

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**NATAN PONZONI GALVANI DE OLIVEIRA**

**Caracterização de polimorfismos em regiões codificadoras de  
miRNA da ORF K12 no genoma do herpesvirus humano do tipo  
8: comparação das variantes de HHV-8 entre grupos de  
indivíduos com e sem sarcoma de Kaposi associado a aids**

**São Paulo**

**2023**

**NATAN PONZONI GALVANI DE OLIVEIRA**

**Caracterização de polimorfismos em regiões codificadoras de miRNA da ORF K12 no genoma do herpesvirus humano do tipo 8: comparação das variantes de HHV-8 entre grupos de indivíduos com e sem sarcoma de Kaposi associado a aids**

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Dissertação de apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva

**São Paulo**

**2023**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Natan Ponzoni Galvani de  
Caracterização de polimorfismos em regiões  
codificadoras de miRNA da ORF K12 no genoma do  
herpesvirus humano do tipo 8 : comparação das  
variantes de HHV-8 entre grupos de indivíduos com e  
sem sarcoma de Kaposi associado a aids / Natan  
Ponzoni Galvani de Oliveira. -- São Paulo, 2023.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientador: Paulo Henrique Braz Silva.

Descritores: 1.Herpesvirus humano 8 2.Sarcoma de  
Kaposi 3.HIV 4.Saliva 5.ORF K12 6.MicroRNAs

USP/FM/DBD-271/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a Deus, que sempre me manteve no caminho correto e me inspira a cada dia.

Dedico também a meus pais, Valdecir Galvani e Marlise Ponzoni, que sempre me apoiaram e encorajaram a perseguir uma carreira científica e ajudaram a superar muitos desafios, e ao meu irmão, Ariel Levi, que compartilhou comigo inúmeras discussões e risadas sobre milhares de assuntos diversos, e sentirei falta disso para sempre.

E finalmente, à minha namorada, Bruna Falk, por me apoiar, suportar e amar, me forçar a continuar e brigar comigo quando necessário. Obrigado por tornar isso possível e por trazer mais cor e alegria para minha vida.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Professor Paulo Henrique Braz Silva, que não me deixou desistir, insistiu e ajudou imensamente na condução deste trabalho.

À Dra. Tânia Regina Tozetto Mendoza, minha coorientadora da parte técnica, que desde meu começo no laboratório de Virologia, orientou-me com afinco e ajudou na minha formação na pesquisa científica para o que me tornei hoje.

Aos meus colegas mais próximos do laboratório, Almir, Caio, Heuder, Giovana, Layla e Rodrigo pelas muitas risadas, ajuda e por tornarem minha vida mais interessante por serem pessoas extraordinárias.

A Professora Dra. Cássia Mendes Correa, chefe do laboratório de Virologia, LIM-52 e a equipe de funcionários técnicos, que direta ou indiretamente participaram da realização desse projeto.

Agradeço ao CNPq por parte do fomento do estudo: Projeto universal 423402-2018-1.

## Epígrafe

“Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que serve o Universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo ainda mais estranho e inexplicável. Existe uma segunda teoria que diz que isso já aconteceu.”

*(Douglas Adams; O restaurante no fim do universo. 2010)*

## RESUMO

Oliveira NPG. Caracterização de polimorfismos em regiões codificadoras de miRNA da ORF K12 no genoma do herpesvirus humano do tipo 8: comparação das variantes de HHV-8 entre grupos de indivíduos com e sem sarcoma de Kaposi associado a AIDS [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução.** O Herpesvirus Humano do tipo 8 (HHV-8) é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK). Embora os casos de SK-aids tenham reduzido drasticamente após a terapia antirretroviral (ARTc) e reconstituição imune, essa forma continua sendo a mais agressiva e resistente ao tratamento. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no genoma do HHV-8 têm sido recentemente relacionados com a produção alterada de microRNAs (miRNA), considerados marcadores do processo neoplásico. Esses miRNAs são codificados na região da ORF K12 e *loci* adjacentes. **Objetivo.** Caracterizar SNPs presentes no *locus* ORF K12 do genoma do HHV-8, que codificam dois miRNAs, comparando isolados de HHV-8 entre indivíduos vivendo com HIV com e sem SK-aids em relação aos dados clínicos-epidemiológicos, demográficos e laboratoriais a partir de uma casuística de conveniência de 740 indivíduos vivendo com HIV sem histórico de SK e 52 com SK-aids, ambos sob uso de ARTc. **Material e Métodos.** Um teste de PCR em tempo real da ORF 73 do HHV-8 foi otimizado para a detecção mais sensível da carga viral de HHV-8 e selecionar as amostras dos isolados de DNA. Testes de PCR em tempo real foram aplicados para avaliar e comparar a presença e carga viral de outros herpesvirus entre os grupos com e sem SK-aids. O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger foi aplicado para descrever e comparar o perfil de SNPs na ORF K12 do genoma do HHV-8. **Resultados.** Otimizamos o qPCR para HHV-8 com eficiência de 92,9% (Slope: -3,5; Y-intercept: 40,4; R<sup>2</sup> = 1), sensibilidade analítica de 50 cópias/ml, sendo a detecção mais sensível de HHV-8 confirmada na saliva. A frequência de DNA de HHV-8 na saliva foi de 14,1% no grupo não-SK e de 51,9% no grupo SK-aids. A excreção salivar de EBV predominou entre os herpesvirus em ambos os grupos e a carga viral do EBV foi maior no grupo -SK-aids. Em ambos os grupos predominou o gênero masculino, faixa etária em torno de 40 anos, com títulos de EBV salivares inversamente proporcional aos

níveis de CD4 circulantes e diretamente proporcional aos níveis de HIV plasmático, evento especialmente observado no grupo SK-aids. Ao todo, cinquenta sequências da ORF K12 foram obtidas partir do DNA salivar de 32 indivíduos não-SK e 18 com SK-aids. Descrevemos 30 sítios polimórficos totalizando uma taxa média de SNPs de 1,96 no grupo SK e de 5,3 no grupo não-SK ao longo da ORF K12. Polimorfismos foram predominantes no loci K12-10a, igualmente reconhecidos em outras sequências de HHV-8 de referência do genBank. Os genótipos A/C e B foram inferidos por meio da reconstrução filogenética da ORF K12, observando maior frequência do genótipo A/C no grupo não-SK, porém sem diferença estatística entre os grupos ( $p=0,3281$ ).

**Conclusão.** A coexcreção salivar de HHV-8 e EBV, associada a alta carga de EBV podem ser marcadores complementares úteis do status imune, assim como a contagem de CD4 e níveis plasmáticos de HIV. Polimorfismos na região que codifica o miRNA 12-10a e trechos adjacentes foram observados na região da ORF K12, não havendo diferença entre os grupos estudados. Mais estudos que caracterizem esses alvos que codifiquem miRNA do genoma do HHV-8 na saliva são necessários diante da potencial perspectiva da busca de biomarcadores do tumor na saliva.

Palavras-chave: Herpesvirus humano 8. Sarcoma de Kaposi. HIV. Saliva. ORF K12. MicroRNAs.



## ABSTRACT

Oliveira NPG. Characterization of polymorphisms in miRNA coding regions in the genome of Human Herpesvirus 8: comparison of HHV-8 variants between groups of individuals with and without AIDS-associated Kaposi's sarcoma [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** Human herpesvirus 8 (HHV-8) is the etiologic agent of Kaposi's sarcoma (KS). Although cases of KS-AIDS have dramatically decreased after the advents of antiretroviral therapy (cART) and immune reconstitution, this form remains more aggressive and resistant to treatment. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genome of HHV-8 were recently related to altered production of microRNAs (miRNA) and recognized as markers of the neoplastic process. These miRNAs are encoded in the ORF K12 region and adjacent loci.

**Objective:** To characterize SNPs present in the ORF K12 *locus* of the HHV-8 genome encoding two miRNAs by comparing HHV-8 isolates between individuals living with HIV with and without KS-AIDS in relation to clinical-epidemiological, demographic and laboratory data from a convenience sample of 740 individuals living with HIV without history of KS and 52 with KS-AIDS, both groups on cART.

**Materials and Methods:** A real-time PCR assay of HHV-8 ORF 73 was optimized for the most sensitive detection of HHV-8 viral load and selection of DNA isolates. Real-time PCR tests were used to assess and compare the presence and viral load of other herpesviruses between groups with and without KS-AIDS. DNA sequencing by the Sanger method was used to describe and compare the profile of SNPs in the ORF K12 *locus* of the HHV-8 genome.

**Results:** We optimized the qPCR for HHV-8 with an efficiency of 92.9% (slope: -3.5; Y-intercept: 40.4;  $R^2 = 1$ ) and analytical sensitivity of 50 copies/ml, with the most sensitive detection of HHV-8 being confirmed in the saliva. The frequencies of HHV-8 DNA in saliva were 14,1% in the non-KS group and 51,9% in the AIDS-KS group. Salivary excretion of EBV was higher for herpesviruses in both groups and EBV viral load was higher in the AIDS-KS group. In both groups, male individuals in the fourth decade of life predominated, with salivary EBV titers being inversely proportional to the circulating CD4 levels and directly proportional to plasma HIV levels, especially in the AIDS-KS group. Overall, 50 ORF K12

sequences were recurrent in the salivary DNA of 32 non-KS individuals and 18 with KS-AIDS. We described 30 polymorphic sites, totaling an average rate of SNPs of 1.96 in the KS-AIDS group and 5.3 in the non-KS group along the ORF K12 sequences. Polymorphisms were predominant in K12-10a loci, being also recognized in other GenBank reference sequences of HHV8. The A/C and B genotypes were inferred through the phylogenetic reconstruction of ORF K12, in which a higher frequency of A/C genotype was observed in the non-KS group, but with no statistical difference between the groups ( $p=0.3281$ ). **Conclusion.** Salivary co-excretion of HHV-8 and EBV, associated with high EBV load, may be useful complementary markers of immune status as well as CD4 count and plasma HIV levels. Polymorphisms in the region encoding miRNA 12-10a and adjacent stretches were observed in the ORF K12 region, with no difference between the studied groups. More studies characterizing targets encoding the miRNA of the HHV-8 genome in the saliva are needed in view of the potential perspective of a search for tumor biomarkers in saliva.

**Keywords:** Herpesvirus human 8. Saliva. Kaposi's Sarcoma. HIV. ORF K12. microRNAs.

## Sumário

1.1 Herpesvirus Humano do tipo 8 (HHV-8) é o agente etiológico do Sarcoma de Kaposi (KS) .....	16
1.2 Transmissão e distribuição do HHV-8 .....	19
1.3 Prevalência de HHV-8 baseada na detecção de DNA .....	21
1.4 Epidemiologia Molecular .....	22
1.5 Classificação dos herpesvirus e enfoque ao genoma do HHV-8.....	26
1.6 Estrutura e genoma do HHV-8.....	27
1.7 Biogênese das moléculas de miRNA celulares e virais, ênfase HHV-8 .....	30
1.8 Enfoque a ORF K12: <i>locus</i> codificante da Kaposina e codificadora de miRNAs .....	33
1.9 Função dos miRNAs do HHV-8 e seus alvos celulares .....	35
1.10 Transativação viral e coinfeção entre HHV-8 e outros herpesvirus .....	38
1.10.1 EBV.....	38
1.10.2 CMV.....	39
1.10.3 HHV-6.....	40
1.11 Justificativa.....	40
1.12 Hipótese .....	42
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Secundários.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Parecer ético .....	44
3.2 Desenho do estudo.....	44
3.3 Descrição da população do estudo e casuística .....	45
3.4 Análise molecular .....	47
3.4.1 Amostras e processamento .....	47
3.4.2 Extração de DNA.....	47
3.4.3 PCR Pan herpes – PCR <i>real time</i> quantitativo (qPCR).....	48
3.4.4 Padronização da Curva de quantificação do HHV-8 .....	51
.....	52
3.5 Análise da região ORF K12 .....	53
3.5.4 Análise do Sequenciamento de DNA – HHV-8.....	55
4 RESULTADOS.....	57
4.2 Otimização dos ensaios moleculares .....	60
4.2.1 qPCR HHV-8 e Curva sintética para detecção molecular de DNA HHV-8 ...	60

4.2.2 Desempenho da saliva para detecção molecular do HHV-8.....	62
4.2.3 Detecção molecular de HHV-8 salivar de indivíduos vivendo com HIV/aids	63
<b>4.3 Perfil de coinfeção com os demais herpesvirus .....</b>	<b>64</b>
4.3.1 Avaliação dos status imune (nível de CD4 e carga viral do HIV) em relação as cargas virais de EBV e HHV-8 na saliva .....	66
<b>4.4 Testes da ORF K12.....</b>	<b>68</b>
<b>4.5 Otimização do sequenciamento da ORF K12.....</b>	<b>69</b>
4.5.1 Análises de sequências obtidas para os rc-miRNAs do genoma do HHV-8 70	
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Soroprevalência do HHV-8 pelo mundo .....	23
<b>Figura 2</b> - Distribuição dos Genótipos do HHV-8 pelo mundo. ....	25
<b>Figura 3</b> - Árvore filogenética dos herpesvirus.....	27
<b>Figura 4</b> - Estrutura da partícula viral abrigando o genoma de DNA do HHV-8: envoltório lipoprotéico, capsídeo icosaédrico. Fonte na imagem .....	28
<b>Figura 5</b> - Mapa do genoma do HHV-8 .....	29
<b>Figura 6</b> - Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs.....	33
<b>Figura 7</b> - Fluxograma simplificado das análises e casuísticas disponíveis e esperadas.....	46
<b>Figura 8:</b> Representação geral do processo de diluição em série .....	52
<b>Figura 9</b> – Etapas e temperaturas da amplificação de DNA no termociclador	52
<b>Figura 10</b> – Ilustração das coordenadas da região codificadora dos miRNA-12- 12 e 12-10 do genoma do HHV-8 e o esquema de pares de primers usados no Nested -PCR .....	53
<b>Figura 11</b> - Fluxograma de resultados obtidos a partir da positividade dos testes empregados:.....	57
<b>Figura 12</b> - Desempenho do qPCR, Reta de regressão .....	60
<b>Figura 13</b> - Curva de quantificação baseado na qPCR HHV-8/ORF73. ....	61
<b>Figura 14</b> - Distribuição da carga viral do HHV-8 em diferentes fluidos biológicos de indivíduos com sarcoma de Kaposi associado à aids. ....	63
<b>Figura 15</b> - Distribuição da carga viral do HHV-8 entre os grupos não-SK e SK- aids.....	64
<b>Figura 16</b> - Distribuição da carga viral dos herpesvirus expressa em log de cópias/ml no grupo não-SK .....	65
<b>Figura 17</b> - Distribuição da carga viral dos herpesvirus expressa em log de cópias/ml no grupo SK-aids.....	66
<b>Figura 18</b> – Correlação entre os níveis de HHV-8, HIV e EBV no grupo não-SK .....	67
<b>Figura 19</b> - Correlação entre os níveis de HHV-8, HIV e EBV no grupo SK-aids .....	67
<b>Figura 20</b> – Eletroforese das amostras em gel 1,5% de agarose com padrão de referência da massa molecular. ....	68

<b>Figura 21</b> – Eletroforese em gel 1,5% de agarose, mostrando a migração dos diferentes fragmentos do genoma do HHV-8 amplificados por 3 pares de primers .....	69
<b>Figura 22</b> - Ilustração de um trecho do <i>locus</i> K12-10a evidenciando SNPs encontrados.....	70

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Descrição dos principais miRNAs do HHV-8, seus alvos e o seu papel preditivo.....	37
<b>Tabela 2</b> – Sequências de primers e sondas.....	49
<b>Tabela 3</b> – Condições do qPCR em tempo real monoplex e triplex.....	51
<b>Tabela 4</b> – Primers para amplificação da ORF K12.....	54
<b>Tabela 5</b> - Características da população do estudo.....	59
<b>Tabela 6</b> - Pontos de diluição da curva sintética.....	61
<b>Tabela 7</b> - Caracterização dos grupos de estudo (com e não-SK-aids) com detecção positiva de SNPs de alta qualidade em sequências de HHV-8 obtidas por Sanger.....	72
<b>Tabela 8</b> - Dados referentes a distribuição de SNPs nos loci K12-12 e K12-10a.....	71

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Herpesvirus Humano do tipo 8 (HHV-8) é o agente etiológico do Sarcoma de Kaposi (KS)

Há 30 anos que o *Human herpesvirus do tipo 8 (HHV-8)* ou *Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)* foi descrito pela primeira vez, por Chang et al., 1994, em lesões do tumor Sarcoma de Kaposi (SK) em indivíduos infectados por HIV. O sarcoma de Kaposi passou a ser o estigma dos portadores da síndrome da imunodeficiência humana (aids), que surgia na década de 80-90 durante a epidemia do HIV/aids. A epidemia de aids teve um papel significativo no aumento de casos de SK. No início da década de 80, o SK era considerado uma doença rara, afetando 1 pessoa a cada 100.000 a cada 10 anos no Reino Unido e 2 pessoas a cada 100.000 nos Estados Unidos. O aumento de casos após o início da epidemia de aids foi tão acentuado que o diagnóstico de SK foi um dos primeiros indicadores da epidemia de aids nos primeiros anos das décadas de 1980-90. Os casos de SK nos Estados Unidos, nesta ocasião, se tornaram quase 20.000 vezes mais comuns na população infectada com HIV com padrões semelhantes de risco do SK, surgindo na mesma época na Austrália e Europa (CESARMAN et al., 2019; ELFORD; MCDONALD; KALDOR, 1993; HERMANS et al., 1996)

O aumento da sobrevivência de indivíduos infectados por HIV e a redução da incidência de SK-aids têm sido notáveis após a evolução das terapias antirretrovirais. Desde a adoção da HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) até a corrente terapia antirretroviral combinada (ARTc). Porém, apesar da redução da incidência de SK, a exposição ao HHV-8 não foi reduzida, e cada vez mais tem se relatado a persistência do tumor SK em alguns casos em relação aos tempos de infecção por HIV, mesmo sob uso das terapias vigentes (VANGIPURAM; TYRING; 2019).

Enquanto a infecção por HHV-8 foi descrita há três décadas, a manifestação da neoplasia foi descrita pela primeira vez há 150 anos, como um tumor cutâneo nas extremidades inferiores de indivíduos idosos, a forma clássica do sarcoma de Kaposi. A doença recebeu a denominação de sarcoma de Kaposi



somente em 1912 em homenagem ao dermatologista húngaro Moritz Kaposi. O tumor SK é classificado em quatro formas distintas: (1) forma clássica – geralmente encontrada em indivíduos entre 64 e 72 anos na parte ocidental da Europa, nas áreas do mediterrâneo e na América do Sul, normalmente levando a um quadro crônico da doença; (2) forma endêmica – normalmente limitada à África subsaariana, sendo bem mais agressiva e letal com alto índice de envolvimento mucocutâneo e/ou visceral; (3) forma iatrogênica – largamente associada à imunossupressão; (4) forma epidêmica (SK associado à aids) – com lesões na pele e lesões viscerais, requerendo, muitas vezes, terapias antirretrovirais e quimioterapia sistêmica. Há ainda um estudo realizado em Paris (DENIS et al., 2018) sobre a infecção do HHV-8 em populações de homens que fazem sexo com homens (HSH) sem HIV em uma área com baixa prevalência de HHV-8, tendo como características os sintomas clínicos do SK clássico, mas em indivíduos significativamente mais jovens, menos linfoedemas e desordens linfoproliferativas, e com mais lesões genitais que os outros grupos (LANTERNIER et al., 2008; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010; RASHIDGHAMAT et al., 2014; VANGIPURAM; TYRING, 2019).

O SK cutâneo é a forma diagnóstica clínica mais comum da doença, sendo caracterizada pela presença de maculopápulas (lesões) rosadas/roxeadas, arredondadas e bem definidas, que não somem nem sangram sob pressão e apalpação (IFTODE et al., 2020). As mucosas também são comumente afetadas pelo SK, afetando a orofaringe (palato duro, palato mole, língua dorsal, gengivas e amígdalas), a mucosa genital e a membrana conjuntiva. As lesões mucosas podem estar presentes nos quatro tipos de SK, sendo que 22% dos casos analisados de pacientes com HIV e SK apresentam as primeiras lesões na mucosa oral (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2013; IFTODE et al., 2020).

O HHV-8 também é conhecido por estar associado ao Linfoma de Efusão Primária (PEL), a Doença Multicêntrica de Castleman e a Síndrome Inflamatória do Sarcoma de Kaposi (KICS), doenças cuja patogenia está intimamente relacionada às fases lítica e latente do vírus (KARASS et al., 2017; MANCUSO

et al., 2008; VANGIPURAM; TYRING, 2019) e por causar uma infecção permanente do hospedeiro, estando ativo ou não.

O HHV-8 é hoje conhecido como o agente etiológico de todas as formas clínico-epidemiológicas do SK. O SK-aids é uma forma clínico-epidemiológica mais frequente e grave; sua evolução varia desde um envolvimento cutâneo restrito e insidioso até um quadro de lesões cutâneas localmente agressivas ou disseminadas, incluindo um acometimento visceral de rápida progressão (CHOKUNONGA et al., 2013; HYMES et al., 1981; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010).

Em pessoas vivendo com HIV (PVHIV), o advento da terapia antirretroviral combinada não só reduziu drasticamente o risco de SK, mas também mudou o manejo para o controle do tumor. De fato, o ARTc é essencial no manejo do SK quando a imunossupressão é reversível e é a primeira opção de tratamento do SK em PVHIV. Na maioria das vezes, a restauração imune ocorre após vários meses e leva, por si só, à regressão das lesões do SK para formas localizadas não graves. Na forma mais grave, são necessários tratamentos sistêmicos que podem contar com agentes quimioterápicos como doxorrubicina lipossomal ou taxanos ou terapia imunomoduladora (interferon alfa ou PEG-interferon) ou agentes antiangiogênicos (GRABAR; COSTAGLIOLA, 2021).

Em números absolutos, houve 34.270 novos casos de SK e o número de mortes foi de 15.086 (44%), segundo Ferlay et al., 2020.

## 1.2 Transmissão e distribuição do HHV-8

A despeito de que a via sexual de HHV-8 tenha sido descrita inicialmente no contexto SK-aids, outras vias de transmissão de HHV-8 diferentes são importantes e comumente reportadas em populacionais particulares.

Em regiões endêmicas, como na África e entre ameríndios, os estudos soroepidemiológicos mostraram que a infecção por HHV-8 ocorre também na infância e aumenta com a idade, consistente com a indicação de transmissão viral horizontal não sexual. Nessas populações, o HHV-8 favoravelmente é transmitido na infância via saliva, fluido em que se observa as maiores cargas virais (MARIGGIÒ; KOCH; SCHULZ, 2017; UEDA, 2018). DUUS et al., 2004 demonstraram que células epiteliais do trato oral são suscetíveis à infecção por HHV-8 e que o epitélio oral parece ser um reservatório do HHV-8, assim como para os herpesvirus humanos orais.

MILLER et al., 2006 encontraram 24% de positividade na saliva em voluntários adultos HIV-negativo e KS-negativo do campus universitário de Kentucky (EUA), região em que a prevalência de anticorpos anti-HHV-8 na população geral é baixa.

O vírus tem sido encontrado em outros tecidos e fluidos, tais como o leite materno, sêmen e sangue (CESARMAN et al., 2019; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017).

Há também algumas evidências de que o HHV-8 seja transmitido por transfusões sanguíneas, uso de drogas injetáveis (tal estatística não se separa da estatística de contaminação através de contato sexual, pois não há evidências o suficiente para separá-las) e por transplante de órgãos caso haja células tumorais de KS no transplante. No entanto, de acordo com Francès et al., 2009 e Parravicini et al., 1997, esse evento não seja exatamente decisivo, pois muitos dos casos estudados que desenvolveram o KS pós-transplante já tinham histórico de infecção por HHV-8 (MARIGGIÒ; KOCH; SCHULZ, 2017). Em pacientes de transplante e associado a aids em áreas hiperendêmicas para HHV-8, o tumor KS também tende a apresentar uma difusão maior em lesões

no rosto, tronco, linfonodos, mucosa oral e órgãos viscerais, além de ter sido observado em diversos órgãos do corpo, como pulmões e sistema gastrointestinal (LEÃO et al., 1999; VANGIPURAM; TYRING, 2019). Na Europa e nos Estados Unidos, a prevalência do HHV-8 é baixa na população em geral (<4%) e alta em homens que fazem sexo com homens (HSH). A meta-análise de Rohner et al., 2016 mostrou que a infecção pelo HIV está associada a soroprevalência aumentada do HHV-8, sendo uma proporção de 30- 47% entre os indivíduos infectados por HIV (BEYARI et al., 2003; GRABAR; COSTAGLIOLA, 2021; MAMIMANDJAMI et al., 2021; VAN DER MEULEN et al., 2021).

No Brasil, a soroprevalência pode variar bastante dependendo do estudo e local, visto que os dados são ainda insuficientes para conhecer a completa prevalência de HHV-8 na população brasileira. Estudos em São Paulo encontraram prevalências entre 3,8 e 4,6%, assim como uma prevalência de 26%. A soroprevalência de HHV-8 é de 20,4 -30 % entre indivíduos brasileiros infectados por HIV (CHABAY et al., 2020; FERREIRA et al., 2003; MACHADO et al., 2016; MAGRI et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2008; PÉREZ et al., 2004; ZAGO et al., 2000). No estudo de Nascimento et al., 2009 a prevalência de HHV-8 na população de indígenas residentes da região Mapuera, no Pará foi de 81,1%, consideravelmente maior que a soroprevalência dos residentes não indígenas, que foi de 27,07%. Tais resultados concordam com os resultados obtidos por BIGGAR et al., 2000, que obteve uma positividade de 79% entre adultos e crianças, entre 6 e 68 anos, de outras 6 vilas indígenas da região. Ainda no estudo de BIGGAR et al., 2000, foi feita uma análise da amostragem serológica histórica de 16 vilas indígenas, representando falantes das línguas Tupi-, Ge- e Carib-, numa amostragem de 746 indivíduos. Em tal análise, em crianças menores de 10 anos, a soroprevalência para HHV-8 foi de 41%, e aumenta lentamente para 65% em indivíduos com idade maior que 30 anos, com um aumento similar entre os sexos.

