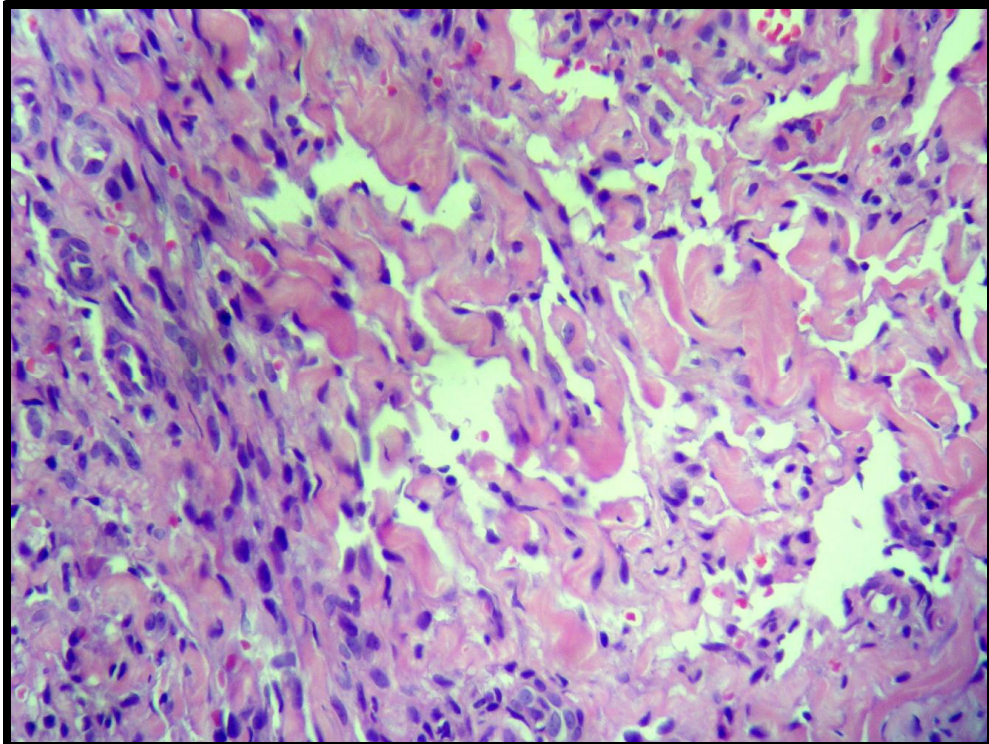


Figura 15b: SK linfangioma-símile. Fendas vasculares dilatadas desprovidas de hemácias com algumas projeções tipo "papilas" para a sua luz. (H&E, 40x)

