



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

JULIANA PRADO GONÇALES

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO NF κ B E TNF- α E DE POLIMORFISMOS NO
PROMOTOR DO NF κ B1 E NF κ BIA COM O CICLO DE REPLICAÇÃO DO HHV-8
EM PESSOAS COINFECTADAS PELO HIV**

Recife
2019

JULIANA PRADO GONÇALES

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO NFκB E TNF-α E DE POLIMORFISMOS NO
PROMOTOR DO *NFκB1* E *NFκBIA* COM O CICLO DE REPLICAÇÃO DO HHV-8
EM PESSOAS COINFECTADAS PELO HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em Medicina
Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Coorientadora: Dr.^a Tania Regina Tozetto Mendoza

Recife

2019

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam CRB4:1895

G635a Gonçalves, Juliana Prado.

Associação da expressão do NFkB e TNF- α e de polimorfismos no promotor NFkB1 e NFkBIA com o ciclo de replicação do HHV-8 em pessoas coinfectadas pelo HIV / Juliana Prado Gonçalves. – Recife: o autor, 2019.

109 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina tropical.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. NF-Kappa B. 2. Poliformismo. 3. Herpesvirus humano 8. 4. Coinfecção. I. Coelho, Maria Rosângela Cunha Duarte (orientadora). II. Título.

616 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 079)

JULIANA PRADO GONÇALES

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO NF κ B E TNF- α E DE POLIMORFISMOS NO
PROMOTOR DO NF κ B1 E NF κ BIA COM O CICLO DE REPLICAÇÃO DO HHV-8
EM PESSOAS COINFECTADAS PELO HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Adriana Viera Gomes (Examinadora externa)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof. Dr. Renato Antônio dos Santos Oliveira (Examinador externo)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Profa. Dra. Regina Célia Moreira (Examinadora externa)
Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP)

Dedico este trabalho a minha mãe, Irma, pelo incentivo constante e amor incondicional ofertado. E a minha filha, Ellen, por sempre me dar forças para seguir em frente, sendo minha luz nos momentos de escuridão. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena. Serei eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que participaram desse estudo e aos funcionários da DIP-HC, sem eles, este trabalho não seria possível.

A minha mãe pela dedicação, compreensão, apoio incondicional e por me ensinar a nunca desistir. A minha filha por sempre me dar forças e, principalmente, por compreender minha ausência em muitos momentos durante esses anos.

A minha orientadora Dra. Maria Rosangela Cunha Duarte Coêlho, pela paciência, compreensão, oportunidade e conhecimento compartilhado.

A minha coorientadora Dra. Tania Tozetto pela colaboração e conhecimento ofertado.

A Dra. Virginia Lorena pelo colaboração, conhecimento e amizade.

A minhas amigas Thaisa Rocha e Melayne Acirole pela parceria científica, paciência, compreensão, amizade e por contribuírem diretamente com esse trabalho.

Ao Dr. Valter Júnior e Me. Deborah Guimarães pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho

Aos meus amigos, Viviane Martha, Regina Athalys, Marcella Silva, Dayvson Silva e Luan Araújo, do setor de virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela convivência nesses anos.

Aos funcionários laboratório de virologia do IMT-USP e do departamento de imunologia do Instituto Aggeu Magalhães pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos distantes Alan Montezano, Tatiana Shizue, Cassiano Marinello, Maurício Rufino, Oriques Batistim e Rildson Holanda que estiveram presentes com conversas incentivadoras e risadas na madrugada.

Aos meus amigos Diego Lira, Michelle Barros, Jefferson Pereira, Queila Fontes, Deborah Guimarães e Crhisllane Vasconcelos pela torcida, abraços apertados e palavras de conforto.

A minha cachorra Candy e a minha gata Sune, pela companhia nas madrugadas e pelo carinho.

“... Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu
é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...”
(TREM-BALA, 2017)