### 1.3 Prevalência de HHV-8 baseada na detecção de DNA

A partir da descoberta de Chang et al., 1994, o estudo da prevalência do HHV-8 baseada na detecção do DNA do HHV-8 começou a ser praticada por PCR em biópsia de tecido (BOSHOF et al., 1995; CHANG et al., 1996; DUPIN et al., 1995), em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (ISHAK et al., 2007; MOORE et al., 1996) e na saliva (BLACKBOURN et al., 1998; DE FRANÇA et al., 2011; DE SOUZA et al., 2007; DEL MISTRO et al., 2012). Os estudos tem apontado que vírions e DNA de HHV-8 estão presentes em altos níveis na saliva de pacientes infectados por HIV (KOURÍ et al., 2010; LEBBÉ; LEGENDRE; FRANCÈS, 2008; MANCUSO et al., 2011; SOUZA et al., 2010) e que a saliva desses indivíduos, com ou sem lesões de SK, é uma fonte de infecção para HHV-8 (BLACKBOURN et al., 1998; KOELLE et al., 1997; LEBBÉ; LEGENDRE; FRANCÈS, 2008; VANGIPURAM; TYRING, 2019; ZONG et al., 2007). DNA do HHV8 foi mais frequentemente encontrado em mais altas concentrações no fluído oral do que em células mononucleares do sangue periférico e no plasma, e ainda menos frequentemente no sémen, secreções prostáticas, uretrais e em swab anal de HSH com ou sem HIV.

Uma maior taxa de detecção de DNA de HHV-8 na saliva tem sido associada à contagem de células T CD4+ (> 350 células/mm<sup>3</sup> e estável) em indivíduos infectados por HIV (GANDHI et al., 2004), igualmente para a taxa de DNA de HHV-8 no plasma (TEDESCHI et al., 2001), de modo a representar uma maior chance de transmissão do HHV-8 nessa condição.

Em populações de alta endemicidade de HHV-8 na África e entre ameríndios, há evidências consistentes de transmissão do HHV-8 da mãe para filho através de saliva (BORGES et al., 2012; DEDICOAT et al., 2004; PLANCOULAIN et al., 2000).

Além das indicações epidemiológicas, a associação da saliva na transmissão do HHV-8 está também fundamentada em estudos que demonstraram a replicação do HHV-8 nas células do epitélio oral. O primeiro estudo de infectividade da saliva foi demonstrada por Vieira et al., 1997, que demonstraram a viabilidade

do HHV-8 em amostras de saliva inoculadas em cultura de células após treze passagens.

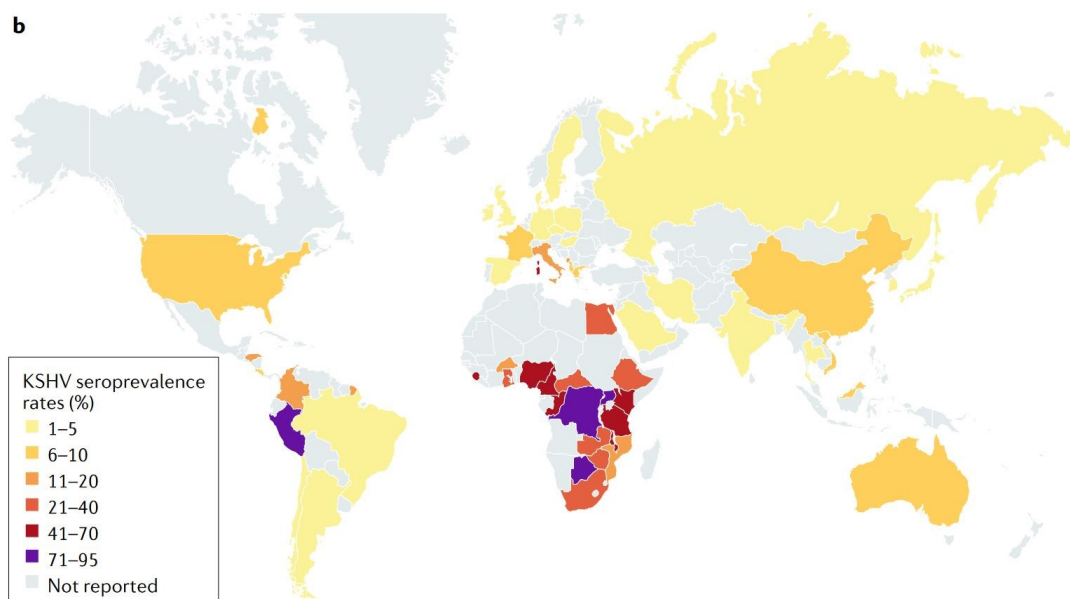
Posteriormente, Duus et al., 2004 demonstraram que células epiteliais do trato oral são suscetíveis à infecção por HHV-8 e que o epitélio oral pode ser, de fato, um reservatório do HHV-8, assim como ocorre com os outros herpesvirus orais.

Vários trabalhos demonstraram a presença do DNA do HHV-8 na cavidade oral pela técnica de PCR em pacientes infectados por HIV ou não, em taxas de positividade que variaram entre indivíduos com SK-aids (15 a 71%) e não-SK (15 a 61%) (BLACKBOURN et al., 1998; CANNON; PHILPOTT; CESARMAN, 2003; CASPER et al., 2004; DI ALBERTI et al., 1997; KOELLE et al., 1997; LAMPINEN et al., 2000; PAUK et al., 2000; TRIANTOS et al., 2004)

LADUCA et al., 1998 quantificaram DNA de HHV-8 em diferentes amostras clínicas de indivíduos com SK e observaram alto número de cópias de DNA na saliva (33.000 cópias/ $\mu$ g) de 37% dos casos, comparado ao encontrado em células mononucleares do sangue periférico (9.000 cópias/ $\mu$ g) de 46% dos casos, no plasma (40 cópias/ $\mu$ g) de 7%, no sêmen (300 cópias/ $\mu$ g) de 12%. Nas lesões de SK encontrou-se DNA do HHV-8 em 92% dos casos (64.000 cópias/ $\mu$ g). Casper et al., 2007 apontaram alta taxa de excreção intermitente de HHV-8 na saliva (61%) em HSH não infectados pelo HIV e sem SK.

#### **1.4 Epidemiologia Molecular**

O HHV-8 não apresenta uma distribuição ubíqua como os outros herpesvirus (Figura 1). A sua distribuição é maior em países do mediterrâneo (Itália, França, Grécia), nos países da África abaixo do deserto do Saara, nos Estados Unidos, América do sul (em especial a população de ameríndios e Peru), China e Austrália, e mesmo nos países mostrados, a porcentagem de soroprevalência é relativamente baixa, se mantendo em torno de 20% quando se desconsidera o Peru e os países subsaarianos africanos (CESARMAN, et al., 2019).



**Figura 1** - Soroprevalência do HHV-8 pelo mundo (Fonte: CESARMAN et al., 2019)

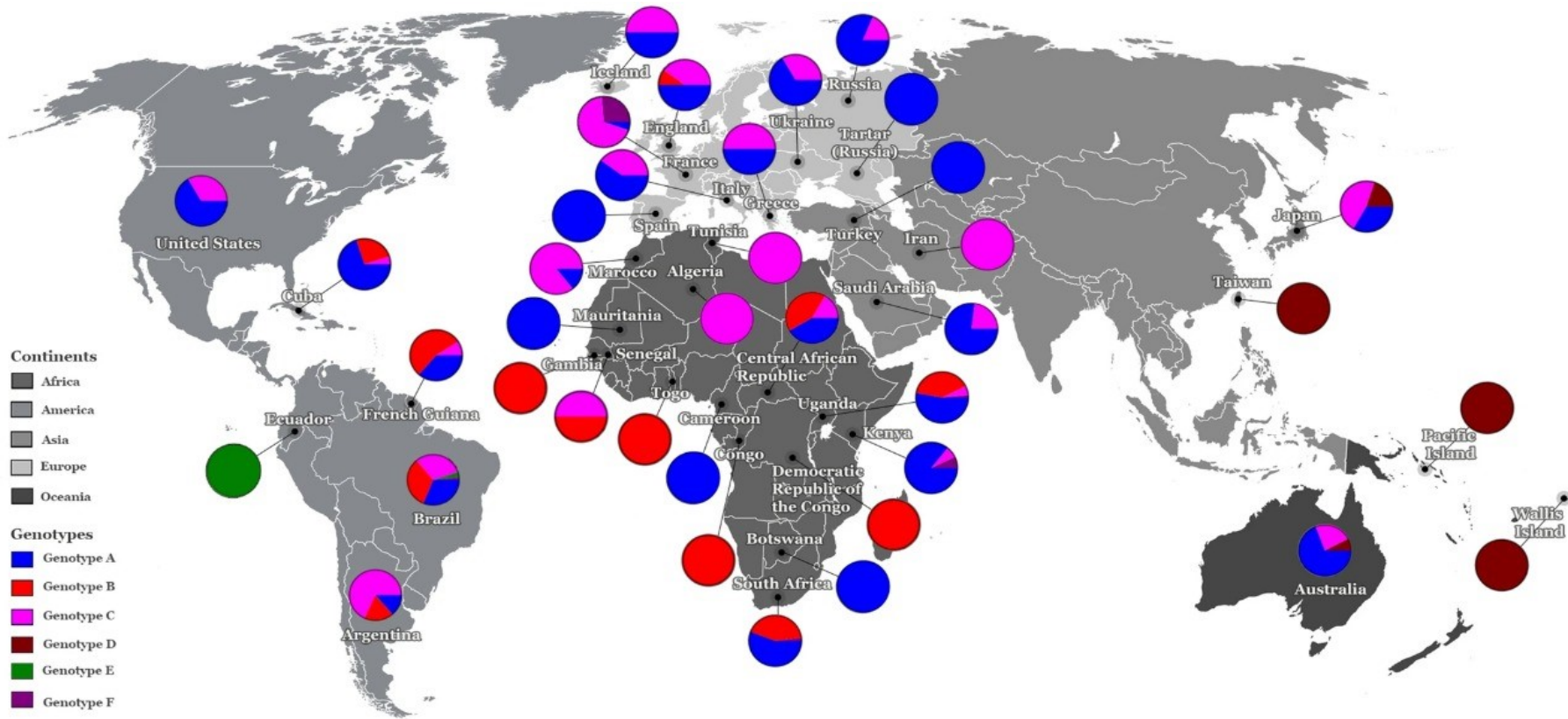
Os estudos de epidemiologia molecular são baseados principalmente na análise da variabilidade (VR) de seu genoma que são usadas para classificar os genótipos de HHV-8. O mais usado é o segmento da ORF K1 (*Open Reading Frames*, Fases de leitura aberta) do genoma do HHV-8. A partir dele é possível identificar 7 genótipos, de A a G, e diversos subgenótipos, que foram descritos para os genótipos A a E, enquanto que os genótipos F e G são menos frequentes e, conseqüentemente, menos descritos (BORALEVI et al., 1998; CATERINO-DE-ARAUJO, 1998; ISHAK et al., 2007; KOURI et al., 2005; LEO et al., 2013; MANCUSO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2005; HAYWARD; ZONG, 2007 apud PÉREZ; TOUS, 2017; RAMOS DA SILVA et al., 2011; RAMOS-DA-SILVA et al., 2006; TOZETTO-MENDOZA et al., 2016; PÉREZ; TOUS, 2017).

Ainda não existe um consenso sobre a classificação dos genótipos do HHV-8 e os estudos de epidemiologia molecular se dirigem a investigar a sua distribuição pelos continentes por meio da análise da variabilidade da ORF K1 de seu genoma (HULANIUK et al., 2021; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010; SCHULZ, 2000). Há ainda o interesse de avaliar se há possíveis associações de seus genótipos com o desenvolvimento do SK. MANCUSO et al., 2008 demonstraram uma relação entre o genótipo A e a progressão rápida

do SK. Ainda, TOZETTO-MENDOZA, et al 2013 mostraram que a evolução de SK em relação à piora clínica foi significativamente menor na presença do genótipo B. No entanto, a variabilidade genética de HHV-8 e a sua possível relação com o prognóstico ou evolução de SK não foi ainda esclarecida.

Lopes et al., 2021 representaram a distribuição de genótipos de HHV-8 pelos continentes (Figura 2).





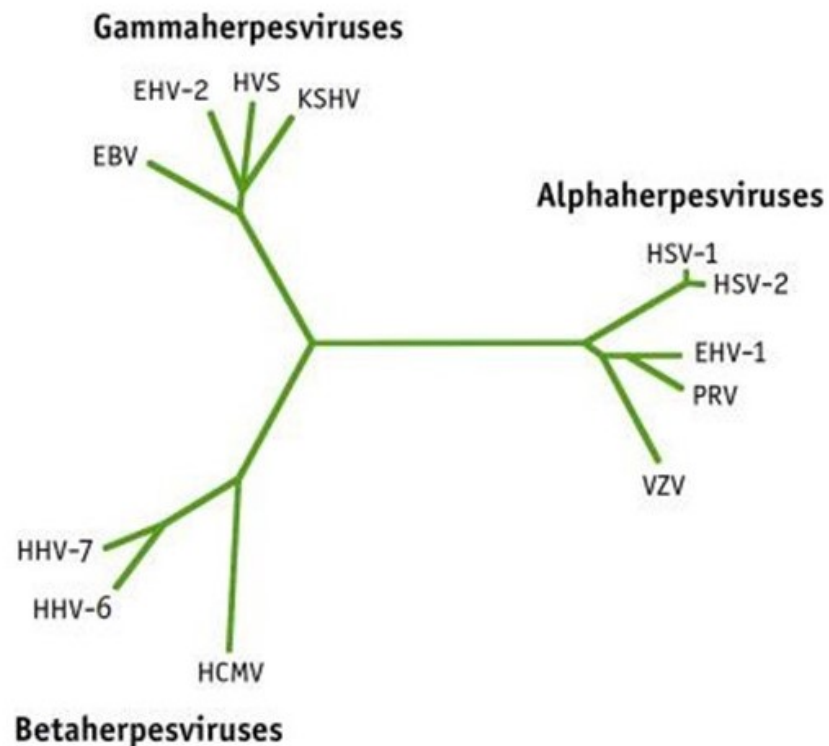
**Figura 2** - Distribuição dos Genótipos do HHV-8 pelo mundo. Fonte: Lopes et al., 2021

### 1.5 Classificação dos herpesvirus e enfoque ao genoma do HHV-8

HHV-8 pertence ao gênero *Rhadinovirus*, da subfamília *Gammaherpesvirinae* ( $\gamma$ -*herpesvirinae*), que também inclui o Epstein Barr vírus ou HHV-4. Outras duas subfamílias dos herpesvirus são: subfamília *Alphaherpesvirinae* ( $\alpha$ -*herpesvirinae*), que inclui o herpesvirus 1 (HVS-1) e 2 (HVS-2), e ainda o vírus varicela/zoster (HHV-3), e a subfamília *Betaherpesvirinae* ( $\beta$ -*herpesvirinae*), que inclui os HHV-5 ou Citomegalovírus, HHV-6 e HHV-7 (MOORE et al., 1996).

A subfamília *Gamaherpesvirinae* contém dois gêneros que incluem os gamma-1 ou *Lymprhocryptovirus* (LCV) e o gamma-2 ou *Rhadnovirus* (RDV). O EBV é o único LCV e o HHV-8 é o único RDV até o momento descobertos que são capazes de infectar o homem.

O DNA do HHV-8 apresenta similaridade maior com membros da subfamília *Gammaherpesvirinae* que não causam doença em humanos, diferente do EBV, agente da mononucleose infecciosa e associado ao linfoma de Burkitt e a outras formas de câncer em humanos (EDELMAN, 2005). O HHV-8 tem proximidade evolutiva ao *Herpesvirus saimiri* (HSV), também do gênero *Rhadnovirus* o qual pode causar linfoma fulminante de células T em seus hospedeiros primatas e pode imortalizar linfócitos T infectados (MOORE; CHANG, 2001). A Figura 3 mostra a relação filogenética dos herpesvirus.

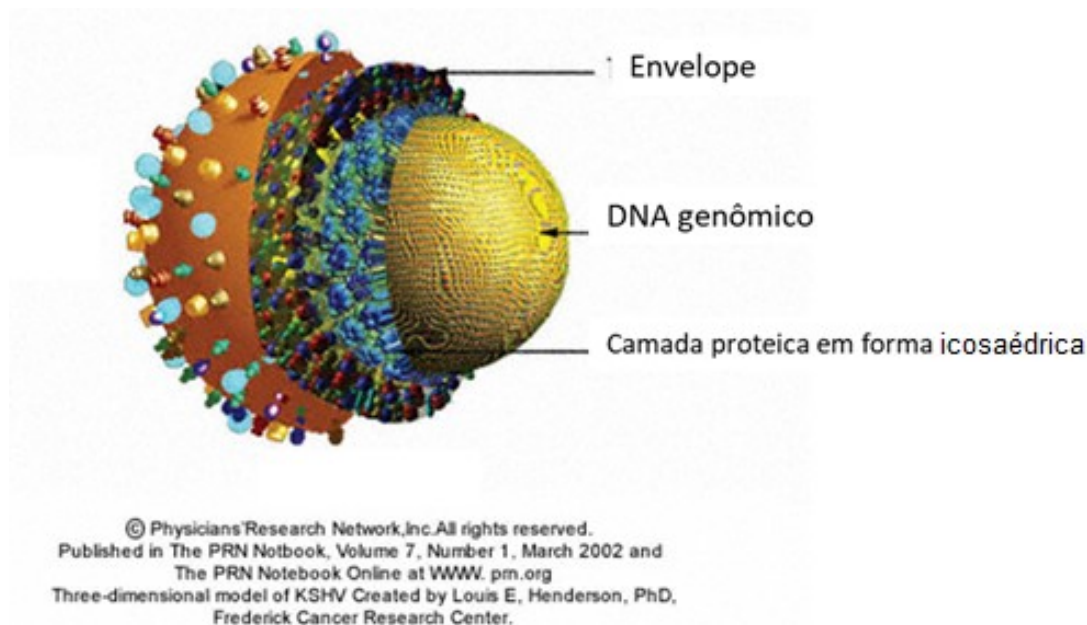


**Figura 3** - Árvore filogenética dos herpesvírus. Herpesvírus 8 humano (HHV-8) ou herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), é um membro da subfamília Gamaherpesvirinae, gênero Rhadinovírus. EBV, vírus Epstein Barr; EHV-2, herpesvírus equino tipo 2; HVS, herpesvírus saimiri; HSV-1, herpesvírus simples tipo 1; HSV-2, herpesvírus simples tipo 2; EHV-1, herpesvírus equino tipo 1; PRV, vírus pseudo-rábico; VZV, vírus da varicela-zoster; HCMV, citomegalovírus humano; HHV-6, herpesvírus 6 humano e HHV-7, herpesvírus 7 humano. Modificado de Moore et al., 1996b; Ganem et al., 2010). Fonte: Fenner and White's Medical Virology (fifth Edition), 2017

## 1.6 Estrutura e genoma do HHV-8

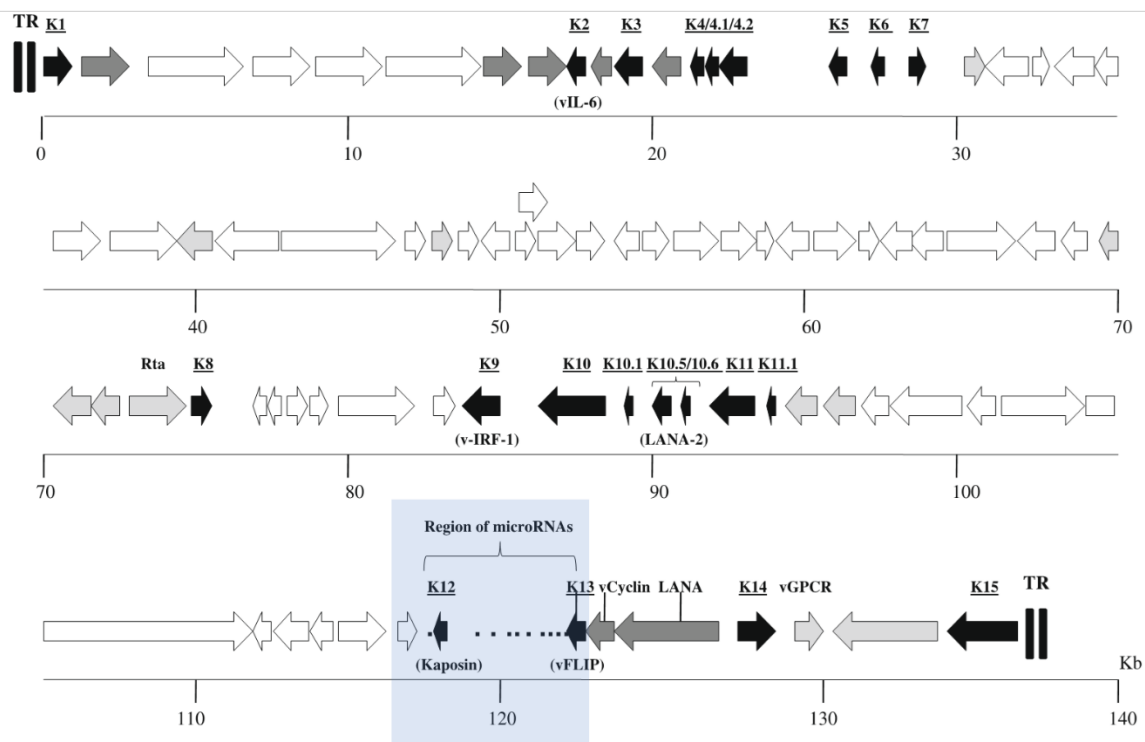
A sua estrutura viral do HHV-8 (Figura 4) apresenta um envelope composto de uma bicamada lipídica dividida internamente, e contém diversas glicoproteínas conservadas comum dos herpesvírus, assim como outras únicas, como a gpK18.1A e B, as ORFs 4, 27, 28 e 68, associadas com o ciclo lítico (DAI et al., 2018; HONG; LEE, 2001; REZAEI et al., 2006; VAN DER MEULEN et al., 2021; YAN et al., 2019). Dentre as ORFs presentes no genoma do HHV-8, destacam-se, neste trabalho, a ORF K1, que codifica a proteína K1, participante

de diversas estruturas da partícula viral, e a ORF K12, cuja principal proteína codificada é a kaposina, responsável também pela alteração de forma de células infectadas (CORDIALI-FEI et al., 2015; LEÃO et al., 1999; PÉREZ; TOUS, 2017).



**Figura 4** - Estrutura da partícula viral abrigando o genoma de DNA do HHV-8: envoltório lipoprotéico, capsídeo icosaédrico. Fonte na imagem

O genoma do HHV-8 tem tamanho aproximado de 165 a 170 kb, é composto por DNA em fita dupla, apresentando mais de 80 ORFs. A região das ORFs ocupa 138-140,5 kb em comprimento no genoma, e as extremidades da sequência apresentam regiões denominadas TR (*Terminal Repeats*) que são unidades repetitivas que variam de 16-75 Kb, gerando variações no tamanho do genoma (WEN E DAMANIA, 2010). A Figura 5, a seguir, apresenta a estrutura da sequência completa do genoma do HHV-8 e destaca os genes exclusivos do HHV-8 (K1-K15).



**Figura 5** - Mapa do genoma do HHV-8, destacando o *locus* que contém a região codificadora de miRNA abrangendo a ORF K12 e região adjacente ao gene FLIP (cor azul). Esquemas da disposição da leitura das ORFs ao longo do genoma viral indicadas por setas e o *locus* codificante de miRNA em pontilhado. As ORFs exclusivas ao genoma do HHV-8 (K1-K15) foram representadas por setas pretas. As ORFs comuns a outros Rhabdovirus e comuns a outros gamma-herpesvirus (exemplo, EBV) foram representadas por setas de cor cinza escura e cinza clara, respectivamente. As regiões ocupadas por setas de cor branca representam a disposição das ORFs comuns a maioria dos herpesvirus. Os números marcados linearmente ao longo do genoma indicam a posição aproximada no genoma em kilobases (Kb); TR - unidades repetitivas terminais flanqueando o genoma (Wen e Damania, 2010).

O genoma do HHV-8 foi sequenciado e analisado na sua forma episomal extracromossômica, sendo dividido em blocos de genes estruturais altamente conservados e semelhantes aos genes estruturais encontrados em outros herpesvirus. A porção central do genoma é flanqueada por genes que têm pouca ou nenhuma similaridade com outros herpesvirus. O genoma apresenta uma região de cadeia longa codificante (LUR- long unique region) altamente conservada, contendo baixas concentrações de G+C (53,5 %). Nessa região, denominada “L ADN”, encontram-se as ORFs. Em ambas as extremidades da “L ADN” estão localizadas as regiões terminais (TR), contendo sítios reguladores com altas concentrações de G+C (84 %) e denominadas “H ADN” (RUSSO et

al., 1996; WEN E DAMANIA, 2010). As ORFs homólogas ao HVS (Herpesvirus saimiri) são enumeradas de 1 a 75 e as outras quinze ORFs identificadas no genoma do HHV-8, que são únicas desse herpesvirus, são designadas com o prefixo K (K1 a K15) e outras designadas com valores decimais ligados ao prefixo K (K4.1, K4.2, K8.1 e K10) (RUSSO et al., 1996; JENNER E BOSHOF, 2002). Algumas ORFs são homólogas aos genes celulares humanos (MOORE E CHANG, 2001; REZAEI et al., 2006).

### **1.7 Biogênese das moléculas de miRNA celulares e virais, ênfase HHV-8**

Uma região codificadora de microRNA (miRNA) é uma porção de DNA que codifica como produto final uma fita simples de RNA que pode medir até 22-24 nucleotídeos, é o que chamamos de miRNA. Em geral, os miRNAs têm sua ação centrada na regulação de expressão de RNA mensageiro (RNAm), fase pós-transcricional. Esses miRNAs reconhecem e interagem com o RNAm correspondente por complementariedade entre seus pares de bases (DAI et al., 2018; UEDA, 2018). A expressão alterada desses miRNAs tem sido proposta como um modulador do processo patogênico, visto que geram miRNA com sequências de nucleotídeos alteradas, que perdem a capacidade de se ligar de forma complementar aos seus respectivos transcritos ou RNAm, conseqüentemente, alterando a expressão gênica da célula hospedeira (CAI; PAN; LU, 2010; CAI et al., 2005; YANG et al., 2015). Alguns autores começaram a demonstrar que a presença de certos SNPs em sítios codificadores de miRNA possam representar um fator de virulência do HHV-8 e aumentar o risco de desenvolvimento do SK (MARSHALL et al 2011, MARSHALL et al, 2018).