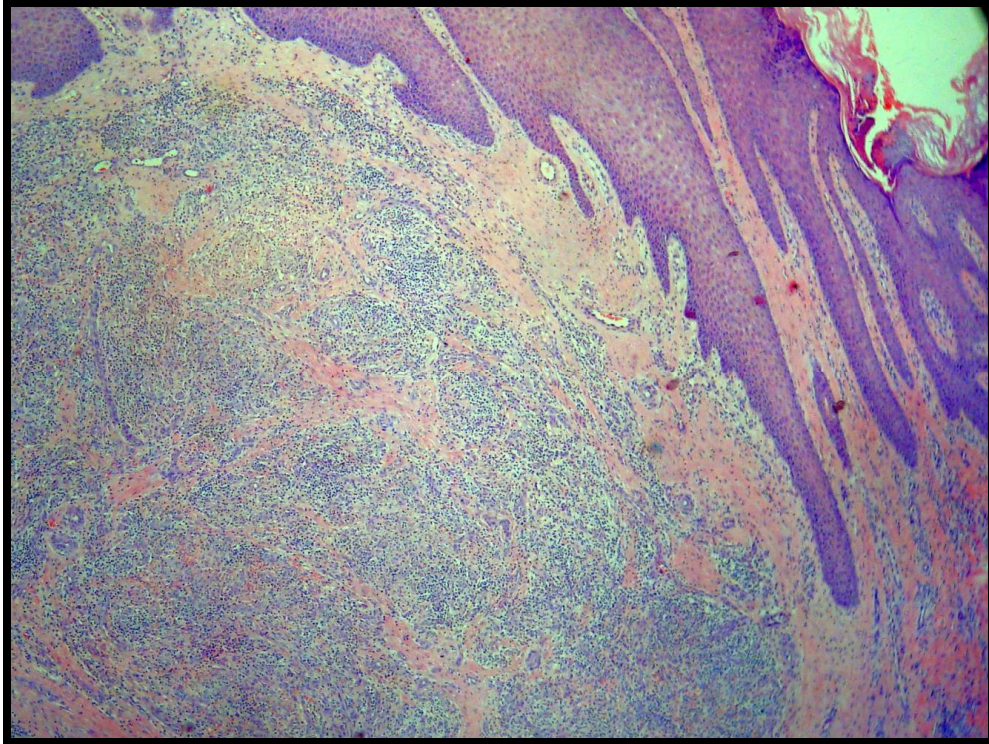


Figura 16: SK granuloma piogênico-símile. Derme ocupada por proliferação celular e epiderme hiperplasiada constituindo colarete. (H&E, 4x)

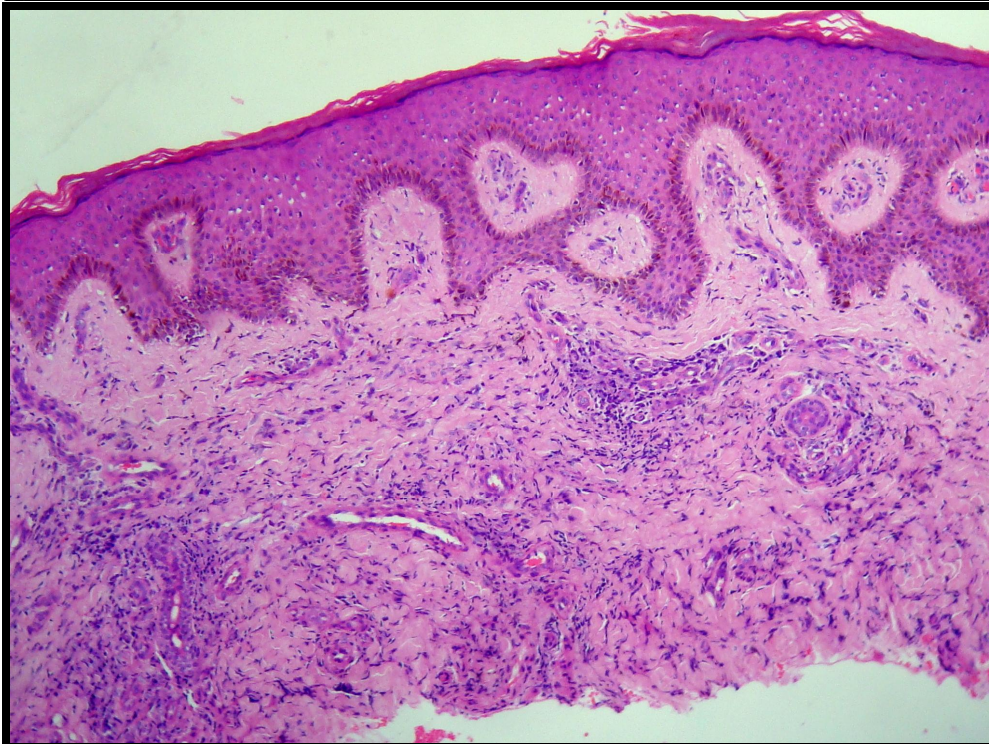


Figura 17: Alterações epidérmicas reminiscentes de dermatofibroma: acantose irregular nítida pigmentação da camada basal. (H&E, 10x)