RESUMO

A infecção pelo Herpesvírus humano do tipo 8 (*Human gammahesvirus 8*, HHV-8) está associada ao sarcoma de Kaposi, um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/aids. Como os demais vírus da família *Herpesviridae*, o HHV-8 pode apresentar duas formas de replicação, latente e lítica, reguladas por fatores virais e do hospedeiro. Um dos fatores relacionados ao hospedeiro é o fator nuclear *Kappa B* (NFκB), que é capaz de direcionar a replicação viral e aumentar a sobrevivência celular. O objetivo do estudo foi verificar a associação entre a infecção latente ou lítica pelo HHV-8 com a expressão do NFκB e TNF-α em linfócitos CD19+ e CD3+ e com os polimorfismos do *NFκB1* e *NFκBIA* em pessoas coinfectadas pelo HIV. Foi realizado um estudo do tipo comparação entre grupos de pessoas coinfectadas HIV/HHV-8, acompanhadas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Recife – PE. Foram analisados 738 pacientes com diagnóstico confirmado para o HIV, desses 189 apresentaram anticorpos IgG para a infecção pelo HHV-8. Posteriormente, com base nos resultados da imunofluorescência indireta para determinar a fase transcrricional do HHV-8, os participantes do estudo foram divididos em dois grupos: latente (76) e lítico (63). Para a análise da expressão do NFκB e TNF-α nas populações de linfócitos B (CD19+) e linfócitos T (CD3+) foram selecionados pacientes que apresentavam carga viral indetectável, as células mononucleares de 83 pacientes [lítico (40) e latente (43)] sem e com estímulo por fito hemaglutinina (*phytohemagglutinin*, PHA) foram marcadas e analisadas por imunofenotipagem. Os polimorfismos do *NFκB1* (94 ins/del ATTG) e *NFκBIA* (3'UTR A → G) foram determinados por PCR-RFLP em total de 132 pacientes, desses, 69 pacientes do grupo latente e 63 do grupo lítico. Foi observada uma alta expressão de NFκB na população de linfócitos CD19+ no grupo lítico ($p < 0.0001$), assim como, um aumento da expressão nas células marcadas com CD19+TNF-α+NFκB+ ($p < 0.0001$). Uma correlação forte e positiva ($r = 0.70$ $p < 0.0001$) foi observada entre a população CD3+TNF-α+ e a contagem de linfócitos TCD8+. Como também, o genótipo ins/del do *NFκB1* ($p < 0.0001$) e AA e AG do *NFκBIA* ($p < 0.0001$) foram associados ao ciclo lítico do HHV-8. De acordo com nossos resultados, o NFκB está fortemente associado ao ciclo lítico do HHV-8, tanto na expressão celular, quanto nos polimorfismos genéticos estudados.

Palavras-chaves: NF-Kappa B. Polimorfismo. Herpesvirus humano 8. Coinfecção.

ABSTRACT

Human herpesvirus 8 (*Human gammahesvirus 8*, HHV-8) infection is associated with Kaposi's sarcoma, one of the most common cancers in people living with HIV/AIDS. Like other viruses in the *Herpesviridae* family, HHV-8 can present two forms of latent and lytic replication, regulated by viral and host factors. One of the factors related to the host is nuclear factor *Kappa* B (NF κ B), which is able to direct viral replication and increase cell survival. The aim of the study was to verify the association between latent or lytic infection by HHV-8 with expression of NF κ B and TNF- α in CD19⁺ and CD3⁺ lymphocytes and with *NF κ B1* and *NF κ BIA* polymorphisms in HIV coinfecting persons. A study comparing HIV/HHV-8 coinfecting individuals was carried out at the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic (DIP) of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), Recife, Brazil. A total of 738 patients with a confirmed HIV diagnosis were analyzed, of whom 189 had IgG antibodies to HHV-8 infection. Subsequently, based on indirect immunofluorescence results to determine the HHV-8 transcriptional phase, study participants were divided into two groups: latent (76) and lytic (63). Analysis of NF κ B and TNF- α expression was performed by immunophenotyping in cell culture with stimulation with phytohemagglutinin (*phytohemagglutinin*, PHA) and without stimulation. The polymorphisms of *NF κ B1* (94 ins / del ATTG) and *NF κ BIA* (3'UTR A $\rightarrow$ G) were determined by PCR-RFLP. Expression analysis of NF κ B and TNF- α was performed in 83 patients, of whom 43 were in latency and 40 in lytic cycle. A high expression of NF κ B was observed in the population of CD19⁺ lymphocytes in the lytic group ($p < 0.0001$), as well as an increase in expression in cells labeled with CD19⁺TNF- α ⁺NF κ B⁺ ($p < 0.0001$). A strong and positive correlation ($r = 0.70$ $p = < 0.0001$) was observed between the CD3⁺TNF- α ⁺ population and the CD8⁺ T lymphocyte count. The analysis of the polymorphisms in the *NF κ B1* and *NF κ BIA* genes was performed in 69 patients in the latency phase and 63 in the lytic cycle. The genotype ins/del of *NF κ B1* ($p < 0.0001$) and AA and AG of *NF κ BIA* ($p < 0.0001$) were associated with the lytic cycle of HHV-8. According to our results, NF κ B is strongly associated with the lytic cycle of HHV-8, both in cell expression and in the genetic polymorphisms studied.