Os miRNAs celulares estão envolvidos na regulação de quase todas as vias celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional. A sua desregulação tem sido associada a diversas doenças, como o câncer. De fato, dada a importância dos miRNAs para a homeostase celular, é evolutivamente esperado que os vírus aproveitem esta via. Os vírus são capazes de codificar e expressar miRNAs virais funcionais que têm como alvo os transcritos virais e celulares. Além disso, a inibição viral de

proteínas-chave e as alterações importantes no *pool* de microRNAs celulares têm sido relatadas por consequência da infecção viral. Além disso, os vírus desenvolveram vários mecanismos para evitar serem alvo de miRNAs celulares. Essa complexa interação entre hospedeiro e vírus para controlar a via do miRNA geralmente favorece a infecção e a persistência viral, seja reduzindo a detecção imunológica, evitando a apoptose, promovendo o crescimento celular ou promovendo infecção lítica ou latente. Um dos melhores exemplos dessa interação vírus-hospedeiro-microRNA está nos membros da família *Herpesviridae*, ou seja, o vírus herpes simplex tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2), citomegalovírus humano (HCMV), herpesvirus humano 8 (HHV-8) e o vírus Epstein-Barr (EBV) (PIEDADE E AZEVEDO-PEREIRA, 2016).

VIRmiRNA é a primeira fonte de pesquisa experimental de miRNA viral e seus alvos, e é um site, referenciado como Qureshi et al., 2014. Em sua página há três subbancos de dados. São eles:

(1) miRNAs virais experimentais, que contém 1.308 descrições de miRNAs codificados por 44 vírus;

(2) alvos de miRNA viral experimental, contendo 7.283 descrições de alvos de miRNA para 15 vírus;

(3) miRNAs antivirais experimentais, contendo 542 miRNAs antivirais direcionados a diferentes processos para 24 vírus.

Há 30 referências de sequências de miRNAs codificadas no genoma do HHV-8, disponíveis em Qureshi et al., 2014, indicando as publicações e com uma extensiva lista de alvos de miRNA de HHV-8, que parecem interferir na sua latência e na linfomagênese. Ainda outro banco de dados é o MirBase, constituído de sequências e anotações de miRNA já publicados ("miRBase", 2006) em que contém 40 achados de miRNAs de HHV-8, sendo 13 sequências disponíveis referenciadas na literatura até o momento.

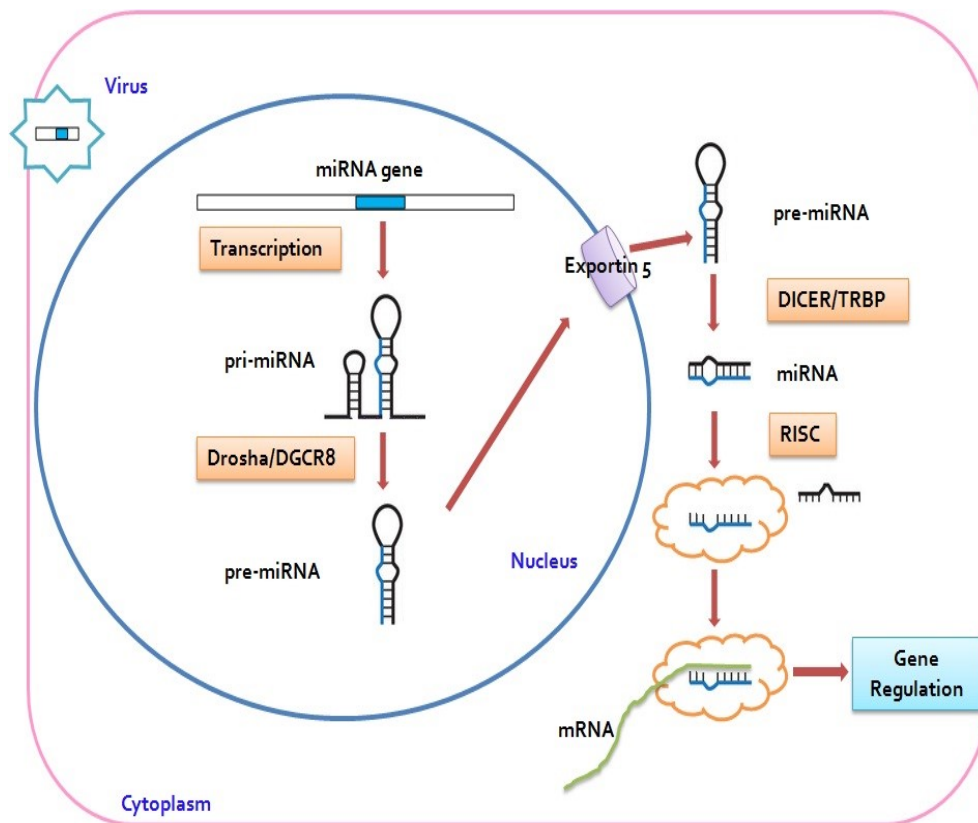
Os miRNAs codificados por vírus foram descobertos pela primeira vez em células de linfoma de Burkitt infectadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e foram subsequentemente identificados em muitos alfas, betas e gammaherpesvirus.

Os bancos de dados mostraram que o HHV-8 codifica 27 regiões maduras de miRNAs a partir de 12 regiões pré-virais de miRNAs (pré-miRNA), e 10 deles se encontram entre a ORF K12 e a ORF 71. Dois destes, miR-K12 e a miR-K10, estão posicionados dentro da ORF K12, adjacente a área codificadora da proteína Kaposina. Os miRNAs maduros são abundantemente encontrados em lesões do Sarcoma de Kaposi e da Doença Multicêntrica de Castleman, e de acordo com estudos, os níveis desses miRNAs variam de acordo com os ciclos virais, podem ser expressas até 2.200 cópias de um único miRNA em uma célula (ABEND; ULDRICK; ZIEGELBAUER, 2010; DAI et al., 2018; QIN et al., 2017; RAMALINGAM; KIEFFER-KWON; ZIEGELBAUER, 2012; SAMOLS et al., 2005; YAN et al., 2019; ZIEGELBAUER, 2011). Marshall et al., 2018 detectaram baixos níveis de determinados miRNA de HHV-8, ilustrando variações em suas sequências associadas a alterações nos níveis de miRNA maduro, concluindo que os níveis de miRNAs maduros codificados por HHV-8 em lesões de SK podem ser associados aos polimorfismos em regiões de DNA viral que os codificam ou na estrutura modificada de seus transcritos intermediários (HAN et al., 2013). Essas descobertas sobre miRNAs codificados por HHV-8 ofereceram a oportunidade de examinar variações de sequência nas regiões de sua codificação no genoma do HHV-8 e em seus transcritos com o potencial de afetar padrões de expressão de genes virais e dos hospedeiros.

O miRNA ligado ao seu alvo complementar de mRNAs leva a inibir a sua respectiva tradução, conseqüentemente levando a queda expressão desse mRNA. Os miRNAs são processados a partir de transcritos precursores da polimerase II (Pol II) por dois tipos de endonucleases III de RNA. No núcleo, os precursores de miRNAs maduros antes da clivagem de Drosha (pri-microRNAs) formam um *hairpin* (estrutura em forma de grampo), que é clivado por Drosha/DGCR8. O pré-microRNA resultante (após a clivagem de Drosha) é eficientemente exportado para o citoplasma, onde é reconhecido por Dicer, que cliva a parte a estrutura protuberante do grampo para gerar uma molécula de RNA de fita dupla. Normalmente, uma fita, o miRNA maduro, é então incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Para alguns miRNAs



humanos e muitos virais, ambas as cadeias podem ser incorporadas no RISC (Figura 6) (AMARAL et al., 2010).



**Figura 6** - Biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs. Fonte da imagem: <http://crdd.osdd.net/servers/virmirna/index.html>.

### 1.8 Enfoque a ORF K12: *locus* codificante da Kaposina e codificadora de miRNAs

A ORF K12 do genoma do HHV-8 é uma região investigada por transcrever a Kaposina, um peptídeo altamente hidrofóbico contendo 60 aminoácidos de tamanho, responsável, majoritariamente, por promover a mudança de formato das células infectadas pelo HHV-8 em ciclo lítico para um formato mais fusiforme, além de ser uma proteína marcadora da infecção latente em tumores do SK. É bastante comum identificar a expressão gênica da ORF K12 durante a latência e, durante o ciclo lítico, sua expressão é, ainda, amplificada por outros fatores. Sua expressão é tão presente no ciclo viral que pode ser encontrada em até 85%

das células fusiformes infectadas com HHV-8 (KLEER et al., 2022; MURALIDHAR et al., 1998; QIN et al., 2017). Além da Kaposina, o *locus* da ORF K 12 contém dois loci que são regiões codificadora de miRNA de cerca de 22 nucleotídeos.

Embora com uma casuística restrita, esses estudos observaram um perfil distinto de SNPs em regiões codificadoras de miRNA de HHV-8 infectando pacientes com SK-aids (CHOI et al., 2015; HAN et al., 2013; MARSHALL et al., 2007, 2010; RAY et al., 2012).

Há dez anos, Hans et al., 2013 analisaram funcionalmente polimorfismos de um único nucleotídeo ou múltiplos em regiões codificadoras de miRNA de HHV-8, alguns das quais foram previstos como gerando variantes da estrutura secundária de pré-microRNAs, de modo a apoiar a hipótese de que esses polimorfismos se refletem em diferenças de expressão de miRNA que estão associadas a diferentes fenótipos clínicos em pacientes infectados por HHV-8. Previamente, outros estudos observaram que, embora essa região do genoma do HHV-8 fosse, em geral, altamente conservada, um grupo distinto de sequências apresentaram uma divergência substancial (MARSHALL et al., 2007). Também observaram polimorfismos de nucleotídeos múltiplos ou únicos em sequências pré-microRNA de K12-2, -4, -5, -6, -7, -9 e -10. Em estudos subsequentes em análises detalhadas de SNPs na região codificadora de miRNA do HHV-8, observaram uma associação dessas variações genéticas com o risco de SK-aids (COLANTONIO; MARTÍ; RUBINSTEIN, 2010), MCD e síndrome de citocina inflamatória associada ao KSHV (KICS)(RAY et al., 2012), uma condição associada a uma carga viral extremamente alta (ULDRICK et al., 2010). Um estudo anterior, usando ensaios *in vitro*, relatou que um SNP observado no precursor do miRNA K12 5 (miR-K12-5) afeta o processamento da enzima Drosha e subsequentemente afeta a expressão de miRNA maduro em linhagens celulares PEL (GOTTWEIN; CAI; CULLEN, 2006). Por fim, juntos, esses dados indicam que esses SNPs podem ter consequências fenotípicas para a biologia e patogênese viral.

### 1.9 Função dos miRNAs do HHV-8 e seus alvos celulares

Dois grupos, Lu et al., 2010 e Ye et al., 2008, se utilizando de versões mutadas do HHV-8, onde 10 dos 12 miRNAs foram deletados, deixando somente os miR-K12 e miR-k10, puderam observar um aumento na expressão de proteínas líticas, quando comparadas com a versão selvagem do vírus. Tal fenótipo seria suprimido com a presença dos outros miRNA virais.

Além disso, o estudo de Abend; Uldrick; Ziegelbauer, 2010 mostrou que o miR-k10a age diretamente diminuindo a expressão de proteínas receptoras indutoras de apoptose.

Sabe-se também que, por exemplo, os miR-K9-5p e miR-k12-7, junto com o miR-K12-9, foram identificados inibindo a expressão de Ativadores de replicação e transcrição (RTA) viral, ou seja, têm um papel importante na mudança de fase viral, de latente para lítica. Outros miRNAs tem papéis tão importantes quanto, como é o exemplo da miR-K2 e a miR-K5 que tem como alvo reduzir as proteínas supressoras de tumor tropomiosina, um fator crítico para a angiogênese e patogênese do HHV-8 (HUSSEIN et al., 2019; PEARCE; MATSUMURA; WILSON, 2005; YAN et al., 2019).

A Tabela 1 abaixo, construída por Piedade e Azevedo-Pereira, 2016, sumariza os diferentes miRNAs do HHV-8. Segundo dados revisados por Piedade e Azevedo-Pereira, 2016, esses miRNAs parecem desempenhar um papel na patogênese viral de maneira específica da doença. Parece possível que os miRNAs virais exibam funções diferentes, dependendo do tipo de célula infectada. Os miRNAs do KSHV têm como alvo vários genes celulares importantes para o funcionamento normal das células. Além disso, os miRNAs do HHV-8 contribuem para a evasão e modulação imune, evitam a apoptose e contribuem para a tumorigênese. Os miRNAs codificados por HHV-8 podem inibir a resposta imune inata. kshv-miR-K12-9 tem como alvo IRAK1 (quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1), enquanto kshv-miR-K12-5 tem como alvo MYD88 (resposta primária de diferenciação mielóide). Tanto IRAK1 quanto MYD88 medeiam a sinalização de TLR/IL-1R, e sua repressão resulta em

inflamação reduzida. Além disso, kshv-miR-K12-11 tem como alvo I $\kappa$ B quinase-epsilon (IKK $\epsilon$ ), resultando em sinalização de interferon tipo I atenuada. Semelhante ao Citomegalovírus e ao EBV, o HHV-8 evita o reconhecimento e a morte das células NK codificando um miRNA, kshv-miR-K12-1, que tem como alvo o mRNA do MICB. Além da modulação do reconhecimento das células NK, o HHV-8 também modula a secreção de citocinas. Um miRNA viral, kshv-miR-K12-10, tem como alvo o indutor fraco do receptor de apoptose semelhante ao fator de necrose tumoral (TWEAKR). A repressão de TWEAKR reduz as interações com seu ligante, resultando em expressão reduzida de IL-8 e proteína que induz a quimiotaxia de monócitos 1 (MCP-1). Além disso, kshv-miR-K12-3 e kshv-miR-K12-7 reprimem C/EBP $\beta$  (CCAAT/proteína de ligação ao intensificador  $\beta$ ), um repressor transcricional de IL-6 e IL-10 [168], duas citocinas que promovem crescimento celular de células infectadas por KSHV e angiogênese. No entanto, ainda não está claro se esses dois miRNAs virais têm como alvo C/EBP $\beta$  direta ou indiretamente, visando outros fatores a montante. Em contraste, kshv-miR-K12-11 tem como alvo direto C/EBP $\beta$  e demonstrou contribuir para a expansão de células B esplênicas e linfomagenese associada a KSHV. Portanto, está bem estabelecido que os miRNAs do KSHV regulam cooperativamente a expressão de citocinas para facilitar a infecção e a oncogênese, evitando o sistema imunológico do hospedeiro (PIEDADE E AZEVEDO-PEREIRA, 2016).

**Tabela 1** - Descrição dos principais miRNAs do HHV-8, seus alvos e o seu papel preditivo.

<b>miRNA HHV-8</b>	<b>Alvo</b>	<b>Papel predito</b>
K12-1	MICB	Evasão Imune
	P21	Oncogênese
	IkB $\alpha$	Sobrevivência celular Modular infecção lítica/latente
	Caspase 3	Sobrevivência celular
	xCT expression	Facilitar a entrada viral
K12-3	C/EBP $\beta$	Evasão Imune Sobrevivência celular Oncogênese
	Caspase 3	Sobrevivência celular
	NFIB	Modular infecção lítica/latente
K12-4	RBL2	Modular infecção lítica/latente
	Caspase 3	Sobrevivência celular
K12-5	BCLAF1	Modular infecção lítica/latente
	MYD88	Evasão Imune
K12-6	xCT expression	Facilitar a entrada viral
K12-7	C/EBP $\beta$	Evasão Imune Sobrevivência celular Oncogênese
	KSHV ORF 50	Modular infecção lítica/latente
	IRAK1	Evasão Imune
K12-9	xCT expression	Facilitar a entrada viral
	KSHV ORF 50	Modular infecção lítica/latente
	BCLAF1	Modular infecção lítica/latente
	TWEAKR	Evasão Imune Sobrevivência celular
K12-10	TGFBR2	Sobrevivência celular Oncogênese
	IKK $\epsilon$	Evasão Imune Modular infecção lítica/latente
K12-11	C/EBP $\beta$	Evasão Imune Sobrevivência celular Oncogênese
	SMAD5	Sobrevivência celular Oncogênese
	xCT expression	Facilitar a entrada viral

Fonte: PIEDADE E AZEVEDO-PEREIRA, 2016

## 1.10 Transativação viral e coinfeção entre HHV-8 e outros herpesvirus

A coinfeção do HHV-8 e outros vírus, incluindo os herpesvirus, pode ser um cofator importante pela possibilidade da transativação e interação entre seus genes e produtos. Um mecanismo que serve de exemplo dessa transativação é dado pelos estudos que apontaram que a replicação do HIV, e não a reconstituição imune, possa ter um importante papel na resolução do SK, devido a interação que ocorre entre o HHV-8 e o gene Tat (Tat do inglês, *Transactive transcription*) do HIV. Estudos indicaram que o HIV induz a replicação lítica do HHV-8, por meio da proteína Tat, que aumenta a atividade de genes envolvidos na angiogênese, proliferação e replicação viral (AOKI et al., 2007, NGUYEN et al., 2008). Alguns outros contextos apoiam o potencial dessas interações ocorrem, como tem sido abordados na literatura, com EBV, o CMV (*human cytomegalovirus* – HHV-5) e o HHV-6 (MCHUGH et al., 2017; THAKKER; VERMA, 2016).

### 1.10.1 EBV

Similarmente ao HHV-8, o EBV é um gammaherpesvirus, e o agente etiológico do Linfoma de Burkitt, assim como o HHV-8, o risco do desenvolvimento de cânceres associados ao EBV aumenta em pacientes imunocomprometidos. Além disso, os dois vírus compartilham um tropismo por linfócitos B como alvo de latência, o que gera interações diretas entre eles. (SPADAVECCHIA et al., 2010; THAKKER; VERMA, 2016). Ainda, estudos na África, em que a prevalência do HHV-8 é alta, especialmente na infância, a persistência da infecção por ambos tem sido associada ao desenvolvimento maior de neoplasia em relação ao tempo de exposição a esses agentes

O grande problema ocorre nos primeiros momentos das infecções de EBV e HHV-8, onde proteínas do EBV e do HHV-8, a RTA do HHV-8 e a ZTA do EBV, inibem uma à outra, e sendo assim, a que estiver em maior concentração na célula predomina e dá continuidade ao ciclo viral a que pertence, inibindo a

“concorrente”. Existe um nível de especulação quanto aos mecanismos desses vírus se inibirem, provavelmente para limitar a concorrência por recursos a curto prazo (THAKKER; VERMA, 2016; UEDA et al., 2011; XU et al., 2007).

A longo prazo, porém, nota-se um aumento considerável nos níveis de infecção de ambos os vírus, visto que ambos são tumorigênicos. Uma vez estabelecidos no hospedeiro, podem se aproveitar dos efeitos inflamatórios das citocinas um do outro e aumentar efetivamente o potencial para a formação de tumores e doenças associadas (HAECKER; RENNE, 2014; KING et al., 2015; LUI et al., 2009; THAKKER; VERMA, 2016). No trabalho de McHugh et al., 2017 foi analisado um sistema com camundongos sistematicamente infectados com HHV-8 e EBV, e um dos principais resultados foi o aumento significativo na formação de tumores e diminuição da sobrevivência dos camundongos.

#### 1.10.2 CMV

O CMV é um membro dos  $\beta$ -herpesvirus. Apresenta tropismo por células do tecido hematopoiético e monócitos. Por apresentar um tropismo bastante ligado ao do HHV-8, é bastante possível que os vírus interajam entre si. O CMV já foi detectado em lesões causadas pelo HHV-8, levantando teorias sobre a interação desses dois vírus. Em estudos com sistemas experimentais já demonstraram a ativação de proteínas RTA do HHV-8 por proteínas produzidas pelo CMV, mas a maneira como interagem não é certa ainda, e tal interação entre os vírus ainda é muito pouco estudada (ADLAND et al., 2015; PARK et al., 2006; SINZGER; DIGEL; JAHN, 2008; TARRANT-ELORZA; ROSSETTO; PARI, 2014; THAKKER; VERMA, 2016).

### 1.10.3 HHV-6

O HHV-6 é um  $\beta$ -herpesvirus não oncogênico de distribuição ubíqua, classificado entre HHV-6A e HHV-6B, associado com *exanthem subitum*. Já foi detectado em monócitos/macrófagos, células T CD4, células dendríticas, epiteliais e astrócitos, ou seja, existe a chance de que exista uma infecção mútua de HHV-6 e HHV-8. Em cenários experimentais, em linhagens de BCBL-1, foi observada uma ativação do ciclo lítico do HHV-8, indicando uma interação direta entre os vírus. Contudo, a coinfeção do HHV-6 e do HHV-8 ainda é muito pouco detectada e ainda menos estudada em estudos *in vivo*, e, portanto, ainda não se pode falar que é um fator de risco para as doenças associadas ao HHV-8 (ABLASHI et al., 2014; LU et al., 2005; MORI et al., 2015; TAMBURRO et al., 2012; THAKKER; VERMA, 2016)

### 1.11 Justificativa

Hoje é claro que o vírus HHV-8 é imprescindível para o desenvolvimento do sarcoma de Kaposi. O SK é o segundo câncer mais prevalente definidor de aids nos países com acesso a ARTc em indivíduos vivendo com HIV. Após a introdução da ARTc, foi observada uma redução na incidência de SK-aids no mundo ocidental, no entanto, não é raro ocorrer a persistência de SK-aids diante do uso de ARTc, da carga de HIV indetectável ou da contagem de linfócitos T CD4+ acima dos valores relacionados à suscetibilidade aos agentes oportunistas (KROWN; LEE; DITTMER, 2008; MAURER; PONTE; LESLIE, 2007; NGUYEN et al., 2008; STEBBING; PORTSMOUTH; GAZZARD, 2003) O Sarcoma de Kaposi no estado avançado ou resistente à terapia antirretroviral permanece potencialmente fatal para os pacientes portadores, requerendo o uso das terapias complementares (NAIPAUER; MESRI, 2023).

Não é claro ainda porque alguns indivíduos infectados por HHV-8 desenvolvem o SK e outros não. A modificação morfológica das células infectadas pela ação da infecção por HHV-8 está relacionada a capacidade deste



de reprogramar células endoteliais em mesenquimais ou vice e versa, sendo um mecanismo importante na oncogênese viral. A sarcomagênese induzida por HHV-8 é multifatorial. Além dos mecanismos associados à susceptibilidade genética e ao imunocomprometimento do paciente, o papel do vírus nesse processo se relaciona, pelo menos em parte, à alteração na expressão de genes celulares e à modulação de citocinas inflamatórias (NAIPAUER; MESRI, 2023).

De fato, a ação de moléculas virais é um dos cofatores que pode exercer sinergismo no processo de reprogramação celular e na modificação do microambiente inflamatório por meio do controle da expressão de genes celulares e virais, como bem exemplificado pela interação entre as moléculas de miRNA dos herpesvirus no controle da expressão de genes do hospedeiro (MARKUS et al., 2017; NAQVI et al., 2018a, 2018b). Por outro lado, temos ainda as interações entre vírus, como acontece na transativação do HHV-8 pela proteína Tat do HIV (YAO et al., 2015). Em estudos *in vitro*, tem sido demonstrado o sinergismo entre EBV e HHV-8, assim como a presença de coinfeção desses herpesvirus em células B transformadas (GRUFFAT; MANET, 2018; McHUGH et al., 2017).

Uma das moléculas importantes que podem interferir na atividade celular são os miRNA (miRNA) virais, que são fitas de RNA de 22-24 nucleotídeos que se ligam a alvos gênicos, e conseqüentemente interferem na expressão de proteínas celulares, envolvidas na tumorigênese. São codificadas em uma região do genoma do HHV-8 de ~ 3,0 kb, que inclui o *locus* da ORF K12 (~0,7 kb), que juntos codificam cerca de 25-27 transcritos com essa função (miRNAs). Qualquer alteração no bioprocessamento dessas moléculas, pode resultar na perda de sua função em controlar a expressão de genes celulares e virais envolvidos na regulação de quase todas as vias celulares, como proliferação celular, diferenciação, apoptose e regulação transcricional. Dessa forma, variações de nucleotídeos em diferentes etapas do bioprocessamento dessas moléculas podem afetar sua funcionalidade, como foi recentemente evidenciado (MARSHALL et al., 2018).

## 1.12 Hipótese

Existem polimorfismos nessa região codificadora de miRNA da ORF K12 que possa distinguir os isolados de HHV-8 entre indivíduos infectados por HIV com SK-ativo e sem histórico de SK-aids?

Temos a possibilidade de detecção de isolados de HHV-8 na saliva e outros fluidos biológicos a partir de uma população de 792 indivíduos vivendo com HIV/aids e bem caracterizada quanto aos dados demográficos e clínicos. De modo adicional, também pretendemos investigar outros parâmetros clinico-laboratoriais, como presença de outros herpesvirus, carga viral do HIV, tempo de uso de ARTc, tempo de infecção por HIV, anticorpos IgG anti-HHV-8 da fase latente e lítica e contagem de células T CD4+.