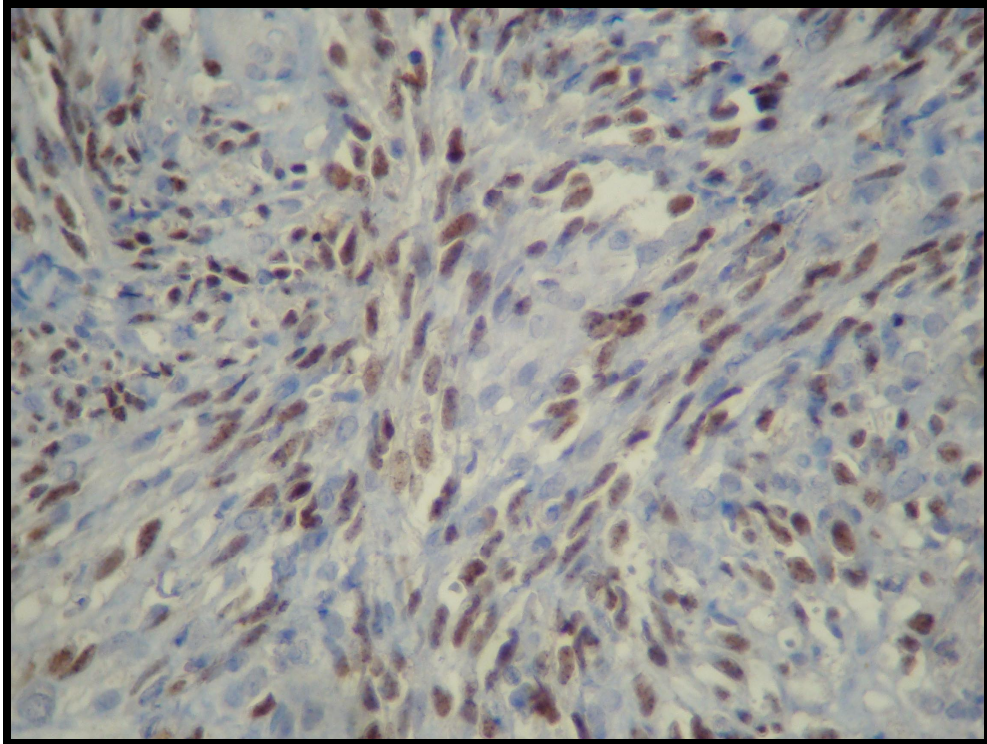


Figura 18: Padrão nuclear de positividade com o anticorpo HHV8-LNA-1 visto em células fusiformes e endoteliais. (Imuno-histoquímica, 40x)

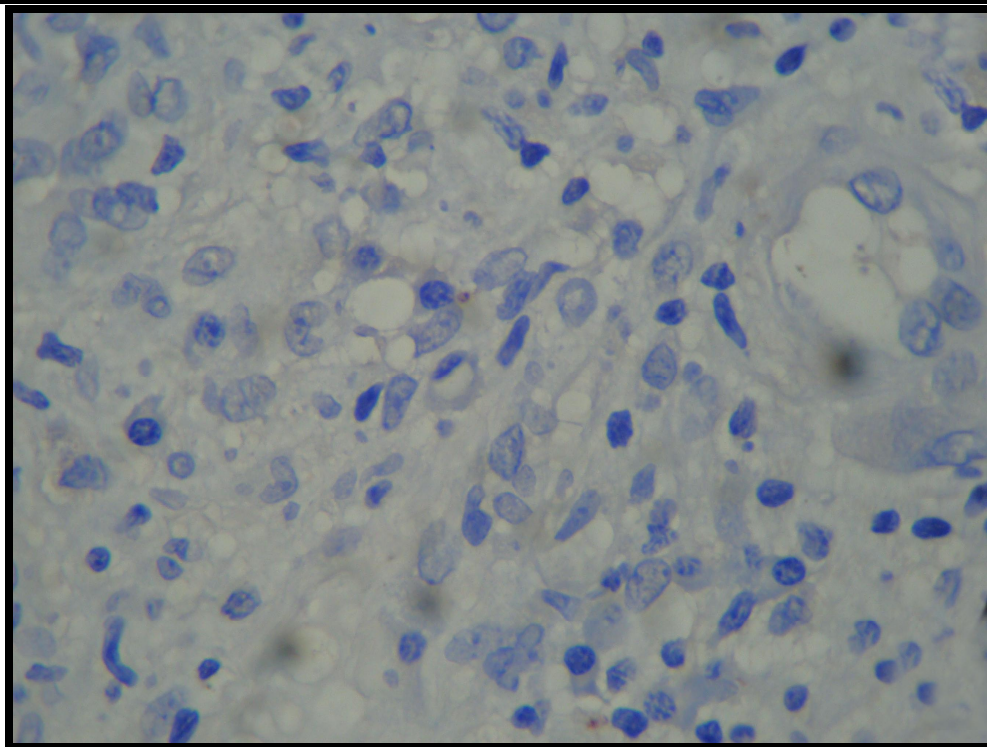


Figura 19: Granuloma piogênico. Reação negativa para o HHV8-LNA-1. (Imuno-histoquímica, 40x)

5.3 Dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais

Os dados clínicos levantados, tempo de infecção pelo HIV, níveis de linfócitos T CD4, uso de TARV, assim como a descrição da lesão dermatológica elementar não se encontravam disponíveis para todos os casos.

Consideramos tempo de infecção pelo HIV como recente, aqueles pacientes cujas biópsias foram obtidas em até um ano após o diagnóstico, tempos superiores a este foram considerados como antigos. A informação relacionada ao tempo de doença pôde ser recuperada em 29 dos 49 casos, e mostrou que a maioria das biópsias (18 casos) foi realizada em pacientes com diagnóstico recente de HIV. Em relação aos níveis de CD4, utilizamos o valor clássico de 200 células/mm³ para subdividir os nossos casos e observamos que dentre os 26 para os quais esta informação estava disponível, a maioria (17 casos) apresentou níveis de linfócitos T CD4 abaixo de 200, indicando comprometimento mais significativo do sistema imunológico na época da biópsia. Informação sobre o uso de TARV estava disponível para 25 dos nossos casos. Em apenas 18 casos obtivemos a descrição clínica da lesão dermatológica elementar. (Tabela 5)

Tabela 5: Relação dos dados clínicos disponíveis

Dados clínicos	Nº de casos	Não informado
Tempo de HIV		
Recente (até 1 ano)	18	15
Antigo (superior a 1 ano)	11	
Níveis de CD4		
(<200)	17	18
(>200)	9	
Pacientes em TARV	25	19
Descrição clínica da lesão		
Mácula	2	26
Placa/pápula	10	
Nódulo	6	

6. DISCUSSÃO

Tal como mencionamos, o diagnóstico histológico de SK e sua distinção de uma série de neoplasias benignas e malignas, assim como de condições inflamatórias pode ser difícil, uma vez que superposições das alterações histológicas podem ocorrer gerando dúvida diagnóstica, e também porque o SK, reconhecido por uma série de características morfológicas, tem seu quadro histológico variado com predomínio de uma ou mais características sobre as outras. Além disso, existem variantes histológicas mais bem caracterizadas do ponto de vista morfológico. Estas variantes são apresentadas no estudo. Tivemos oportunidade de observar seis delas: telangiectásica, queloidal, linfangiectásica, anaplásica, linfangioma-símile e granuloma piogênico-símile em 12 casos. Embora a identificação de variantes histológicas amplie o diagnóstico diferencial desta neoplasia, alterações morfológicas típicas do SK são comumente observadas.

O significado clínico da maioria das variantes histológicas do sarcoma de Kaposi descritas na literatura ainda não foi bem estudado. A variante anaplásica parece ser a única associada a comportamento agressivo [56]. Em nosso estudo não foi possível avaliar esta característica.

Todas as alterações características dos diferentes estágios de desenvolvimento desta neoplasia foram observadas no grupo analisado. Dificuldade maior foi oferecida pelas lesões iniciais, nas quais a proliferação vascular, quando presente, foi discreta e focal e a proliferação celular, ausente. O principal diagnóstico diferencial considerado nestes casos foi dermatite de estase, uma vez que, além exibir aspecto morfológico semelhante, é uma alteração comum nos pacientes HIV positivos.

As lesões mais avançadas, formando nódulos mostraram caráter neoplásico evidente com proliferação exuberante de células fusiformes formando feixes com pouca proliferação vascular. Portanto é necessário incluir numerosas neoplasias de células fusiformes no diagnóstico diferencial. A princípio, lesões em estágio clínico mais avançado, em geral, não geraram dificuldade diagnóstica, uma vez que tanto a proliferação vascular quanto a celular era evidente. Entretanto, ainda assim, o

diagnóstico pode oferecer dificuldade quando ocorre fora do contexto epidemiológico, implicando em análise diagnóstica diferencial mais elaborada.

Subdividimos as lesões de SK em três grupos e diferenciamos as lesões iniciais das avançadas ou mais proliferativas, do ponto de vista histopatológico.

Como descrito na literatura, a descoberta do HHV-8 em todas as formas de SK possibilita utilizar a detecção viral para diagnóstico desta neoplasia. A identificação do HHV8 em tecidos fixados através da utilização do anticorpo monoclonal anti-HHV8-LNA-1 é uma forma eficaz e de baixo custo para diferenciar o SK de seus simuladores histológicos se comparado aos métodos moleculares tradicionalmente utilizados. Além disso, apresenta a vantagem de permitir interpretação dos resultados em contexto morfológico com a identificação dos tipos celulares envolvidos, facilitando até a identificação de falso-positivos [38, 64]. Em nosso estudo, a técnica de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti-HHV8-LNA-1 apresentou 100% de sensibilidade e de especificidade. Todos os nossos casos de SK mostraram forte reação nuclear para o HHV-8, enquanto que a reação mostrou-se negativa em todos os dermatofibromas (n=12), hemangiomas (n=17), granulomas piogênicos (n=8) e dermatites de estase (n=23).