A identificação e frequência de SNPs no genoma do HHV-8 pode trazer esclarecimentos sobre a relação entre a variabilidade do HHV-8 e a patogênese do tumor. Há ainda poucos genomas do HHV-8 no genBank, que permita relacionar as variações genotípicas do HHV-8 com o desenvolvimento do tumor SK-aids. A associação entre variantes virais e patogenia é bem conhecida em algumas infecções virais, mas para o HHV-8 é ainda um desafio.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Descrever a presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) ou múltiplos em regiões codificadoras de miRNA (rc-miRNA) do *locus* da ORF K12 do genoma do HHV-8, comparando essa variação genética entre isolados de HHV-8 na saliva de indivíduos vivendo com HIV com e sem de SK-aids;

### 2.2 Objetivos Secundários

1. Descrever as características da população geral do estudo de indivíduos vivendo com HIV sob uso de ARTc em relação aos dados demográficos, laboratoriais e clínicos, comparando indivíduos infectados por HIV sem histórico de sarcoma de Kaposi e indivíduos com SK-aids.
2. Otimizar um teste de qPCR em tempo real sensível para medir a presença e carga viral de isolados de HHV-8, comparando a saliva com diferentes fluidos biológicos (plasma e creme leucocitário);
3. Determinar a presença e carga viral salivar dos herpesvirus humanos em indivíduos infectados por HIV, comparando indivíduos infectados por HIV com SK e não-SK-aids.
4. Caracterizar os polimorfismos nas regiões codificadoras de miRNA da ORF K12 do genoma viral, comparando as variações genéticas de isolados de HHV-8 na saliva de indivíduos vivendo com HIV com e não-SK-aids;
5. Classificar filogeneticamente as sequências de DNA de HHV-8 da região da ORF K12 de isolados de HHV-8 e inferir seus potenciais genótipos virais e ainda, verificar se a presença dessas variantes e seus SNPs podem predominar nos grupos com SK-aids ou se estão relacionadas com alguns dos parâmetros clínico-laboratoriais ou de predisposição ao tumor: gênero, idade, uso de quimioterapia anti-tumoral, tempo de uso de ARTc, tempo da infecção por HIV, carga viral dos herpesvirus humanos na saliva, contagem de células T CD4+ e carga plasmática do HIV e sorologia para anti-HHV-8 da fase latente (LANA) e lítica.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Parecer ético**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob Registro 290/2011. O protocolo atual foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Nº do parecer 1.560.798 e Instituto de Infectologia Emilio Ribas segundo protocolo CC Nº 48/2016, julho de 2016. A atualização do parecer ético foi aprovada para o estudo sob registro na plataforma Brasil CAAE 55771116.0.1001.0065, número do parecer 5.156.229, em 09 de dezembro de 2021, que é mostrado no anexo C.

#### **3.2 Desenho do estudo**

Estudo transversal do tipo caso-controle para comparação indivíduos vivendo com HIV em relação aos isolados de HHV-8 entre os grupos com e sem SK-aids. Um cálculo a priori foi baseado na proporção mínima de 1:1, para comparação da variabilidade de isolados virais dentro da ORF K12 do genoma do HHV-8 entre um grupo de indivíduos infectados por HIV e com SK-aids (n=52) e outro de indivíduos infectados por HIV sem histórico de SK (n=740).

Inicialmente, uma casuística de 52 indivíduos com SK-aids, contando com amostras disponíveis de plasma, creme leucocitário e saliva, foi estudada para avaliar o desempenho da saliva em relação ao plasma e creme leucocitário.

A experiência do Laboratório de Virologia do IMT e a literatura (Nascimento et al., 2009; Tozetto-Mendoza et al, 2016), leva-nos a esperar a proporção de 15 a 19% de amostras de isolados virais com Ct < 25 no PCR em tempo real, de modo que de 10 a 47% dessas amostras possam ter seus isolados de HHV-8 com qualidade de sequenciamento de DNA da região de interesse, e consequentemente favorecer as comparações entre os isolados dos dois grupos, com e sem histórico de SK-aids, na proporção de, pelo menos, 1:1.

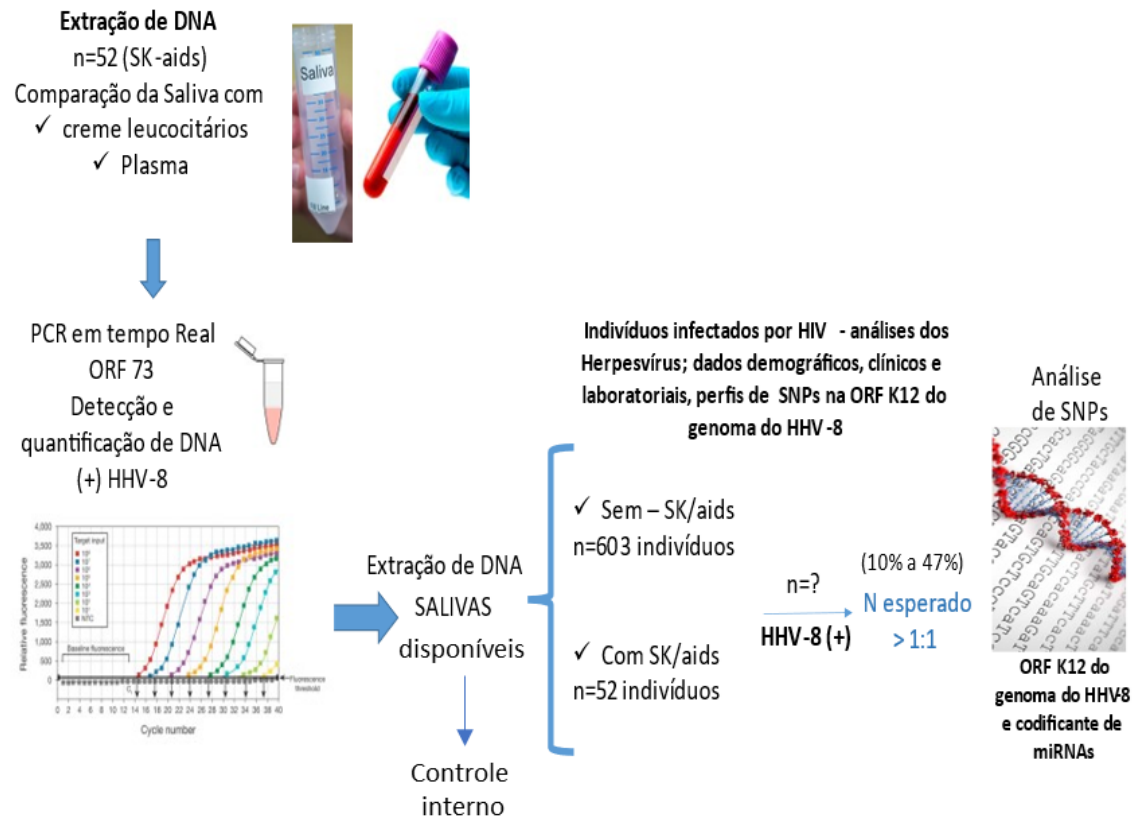
### 3.3 Descrição da população do estudo e casuística

A população original do estudo foi composta de 740 indivíduos vivendo com HIV, cujas amostras biológicas foram coletadas no período de 2008 a 2009. Em adição, 52 indivíduos com SK-aids foram incluídos no estudo (2016-2018), visto que amostras biológicas (plasma, saliva e creme leucocitário) destes foram escassas em volume e em número de casos na casuística original.

Ambos os grupos de estudo se mantinham em tratamento com terapia antirretroviral combinada (ARTc). A mediana e o intervalo interquartil do tempo de tratamento por ARTc no grupo infectado por HIV sem histórico de SK-aids foi de 4,4 anos (4,3; 4,5 anos) e no grupo SK-aids, foi de 1,0 ano (0,3; 4,2 anos).

As amostras biológicas disponíveis de indivíduos vivendo com HIV sem histórico de SK-aids foram provenientes de pacientes em atendimento ambulatorial associado ao Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Os indivíduos com SK-aids foram atendidos no Hospital Dia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), São Paulo, Brasil. O esquema quimioterápico antiviral pelo qual os indivíduos com SK-aids foram submetidos foram: Tenofovir Disoproxil Fumarate, Lamivudine, Efavirenz, Azidothymidine, Lopinavir/ritonavir, TNF – Tumor Necrosis Factor, RTV - Ritonavir, IDV – Indinavir, ABC – Abacavir, d4T – Stavudine, ATV/r – Atazanavir/ritonavir, DRV – Darunavir, DTG – Dolutegravir, NVP – Nevirapine, ABV – Adriamycin, Bleomycin, Vincristine.

O fluxograma (Figura 7) apresenta as atividades metodológicas com as casuísticas disponíveis para a avaliação do melhor fluido biológico para a DNA de HHV-8. As análises moleculares e a obtenção de sequências de DNA do genoma do HHV-8 abrangeram uma região codificadora de miRNA da ORF K12 de 0,4 a 0,7 kb. Esse *locus* tem função codificadora da proteína Kaposina e dois transcritos para a produção de miRNA ORF-K12a-10 e ORF-k12-12. Ainda, associado a variabilidade genética do HHV-8, outros co-fatores foram investigados quanto a sua relação a presença de sarcoma de Kaposi, como a presença e carga viral na saliva de outros herpesvirus e dados clínico-laboratoriais disponíveis.



**Figura 7** - Fluxograma simplificado das análises e casuísticas disponíveis e esperadas.

## Coleta de dados

Dados do prontuário disponível para o estudo foram analisados pelo pesquisador principal e pelos médicos responsáveis pelo atendimento ambulatorial no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto Emilio Ribas São Paulo, de acordo termo de consentimento livre e esclarecido assinado no momento da coleta do material biológico e mantendo a confidencialidade dos dados dos sujeitos da pesquisa. Foram adquiridos desses prontuários dados demográficos, clínicos e laboratoriais como gênero, idade, via de contágio do HIV, estadiamento do sarcoma de Kaposi no momento da biópsia, contagem de linfócitos T CD4+, tempo de uso tratamento antirretroviral ou tempo do diagnóstico do HIV, tempo de quimioterapia (QT) para o tratamento do sarcoma de Kaposi, carga viral do

HIV, dados sobre sorologia dos indivíduos para anticorpos IgG anti-HHV-8 (fase latente e lítica).

### **3.4 Análise molecular**

#### **3.4.1 Amostras e processamento**

Dos 792 indivíduos relacionados, no início do estudo, vivendo com HIV, apenas 640 amostras biológicas estavam disponíveis do grupo não-SK e 52 do grupo com SK-aids. Essa diferença ocorreu, pois as amostras biológicas foram usadas para outros estudos, e em alguns casos, a amostra não apresentou um controle interno positivo, sendo assim, descartada.

As amostras de saliva foram processadas a partir de 200 µl de sedimento, de acordo com o protocolo descrito por Beyari et al., 2003. As amostras de creme leucocitário e plasma foram obtidas da interface sangue e plasma de sangue total com anticoagulante (EDTA) após centrifugação a 800 g.

Para avaliar a saliva em comparação ao plasma e creme leucocitário em relação a abundância de detecção molecular do HHV-8, essas amostras biológicas (n=52) foram disponíveis dos indivíduos infectados por HIV com sarcoma de Kaposi.

As amostras foram aliquotadas em volumes de 500 µL e preservadas a -80°C até o momento do uso.

#### **3.4.2 Extração de DNA**

Um volume de 500 µL de amostra biológica foi submetida as extrações de ácidos nucleicos totais por meio de extração automatizada NUCLISENS® EASYMAG® da BioMérieux, segundo instruções do fabricante. As amostras foram processadas em ambientes específicos, a fim de prevenir contaminações. Cada ensaio contou com três controles negativos (água Milli Q) intercalados entre as amostras do estudo. Amostras de DNA obtidas de linhagem de Células

de Linfoma de Efusão Primário (do inglês, B Cell Lymphoma Lymphocytes, designada por BCBL-1) foram empregadas como controle positivo dos ensaios da reação de qPCR.

Controles positivos biológicos e sintéticos (com número de cópias pré-determinadas) e controles negativos (NTC, *nuclease free water*, Invitrogen®) foram usados em cada processo de extração e PCR em tempo real para monitorar a reprodutibilidade dos processos ao longo do tempo de aplicação dos mesmos.

Um controle interno para avaliar a qualidade do extrato de DNA foi baseado na amplificação do fragmento gênico da Ribonuclease P (RNase P, RP) humana (GenBank accession number NM\_006413), com as sequências dos iniciadores (*primers*) e sonda descritos previamente (EMERY et al., 2004) e apresentadas a seguir:

sense 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'

anti-sense 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3')

sonda FAM 5'-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3'

#### 3.4.3 PCR Pan herpes – PCR *real time* quantitativo (qPCR)

Os ensaios de PCR em tempo real foram baseados no sistema TaqMan®, com uso dos *primers*, sondas e oligonucleotídeos sintéticos para a detecção e construção de curva padrão de quantificação da carga viral do HHV-8 (Tabela 2).



**Tabela 2** – Sequências de primers e sondas Pan herpes

<b>Vírus</b>	<b>Nome</b>	<b>Primers/sondas 5' – 3'</b>
HSV-1	HSV_1F_UL39	CCAAGTGCACCATGATCATCGA
	HSV_1R_UL39	GATGTTTGTACCGCAACGAA
	HSV_1P_UL39	FAM – CCCGCGCACCACGTC – MGB
HSV-2	HSV_2F_gG	CGCTCTCGTAAATGCTTCCCT
	HSV_2R_gG	TCTACCCACAACAGACCCACG
	HSV_2P_gG	VIC – CGCGGAGACATTCGAGTACCAGATCG – MGB
VZV	VZV_F_UP	CGGCATGGCCCGTCTAT
	VZV_R_UP	TCGCGTGCTGCGGC
	VZV_P_UP	Cy5 – ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC – MGB
EBV	HHV4F_EBNA	CCGCTCCTACCTGCAATATCA
	HHV4R_EBNA	GGAAACCAGGGAGGCAAATC
	HHV4P_EBNA	FAM – TGCAGCTTTGACGATGG-MGB
CMV	HHV5F_UL54	GGCCGTTACTGTCTGCAGGA
	HHV5R_UL54	GGCCTCGTAGTGAAAATTAATGGT
	HHV5P_UL54	FAM – CCGTATTGGTGC GCGATCTGTTCAA – MGB
HHV-6	HHV6F_U56A	
	B	AAAGACCTAAATTGCCGCTACCT
	HHV6R_U56A	
	B	GCAAGCTCATGAACATCGTCA
	HHV6P_U56A	
	B	VIC – TTAGATGGTGGTGAGCTGGGATCGGT – MGB
HHV-7	HHV7F_U37	CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA
	HHV7R_U37	CCAATCCTTCCGAAACCGAT
	HHV7P_U37	Cy5 – CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG-MGB
HHV-8	HHV8F_ORF7	
	3	CGCGAATACCGCTATGTAICTCA
	HHV8R_ORF7	
	3	GGAACGCGCCTCATACGA
	HHV8P_ORF7	
	3	Cy5 – ACATCACCACCCACAGACCTGGAG – MGB

NOTA: Os primers e sondas estão dispostos da posição 5' para 3' e as sondas são acompanhadas pelos marcadores de fluorescência utilizados.

Ajustamos nosso protocolo com a otimização de ensaios de PCR em tempo real em triplex, mais apropriados para a quantificação da carga viral e tipagem dos herpesvirus para um grande número de amostras. A otimização foi feita conforme protocolos publicados por nossos colaboradores LIMA ET AL., 2017; RAPOSO ET AL., 2019 E OUTROS AUTORES FELLNER ET AL., 2014; WEIDMANN; ARMBRUSTER; HUFERT, 2008 e com a experiência anterior do laboratório de Virologia -LIM 52.

Algumas modificações foram adicionadas aos protocolos em relação as concentrações dos *primers* e sondas, marcação por fluoróforos, estratégias de MGB e definição do valor do limite de detecção a uma taxa maior do que 95% (LOD>95%) como descrito na Tabela 2.

O primeiro triplex foi composto com os primers e sondas para HSV-1, HSV-2 e VZV(HHV-3), o segundo triplex foi composto com os primers e sondas para CMV(HHV-5), HHV-6 e HHV-7 e os individuais contém os primers e sondas para o EBV(HHV-4) e HHV-8, separadamente, de acordo com as concentrações mostradas na tabela 3.

O trabalho de LIMA et al., 2017, em curva sintética, relata uma detecção de até  $1,9 \times 10^1$  cópias/ml para o HSV-1 e  $4,7 \times 10^1$  cópias/ml para o HSV-2

O trabalho de WEIDMANN; ARMBRUSTER; HUFERT, 2008, que relata um triplex para a detecção de HSV-1, HSV-2 e VZV, obteve uma sensibilidade de  $10^2$  moléculas/ $\mu$ l.

O trabalho de RAPOSO et al., 2019 que também relata um triplex para detecção de CMV, HHV-6 e HHV-7, obteve uma sensibilidade aproximada variando entre  $10^3$  e  $10^5$  cópias/ml.

**Tabela 3** – Condições do qPCR em tempo real monoplex e triplex

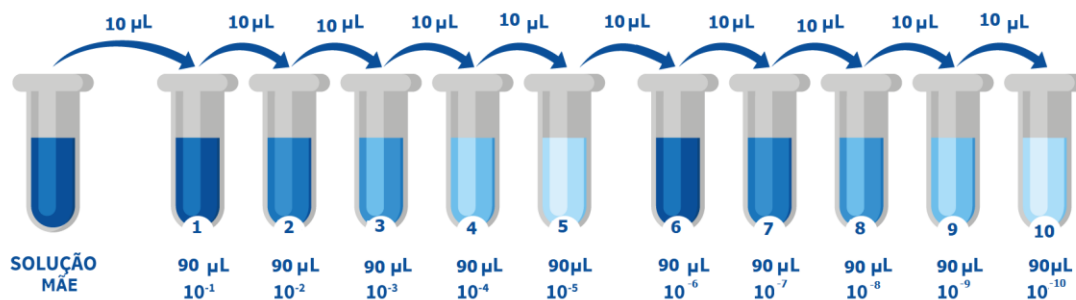
qPCR em tempo real Pan herpes	Conc. Primer F	Conc. Primer R	Conc. Sonda	Referência dos primers e sondas
Triplex HSV1 HSV2 VZV	200nM	200 nM	62nM	LIMA et al., 2017; WEIDMANN; ARMBRUSTER; HUFERT, 2008
Triplex CMV	375 nM	375 nM	250 nM	RAPOSO et al., 2019
HHV-6	200 nM	200 nM	160 nM	
HHV-7	375 nM	375 nM	250 nM	
EBV	200 nM	200 nM	62 nM	FELLNER et al., 2014
HHV-8	200nM	200nM	62nM	KRISHNAN et al., 2004

#### 3.4.4 Padronização da Curva de quantificação do HHV-8

As condições do PCR em tempo real quantitativo para HHV-8 com a construção da curva padrão (qPCR – HHV-8/ORF 73) foram estabelecidas no atual estudo. Os *primers* e sondas específicos para HHV-8 foram descritos por Krishnan et al., 2004. A curva padrão de quantificação foi desenvolvida com o uso de sequências de oligonucleotídeo sintético da ORF 73, purificadas por HPLC e liofilizadas pela empresa INVITROGEN® (USA). O desenho da sequência do oligo sintético para a construção da curva padrão do qPCR para a ORF 73 (HHV-8) do estudo feita como a seguir: 5'-TTCGTGGAACGCGCCTCATACGACGTATCTCCAGGTCTGTGGGGTGGTGA TGTATGCGT TGAGTACATAGCCGGTATTCGCGCTGATA –3'.

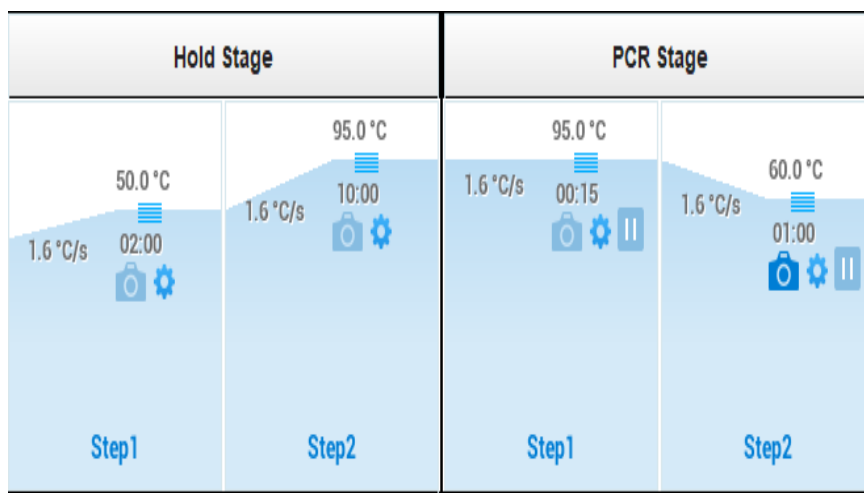
Foi dissolvida em água ultrapura livre de DNase / Rnase a 100 pMol/ $\mu$ L equivalente a  $10^{13}$  moléculas de DNA/ $\mu$ L, de acordo com o cálculo do número de Avogadro [DNAg/uL]/ tamanho do DNA oligo (bp) x 660) x (6,022x10<sup>23</sup>).

Foi produzida uma solução mãe com 100  $\mu\text{M}$  de concentração inicial, utilizando 10 $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo e 990 $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA (LGC Biotecnologia), e a partir da solução mãe foram produzidos os pontos de curva, em diluição seriada na base 10, representada na figura 8.



**Figura 8** - Representação geral do processo de diluição em série

O oligonucleotídeo sintético foi então submetido a ampliações em qPCR, mostradas na figura 9, utilizando a QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific, seguindo as instruções do fabricante.



**Figura 9** – Etapas e temperaturas da amplificação de DNA no termociclador

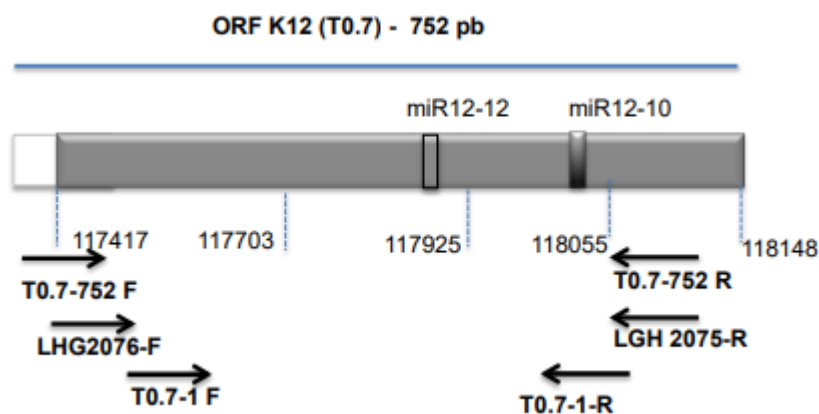
### 3.5 Análise da região ORF K12

A análise de variabilidade entre o *locus* K12 abrangeu a região contida entre os nucleotídeos 117.378 a 118.121, com base no genoma de referência do GenBank U75698 (CHANG et al., 1994).

Estudamos duas regiões codificadoras de miRNA do *locus* K12 denominadas *miR-K12-12* e *miR-K12-10<sup>a</sup>*, cujas sequências foram consultadas no banco de dados VIRmiRNA, geradas a partir de pesquisa experimental de miRNA viral e seus alvos (<http://www.crdd.osdd.net/servers/virmirna>). A Figura 10 apresenta a região da ORF K12 do HHV-8.

As posições nucleotídicas para a identificação das regiões codificadoras de miRNA foram confirmadas no banco de dados mirBase <https://www.mirbase.org/clusters.shtml>. A posição de cada um no genoma de referência são: kshv-mir-K12-12 (MI 0007987 – KSU75698) de 117. 674 a 117.771 e kshv-mir-K12-10<sup>a</sup> (MI 0002472-KSU75698) de 117.967 a 118.036.

A região da ORF K12 é uma região relativamente conservada, medindo 752pb, como ilustrado na figura 10, e foi analisada usando 3 conjuntos de *primers*, mostrados na tabela 4.



**Figura 10** – Ilustração das coordenadas da região codificadora dos miRNA-12-12 e 12-10 do genoma do HHV-8 e o esquema de pares de *primers* usados no Nested -PCR para a amplificação do fragmento de 0, 4 a 0,7 Kb do genoma do HHV-8 identificado como ORF K12 .

**Tabela 4 – Primers para amplificação da ORF K12**

ORF K12	Sequencias de Primers 5'-3'	Produto	Referências
<b>T0.7-752 Forward</b>	TGCAACTGACCATGTTTCAGGT G	752 pb	WHITBY et al., 2004
<b>Reverse</b>	CTCCTCCCTCCTCACTCCAAT C		
<b>LGH 2076 Forward</b>	GCTGCAATGTACTGCCATG	646 pb	POOLE et al., 2002
<b>Reverse</b>	CTCCAATCCAATGCATGGA		
<b>T0.7-1 Forward</b>	ACTTGGCGTCTGCCGAAGTC	407 pb	WHITBY et al., 2004
<b>Reverse</b>	TAGCGTGCCCTCCCAAAGAG		

### Identificação dos fragmentos de DNA alvo em gel de agarose

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese com corrente constante de 100 mA em gel de agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen®, Waltham, EUA) a 1,5%, e Brometo de Etídeo (UltraPure™ Ethidium Bromide, Invitrogen®, Waltham, EUA), juntamente com peso molecular (PM) de 100 pb (100 bp DNA Ladder™, Invitrogen®, Waltham, EUA) e *Low Mass DNA Ladder* (LM) (Invitrogen®, Waltham, EUA) para semi-quantificação do DNA presentes na amostra em *ng*. A visualização da corrida ocorreu por meio do transiluminador com luz ultravioleta (Major Science, Saratoga, CA, EUA).

As amostras que apresentaram amplificação de DNA dos alvos gênicos de interesse visualizados no gel de agarose foram selecionadas para a etapa de purificação e sequenciamento do DNA.

### Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento pelo método de Sanger foi realizada pelo kit comercial *Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA) em diluição 1:4. A mistura de reação continha, ainda, água ultrapura livre de nucleases (Ambion™, Invitrogen®, Waltham, EUA), *primers* (Exxtend®, Paulínia, Brasil) e *template*, com volume final de reação de 20 µL. As concentrações dos *primers* e volumes

de *templates* utilizados foram baseadas em protocolo do Centro de Genômica da Universidade de Nevada, Estados Unidos <<https://www.unr.edu/genomics/guidelines/ss-template-primer>>. O protocolo de termociclagem baseou-se nas instruções do fabricante do tampão Big Dye™ (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA).