Apesar da positividade em todos os casos de SK avaliados por nós, esta variou de acordo com o estágio de desenvolvimento das lesões. As lesões dos grupos 1 e 2 (iniciais) mostraram número menor de células positivas quando comparadas às lesões do grupo 3 (avançadas) com arquitetura histológica nodular. Nestas, reação nuclear forte foi observada difusamente, correspondendo ao grau 4 com reatividade variando de 76% a 100%. Positividade inferior a 50% das células foi observada, com maior frequência, nas lesões mais iniciais. Esta variabilidade traduz a celularidade geral de cada caso e/ou estágio de desenvolvimento da lesão de acordo com os grupos estudados, supostamente traduzindo o estágio clínico de desenvolvimento das lesões. O estudo de Long et al. [44] para determinar o nível de expressão de LNA-1 na pele, mucosa e vísceras de lesões de SK em pacientes SK/SIDA demonstrou expressão aumentada deste marcador nos estágios mais avançados da doença. No SK cutâneo, a reação imuno-histoquímica mostrou positividade significativamente maior nas lesões nodulares, indicando forte correlação entre a presença do HHV8 tecidual e as características clinico-patológicas do SK.

Observamos que a detecção do HHV-8 foi especialmente útil no diagnóstico das lesões iniciais do SK, nas quais as alterações neoplásicas não são prontamente evidenciadas. A especificidade encontrada nos casos nos estimula a considerar o diagnóstico de SK mesmo que a positividade seja focal. Por outro lado, lesões pouco proliferativas em que a possibilidade de SK é apresentada como suspeita clínica, a utilização do anticorpo anti-HHV8 pode ajudar a afastar este diagnóstico. No curso do estudo recebemos uma biópsia de pálpebra com suspeita de SK cuja histologia mostrava pequenos vasos, por vezes dilatados e edema da derme; células fusiformes não foram observadas. O estudo imuno-histoquímico com o anticorpo para HHV8 não apresentou reatividade nos núcleos das células endoteliais. Concluimos, portanto, que as alterações observadas eram próprias da região anatômica.

Ulceração, linfedema e infecções secundárias podem alterar a histopatologia característica do SK, tornando a detecção viral crucial para o diagnóstico. O SK granuloma piogênico-símile caracteriza-se pela proliferação de capilares bem formados dispostos em lóbulos com colarete epidérmico e desprovidos de agregados sólidos de células fusiformes, porém, a positividade para o HHV8 fornece o diagnóstico em casos duvidosos. O valor da imuno-histoquímica também é observado em biópsias superficiais de SK ulcerado, nas quais se observam células fusiformes HHV8 positivas em meio ao tecido de granulação. Focos angiomasos destas lesões podem ser confundidos com hemangiomas em biópsias superficiais, e a variante anaplásica pode ser confundida com o angiossarcoma por sua capacidade de invadir o subcutâneo e pelas próprias atipias citológicas; agregados sólidos de células fusiformes podem mascarar a natureza vascular do SK simulando várias neoplasias malignas, como o fibrossarcoma e o leiomiossarcoma. Existem poucos relatos desta variante na literatura. Yue Yu et al. (2009) [68] descreveram um caso de SK anaplásico clinicamente agressivo no qual o paciente foi ao óbito uma semana após o diagnóstico, apesar do uso de TARV e agentes quimioterápicos sistêmicos. Em comum com o nosso caso, proliferação sólida de células anaplásicas exibindo atipia citológica, pleomorfismo celular e figuras de mitose foram observadas. E a reação imuno-histoquímica para o HHV8 mostrou positividade nuclear na maioria das células da lesão.

O estudo realizado por Ryan et al, 2002 [68], relata a detecção do HHV-8 em dois casos granuloma piogênico, porém, este resultado não foi reproduzido em

estudos posteriores. Os oito casos de granuloma piogênico estudados foram negativos para este antígeno.

Os resultados do nosso estudo estão em concordância com a maioria dos estudos existentes relacionados à utilização da técnica de imuno-histoquímica na detecção do HHV8 para diagnóstico do sarcoma de Kaposi em casos duvidosos [30, 38, 64, 65]. Há, na literatura, relatos de resultados conflitantes utilizando o mesmo marcador, os quais podem estar associados a diversos fatores como a escolha do anticorpo, fixação do tecido, recuperação antigênica e interpretação da reação. A identificação de biomarcadores como o LNA-1 fornece não apenas ferramentas diagnósticas práticas, como também alvos potenciais de tratamentos. A imuno-histoquímica pode representar excelente técnica para estudo de novos mecanismos da doença, avaliação de marcadores prognósticos emergentes e descoberta de novos alvos terapêuticos [66].