Após esta etapa, foi feita purificação pelo método de precipitação com isopropanol 65%, de acordo com especificações do fabricante do kit comercial *Big Dye*™ (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA). Após adição de 90 µL de isopropanol, homogeneização e incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 20 minutos, as amostras foram centrifugadas à 5.975 g por 45 minutos. Após centrifugação e remoção de resíduos de isopropanol, as amostras foram novamente purificadas com 200 µL de etanol 70%. Após adição de etanol às amostras, elas foram centrifugadas à 5.975 g por 20 minutos. Após processo de purificação e evaporação total do etanol, foi realizada a ressuspensão do sedimento seco com formamida 10% e realizada desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de resfriamento a 4°C. As amostras, então, foram levadas para sequenciamento em Sequenciador Automático ABI 3730, que faz uso de metodologia de eletroforese capilar (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA), no Laboratório de Imunopatologia do HC-FMUSP, com apoio técnico do Dr Hebert Fabrício Culler e da professora Dra Juliana Pereira.

#### **3.5.4 Análise do Sequenciamento de DNA – HHV-8**

Todos os arquivos FAST foram analisadas usando MEGA versão 11. Os mesmos polimorfismos foram confirmados em outras sequências do genbank. Alinhamento de nucleotídeos foi preparado para a identificação dos SNPs pelo uso do software Bioedit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html)), com genomas de referência e alinhamento pelo método de ClustalW incorporado ao programa Mega 11 aqui citado. O software Geneious Prime® 2022.0.2, [www.geneious.com](http://www.geneious.com) e The Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR), Herpesvirus home, [www.viprbrc.org](http://www.viprbrc.org), foram usados para visualização dos

SNPs e obtenção das imagens. Os alinhamentos das sequências obtidas no atual estudo foram feitos em conjunto com 96 referências do genBank (ANEXO)

O método de máxima verossimilhança (MV), do inglês maximum likelihood (ML) foi adotado para as reconstruções filogenéticas desse trabalho, e como justificativas determinantes temos que se trata de um método estatístico e que permite o uso de modelos explícitos de substituição de nucleotídeos. As desvantagens apresentadas pelo método de MV, como tempo computacional e escolha de modelos de substituição com parâmetros adequados não representam um problema, visto que o número de sequências alvo utilizadas, bem como o tamanho das mesmas foram relativamente pequenos.

As sequências protótipos do genBank para a ORF K12 do genoma do HHV-8 utilizadas no estudo foram, em geral, obtidas de biópsia de SK, sangue ou clones sintéticos, e de diferentes regiões geográficas com os códigos do número de acesso descritos no anexo B.

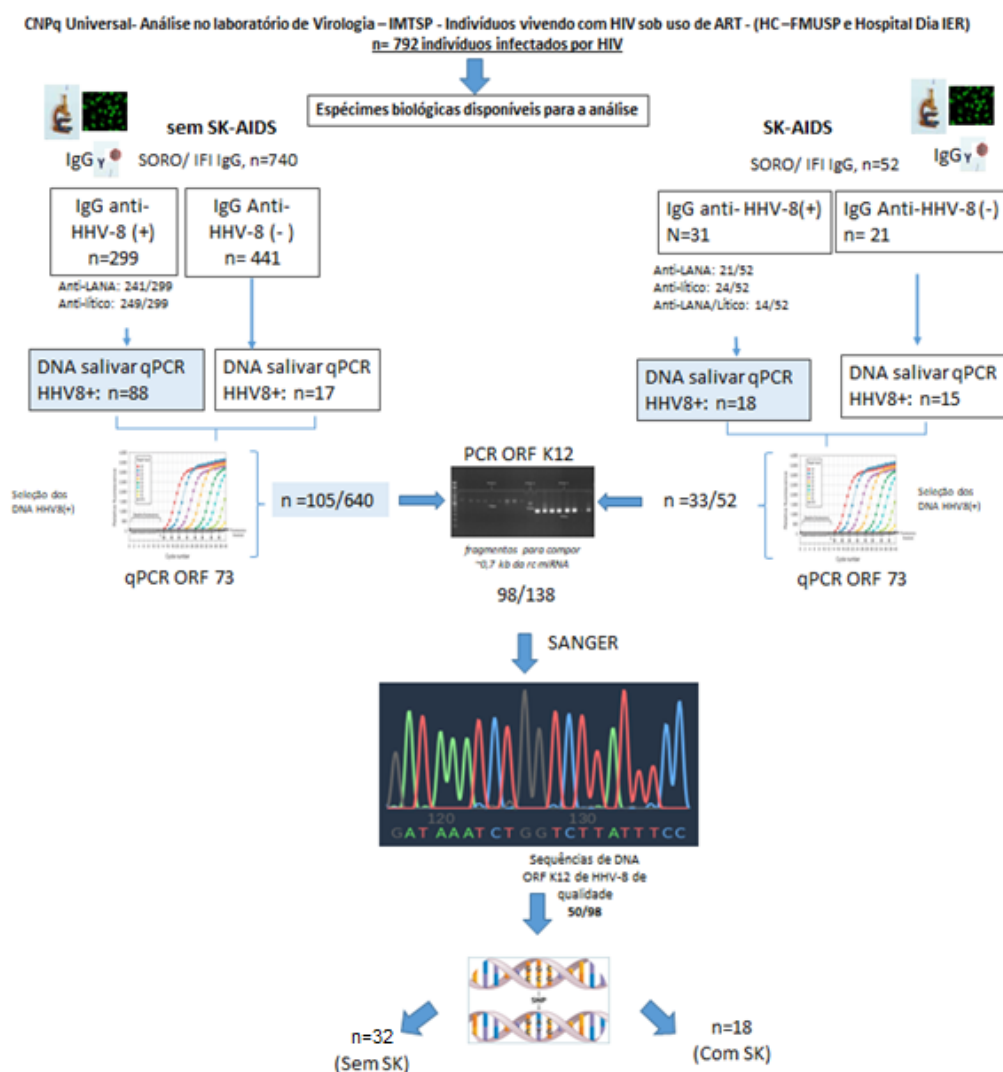
### **Análise estatística**

As diferenças nas variáveis contínuas foram analisadas pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, conforme apropriado. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Associações entre os títulos dos vírus e contagem de linfócitos T CD4+ e outros biomarcadores foram feitos pelo teste de correlação de *Spearman*. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises utilizaram o software GraphPad Prism 9 (San Diego, CA).



## 4 RESULTADOS

Os resultados referentes as etapas metodológicas empregadas no estudo estão apresentados na figura 11. Partimos de uma população de indivíduos vivendo com HIV não-SK e com SK-aids (n=792). Aplicamos o teste qPCR para a ORF 73 para identificação dos casos HHV-8 (DNA+) positivos (n=138), para posterior obtenção do fragmento da região codificadora de miRNA da ORF K12 (0,4 a 0,7 kb) (n=98), resultando em 50 de sequencias de DNA de qualidade para a análise de SNPs (n=50), de acordo com o fluxograma (Figura 11).



**Figura 11** - Fluxograma de resultados obtidos a partir da positividade dos testes empregados: população de indivíduos vivendo com HIV não-SK-aids e com SK-aids (n=792). Teste qPCR ORF 73 para identificação dos HHV-8 (DNA+) positivos (n=138), obtenção dos casos com amplificação da fragmento da região codificadora de miRNA da ORF K12 (0,4 a 0,7 kb) (n=98), obtenção de sequencias de DNA de qualidade para a análise de SNPs (n=50).

#### 4.1 Dados gerais da população original do estudo

Os dados gerais da população de estudo foram compilados na Tabela 5. A população do estudo caracterizou-se por predomínio de homens, autorreferidos como brancos, cuja infecção por HIV foi relatada predominantemente por via sexual. Houve coexcreção de outros herpesvirus na saliva dos indivíduos do grupo não-SK, e somente coexcreção de EBV e HHV-8 nos indivíduos SK-aids.

Quanto aos dados de sorologia, obtidos através da técnica de imunofluorescência indireta para HHV-8 realizados anteriormente a este estudo, um total de 229/ 740 (30,9%) foram soropositivos para IgG anti-HHV-8 no grupo não-SK e 31/52 (59,6%) no grupo SK-aids (teste exato de Fisher,  $p=0,0081$ ). Um total de 3,9% dos não-SK e 57,1% dos SK-aids que não apresentaram IgG anti-HHV-8 tinham carga viral detectável de HHV-8. Do total de 792 indivíduos infectados por HIV, 138 (17,4%) apresentaram carga viral de HHV-8. No grupo Não-SK, anticorpos IgG anti-HHV-8 foram detectados no soro de 299/740 (30,4%) indivíduos, sendo 241/299 (80,6%) soropositivos para anticorpos dirigidos para o antígeno (Ag) da fase latente (anti-LANA) do HHV-8 e 249/299 (83,2%) soropositivos para Ag da fase lítico do HHV-8 (anti-lítico). No grupo SK-aids, anticorpos anti-HHV-8 foram detectados no soro de 31/52 (59,6%) indivíduos vivendo com HIV/SK-aids: sendo 21/31 (67,7%) soropositivos para LANA e 24/31 (77,4%) soropositivos para lítico. Observamos maior frequência de IgG Anti-lítico do que anti-Lana, tanto no grupo SK-aids quanto naqueles não-SK (77,4% e 83,2 %), sem diferença estatística ( $p=0,0714$ ). Não houve também diferença entre não-SK e SK-aids em relação a frequência de soropositividade para IgG anti-LANA ( $p=0,2857$ ).

Níveis plasmáticos de HIV foram detectados predominantemente entre os indivíduos soronegativos para HHV-8, variando de 34,7% a 95%.

Níveis de CD4 foi em torno de 500 células/mm<sup>3</sup> entre os soronegativos e soropositivos para HHV-8 no grupo não SK, mas no grupo SK-aids a mediana do nível de CD4 foi menor do que 70 células/mm<sup>3</sup> entre os IgG soronegativos.

**Tabela 5** - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos.

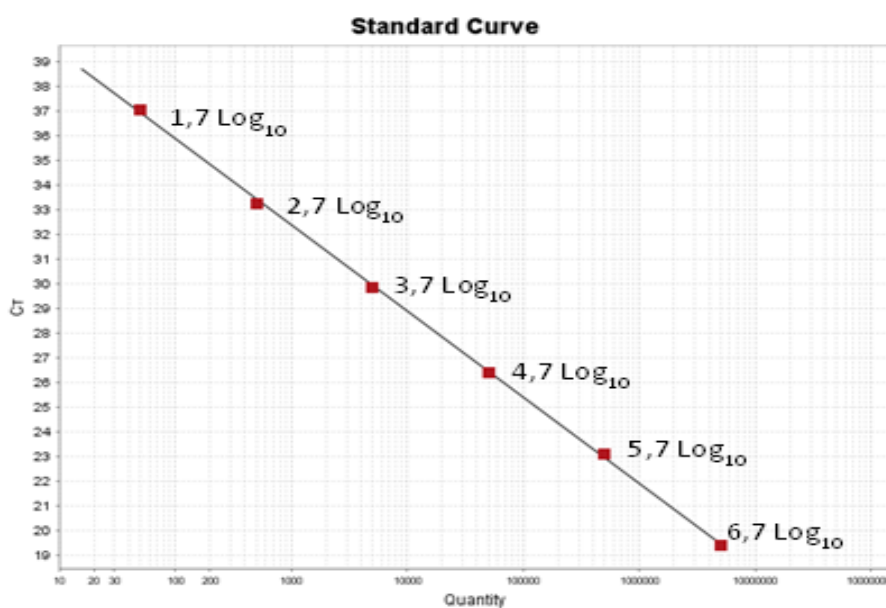
Variáveis	não-SK		SK-aids	
	IgG+	IgG-	IgG+	IgG-
% or mediana (IRQ)	n=299	n=441	31	21
<b>Masculino</b>	86,6	58,5	93,5	100
<b>Idade(min;max)</b>	44 (39;50)	44 (38;50)	42(33;49)	33,0 (26,0; 207,0)
<b>Risco HIV</b>				
sexual	85,6	45,7	80,6	61,9
não sexual	24,5	54,5	0,0	0
NI	0,3	0,2	19,4	38,1
<b>Cor de pele branca</b>	65,9	58	48,4	61,9
<b>HHV-8+</b>	29,4	3,9	48,4	57,1
	3,66 (2,19;4,51)	2,11 (1,25;2,19)	5,3 (4,4;6,6)	6,2 (5,4 ;6,9)
<b>HIV+</b>	1,3	34,7	48,4	95,0
	1,70 (1,70;1,85)	1,70 (1,70;2,56)	3,0 (2,1;4,7)	4,60 (2,3; 5,4)
<b>Hespesvirus</b>	79,6	63,2	58,0	76,2
<b>EBV+</b>	83,2	76,4	58,0	76,2
	6,2 (5,11;7,75)	5,93(4,97;7,24)	7,4 (5,5;8,6)	8,5 (5,1; 9,8)
<b>HSV-1+</b>	6,3	6,3	0,0	0,0
	5,51 (4,34;5,91)	5,62 (5,04;4,34)	0,0	0,0
<b>HSV-2+</b>	0,8	1,1	0,0	0,0
	5,62 (4,51;6,73)	3,78 (3,74;4,67)	0,0	0,0
<b>VZV+</b>	0	0,3	0,0	0,0
	0	6,3(6,3;6,3)	0,0	0,0
<b>CMV+</b>	9,7	6,6	0,0	0,0
	4,92 (4,64;5,48)	4,80 (4,58;5,16)	0,0	0,0
<b>HHV-6+</b>	0,8	0,3	0,0	0,0
	5,90 (5,70;6,10)	6,1 (6,1;6,1)	0,0	0,0
<b>HHV-7+</b>	2,9	1,9	0,0	0,0
	4,71 (4,31;5,55)	4,2 (4,2;4,2)	0,0	0,0
<b>Nível CD4</b>	521 (350;784)	508 (365;708,6)	265 (108;496,8)	72,0 (16,0; 207,0)
<b>IgG anti-HHV-8</b>				
LANA+	80,6	0	67,7	0
Lítico +	83,3	0	77,4	0

Sobrescrito <sup>a</sup> = %; sobrescrito; <sup>b</sup> mediana (Índice interquartil, IRQ) NI=não Informado

## 4.2 Otimização dos ensaios moleculares

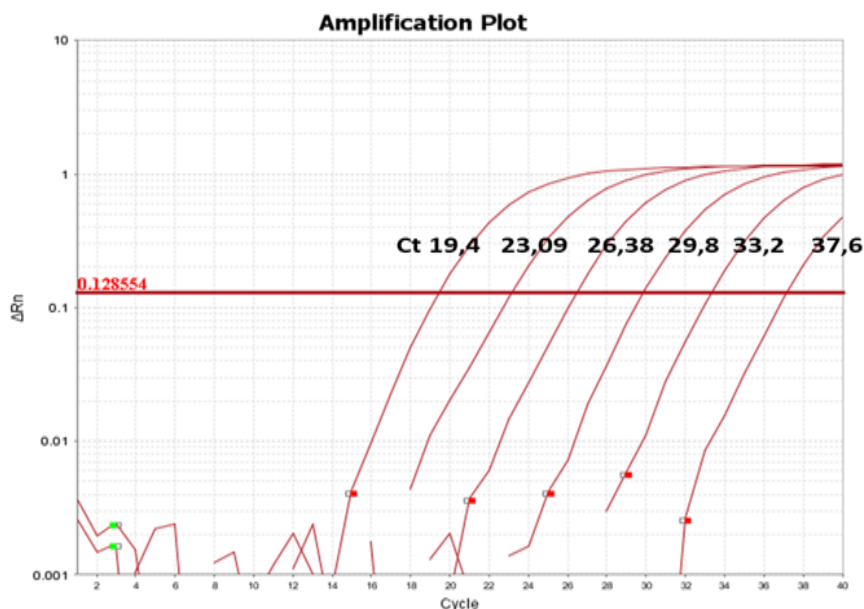
### 4.2.1 qPCR HHV-8 e Curva sintética para detecção molecular de DNA HHV-8

O desempenho do teste para quantificação da carga viral do HHV-8 foi satisfatório, com os valores de eficiência dentro do valor de referência: a eficiência do teste qPCR foi de 92,9% (slope; -3,5; Y-intercep: 40,4; R2=1). A tabela 6 abaixo apresenta o Plot de amplificação do qPCR do HHV-8/ORF 73 e a construção da sua curva sintética, variando de 1,7 a 6,7 log<sub>10</sub> cópias/ml (Ct entre 19,7 a 37,6), conforme curva padrão (Fig. 12 e Fig. 13).



**Figura 12** - Desempenho do qPCR. Retra da regressão: relação Ct e carga viral. Slope: -3,5; Y-intercept: 40,4; R2 = 1; Eficiência: 92,9%

Obtendo então as quantidades de cópias virais/ml por ponto de diluição mostradas na tabela 6.



**Figura 13** - Curva de quantificação baseado na qPCR HHV-8/ORF73. 1,7 A 6,7 log<sub>10</sub> cópias/ml (CT entre 19,7 a 37,6)

**Tabela 6** - Pontos de diluição da curva sintética

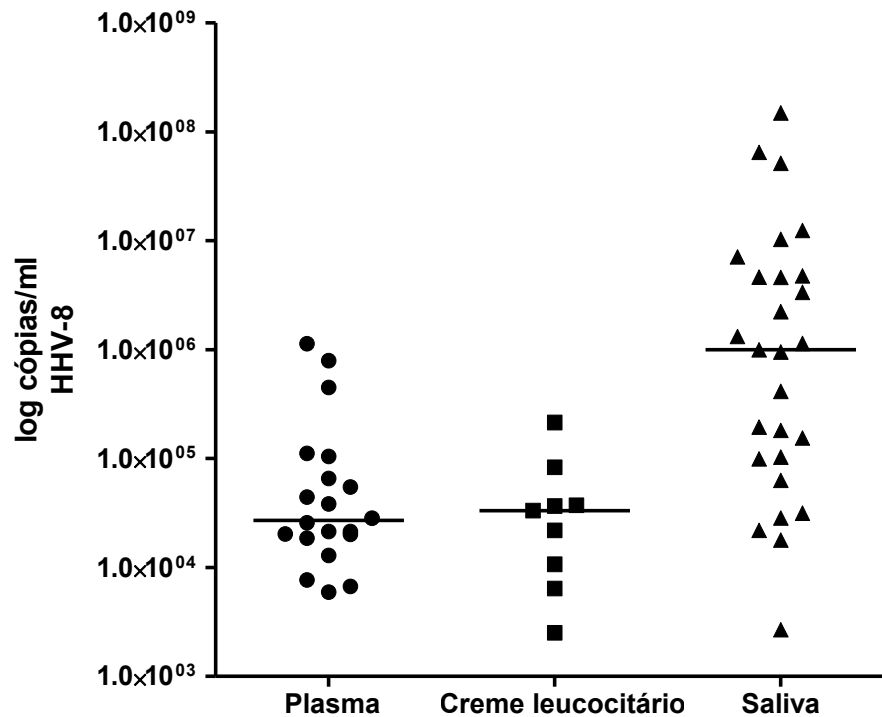
Ponto da Curva		ct	cópias/ml	log
<b>P6</b>	HHV-8	19.404	500000	6,7
<b>P7</b>	HHV-8	23.088	50000	5,7
<b>P8</b>	HHV-8	26.387	5000	4,7
<b>P9</b>	HHV-8	29.861	500	3,7
<b>P10</b>	HHV-8	33.268	50	2,7
<b>P11</b>	HHV-8	37.069	50	1,7
<b>C+BCBL</b>	HHV-8	28.020	17.567.033	7,2

O limite de detecção menor (LoD, ou *low detection*  $\geq 95\%$ ) do teste foi definido como 50 cópias/ml, dado que, quando testado em octaplicata, o P11 é amplificado em 100% de suas réplicas.

#### 4.2.2 Desempenho da saliva para detecção molecular do HHV-8

Um total de 100% das amostras tiveram seu DNA amplificável pelo controle interno na salivas do grupo não-SK e SK-aids; 96,1% foi viável no sangue do grupo com SK-aids, sendo a redução decorrente de duas amostras de sangue hemolisadas.

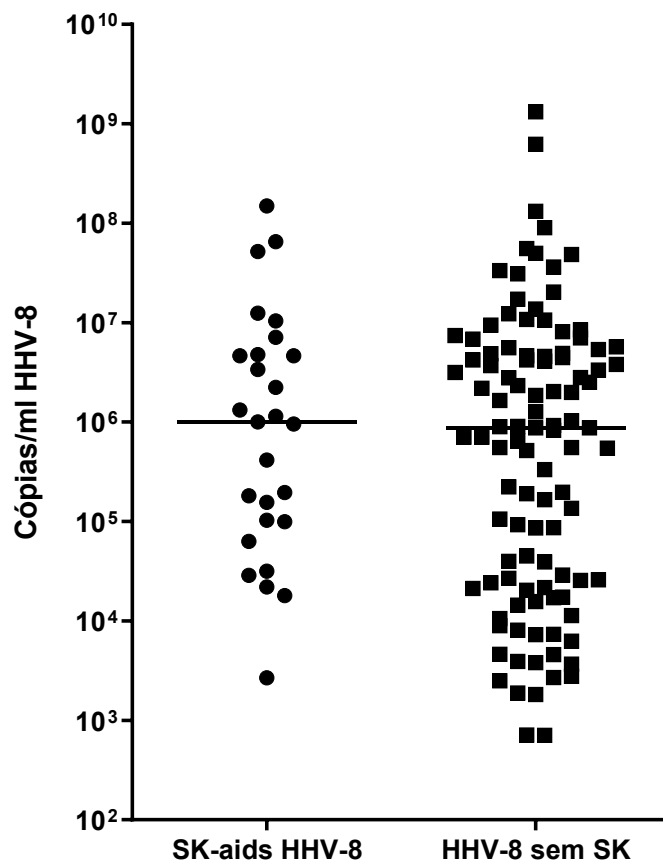
A mediana da carga viral por qPCR ORF73/HHV-8 nos diferentes fluidos biológicos (saliva, creme leucocitário e plasma) diferiu no grupo com SK-aids (Kruskall Wallis test,  $p=0.0001$ ). Verificamos maior carga viral na saliva do que no sangue ( $p > 0.05$ , plasma ou creme leucocitário). Nove (9) amostras foram positivas para DNA HHV-8 de forma concordante entre os fluidos. A frequência de DNA viral detectável foi de 37,2% (19/51), 18,0% (9/50), 63,4% (33/52), para plasma, buffy coat e saliva, respectivamente. Ao todo, 33/52 (63,4%) indivíduos com SK-aids foram positivos para DNA de HHV-8, considerando todos os fluidos biológicos analisados. A Fig.14 apresenta a distribuição dos títulos de HHV-8 em log cópias/ml nos três fluidos biológicos.



**Figura 14** - Distribuição da carga viral do HHV-8 em diferentes fluidos biológicos de indivíduos com sarcoma de Kaposi associado à aids. A mediana da carga viral foi significativamente diferente entre os 3 fluidos (Kruskal Wallis test,  $p=0.0001$ ). O título de HHV-8 na saliva foi maior do que do plasma (Mann Whitney test,  $p=0,0002$ ) e do buffy coat (Mann Whitney test,  $p=0,0019$ ).

#### 4.2.3 Detecção molecular de HHV-8 salivar de indivíduos vivendo com HIV/aids

A saliva foi o melhor fluido para a garantir melhor sensibilidade de detecção de HHV-8 por qPCR. Desta forma, as salivas disponíveis foram usadas para medir e comparar a carga viral do HHV-8 dos pacientes com e não-SK. Um total de 14,1% (105/640) salivas foram positivas para DNA de HHV-8 no grupo assintomático e 51,9% (27/52), no grupo SK-aids, significativamente com maior frequência no grupo SK-aids (Teste exato de Fisher,  $p<0,0001$ ). A mediana da carga viral não diferiu entre os grupos (Mann Whitney test,  $p=0,4429$ )(Fig. 15).

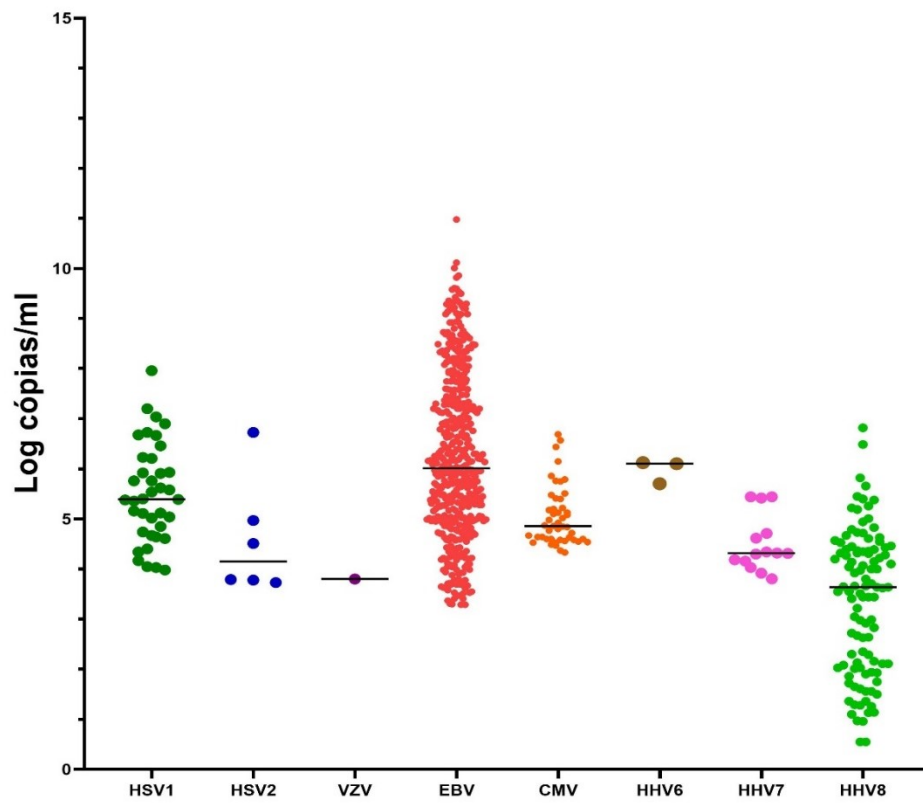


**Figura 15** - Distribuição da carga viral do HHV-8 entre os grupos HHV-8+ e não-SK) e HHV-8+ com SK-aids. A mediana do título de HHV-8 não diferiu entre os grupos (Mann Whitney test,  $p=0,4429$ ).

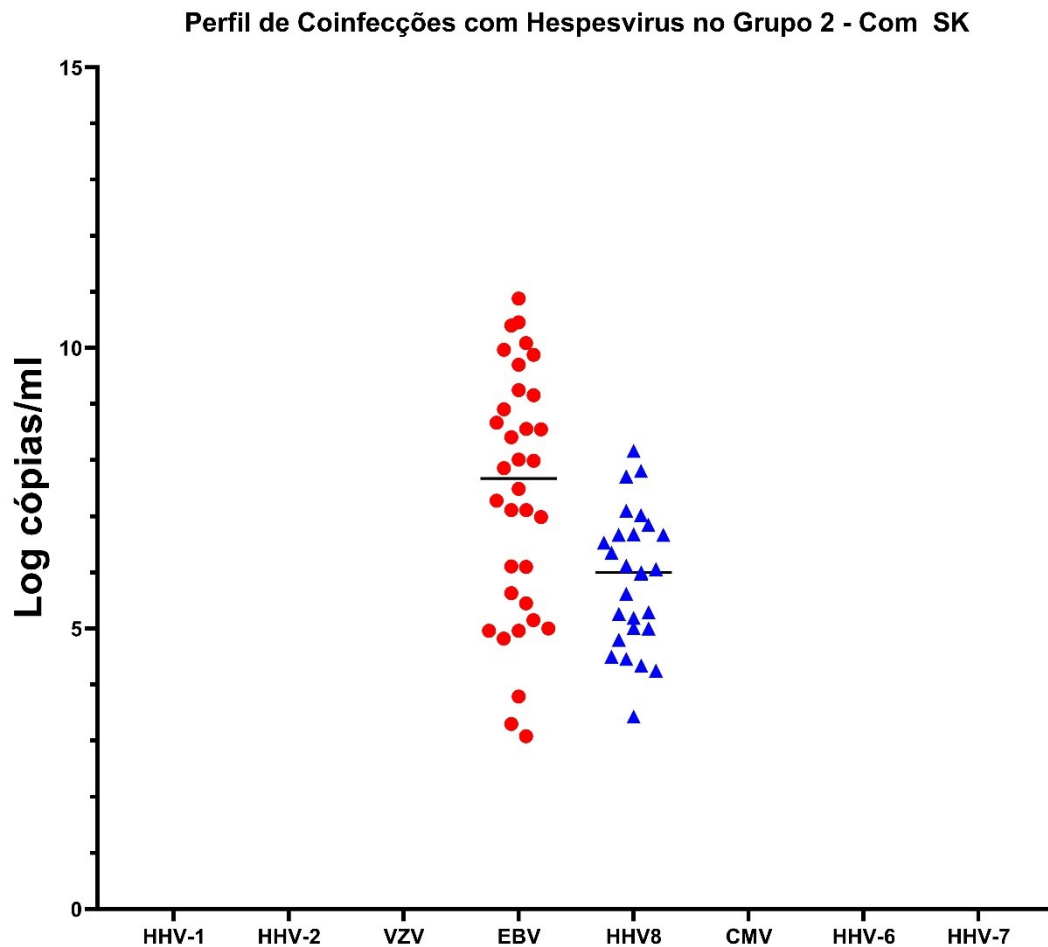
### 4.3 Perfil de coinfeção com os demais herpesvirus

Avaliamos a distribuição da carga viral dos 8 tipos de herpesvirus nas salivas disponíveis ( $n=640$ ) na reação de qPCR em tempo real multiplex e monoplex. A frequência do EBV salivar predominou em ambos os grupos, sendo a carga viral maior no grupo SK-aids do que nos indivíduos vivendo com HIV não-SK (Mann Whitney test,  $p>0,0001$ ). No grupo não-SK-aids, as frequências para os outros herpesvirus HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 e HHV-7 foram, respectivamente: 6,44%; 1,01%; 0,16%; 79,27%; 7,96%; 0,5% e 2,37%, e na Figura 16. Enquanto no grupo SK-aids, somente a excreção salivar de EBV foi detectável (51,9%), além do HHV-8, como representado na figura 17.





**Figura 16** - Distribuição da carga viral dos herpesvirus expressa em log de cópias/ml no grupo não-SK

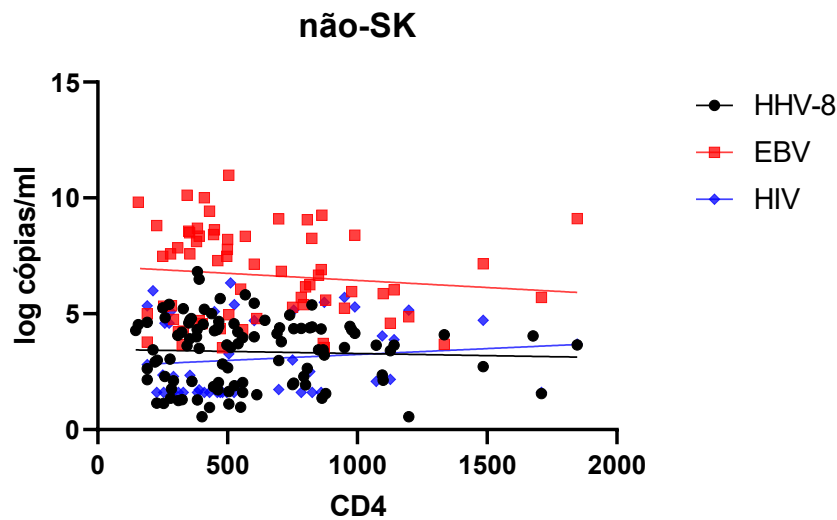


**Figura 17** - Distribuição da carga viral dos herpesvirus expressa em log de cópias/ml no grupo SK-aids

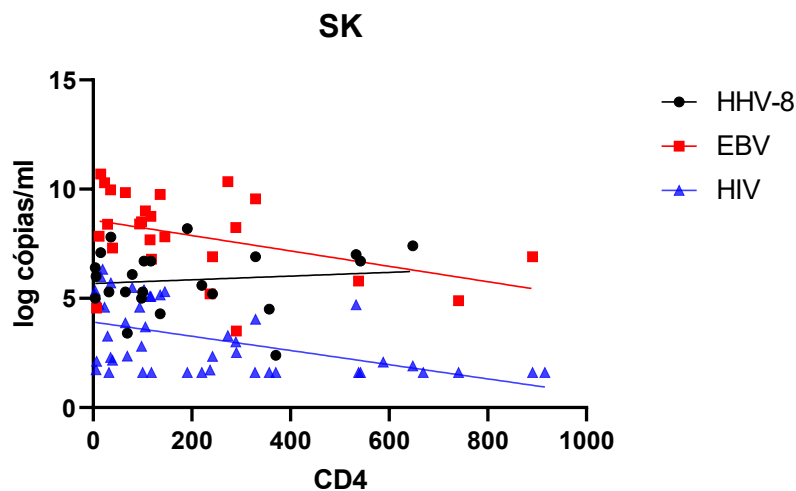
#### 4.3.1 Avaliação dos status imune (nível de CD4 e carga viral do HIV) em relação as cargas virais de EBV e HHV-8 na saliva

Avaliamos os títulos de DNA salivar para EBV (Grupo não-SK n=640; Grupo SK n=8) e HHV-8 (Grupo não-SK n=88; Grupo SK n=32) quanto à relação com os níveis de linfócitos T CD4 circulantes na data da coleta da saliva.

Observamos que os títulos de EBV salivar apresentaram correlação inversa com níveis de linfócitos T CD4 circulante em ambos os grupos, significativamente no grupo não-SK ( $p < 0,0001$  teste Spearman) (Fig.18 e Fig.19).



**Figura 18** – Não houve correlação títulos de HHV-8 ( $p=0,1955$ , Spearman teste), títulos de EBV ( $p=0,3509$ , Spearman teste), títulos de HIV ( $p=0,1750$ , Spearman teste) em relação aos níveis de CD4+ em indivíduos vivendo com HIV sob uso de ART e **não-SK**



**Figura 19** - Correlação inversa entre títulos de EBV (\*  $p=0,0370$ , Spearman teste) e HIV (\*  $p=0,0303$ , Spearman teste) na saliva em relação aos níveis de linfócitos T CD4+ circulante em indivíduos vivendo com HIV sob uso de ART e **SK-aids**. Não houve correlação entre níveis de CD4 e títulos de HHV-8 ( $p=0,3326$ , Spearman teste).

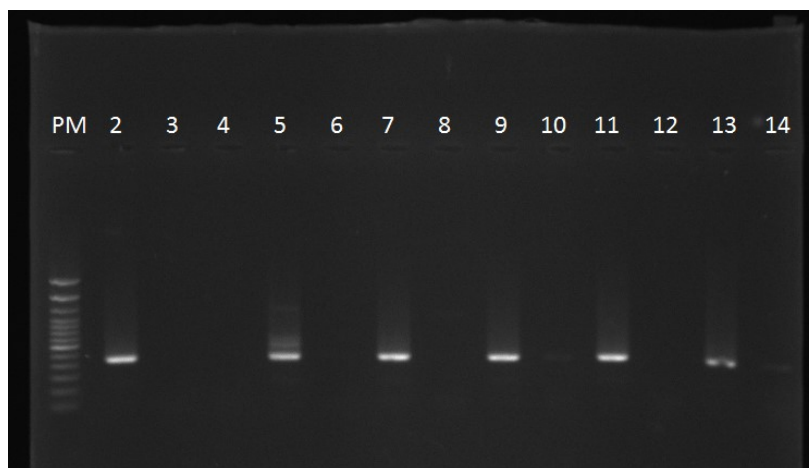
A mediana dos títulos de EBV foram significativamente maiores do que HHV-8 tanto no grupo com o tumor SK quanto no grupo não-SK ( $p=0,0029$  e  $p=0,0047$ , teste Mann Whitney), independente dos níveis de CD4. Os títulos de HHV-8

salivar não tiveram correlação com os níveis de CD4. Comparando a mediana dos títulos de EBV entre os grupos com e sem o tumor SK, observamos significativa diferença ( $p=0,0019$ , Mann Whitney test).

#### 4.4 Testes da ORF K12

A partir dos testes de detecção do HHV-8 nas amostras realizadas neste estudo, foram definidas as amostras que seriam testadas para o sequenciamento da ORF K12.

Nas figuras 20 e 21 estão as ilustrações das amostras do grupo SK-aids que foram selecionadas por serem positivas para a ORF 73 e nas colunas onde existe banda, estão as amostras onde a ORF K12 foi amplificada com sucesso.

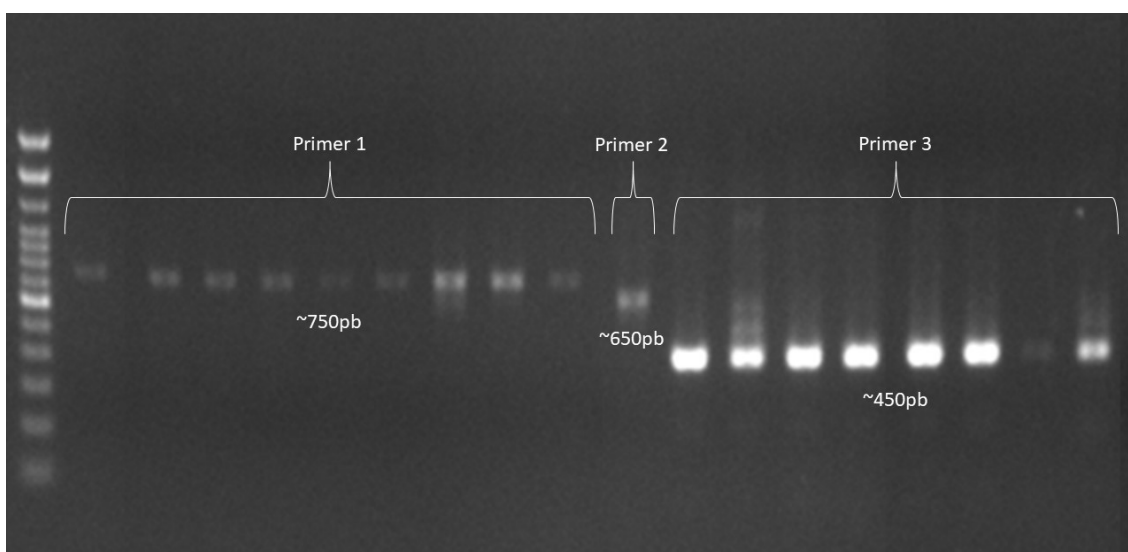


**Figura 20** – Eletroforese em gel 1,5% de agarose com padrão de referência da massa molecular e fragmento de 450 pb do produto de amplificação da ORF K12 do genoma do HHV-8 isolados da saliva de indivíduos com SK-aids. Note o rendimento de melhor qualidade do produto gerado.

#### 4.5 Otimização do sequenciamento da ORF K12

O DNA do HHV-8 foi detectado em 33 amostras de saliva do grupo SK-aids e em 105 amostras no grupo Não-SK. Dessas 138 amostras de DNA de HHV-8 salivar, 98 delas apresentaram fragmento gênico detectável em gel de agarose, sendo aquelas com Ct de 28 ou rendimento após purificação < 20 ng/μl não foram apropriadas para o sequenciamento com qualidade. Em conclusão, 50 seqüências de DNA de HHV-8 mostraram resultado satisfatório dos alvos analisados, sendo 32 amostras do grupo Não-SK e 18 amostras do grupo com SK-aids. O rendimento de seqüências consenso obtidas com carga viral e qualidade de leitura satisfatória foi de 51,5 (50/98).

**Figura 21** – Eletroforese em gel 1,5% de agarose, mostrando a migração dos diferentes fragmentos do genoma do HHV-8 amplificados por 3 pares de primers para cobrir a região a região codificadora de miRNA da ORF K12 (miRNA K12-12 e K12-10).





Foram sumarizados os SNPs encontrados na região da ORF K12, enfocando a região codificadora do miRNA 12-10a, com a sua distribuição (Tabela 7) e frequência dos SNPs na rc-miRNA do genoma viral entre os isolados de HHV-8 das amostras do estudo (n=50) e referências (n=96).

**Tabela 7** - Dados referentes a distribuição de SNPs ao longo das sequências de DNA de HHV-8 (ORF K12) de indivíduos com SK-aids, não-SK e sequências protótipas do genBank.

SÉRIE	REGIÃO	POSIÇÃO U75698	SNP	TOTAL	SK-aids n=18	NÃO-SK n=32	PROTÓTIPOS n=96
1		117393	A/G	10	0	4	6
2		117399	G/A	11	0	5	6
3		117441	G/T	17	1	5	11
4		117460	A/G	8	0	3	5
5		117478	C/G	22	2	3	17
6		117506	G/A	5	1	2	2
7		117526	G/C	47	3	10	34
8		117528	A/G	16	0	7	9
9		117554	C/A	14	0	7	7
10		117579	A/G	51	3	10	38
11		117581	A/G	25	3	3	19
12		117608	A/G	37	7	7	23
13		117638	T/C	51	3	11	37
14		117665	C/A	21	0	8	13
15		117671	G/A	16	0	8	8
16		117783	G/A	4	0	1	3
17		117860	C/T	46	3	11	32
18		117868	C/A/T	4	0	2	2
19		117883	A/G	12	0	1	11
20		117888	T/C	72	11	10	51
21		117910	T/C	60	3	12	45
22		117913	C/G	38	7	8	23
23		117942	T/G	23	3	3	17
24	mirK12-10a	117970	G/T	3	0	1	2
25	mirK12-10a	117987	A/G	13	0	1	12
26	mirK12-10a	117997	G/C	3	1	0	2
27	mirK12-10a	118002	A/C	17	1	0	16
28	mirK12-10a	118003	C/A	16	1	0	15
29	mirK12-10a	118012	G/A/C	42	4	8	30
30	mirK12-10a	118031	A/G	38	2	8	28

\* foram computados os SNPs com duas ou mais referências descritas no genBank.

A Tabela 8 apresenta as variáveis analisadas entre os indivíduos vivendo com HIV com SK-aids e não-SK, conforme a disponibilidade de dados e isolados de HHV-8 molecularmente caracterizados. As tabelas 9 e 10 apresentam a caracterização dos grupos de estudo dos indivíduos infectados por HIV, sem histórico de SK-aids (Tabela 9) e com SK-aids (Tabela 10) em relação à análise de SNPs nas sequências de DNA de isolados de HHV-8 e os dados clínicos laboratoriais e a figura 24 mostra a árvore filogenética construída a partir dos dados obtidos no estudo, utilizando o programa MEGA 11 em conjunto com o IQ-TREE ( <http://www.iqtree.org> - KALYAANAMOORTHY et al., 2017; MINH; NGUYEN; VON HAESELER, 2013; NGUYEN et al., 2015) utilizando o método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 repetições e usando o método de substituição Kimura-2-p.

O Anexo B apresenta o código das sequências de DNA de HHV-8 desse estudo no GenBank: OQ985001 a OQ985050, correspondente aos isolados de HHV-8 com sufixo NTN1 a NTN50, respectivamente

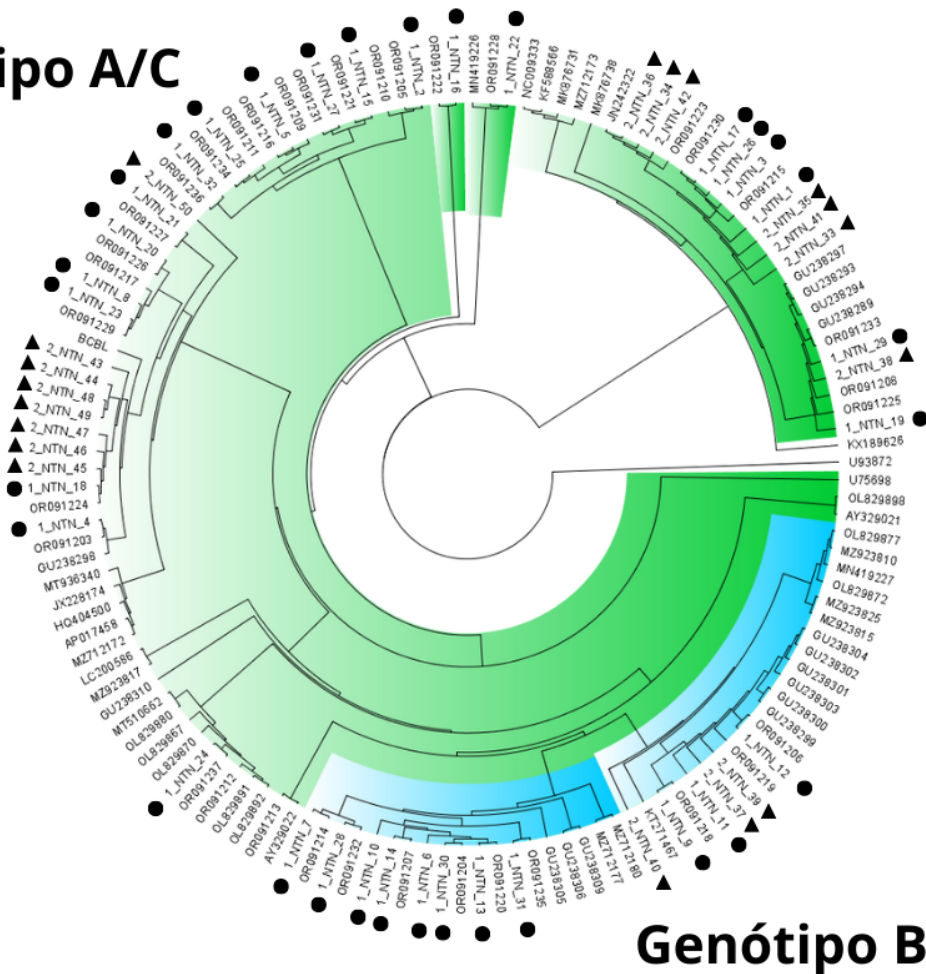


**Tabela 8** - Caracterização dos indivíduos dos grupos de estudo (não-SK e SK-aids) que apresentaram sequências de DNA de isolados de HHV-8 na saliva para a região da ORF K12, codificadora de miRNA.

Indivíduos vivendo com HIV	Não-SK n=32	SK-aids n=18
<b>VARIÁVEIS</b>		
Idade média, (min-max) anos	45 (28-62)	36,4 (21-62)
Cor branca (n,%)	24/32(75%)	12(66,6%)
Gênero masculino (n,%)	27/32 (84,3%)	18 (100%)
Tempo HIV média (max-min) anos	3,4 <sup>a</sup>	4,6 (0,1-17)
SK visceral (n,%)	0	14/18 (77,7)
SK não visceral (n,%)	0	4/18 (22,2)
Quimioterapia -média (max-min) anos	0	3,0 (0,1 a 17)
ARTc - média (min-max) anos	3,45 (3,12 a 4,43) <sup>a</sup>	4,6 (0,1 a 17)
CD4 -média (min-max) células/mm <sup>3</sup>	613 (350 a 1.608)	314,2 (6 a 902)
IgG Lana (n,%)	23/32 (71,8)	12/18 (66,6%)
IgG Lítico (n,%)	25/32 (78,1)	12/18 (66,6%)
Título HIV plasmático- média(log) (min-max)	1,69 (ind-1,69)	4,62 (ind- 4,82)
Título HHV-8 salivar- média(log) (min-max)	6,51 (4,20-9,12)	5,35 (6,66-4,25)
<b>Número de SNPs</b>		
Número de SNPs ORF K12 e taxa média <sup>b</sup>	159 (5,30)	59 (1,96)
ORF K12 genótipos B	10/32 (31,3%) <sup>c</sup>	3/18 (16,7) <sup>c</sup>
ORF K12 genótipo A/C	22/32 (68,7) <sup>d</sup>	15/18 (83,3) <sup>d</sup>

Minimo (min) e máximo (Max); n, número de casos; (<sup>a</sup>) dados disponíveis para 5/32 pacientes com solicitação da análise da carga viral de HIV no período de coleta de saliva dos indivíduos não-SK; o limite de detecção da carga viral do HIV foi de 1,69 log<sub>10</sub> cópias/ml ou < 50 cópias; ind (indetectável).(<sup>b</sup>)Taxa média de SNPs por indivíduo de cada grupo; (<sup>c</sup>) p=0,3281, genótipo B e não B, teste exato de Fisher; (<sup>d</sup>) genótipo A/C e não A/C, p= 0,3281, teste exato de Fisher)

## Genótipo A/C



▲ Grupo SK

● Grupo não-SK

**Figura 23** Genótipos A/C e B da análise da ORF K12 por reconstrução filogenética a partir das sequências de DNA de HHV-8 (rc-miRNA, ORF K12), sendo as obtidas nesse estudo (NTN) representadas em círculo (HIV e não SK) ou em triângulo (HIV e SK-aids). A nomenclatura do subtipo é consistente com aquela estabelecida para a região do gene KSHV K12/T0.7. A análise envolveu 50 sequências de nucleotídeos de amostras de estudo atuais e referências de sequências prototípicas do GenBank de genótipos já caracterizados previamente. O conjunto de dados final incluiu de ~400 a ~700 posições. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA 11 e no IQ-TREE (<http://www.iqtree.org>). Anexo B apresenta o código das sequências de DNA de HHV-8 desse estudo no GenBank: OQ985001 a OQ985050, correspondente aos isolados de HHV-8 com sufixo NTN1 a NTN50, respectivamente. Em Verde o genótipo A/C e em azul o genótipo B. colocar os parâmetros da árvore (Kimura 2-p.Bootstrap 1000 repetições).

## DISCUSSÃO

O estudo caracterizou uma população de indivíduos vivendo com HIV com e sem SK-aids sob o uso de ARTc com o propósito de conhecer a exposição a infecção por HHV-8 em cada um desses grupos, e especialmente identificar a presença e carga viral de HHV-8, com foco em avaliar polimorfismos na região da ORF K12 do seu genoma, uma região potencialmente importante biologicamente por codificar dois miRNAs que interferem no controle da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do tumor. Estudos em miRNAs de HHV-8 tem contribuído para o reconhecimento do seu papel na patogênese das neoplasias malignas em humanos, assim como a identificação de seus alvos e os desfechos de sua regulação (MARSHALL et al., 2018; QIN et al., 2017, 2012). As interações de miRNAs virais com as células tem permitido conhecer os efeitos funcionais da inibição de miRNAs de HHV-8. Finalmente, as abordagens terapêuticas tem sido potencialmente oferecidas para as neoplasias de etiologia viral com base no direcionamento de miRNAs (QIN et al., 2012).

Há um grande desafio nos estudos de detecção da infecção por HHV-8, visto que, ao contrário dos outros herpesvirus, este não tem distribuição ubíqua. Em países como o Brasil, a infecção do HHV-8 é agregada ao contexto do sarcoma de Kaposi associado a aids. Estudos ainda não foram concordantes em associar genótipos de HHV-8 baseado na região variável da ORF K1 e o desenvolvimento do sarcoma de Kaposi. Por isso, no presente estudo, focamos em verificar polimorfismos em uma região relativamente conservada denominada ORF K12 e com propriedades biológicas de impacto à tumorigênese, visto que estudos anteriores têm apontado a relação de SNPs nessa região interferindo em várias etapas do processo de produção de miRNA humanos e virais (MARSHALL et al., 2018).

Verificamos neste estudo uma frequência maior, em porcentagem, de anticorpos IgG anti-HHV-8 no grupo com histórico da manifestação do tumor vivendo com HIV, comparado aos indivíduos sem o SK-aids. Pauk et al., 2000 mostraram a baixa soroprevalência do vírus, mesmo em pacientes com lesões

do SK, entre 6% e 50%, a depender do status imunológico dos pacientes, e outros estudos corroboraram com essa evidência, tanto relacionado a fatores do hospedeiro como do vírus (de Souza et al., 2007). Diversas proteínas do HHV-8, como a RTA e a K3, promovem a evasão das células CD4+ e diminuem consideravelmente a ativação de linfócitos CD8+ (Broussard; Damania, 2020).

Em relação a detecção molecular do DNA do HHV-8, tem sido demonstrado que tanto nos Estados Unidos, Europa e igualmente na população não indígena brasileira, a prevalência do DNA viral em geral é baixa assim como a soroprevalência, embora alguns estudos ainda mostrem que em certas regiões, a positividade chegue a quase 30%, no estado brasileiro do Pará, por exemplo (NASCIMENTO et al., 2009). No entanto, a excreção salivar de HHV-8 é maior do que a viremia em indivíduos vivendo com SK-aids como pudemos verificar comparando sangue e saliva, reforçando o uso da saliva como um meio acessível na prática clínica para estudar biomarcadores. Isso também foi demonstrado nos trabalhos de Braz-Silva et al., 2017; De França et al., 2011; De Souza et al., 2007 e de Kourí et al., 2010.