Os dados clínicos apresentados têm apenas caráter descritivo, uma vez que as informações não estavam disponíveis para todos os casos dificultando análise e correlação mais aprofundada.

7. CONCLUSÕES

- A utilização do anticorpo monoclonal anti-HHV8-LNA-1 define o diagnóstico de SK cutâneo, inclusive frente aos simuladores histológicos.
- A revisão dos aspectos histopatológicos dos casos de SK possibilitou a confirmação do diagnóstico e a identificação de seis variantes histológicas da neoplasia em 12 casos: linfangiectásica, telangiectásica, queloidal, anaplásica, linfangioma-símile e granuloma piogênico-símile.
- Reação imuno-histoquímica positiva pode ser focal ou difusa na lesão, o que guarda correspondência ao estágio proliferativo dos casos. Reações focais devem ser valorizadas tendo em vista a especificidade do anticorpo.
- Os aspectos epidemiológicos observados na população estudada reproduzem os achados já descritos na literatura: maioria homens jovens com tempo de infecção pelo HIV inferior a um ano, níveis de linfócitos T CD4 abaixo de 200 células/ mm³ e em uso de TARV na época da biópsia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med*. 2000 Apr 6;342(14):1027-38.
- [2] Ramdial PK. Dermatopathological challenges in the human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome era. *Histopathology*. 2010 Jan;56(1):39-56.
- [3] Rezza G, Andreoni M, Dorrucchi M, Pezzotti P, Monini P, Zerboni R, et al. Human herpesvirus 8 seropositivity and risk of Kaposi's sarcoma and other acquired immunodeficiency syndrome-related diseases. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Sep 1;91(17):1468-74.
- [4] Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*. 2000 Feb 1;88(3):500-17.
- [5] Rouhani P, Fletcher CD, Devesa SS, Toro JR. Cutaneous soft tissue sarcoma incidence patterns in the U.S. : an analysis of 12,114 cases. *Cancer*. 2008 Aug 1;113(3):616-27.
- [6] Sullivan RJ, Pantanowitz L, Casper C, Stebbing J, Dezube BJ. HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Clin Infect Dis*. 2008 Nov 1;47(9):1209-15.
- [7] Fonseca AL, Bollela R, Da Justa P, Neto R. Sarcoma de Kaposi e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: Características desta associação, incluindo novos conceitos sobre patogênese e tratamento. *Medicina*. 1999 jan 1999;32:26-39.
- [8] Duman S, Töz H, Aşçi G, Alper S, Ozkahya M, Unal I, et al. Successful treatment of post-transplant Kaposi's sarcoma by reduction of immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 May;17(5):5.

- [9] Friedman-Kien A, Saltzman B. Clinical manifestations of classical, endemic African, and epidemic AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Jun;22(6 Pt 2):13.
- [10] Sullivan RJ, Pantanowitz L, Dezube BJ. Targeted therapy for Kaposi sarcoma. *BioDrugs*. 2009;23(2):69-75.
- [11] Friedman-Kien A. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men.. *J Am Acad Dermatol*. 1981 Oct;5(4):4.
- [12] Gnann JW, Jr., Pellett PE, Jaffe HW. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2000 Apr;30 Suppl 1:S72-6.
- [13] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer*. 2010 Oct;10(10):707-19.
- [14] Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*. 1995 May 4;332(18):1186-91.
- [15] Du MQ, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol*. 2007 Dec;60(12):1350-7.
- [16] Nsubuga MM, Biggar RJ, Combs S, Marshall V, Mbisa G, Kambugu F, et al. Human herpesvirus 8 load and progression of AIDS-related Kaposi sarcoma lesions. *Cancer Lett*. 2008 May 18;263(2):182-8.
- [17] Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Biberfeld P. KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:4.
- [18] Wood NH, Feller L. The malignant potential of HIV-associated Kaposi sarcoma. *Cancer Cell Int*. 2008;8:14.
- [19] Kennedy MM, Cooper K, Howells DD, Picton S, Biddolph S, Lucas SB, et al. Identification of HHV8 in early Kaposi's sarcoma: implications for Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Mol Pathol*. 1998 Feb;51(1):14-20.

- [20] Ramos da Silva S, Bacchi MM, Bacchi CE, Elgui de Oliveira D. Human bcl-2 expression, cleaved caspase-3, and KSHV LANA-1 in Kaposi sarcoma lesions. *Am J Clin Pathol*. 2007 Nov;128(5):794-802.
- [21] Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett* 2010:140-50.
- [22] Weedon D, Strutton G, Rubin AI. Vascular Tumors. *Weedon's skin pathology*: Churchill Livingstone 2010:913-8.
- [23] Arora M, Goldberg EM. Kaposi sarcoma involving the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010 Jul;6(7):459-62.
- [24] Barrison IG, Foster S, Harris JW, Pinching AJ, Walker JG. Upper gastrointestinal Kaposi's sarcoma in patients positive for HIV antibody without cutaneous disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988 Jan 9;296(6615):92-3.
- [25] Danzig JB, Brandt LJ, Reinus JF, Klein RS. Gastrointestinal malignancy in patients with AIDS. *Am J Gastroenterol*. 1991 Jun;86(6):715-8.
- [26] Afessa B, Green W, Chiao J, Frederick W. Pulmonary complications of HIV infection: autopsy findings. *Chest*. 1998 May;113(5):1225-9.
- [27] Ognibene FP, Shelhamer JH. Kaposi's sarcoma. *Clin Chest Med*. 1988 Sep;9(3):459-65.
- [28] Yoo DJ, Lee KH, Munderi P, Shin KC, Lee JK. Clinical and bronchoscopic findings in Ugandans with pulmonary Kaposi's sarcoma. *Korean J Intern Med*. 2005 Dec;20(4):290-4.
- [29] Lemlich G, Schwam L, Lebwohl M. Kaposi's sarcoma and acquired immunodeficiency syndrome. Postmortem findings in twenty-four cases. *J Am Acad Dermatol*. 1987 Feb;16(2 Pt 1):319-25.
- [30] Kyoung-Bun L, Hye-Seung L, Hee-Eun L, So-Yeon P, Jin-Haeng C, Gheeyoung C. Immunohistochemical Characteristics of Kaposi Sarcoma and its Mimicries *The Korean Journal of Pathology*. 2006;40:7.

- [31] Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE, Jr., Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jul;15(3):439-64.
- [32] Stebbing J, Portsmouth S, Gazzard B. How does HAART lead to the resolution of Kaposi's sarcoma? *J Antimicrob Chemother.* 2003 May;51(5):1095-8.
- [33] Stebbing J, Sanitt A, Nelson M, Powles T, Gazzard B, Bower M. A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet.* 2006 May 6;367(9521):1495-502.
- [34] Lodi S, Guiguet M, Costagliola D, Fisher M, de Luca A, Porter K. Kaposi sarcoma incidence and survival among HIV-infected homosexual men after HIV seroconversion. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Jun 2;102(11):784-92.
- [35] Nguyen HQ, Magaret AS, Kitahata MM, Van Rompaey SE, Wald A, Casper C. Persistent Kaposi sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy: characterizing the predictors of clinical response. *Aids.* 2008 May 11;22(8):937-45.
- [36] Bernstein WB, Little RF, Wilson WH, Yarchoan R. Acquired immunodeficiency syndrome-related malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Int J Hematol.* 2006 Jul;84(1):3-11.
- [37] J.C Leão SIH, B.L. de Freitas, S.R. Porter. . Herpes vírus humano-8 e Sarcoma de Kaposi. *Rev Ass Med Brasil.* 1999;45(1):8.
- [38] Patel RM, Goldblum JR, Hsi ED. Immunohistochemical detection of human herpes virus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. *Mod Pathol.* 2004 Apr;17(4):456-60.
- [39] Duprez R, Kassa-Kelembho E, Plancoulaine S, Briere J, Fossi M, Kobangue L, et al. Human herpesvirus 8 serological markers and viral load in patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Central African Republic. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4840-3.

- [40] Mancuso R, Biffi R, Valli M, Bellinvia M, Turlaki A, Ferrucci S, et al. HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2008 Dec;80(12):2153-60.
- [41] Simonart T. Role of environmental factors in the pathogenesis of classic and African-endemic Kaposi sarcoma. *Cancer Lett.* 2006 Nov 28;244(1):1-7.
- [42] Carroll PA, Kenerson HL, Yeung RS, Lagunoff M. Latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of endothelial cells activates hypoxia-induced factors. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10802-12.
- [43] Moses AV, Fish KN, Ruhl R, Smith PP, Strussenberg JG, Zhu L, et al. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6892-902.
- [44] Long E, Ilie M, Hofman V, Havet K, Selva E, Butori C, et al. LANA-1, Bcl-2, Mcl-1 and HIF-1alpha protein expression in HIV-associated Kaposi sarcoma. *Virchows Arch.* 2009 Aug;455(2):159-70.
- [45] Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994 Dec 16;266(5192):1865-9.
- [46] Pelser C, Dazzi C, Graubard BI, Lauria C, Vitale F, Goedert JJ. Risk of classic Kaposi sarcoma with residential exposure to volcanic and related soils in Sicily. *Ann Epidemiol.* 2009 Aug;19(8):597-601.
- [47] Stebbing J, Portsmouth S, Bower M. Insights into the molecular biology and sero-epidemiology of Kaposi's sarcoma. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Feb;16(1):25-31.
- [48] Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol.* 2004 Jan;85(Pt 1):155-63.
- [49] Ziegler JL, Simonart T, Snoeck R. Kaposi's sarcoma, oncogenic viruses, and iron. *J Clin Virol.* 2001 Feb;20(3):127-30.