O rendimento de obtenção de DNA viral é um grande entrave para os estudos moleculares envolvendo os herpesvirus, em especial o HHV-8, por isso nosso alvo se deteve em caracterizar uma região do genoma viral, que pudesse contribuir para o entendimento sobre um conjunto de biomarcadores de prognóstico do desenvolvimento do tumor. Em adição, a oportunidade de dispormos de saliva de indivíduos vivendo com HIV bem caracterizados quanto a presença do tumor, favoreceu a obtenção de uma casuística de 50 isolados de HHV-8 na saliva avaliados quanto a presença de SNPs na ORF K12. O trabalho de Kourí et al., 2010, em específico, testou simultaneamente os diferentes tecidos do tumor SK de pacientes HIV, chegando à conclusão de que o único tecido que demonstrou ter maior presença viral que a saliva vem do tecido lesionado.

A variabilidade intra-hospedeiro do HHV-8, que possa indicar a presença de genótipos diferentes no sangue e saliva, não parece ser algo comum entre os isolados virais do HHV-8, visto que é consistente o encontro do mesmo

genótipo em vários sítios do corpo do mesmo hospedeiro, como previamente (Zong et al., 1999, Kourí et al., 2010 e Marshall et al., 2018). Por isso, a seleção da saliva para detectar DNA de HHV-8 veio de encontro a possibilidade de proporcionar uma coleta acessível e não-invasiva, além de corroborar com outros estudos que apontaram que a presença significativa de excreção salivar dos herpesvirus e outros vírus na saliva, além de corroborar com outros estudos que apontaram uma significativa correlação da carga viral salivar com status imune dos pacientes em diferentes contextos, em relação a outros herpesvirus nos casos de transplantados e no contexto da COVID-19 (BATISTA et al., 2022; HONORATO et al., 2022; MENDES-CORREA et al., 2021).

No atual estudo foi possível otimizar um PCR em tempo real quantitativo que pode ser aplicado em larga escala para investigar a carga viral e presença do HHV-8 na saliva dos indivíduos vivendo com HIV, com uma sensibilidade analítica de 50 cópias por mL, por meio do emprego de uma curva padrão baseada em oligonucleotídeos sintéticos da ORF 73 do HHV-8. A experiência prévia do laboratório de virologia, confirma o desempenho da ORF 73 a partir de curva padrão com vetores plasmidiais (LEVI et al., 2011). Não há ainda um consenso na literatura sobre qual alvo do genoma viral seria mais eficiente em termos de sensibilidade, alguns dos sítios usados são: a ORF 22, como no estudo de (BIGGAR et al., 2000;), a ORF 26, como usada por Cordiali-Fei et al., 2015 e De França et al., 2011 LOPES et al., 2021; a ORF 73, usada neste estudo e no estudo de Krishnan et al., 2004, e a região da K6, usada por Marshall et al., 2010. No entanto, esses protocolos, assim como o aplicado aqui, também foram capazes de detectar a carga viral do HHV-8 na ausência de indicadores de exposição ao HHV-8 (IgG soronegativos para HHV-8), mesmo após longos anos de infecção por HIV. Verificamos a frequência de 3,9% e 57,1% de presença de HHV-8 na saliva entre os IgG soronegativos anti-HHV-8 sem e com SK-aids, respectivamente. Para a otimização de uma qPCR a partir da busca do vírus na saliva é importante também considerar os parâmetros de desempenho do teste, que sejam reprodutíveis e sensíveis, a fim de identificar aquelas amostras que poderão ter melhor chance de ter melhor rendimento nos posteriores estudos de sequenciamento de DNA viral, e sobretudo avaliar a relação de sua carga viral

com parâmetros de prognóstico ou o status imunológico no monitoramento dos pacientes. Não observamos relação da carga viral do HHV-8 e níveis de CD4+, mas a carga viral de EBV e HIV foi inversamente correlacionada aos níveis de CD4+ em indivíduos com SK-aids, levando-nos a hipótese de que alguma interferência ou sinergismo possa haver entre esses agentes (GRUFFAT; MANET, 2018). Em modelos experimentais essa hipótese parece ser viável, como proposto no trabalho de McHugh et al., 2017, em que foi analisado um sistema com camundongos sistematicamente infectados com HHV-8 e EBV, e um dos principais desfechos foi o aumento significativo na formação de tumores e diminuição da sobrevivência dos camundongos.

Observamos que nos grupos de pacientes com SK-aids, a coexcreção salivar de HHV-8 e EBV foi exclusiva, enquanto os não-SK apresentaram a frequência de outros herpesvirus, ainda que em frequência baixa (entre cerca de 2% a 10%). A ausência de outros herpesvirus na cavidade oral no grupo SK-aids pode refletir o efeito da interferência viral associada a presença de altas cargas virais dos gammaherpesvirus (EBV e HHV-8), mas existem poucos estudos que demonstram as relações entre o HHV-8 e os demais herpesvirus, com algumas das interações que ocorrem entre HHV-8, EBV, CMV e HHV-6 (MCHUGH et al., 2017; THAKKER; VERMA, 2016). Em populações holoendêmicas de malária, a exposição prolongada e precoce de EBV, parece resultar na maior frequência de linfoma de Burkitt nessa população, assim como de sarcoma de Kaposi (DAUD et al., 2015; MATAR et al., 2015). Ambos compartilham alvos muito próximos, os linfócitos B e monócitos, porém algumas proteínas de início do HHV-8 e do EBV (como a RTA do HHV-8 e a ZTA do EBV), por exemplo, podem, de fato, inibir o ciclo lítico de outros vírus, diminuindo ainda mais a chance de uma viremia positiva de outros herpesvirus em pacientes SK (THAKKER; VERMA, 2016). Estudos são necessários para esclarecer sobre o fenômeno exato promovido quando as células alvo dos vírus coincidem. Parece esperado que muitos cofatores virais, inclusive miRNAs virais e humanos, possam interferir. Outros cofatores foram avaliados neste estudo, tendo significativa relação como potenciais biomarcadores de status imune na saliva, como a presença de altos títulos de EBV, inversamente proporcional aos níveis de CD4 e diretamente

proporcionais aos níveis de HIV circulantes, que foram fatores especialmente observados no grupo SK-aids.

Ainda, o estudo atual foi capaz de descrever as características moleculares da ORF K12 de isolados de HHV-8, encontramos 524 SNPs em rc-miRNA nas 96 sequências de HHV-8 aleatoriamente investigadas do genBank e nas amostras do estudo, foram 59 SNPs nos grupo SK-aids e 159 no grupo não-SK. Dentre todos esses SNPs, somente 27 ocorreram na rc-miRNA K12-10a, e nenhum SNP significativo (encontrado em mais de uma sequência de DNA viral) ocorreu na rc-miRNA K12-12 (incluindo as referências do genBank), isso também é mostrado no trabalho de Marshall et al., 2018, em uma casuística de 24 indivíduos com SK ( 18 positivos para HIV) que provém de diferentes continentes.

O foco de investigar a sequência de nucleotídeos das fitas de DNA viral e não os miRNA diretamente veio da vantagem de analisar o DNA viral para a busca de SNPs visto que o DNA apresenta melhor viabilidade e estabilidade em relação às análises voltadas diretamente às moléculas de miRNAs, que são transcritos extremamente lábeis e pequenos. Tanto a estabilidade maior do DNA viral e a carga viral aumentada do HHV-8 na saliva foram fatores que ofereceram vantagens práticas e acessíveis em comparação às análises de moléculas de miRNA. Como citado por He et al., 2020 e Amaral et al., 2010, os miRNAs podem levar o controle de expressão de proteínas indutoras de diferentes fases de muitos tipos diferentes de cânceres. Dessa forma, identificar suas variações e posteriormente avaliar como repercutem na alteração de suas funções poderá contribuir futuramente para a pesquisa de biomarcadores na saliva para o prognóstico de tumores.

O miRNA k12-10a está relacionado à evasão imune e à oncogênese, enquanto que o miRNA k12-12 até o momento foi descrito interferindo na ativação lítica do HHV-8 (RAY et al., 2012). Os isolados de HHV-8 dos indivíduos vivendo com HIV deste estudo confirmaram os dados de outras regiões geográficas, em que a rc-miRNA K12-12 é caracteristicamente altamente conservada e que essa propriedade parece ser imprescindível para a

sobrevivência viral, inclusive por se tratar de uma região codificadora de miRNA interferindo no controle da latência e replicação do vírus, corroborando assim com os nossos resultados em que não se observou SNPs nessa região.

A filogenia baseada na região da ORF K12 possibilitou inferir sobre a circulação de isolados de HHV-8 dos genótipos A/C e B, conforme observado previamente em populações africanas, indígenas e vivendo com HIV (MARSHALL et al., 2010; WHITBY et al., 2004). Embora seja possível separar os genótipos A e C baseado na ORF K1, como feito por Marshall et al., 2018, e detectar tipos diferentes, F, Q e N (MARSHALL et al., 2007; RAY et al., 2012; WHITBY et al., 2004), a distância evolutiva entre o genótipo A e C não é suficientemente discriminada por meio da análise da região da ORF K12. Obtivemos uma reconstrução interessante na filogenia dos isolados de HHV-8 na saliva deste trabalho, pois no Grupo SK-aids, predominou o genótipo A/C (83,3%) em relação ao B (16,75%). Esse evento exige melhor atenção, a fim de que o genótipo A/C (ORF K12) possa ser mais amplamente investigado para avaliar seu papel como um biomarcador de desenvolvimento de SK. Em um estudo anterior no laboratório de Virologia, igualmente verificou-se, embora numa casuística restrita, uma baixa frequência de genótipo B do HHV-8 pela análise da ORF K1 entre aqueles casos de SK-aids e com desfecho de óbito (TOZETTO-MENDOZA et al., 2016).

Os dados que verificamos em relação aos genótipos A/C e B pela análise da ORF K12 em PVHIV vêm de encontro as observações dos padrões de divergência acumulados no genoma do HHV-8 durante a migração do homem moderno fora da África, que permitem identificar variantes genotípicas de HHV-8 localmente distribuídas. Na população brasileira pare haver a co-circulação de quase todos os genótipos de HHV-8, como esperado para uma população altamente miscigenada. A distribuição geográfica dos genótipos ou subtipos de HHV-8 levaram Hayward, 1999 a propor que um ancestral comum tenha surgido a mais de 100.000 anos e divergiu conforme as migrações do homem primitivo e subsequente isolamento e efeito fundador em populações restritas. Dessa forma, a primeira migração do homem através da África subsaariana começou a



100.000 anos, sendo o genótipo B o mais ancestral; a segunda migração dirigiu-se ao sul da Ásia, Austrália, Taiwan e ilhas do Pacífico há 60.000 – 70.000 anos (genótipo D); a terceira migração formou a separação do terceiro ramo para a Europa e norte da Ásia há 35.000 anos (genótipos A e C) com posterior expansão para as Américas (genótipo E) há cerca de 15.000 anos, e para o Norte da Europa há 10.000 anos atrás, no final da era do gelo (ZONG et al., 2002). estudos apontaram que os isolados de HHV-8 do subtipo B predominavam na África e foram filogeneticamente mais distantes do subtipo A e C, os quais foram encontrados em populações da Europa ou em europeus descendentes de americanos do norte (EUA), do que dos subtipos A e C entre si (COOK et al., 1999; FOUCHARD et al., 2000; HAYWARD, 1999; KADYROVA et al., 2003; POOLE et al., 1999; WHITE et al., 2008; ZONG et al., 1999).

Desde 1996 até o momento, os descritores KSHV e HHV-8 chamam cerca de 7.374 publicações no PUBMED e de acordo com o genBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, acesso em 10/05/2023), há menos de 4.700 sequências de DNA de HHV-8 descritas. Os estudos sobre o HHV-8, quando comparados com outros herpesvirus são mais escassos (buscar por EBV no PUBMED retorna 30.324 resultados), considerando a dificuldade de detectar o vírus ou pela baixa prevalência do DNA viral na população geral. Contudo, é importante que as características moleculares do vírus sejam decifradas, mesmo diante de seu complexo e amplo genoma, justamente para compor ferramentas de prognóstico sobre o risco de desenvolvimento do SK em portadores de HHV-8.

O herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi (KS) (KSHV/HHV-8) foi sequenciado pela primeira vez a partir da linhagem celular de linfoma da cavidade corporal (BC), BC-1, em 1996. Poucos outros genomas de HHV-8 completos, devido ser altamente complexo de 137,9 kb, foram descritos até o momento. De fato, nosso conhecimento de sua variabilidade genética permanece irregular. No genBank estão armazenados os dados inferiores a 5.000 sequências de DNA de HHV-8, principalmente de genomas parciais de HHV-8, com a menor registrada medindo 97pb, e são feitas a partir de amostras

históricas de pacientes de diferentes partes do mundo, isoladas a partir de biópsias de SK ou de reproduções do vírus em linhagens celulares específicas para isolar determinados genes do HHV-8. Em pesquisa simples, encontram-se somente 45 genomas denominados completos do HHV-8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em maio, 2023).

Vale ressaltar algumas limitações do estudo. Houve um número limitado de isolados de HHV-8 que puderam ser sequenciados com qualidade para que as comparações entre SK e não SK fossem apropriadas. Ainda, houve uma restrição de dados em relação aos indivíduos vivendo com HIV sem SK em que não foi possível confirmar a carga viral indetectável e níveis de CD4 no período da coleta em uma proporção de casos, reduzindo a casuística para análise desses cofatores nesse grupo. Uma coleta e análise longitudinal poderiam favorecer uma maior detecção viral desde que a excreção de HHV-8, assim como de outros herpesvirus é intermitente, de modo que essa alternativa poderia aumentar a chance de detecção viral.

Uma outra limitação para a caracterização molecular do HHV-8 nesse estudo foi a reduzida capacidade do método de gerar sequências maiores de 1kb, o que nos limitou a estudar a região codificadora de miRNA entre 400 e 700 pb num protocolo dependendo de três pares de *primers* e Nested PCR. A região completa codificadora de miRNA tem cerca de 3,0 kb, e a análise completa de SNPs nessa região poderia trazer maior número de dados para as comparações. Supomos que as análises por sequenciamento de nova geração (SNG) do HHV-8 teria maior potencial para sequenciamento de amplicons mais longos e contribuir para gerar maior número de dados, visto que o atual entrave para a entender a relação das variações virais e a virulência está relacionado ao número limitado de sequências e o tamanho delas em relação ao genoma do HHV-8 depositadas no genBank. A vantagem importante do SNG em relação ao nosso protocolo seria o uso de uma reação PCR multiplex ou *shotgun* dispensando o uso de *Nested* PCR individuais. No entanto, o custo do sequenciamento de nova geração é ainda considerado alto (100 dólares por amostra). Protocolos adaptados de SNG em nosso meio têm apresentado alta cobertura para se obter

uma sequência consenso com acurácia de aproximadamente 99%. Dados obtidos em estudos do genoma de quase completo (~197 kb) do vírus Monkeypox tem aberto essa perspectiva (CLARO et al., 2022).

## CONCLUSÃO

Em conclusão, a comparação da sensibilidade de detecção de HHV-8 na saliva foi superior comparada à do sangue, de modo que pudemos caracterizar os sítios polimórficos e os conservados nas regiões codificadoras de miRNA de isolados de HHV-8 salivar da ORF K12. O método de q PCR ORF 73 foi uma ferramenta útil para análise de um grande número de amostras para análise de sua carga viral e para seleção de DNA de HHV-8 positivos e, conseqüentemente posterior caracterização molecular. O genótipo A/C da ORF K12 foi predominante entre os isolados virais de HHV-8, especialmente no grupo SK-aids. O perfil de SNPs foi diferente entre os grupos com e sem SK na região codificante do miRNA K12-10a. Outros cofatores foram significativamente presentes sendo observados como potenciais marcadores de status imune, como correlação dos títulos de EBV salivar e HIV plasmático relacionados inversamente aos níveis de CD4+ circulante, especialmente entre os indivíduos infectados por HIV com SK-aids.

## ANEXOS

## ANEXO A

**Código e classificação das sequências da ORF K12 do genoma do HHV-8 obtidas dos 50 isolados de HHV-8 na saliva de indivíduos vivendo com HIV analisadas no atual estudo e depositadas no genBank**

não-SK		Orf K12	SK-aids	Orf K12	
NTN1	OQ985001	A/C	NTN33	OQ985033	A/C
NTN2	OQ985002	A/C	NTN34	OQ985034	A/C
NTN3	OQ985003	A/C	NTN35	OQ985035	A/C
NTN4	OQ985004	A/C	NTN36	OQ985036	A/C
NTN5	OQ985005	A/C	NTN37	OQ985037	B
NTN6	OQ985006	B	NTN38	OQ985038	A/C
NTN7	OQ985007	B	NTN39	OQ985039	B
NTN8	OQ985008	A/C	NTN40	OQ985040	B
NTN9	OQ985009	B	NTN41	OQ985041	A/C
NTN10	OQ985010	B	NTN42	OQ985042	A/C
NTN11	OQ985011	B	NTN43	OQ985043	A/C
NTN12	OQ985012	B	NTN44	OQ985044	A/C
NTN13	OQ985013	B	NTN45	OQ985045	A/C
NTN14	OQ985014	B	NTN46	OQ985046	A/C
NTN15	OQ985015	A/C	NTN47	OQ985047	A/C
NTN16	OQ985016	A/C	NTN48	OQ985048	A/C
NTN17	OQ985017	A/C	NTN49	OQ985049	A/C
NTN18	OQ985018	A/C	NTN50	OQ985050	A/C
NTN19	OQ985019	A/C			
NTN20	OQ985020	A/C			
NTN21	OQ985021	A/C			
NTN22	OQ985022	A/C			
NTN23	OQ985023	A/C			
NTN24	OQ985024	A/C			
NTN25	OQ985025	A/C			
NTN26	OQ985026	A/C			
NTN27	OQ985027	A/C			
NTN28	OQ985028	B			
NTN29	OQ985029	A/C			
NTN30	OQ985030	B			
NTN31	OQ985031	B			
NTN32	OQ985032	A/C			

Número de submissão: BankIt 2702689

## ANEXO B

## Lista de referências usadas na produção da filogenia

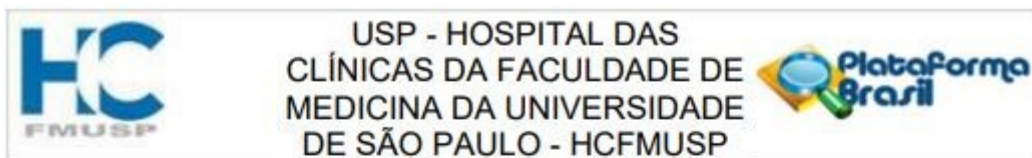
Taxid	nº de acesso	Taxid	nº de acesso	Taxid	nº de acesso
37296	AP017458.1	37296	MT510653.2	37296	OL829888.1
37296	GQ994935.1	37296	MT510658.2	37296	OL829891.1
37296	HQ404500.1	37296	MT510659.2	37296	OL829892.1
37296	JQ619843.1	37296	MT510660.2	37296	OL829893.1
37296	JX228174.1	37296	MT510661.2	37296	OL829894.1
37296	KF588566.1	37296	MT510662.2	37296	OL829895.1
37296	KT271455.1	37296	MT510670.2	37296	OL829896.1
37296	KT271456.1	37296	MT936340.2	37296	OL829897.1
37296	KT271467.1	37296	MZ712172.1	37296	OL829898.1
32630	KX189626.1	37296	MZ712173.1	2708202	OR091203
32630	KX189627.1	37296	MZ712174.1	2708202	OR091204
32630	KX189628.1	37296	MZ712175.1	2708202	OR091205
32630	KX189629.1	37296	MZ712176.1	2708202	OR091206
32630	KY246443.1	37296	MZ712177.1	2708202	OR091207
32630	KY246444.1	37296	MZ712180.1	2708202	OR091208
37296	LC200586.1	37296	MZ712181.1	2708202	OR091209
37296	LC200587.1	37296	MZ712183.1	2708202	OR091210
37296	LC200588.1	37296	MZ712184.1	2708202	OR091211
37296	LC200589.1	37296	MZ712185.1	2708202	OR091212
37296	MK143395.1	37296	MZ923810.1	2708202	OR091213
32630	MK208323.1	37296	MZ923811.1	2708202	OR091214
32630	MK497257.1	37296	MZ923813.1	2708202	OR091215
37296	MK733606.1	37296	MZ923817.1	2708202	OR091216
37296	MK733607.1	37296	MZ923821.1	2708202	OR091217
37296	MK733608.1	37296	MZ923822.1	2708202	OR091218
37296	MK733609.1	37296	MZ923823.1	2708202	OR091219
37296	MK876731.1	37296	MZ923824.1	2708202	OR091220
37296	MK876733.1	37296	NC009333.1	2708202	OR091221
37296	MK876737.1	37296	OL829860.1	2708202	OR091222
37296	MK876738.1	37296	OL829861.1	2708202	OR091223
37296	MN419219.1	37296	OL829865.1	2708202	OR091224
37296	MN419220.1	37296	OL829866.1	2708202	OR091225
37296	MN419221.1	37296	OL829867.1	2708202	OR091226
37296	MN419222.1	37296	OL829868.1	2708202	OR091227
37296	MN419223.1	37296	OL829869.1	2708202	OR091228
37296	MN419224.1	37296	OL829870.1	2708202	OR091229
37296	MN419225.1	37296	OL829871.1	2708202	OR091230
37296	MN419226.1	37296	OL829872.1	2708202	OR091231

<b>Taxid</b>	<b>nº de acesso</b>	<b>Taxid</b>	<b>nº de acesso</b>	<b>Taxid</b>	<b>nº de acesso</b>
37296	MN419227.1	37296	OL829874.1	2708202	OR091232
32630	MN688631.1	37296	OL829876.1	2708202	OR091233
37296	MN752405.1	37296	OL829877.1	2708202	OR091234
37296	MT510649.2	37296	OL829880.1	2708202	OR091235
37296	MT510650.2	37296	OL829881.1	2708202	OR091236
37296	MT510651.2	37296	OL829882.1	2708202	OR091237
37296	MT510652.2	37296	OL829883.1	435895	U75698.1
				37296	U93872.2

**Anexo C**

**Parecer Consubstanciado do CEP**





## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Comparação da variabilidade do Herpesvírus Humano do tipo 8 (HHV-8) entre grupos de indivíduos infectados por HIV sem e com Sarcoma de Kaposi associado à AIDS.

**Pesquisador:** Tania Regina Tozetto Mendoza

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 55771116.0.1001.0065

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.156.229

#### Apresentação do Projeto:

Nova Emenda (4) foi encaminhada

#### Objetivo da Pesquisa:

Visa incluir o aluno Natan Ponzoni Galvani de Oliveira em programa de pós graduação com o título Comparação da variabilidade do Herpesvírus Humano do tipo 8 (HHV-8) entre grupos de indivíduos infectados por HIV sem e com Sarcoma de Kaposi associado à AIDS, que é o mesmo já registrado

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A inclusão foi justificada e é regular

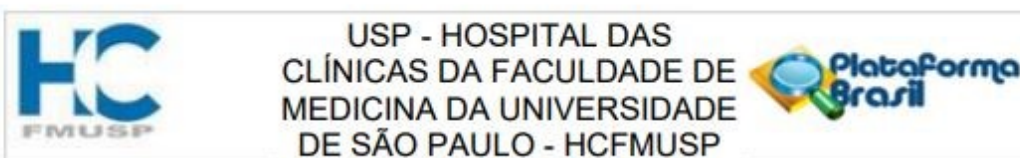
#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

#### Recomendações:

Não há

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.156.229

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

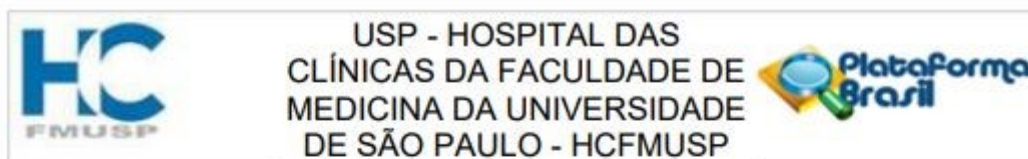
Não há pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_185965_4_E4.pdf	06/12/2021 12:05:54		Aceito
Outros	pdfemenda4mestrado.pdf	06/12/2021 12:03:36	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	emenda4mestrado.doc	17/11/2021 09:39:12	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	formulario.pdf	14/10/2021 14:20:44	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	relatorioparcial.docx	14/10/2021 14:18:33	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	EmendaTTV.docx	14/10/2021 14:13:48	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Parecer Anterior	pareceranterior2470526_E1.pdf	04/06/2018 16:05:42	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	pdfemenda.pdf	04/06/2018 16:04:48	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	070616respostaaoparecer.docx	14/06/2016 16:37:35	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	v1DispensaTCLE.docx	14/06/2016 14:23:13	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensaTCLE.pdf	13/06/2016 16:10:58	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Declaração do Patrocinador	anuenciapatroc.pdf	13/06/2016 16:09:44	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrut.doc	28/04/2016 09:09:16	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Folha de Rosto	folharostohv8.pdf	26/04/2016 10:09:03	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pdf2016TozettoMendoza.pdf	07/04/2016 10:15:09	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.156.229

Brochura Pesquisa	pdfmicroRNA0504cas.pdf	05/04/2016 16:46:57	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo3tcle.pdf	05/04/2016 14:37:58	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Orçamento	Anexo1provisao.pdf	05/04/2016 14:36:12	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Cronograma	Quadro1cronogramasnps.pdf	05/04/2016 14:32:45	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 09 de Dezembro de 2021

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar      **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585      **Fax:** (11)2661-7585      **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## REFERÊNCIAS

ABEND, J. R.; ULDRICK, T.; ZIEGELBAUER, J. M. Regulation of Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Receptor Protein (TWEAKR) Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Prevents TWEAK-Induced Apoptosis and Inflammatory Cytokine Expression. **Journal of Virology**, v. 84, n. 23, p. 12139–12151, dez. 2010.

ABLASHI, D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. **Archives of virology**, v. 159, n. 5, p. 863–870, maio 2014.

ADLAND, E. et al. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1016, 24 set. 2015.