- [50] Carroll PA, Brazeau E, Lagunoff M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of blood endothelial cells induces lymphatic differentiation. *Virology*. 2004 Oct 10;328(1):7-18.
- [51] Horenstein MG, Moontasri NJ, Cesarman E. The pathobiology of Kaposi's sarcoma: advances since the onset of the AIDS epidemic. *J Cutan Pathol*. 2008 Nov;35 Suppl 2:40-4.
- [52] Gessain A, Duprez R. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Dec;37(12):2457-65.
- [53] Guedes F, de Andrade HF, Jr., Fernandes ER, Tuon FF, Brasil RA, Pagliari C, et al. The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon-gamma response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus-infected and uninfected individuals. *Br J Dermatol*. 2008 Sep;159(4):839-46.
- [54] Morris CB, Gendelman R, Marrogi AJ, Lu M, Lockyer JM, Alperin-Lea W, et al. Immunohistochemical detection of Bcl-2 in AIDS-associated and classical Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*. 1996 Apr;148(4):1055-63.
- [55] Fitzpatrick T, Freedberg I. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 5 ed: McGraw-Hill, Medical Pub. Division 1999.
- [56] Grayson W, Pantanowitz L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol*. 2008;3:31.
- [57] O'Donnell PJ, Pantanowitz L, Grayson W. Unique histologic variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Am J Dermatopathol*. 2010 May;32(3):244-50.
- [58] Yu Y, Demierre MF, Mahalingam M. Anaplastic Kaposi's sarcoma: an uncommon histologic phenotype with an aggressive clinical course. *J Cutan Pathol*. 2010 Oct;37(10):1088-91.
- [59] Kempf W, Cathomas G, Burg G, Trueb RM. Micronodular Kaposi's sarcoma - a new variant of classic-sporadic Kaposi's sarcoma. *Dermatology*. 2004;208(3):255-8.

- [60] Pantanowitz L, Fruh K, Marconi S, Moses AV, Dezube BJ. Pathology of rituximab-induced Kaposi sarcoma flare. *BMC Clin Pathol*. 2008;8:7.
- [61] Nickoloff BJ, Griffiths CE. The spindle-shaped cells in cutaneous Kaposi's sarcoma. Histologic simulators include factor XIIIa dermal dendrocytes. *Am J Pathol*. 1989 Nov;135(5):793-800.
- [62] Gray MH, Trimble CL, Zirn J, McNutt NS, Smoller BR, Varghese M. Relationship of factor XIIIa-positive dermal dendrocytes to Kaposi's sarcoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1991 Aug;115(8):791-6.
- [63] Nuovo M, Nuovo G. Utility of HHV8 RNA detection for differentiating Kaposi's sarcoma from its mimics. *J Cutan Pathol*. 2001 May;28(5):248-55.
- [64] Robin YM, Guillou L, Michels JJ, Coindre JM. Human herpesvirus 8 immunostaining: a sensitive and specific method for diagnosing Kaposi sarcoma in paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol*. 2004 Mar;121(3):330-4.
- [65] Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Dinkel JE, Ben-Dor D, Chan JK. Immunostaining for human herpesvirus 8 latent nuclear antigen-1 helps distinguish Kaposi sarcoma from its mimickers. *Am J Clin Pathol*. 2004 Mar;121(3):335-42.
- [66] Pantanowitz L, Otis CN, Dezube BJ. Immunohistochemistry in Kaposi's sarcoma. *Clin Exp Dermatol*. 2010 Jan;35(1):68-72.
- [67] Fletcher CD, Unni KK, Mertens F. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC 2002.
- [68] Ryan P, Aarons S, Murray D, Markham T, O'Sullivan S, Lyons F, et al. Human herpesvirus 8 (HHV-8) detected in two patients with Kaposi's sarcoma-like pyogenic granuloma. *J Clin Pathol*. 2002 Aug;55(8):619-22.