AMARAL, B. A. DO et al. MicroRNAs: biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 9, n. 2, p. 105–109, jun. 2010.

BATISTA, A. M. et al. Quantification of torque teno virus (TTV) DNA in saliva and plasma samples in patients at short time before and after kidney transplantation. **Journal of Oral Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 2008140, 2022.

BEYARI, M. M. et al. Multiple Human Herpesvirus–8 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 5, p. 678–689, set. 2003.

BIGGAR, R. J. et al. Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: A Hyperendemic Population with a New Subtype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1562–1568, maio 2000.

BLACKBOURN, D. J. et al. Human Herpesvirus 8 Detection in Nasal Secretions and Saliva. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 213–216, 1 jan. 1998.

BORALEVI, F. et al. Study of Human Herpesvirus 8 (HHV8) Variants from Kaposi's Sarcoma in France: Is GGV-8 Subtype A Responsible for More Aggressive Tumors? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 1546, n. 7, p. 178–178, 1998.

BORGES, J. D. et al. Transmission of human herpesvirus type 8 infection within families in American indigenous populations from the Brazilian Amazon. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 12, p. 1869–1876, jun. 2012.

BOSHOFF, C. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. **Nature Medicine**, v. 1, n. 12, p. 1274–1278, dez. 1995.

BRAZ-SILVA, P. H. et al. Prospective study of human herpesvirus 8 oral shedding, viremia, and serological status among human immunodeficiency virus

seropositive and seronegative individuals in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1384287, 15 out. 2017.

BROUSSARD, G.; DAMANIA, B. KSHV: Immune Modulation and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 3084, 7 fev. 2020.

CAI, B. Z.; PAN, Z. W.; LU, Y. J. The Roles of MicroRNAs in Heart Diseases: A Novel Important Regulator. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 407–411, 2010.

CAI, X. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5570–5575, mar. 2005.

CANNON, M.; PHILPOTT, N. J.; CESARMAN, E. The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus G Protein-Coupled Receptor Has Broad Signaling Effects in Primary Effusion Lymphoma Cells. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 57–67, jan. 2003.

CASPER, C. et al. HIV Infection and Human Herpesvirus-8 Oral Shedding Among Men Who Have Sex with Men. **Journal of acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 35, n. 3, p. 233–238, mar. 2004.

CASPER, C. et al. Frequent and Asymptomatic Oropharyngeal Shedding of Human Herpesvirus 8 among Immunocompetent Men. **The journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 1, p. 30–36, nov. 2007.

CATERINO-DE-ARAUJO, A. Human Herpesvirus 8 Group B and C Variants Circulating in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 4, p. 1136–1137, abr. 1998.

CESARMAN, E. et al. Kaposi sarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 9, dez. 2019.

CHABAY, P. et al. Lymphotropic Viruses EBV, KSHV and HTLV in Latin America: Epidemiology and Associated Malignancies. A Literature-Based Study by the RIAL-CYTED. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2166, 4 ago. 2020.

CHANG, Y. et al. Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. **Science**, v. 266, n. 5192, p. 1865–1869, 16 dez. 1994.

CHANG, Y. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in Africa. Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. **Archives of Internal Medicine**, v. 156, n. 2, p. 202–204, 22 jan. 1996.

CHOI, H. S. et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Induces the Oncogenic miR-17-92 Cluster and Down-Regulates TGF- $\beta$  Signaling. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 11, 6 nov. 2015.

CHOKUNONGA, E. et al. Trends in the incidence of cancer in the black population of Harare, Zimbabwe 1991–2010. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 3, p. 721–729, 2013.

CLARO, I. M. et al. Shotgun metagenomic sequencing of the first case of monkeypox virus in Brazil, 2022. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. 48, 20 jun. 2022.

COOK, P. M. et al. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. **AIDS**, v. 13, n. 10, p. 1165-1176, 9 jul. 1999.

CORDIALI-FEI, P. et al. Analysis of the ORFK1 hypervariable regions reveal distinct HHV-8 clustering in Kaposi's sarcoma and non-Kaposi's cases. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, 2015.

DAI, X. et al. Structure and mutagenesis reveal essential capsid protein interactions for KSHV replication. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 521–525, jan. 2018.

DAUD, I. I. et al. Plasmodium falciparum infection is associated with Epstein-Barr virus reactivation in pregnant women living in malaria holoendemic area of Western Kenya. **Maternal and Child Health Journal**, v. 19, n. 3, p. 606–614, mar. 2015.

DE FRANÇA, T. R. T. et al. Salivary shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 1, p. 97–102, 2011.

DE SOUZA, V. A. U. F. et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon Region. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 6, p. 844–852, set. 2007.

DEDICAT, M. et al. Mother-to-Child Transmission of Human Herpesvirus-8 in South Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 6, p. 1068–1075, 15 set. 2004.

DEL MISTRO, A. et al. Oral Human Papillomavirus and Human Herpesvirus-8 Infections Among Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Men and Women in Italy. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 39, n. 11, p. 894, nov. 2012.

DENIS, D. et al. A fifth subtype of Kaposi's sarcoma, classic Kaposi's sarcoma in men who have sex with men: a cohort study in Paris. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 8, p. 1377–1384, ago. 2018.

DI ALBERTI, L. et al. Human herpesvirus 8 variants in sarcoid tissues. **The Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1655–1661, 6 dez. 1997.

DUPIN, N. et al. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. **The Lancet**, v. 345, n. 8952, p. 761–762, 25 mar. 1995.

DUUS, K. M. et al. Wild-Type Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Isolated from the Oropharynx of Immune-Competent Individuals Has Tropism for Cultured Oral Epithelial Cells. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 4074–4084, abr. 2004.

EDELMAN, D. C. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. **Virology Journal**, v. 2, 2 set. 2005.

ELFORD, J.; MCDONALD, A.; KALDOR, J. Kaposi's sarcoma as a sexually transmissible infection: an analysis of Australian AIDS surveillance data. The National HIV Surveillance Committee. **AIDS**, v. 7, n. 12, p. 1667–1671, 1993.

EMERY, S. L. et al. Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 311–316, fev. 2004.

FELLNER, M. D. et al. Duplex realtime PCR method for Epstein-Barr virus and human DNA quantification: Its application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 271–280, 2014.

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

FERREIRA, S. et al. Human herpesvirus type 8 among Brazilian blood donors. **Transfusion**, v. 43, n. 12, p. 1764–1765, 2003.

FOUCHARD, N. et al. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. **07/01/2000**, International Journal of Cancer. v. 85, n. 2, p. 166–170, 15 jan. 2000.

FRANCÈS, C. et al. The Impact of Preexisting or Acquired Kaposi Sarcoma Herpesvirus Infection in Kidney Transplant Recipients on Morbidity and Survival. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 11, p. 2580–2586, nov. 2009.

GANDHI, M. et al. Prevalence of Human Herpesvirus-8 Salivary Shedding in HIV Increases with CD4 Count. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 8, p. 639–643, 1 ago. 2004.

GOTTWEIN, E.; CAI, X.; CULLEN, B. R. A Novel Assay for Viral MicroRNA Function Identifies a Single Nucleotide Polymorphism That Affects Drosha Processing. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5321–5326, jun. 2006.

GRABAR, S.; COSTAGLIOLA, D. Epidemiology of Kaposi's Sarcoma. **Cancers**, v. 13, n. 22, 14 nov. 2021.

GRUFFAT, H.; MANET, E. Co-infection EBV/KSHV. **Medecine/Sciences**, v. 34, n. 1, p. 79–82, jan. 2018.

HAECKER, I.; RENNE, R. HITS-CLIP and PAR-CLIP advance viral miRNA targetome analysis. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 24, n. 2, p. 101–116, 2014.

HAN, S.-J. et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Single-Nucleotide Polymorphisms Identified in Clinical Samples Can Affect MicroRNA Processing, Level of Expression, and Silencing Activity. **Journal of Virology**, v. 87, n. 22, p. 12237–12248, nov. 2013.

HAYWARD, G. S. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 3, p. 187–199, 1 jun. 1999.

HE, B. et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 14, p. 2628–2647, 19 jul. 2020.

HERMANS, P. et al. Epidemiology of AIDS-related Kaposi's sarcoma in europe over 10 years. **AIDS**, v. 10, n. 8, p. 911–917, 1996.

HONG, A.; LEE, C. S. Timely topic the emerging role of the human herpesvirus 8 (HHV8) in human neoplasia. **Pathology**, v. 33, n. 4, p. 461–468, 2001.

HONORATO, L. et al. The Torque Teno Virus Titer in Saliva Reflects the Level of Circulating CD4+ T Lymphocytes and HIV in Individuals Undergoing Antiretroviral Maintenance Therapy. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 14 jan. 2022.

HULANIUK, M. L. et al. A simple and rapid approach for human herpesvirus type 8 subtype characterization using single base extension. **Letters in Applied Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 308–317, set. 2021.

HUSSEIN, H. A. M. et al. miRNAs and their roles in KSHV pathogenesis. **Virus Research**, v. 266, p. 15–24, jun. 2019.

HYMES, KENNETHB. et al. KAPOSI'S SARCOMA IN HOMOSEXUAL MEN—A REPORT OF EIGHT CASES. **The Lancet**, v. 318, n. 8247, p. 598–600, set. 1981.

ISHAK, M. D. O. G. et al. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1537–1544, out. 2007.

KADYROVA, E. et al. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 4, p. 548–556, 2003.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017.



KARASS, M. et al. Kaposi Sarcoma Inflammatory Cytokine Syndrome (KICS): A Rare but Potentially Treatable Condition. **The Oncologist**, v. 22, n. 5, p. 623–625, maio 2017.

KING, C. A. et al. STAT3 Regulates Lytic Activation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11347–11355, 2 set. 2015.

KLEER, M. et al. A Panel of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Mutants in the Polycistronic Kapsin Locus for Precise Analysis of Individual Protein Products. **Journal of Virology**, v. 96, n. 5, mar. 2022.

KOELLE, D. M. et al. Frequent Detection of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) DNA in Saliva of Human Immunodeficiency Virus-Infected Men: Clinical and Immunologic Correlates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 94–102, 1 jul. 1997.

KOURI, V. et al. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts. **Virology**, v. 337, n. 2, p. 297–303, jul. 2005.

KOURÍ, V. et al. Simultaneous quantification of human herpesvirus 8 DNA by real time PCR in different tissues of HIV infected cuban patients with Kaposi's sarcoma. **Herpesviridae**, v. 1, p. 3, 7 dez. 2010.

KRISHNAN, H. H. et al. Concurrent Expression of Latent and a Limited Number of Lytic Genes with Immune Modulation and Antiapoptotic Function by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Early during Infection of Primary Endothelial and Fibroblast Cells and Subsequent Decline of Lytic Gene Expression. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3601–3620, abr. 2004.

LADUCA, J. R. et al. Detection of Human Herpesvirus 8 DNA Sequences in Tissues and Bodily Fluids. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 6, p. 1610–1615, dez. 1998.

LAMPINEN, T. M. et al. Detection of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Oral and Genital Secretions of Zimbabwean Women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1785–1790, maio 2000.

LEÃO, J. C. et al. Herpes vírus humano-8 e Sarcoma de Kaposi. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 55–62, mar. 1999.

LEAO, J. C. et al. Intrahost genetic variability of human herpes virus-8. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 4, p. 636–645, abr. 2013.

LEBBÉ, C.; LEGENDRE, C.; FRANCÈS, C. Kaposi sarcoma in transplantation. **Transplantation Reviews**, v. 22, n. 4, p. 252–261, 1 out. 2008.

LEVI, J. E. et al. Non-Detection of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-Seropositive Blood Donors from Three Brazilian Regions. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 8 ago. 2011.

LIMA, L. R. P. et al. Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): Use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 220–223, mar. 2017.

LOPES, A. DE O. et al. Update of the global distribution of human gammaherpesvirus 8 genotypes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, dez. 2021.

LU, C. et al. Human Herpesvirus 6 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 1, p. 173–183, jan. 2005.

LU, F. et al. Epigenetic Regulation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency by Virus-Encoded MicroRNAs That Target Rta and the Cellular Rbl2-DNMT Pathway. **Journal of Virology**, v. 84, n. 6, p. 2697–2706, mar. 2010.

LUI, V. W. Y. et al. STAT3 activation contributes directly to Epstein-Barr virus-mediated invasiveness of nasopharyngeal cancer cells in vitro. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 8, p. 1884–1893, 2009.

MACHADO, P. R. L. et al. Herpesvírus humano 8 (HHV-8) detectado por reação da polimerase em cadeia do tipo nested PCR em pacientes HIV-positivos com ou sem sarcoma de Kaposi. Um estudo transversal analítico. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 3, p. 187–192, maio 2016.

MAGRI, M. C. et al. A comparative study of the frequency of antibody and titers against human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in “at-risk” individuals and among patients with Kaposi's sarcoma. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 7, p. 1292–1297, 2009.

MAMIMANDJIAMI, A. I. et al. Epidemiology and Genetic Variability of HHV-8/KSHV among Rural Populations and Kaposi's Sarcoma Patients in Gabon, Central Africa. Review of the Geographical Distribution of HHV-8 K1 Genotypes in Africa. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 175, 25 jan. 2021.

MANCUSO, R. et al. HHV8 A subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 12, p. 2153–2160, dez. 2008.

MANCUSO, R. et al. Intrafamilial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and seronegative infection in family members of classic Kaposi's sarcoma patients. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 4, p. 744–751, 2011.

MARIGGIÒ, G.; KOCH, S.; SCHULZ, T. F. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1732, 19 out. 2017.

MARKUS, A. et al. Varicella-Zoster Virus Expresses Multiple Small Noncoding RNAs GENOME REPLICATION AND REGULATION OF VIRAL GENE EXPRESSION crossm. **Journal of Virology**, v. 91, n. 24, p. 1710–1727, out. 2017.

MARSHALL, V. et al. Conservation of Virally Encoded MicroRNAs in Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus in Primary Effusion Lymphoma Cell Lines and in Patients with Kaposi Sarcoma or Multicentric Castlemans Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 5, p. 645–659, 1 mar. 2007.

MARSHALL, V. et al. Kaposi Sarcoma (KS) - Associated herpesvirus microRNA sequence analysis and KS risk in a European AIDS-KS case control study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 7, p. 1126–1135, out. 2010.

MARSHALL, V. A. et al. Polymorphisms in KSHV-encoded microRNA sequences affect levels of mature viral microRNA in Kaposi Sarcoma lesions. **Oncotarget**, v. 9, n. 88, p. 35856–35869, 9 nov. 2018.

MATAR, C. G. et al. Does EBV alter the pathogenesis of malaria? **Parasite Immunology**, v. 37, n. 9, p. 433–445, 2015.

MCHUGH, D. et al. Persistent KSHV Infection Increases EBV-Associated Tumor Formation In Vivo via Enhanced EBV Lytic Gene Expression. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 1, p. 61- 73, jul. 2017.

MENDES-CORREA, M. C. et al. Torquetenovirus in saliva: A potential biomarker for SARS-CoV-2 infection? **PLoS ONE**, v. 16, n. 8, 24 ago. 2021.

MENDOZA, T. R. T. **Análise da variabilidade genética do Herpesvirus 8 humano (HHV-8) em indivíduos infectados por HIV com e sem sarcoma de Kaposi**. Doutorado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional—São Paulo: Universidade de São Paulo, 12 dez. 2013.

MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOFF, C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707–719, out. 2010.

MILLER, C. S. et al. High Prevalence of Multiple Human Herpesviruses in Saliva from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2409–2415, jul. 2006.

MINH, B. Q.; NGUYEN, M. A. T.; VON HAESELER, A. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1188–1195, 1 maio 2013.

**miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** Disponível em: <<https://www.mirbase.org/>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

MOORE, P. S. et al. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5293, p. 1739–1744, 6 dez. 1996.

MOORE, P. S.; CHANG, Y. Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, v. 356, n. 1408, p. 499–516, 29 abr. 2001.

MORI, J. et al. Human Herpesvirus-6 U14 Induces Cell-Cycle Arrest in G2/M Phase by Associating with a Cellular Protein, EDD. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 4 set. 2015.

MURALIDHAR, S. et al. Identification of Kaposin (Open Reading Frame K12) as a Human Herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) Transforming Gene. **Journal Of Virology**. v. 72 n. 6 p. 4980-4988, jun 1998.

NAIPAUER, J.; MESRI, E. A. The Kaposi's sarcoma progenitor enigma: KSHV-induced MEndT–EndMT axis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 29, n. 3, p. 188–200, 1 mar. 2023.

NAQVI, A. R. et al. Viral miRNAs alter host cell miRNA profiles and modulate innate immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, mar. 2018a.

NAQVI, A. R. et al. Herpesvirus-encoded microRNAs detected in human gingiva alter host cell transcriptome and regulate viral infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1861, n. 5, p. 497–508, maio 2018b.

NASCIMENTO, M. C. et al. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, n. 1, p. 52–59, 2005.

NASCIMENTO, M. C. et al. Prevalence of, and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors in Brazil: A multi-center serosurvey. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 7, p. 1202–1210, 2008.

NASCIMENTO, M. C. et al. Seroprevalence of Kaposi Sarcoma–associated Herpesvirus and Other Serologic Markers in the Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 663–667, abr. 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (ED.). **16th International Conference on Malignancies in HIV/AIDS | IeDEA International epidemiology Databases to Evaluate AIDS**. . Em: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALIGNANCIES IN HIV/AIDS. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland: 2017. Disponível

em: <<https://www.iedea.org/16th-international-conference-on-malignancies-in-hiv-aids/>>. Acesso em: 20 nov. 2022

NGUYEN, L.-T. et al. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, jan. 2015.

PARK, M.-Y. et al. Interactions among Four Proteins Encoded by the Human Cytomegalovirus UL112-113 Region Regulate Their Intranuclear Targeting and the Recruitment of UL44 to Prereplication Foci. **Journal of Virology**, v. 80, n. 6, p. 2718–2727, mar. 2006.

PARRAVICINI, C. et al. Risk of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus Transmission From Donor Allografts Among Italian Posttransplant Kaposi's Sarcoma Patients. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2826–2829, 1997.

PAUK, J. et al. Mucosal Shedding of Human Herpesvirus 8 in Men. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 19, p. 1369–1377, 9 nov. 2000.

PEARCE, M.; MATSUMURA, S.; WILSON, A. C. Transcripts Encoding K12, v-FLIP, v-Cyclin, and the MicroRNA Cluster of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Originate from a Common Promoter. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14457–14464, 15 nov. 2005.

PÉREZ, C. et al. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in blood donors from different geographical regions of Argentina, Brazil, and Chile. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 4, p. 661–667, 2004.

PÉREZ, C. L.; TOUS, M. I. Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 11, p. 2020–2028, nov. 2017.

PIEPADE, D.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. The Role of microRNAs in the Pathogenesis of Herpesvirus Infection. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 156, jun. 2016.

PLANCOULAIN, S. et al. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. **The Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1062–1065, 23 set. 2000.

POOLE, L. J. et al. Comparison of Genetic Variability at Multiple Loci across the Genomes of the Major Subtypes of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Reveals Evidence for Recombination and for Two Distinct Types of Open Reading Frame K15 Alleles at the Right-Hand End. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6646–6660, ago. 1999.

POOLE, L. J. et al. Altered Patterns of Cellular Gene Expression in Dermal Microvascular Endothelial Cells Infected with Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3395–3420, abr. 2002.

QIN, J. et al. KSHV microRNAs: Tricks of the Devil. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 648–661, ago. 2017.

QIN, Z. et al. KSHV-Encoded MicroRNAs: Lessons for Viral Cancer Pathogenesis and Emerging Concepts. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 603961, 2012.

QURESHI, A. et al. VIRmiRNA: a comprehensive resource for experimentally validated viral miRNAs and their targets. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2014, 6 nov. 2014.

RAMALINGAM, D.; KIEFFER-KWON, P.; ZIEGELBAUER, J. M. Emerging themes from EBV and KSHV microRNA targets. **Viruses**, v. 4, n. 9, p. 1687–1710, set. 2012.

RAMOS DA SILVA, S. et al. KSHV genotypes A and C are more frequent in Kaposi sarcoma lesions from Brazilian patients with and without HIV infection, respectively. **Cancer Letters**, v. 301, n. 1, p. 85–94, fev. 2011.

RAMOS-DA-SILVA, S. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and Kaposi's sarcoma in Brazil. **Journal of Medical and Biological Research**. v. 39 n. 5 p. 573-580, 2006.

RAPOSO, J. V. et al. Multiplex qPCR facilitates identification of betaherpesviruses in patients with acute liver failure of unknown etiology. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, set. 2019.

RAY, A. et al. Sequence Analysis of Kaposi Sarcoma–Associated Herpesvirus (KSHV) MicroRNAs in Patients with Multicentric Castlemann Disease and KSHV-Associated Inflammatory Cytokine Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 11, p. 1665–1676, 1 jun. 2012.

REZAEI, S. A. R. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 7, p. 1781–1804, 1 jul. 2006.

ROHNER, E. et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: systematic review and meta-analysis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 138, n. 1, p. 45–54, 1 jan. 2016.

SAMOLS, M. A. et al. Cloning and Identification of a MicroRNA Cluster within the Latency-Associated Region of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9301–9305, jul. 2005.

SCHULZ, T. F. KSHV (HHV8) Infection. **Journal of Infection**, v. 41, n. 2, p. 125–129, set. 2000.

SINZGER, C.; DIGEL, M.; JAHN, G. Cytomegalovirus Cell Tropism. Em: SHENK, T. E.; STINSKI, M. F. (Eds.). **Human Cytomegalovirus**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. p. 63–83.

SOUZA, V. A. U. F. et al. Variations in human herpesvirus type 8 seroprevalence in native Americans, South America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1003–1006, 2010.

SPADAVECCHIA, S. et al. Convergence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Reactivation with Epstein-Barr Virus Latency and Cellular Growth Mediated by the Notch Signaling Pathway in Coinfected Cells. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10488–10500, out. 2010.

TAMBURRO, K. M. et al. Vironome of Kaposi Sarcoma associated Herpesvirus-Inflammatory Cytokine Syndrome in an AIDS patient reveals co-infection of Human Herpesvirus 8 and Human Herpesvirus 6A. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 220–225, 10 nov. 2012.

TARRANT-ELORZA, M.; ROSSETTO, C. C.; PARI, G. S. Maintenance and Replication of the Human Cytomegalovirus Genome during Latency. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 1, p. 43–54, 9 jul. 2014.

TEDESCHI, R. et al. A prospective seroepidemiological study of human herpesvirus-8 infection and the risk of multiple myeloma. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 1, p. 122–125, jan. 2001.

THAKKER, S.; VERMA, S. C. Co-infections and pathogenesis of KSHV-associated malignancies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, fev. 2016.

TOZETTO-MENDOZA, T. R. Análise da variabilidade genética do Herpesvirus 8 Humano (HHV-8) em indivíduos infectados por HIV com e sem sarcoma de Kaposi. p. 1–192, nov. 2013.

TOZETTO-MENDOZA, T. R. et al. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS?. **Medicine**, v. 95, n. 48, 2016.

TRANTOS, D. et al. Presence of human herpes virus-8 in saliva and non-lesional oral mucosa in HIV-infected and oncologic immunocompromised patients. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 3, p. 201–204, 2004.

UEDA, K. et al. Characterization of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Related Lymphomas by DNA Microarray Analysis. **Leukemia Research and Treatment**, v. 2011, 2011.

UEDA, K. KSHV Genome Replication and Maintenance in Latency. Em: KAWAGUCHI, Y.; MORI, Y.; KIMURA, H. (Eds.). **Human Herpesviruses**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1045p. 299–320.

ULDRICK, T. S. et al. An interleukin-6-related systemic inflammatory syndrome in patients coinfecting with Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and HIV but without multicentric Castleman disease. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 3, p. 350–358, 1 ago. 2010.

VAN DER MEULEN, E. et al. Cellular receptors involved in kshv infection. **Viruses**, v. 13, n. 1, 2021.

VANGIPURAM, R.; TYRING, S. K. Epidemiology of Kaposi sarcoma: review and description of the nonepidemic variant. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 538–542, maio 2019.

VIEIRA, J. et al. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. **Journal of Virology**, v. 71, n. 9, p. 7083–7087, set. 1997.

WEIDMANN, M.; ARMBRUSTER, K.; HUFERT, F. T. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 326–334, ago. 2008.

WHITBY, D. et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 1, p. 155–163, 1 jan. 2004.

WHITE, T. et al. Genetic Diversity of the Kaposi's Sarcoma Herpesvirus K1 Protein in AIDS-KS in Zimbabwe. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 42, n. 2, p. 165–171, jun. 2008.

XU, D. et al. Epstein-Barr Virus Inhibits Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication in Primary Effusion Lymphomas. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 6068–6078, jun. 2007.

YAN, L. et al. Towards Better Understanding of KSHV Life Cycle: from Transcription and Posttranscriptional Regulations to Pathogenesis. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 2, p. 135–161, abr. 2019.

YANG, C. H. et al. The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 6037–6046, mar. 2015.

YAO, S. et al. MiRNA-891a-5p mediates HIV-1 Tat and KSHV Orf-K1 synergistic induction of angiogenesis by activating NF- $\kappa$ B signaling. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 19, p. 9362–9378, out. 2015.

YE, F.-C. et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Gene vFLIP Inhibits Viral Lytic Replication through NF- $\kappa$ B-Mediated Suppression of the AP-1



Pathway: a Novel Mechanism of Virus Control of Latency. **Journal of Virology**, v. 82, n. 9, p. 4235–4249, maio 2008.

ZAGO, A. et al. Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 and Its Association With Kaposi Sarcoma in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 27, n. 8, p. 468, set. 2000.

ZIEGELBAUER, J. M. Functions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, n. 11–12, p. 623–630, nov. 2011.

ZONG, J. et al. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. **Journal of Clinical Virology**, v. 23, n. 3, p. 119–148, 1 jan. 2002.

ZONG, J.-C. et al. High-Level Variability in the ORF-K1 Membrane Protein Gene at the Left End of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Defines Four Major Virus Subtypes and Multiple Variants or Clades in Different Human Populations. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 4156–4170, maio 1999.

ZONG, J.-C. et al. Reflections on the Interpretation of Heterogeneity and Strain Differences Based on Very Limited PCR Sequence Data from Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Genomes: A Review. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 1–8, set. 2007.