Keywords: NF-Kappa B. Polymorphism. Human herpesvirus 8. Coinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagem ilustrativa da partícula viral do HHV-8.....	19
Figura 2-	Representação esquemática da estrutura genômica do HHV-8.....	21
Figura 3-	Representação esquemática do ciclo de vida do HHV-8.....	21
Figura 4-	Imagem ilustrativa da estrutura cristalográfica do NFκB1.....	27
Figura 5-	Representação esquemática das vias de ativação do NFκB.....	29
Figura 6-	Vias de sinalização do NFκB.....	30
Figura 7-	Imunofluorescência indireta positiva antígenos latentes e líticos.....	41
Figura 8-	Representação da análise com marcação tripla.....	43

Artigo 1

Figura 1-	Expressão do NFκB or TNF-α em linfócitos CD3+ e CD19+ de pacientes infectados pelo HIV em infecção lítica ou latente pelo HHV-8.....	50
Figura 2-	Expressão simultânea de NFκB e TNF-α em linfócitos CD3+ e CD19+ de pacientes infectados pelo HIV em infecção latente ou lítica por HHV-8.....	51
Figura 3-	Correlação da expressão de CD3 + TNF-α + com contagem de linfócitos TCD8 de pacientes infectados pelo HIV em infecção latente ou lítica por HHV-8.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sequência de primers e enzimas de restrição.....	44
------------------	--	----

Artigo 1

Tabela 1-	Caracterização da população.....	47
------------------	----------------------------------	----

Artigo 2

Tabela 1-	Caracterização da população do estudo.....	62
------------------	--	----

Tabela 2-	Associação dos genótipos e alelos dos polimorfismos NFκB1-94 ins/del ATTG e NFκB1A 3'UTR A → G com a infecção latente e lítica do HHV-8 em PVHA.....	63
------------------	--	----

Tabela 3-	Avaliação dos genótipos combinados dos polimorfismos NFκB1-94 ins/del ATTG e NFκB1A 3'UTR A → G com a infecção latente e lítica pelo HHV-8 em PVHA.....	63
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAFF	Receptor do fator ativador de células B, do inglês <i>B cell-activating fator receptor</i>
BCBL-1	Linhagem celular do Linfoma de Base Cavitária, do inglês <i>Body Cavity Based Lymphoma</i>
BCR	O receptor de linfócitos B, do inglês <i>B-cell receptor</i>
CMVH	Citomegalovírus humano
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EBV	Vírus Epstein Barr, do inglês <i>Epstein-Barr vírus</i>
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> .
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do Inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAAD	Domínio de morte associado a Fas, do inglês <i>Fas-Associated Death Domain</i>
HHV-1	Herpesvírus Humano Tipo 2, do inglês <i>Human alphaherpesvirus 1</i>
HHV-2	Herpesvírus Humano Tipo 2, do inglês <i>Human alphaherpesvirus 2</i>
HHV-6	Herpesvírus Humano Tipo 6, do inglês <i>Human betaherpesvirus 6</i>
HHV-7	Herpesvírus Humano Tipo 6, do inglês <i>Human betaherpesvirus 7</i>
HHV-8	Herpesvírus Humano Tipo 8, do inglês <i>Human gammaherpesvirus 8</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency vírus</i>
HSH	Homens que Fazem Sexo com Homens
HSV	Herpesvirus Saimiri
IFI	Ensaio de Imunofluorescência Indireta, do Inglês <i>Indirect Immunofluorescence Assay</i>
IKK α	Complexo quinase α , do inglês <i>kinase complex α</i>
IKK β	Complexo quinase β , do inglês <i>kinase complex β</i>

I κ B	Inibidor de κ B, do inglês <i>inhibitor of kappa B</i>
KSHV	Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi, do inglês <i>Kaposi'scarcoma-associated Herpesvirus</i>
LANA	Antígeno Nuclear Associado à Latência, do Inglês <i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i>
LB	Linfócitos B
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LT	Linfócitos T
LUR	Região Única de Cadeia Longa, do inglês <i>Long Unique Region</i>
MCD	Doença de Castleman multicêntrica, do inglês <i>Multicentric Castleman disease</i>
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>Messenger RNA</i>
NEMO	Modulador Essencial do NF- κ B, do inglês <i>NF-κB essencial modulator</i>
NF- κ B	Fator Nuclear <i>Kappa B</i> , do inglês <i>Nuclear factor Kappa B</i>
NIK	Quinase indutor de NF- κ B, do inglês <i>NF-κB inducing Kinase</i>
N κ	Do inglês <i>NFκB inducing Kinase</i>
ORF	Sequência aberta de leitura, do Inglês <i>Open Reading Frame</i>
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampão Fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chains Reaction</i>
PEL	Linfoma de Efusão Primária, do inglês <i>primary effusion lymphoma</i> .
Primer	Iniciador da Reação de PCR.
qPCR	PCR em Tempo Real Quantitativa, do inglês <i>Real time quantitative PCR</i> .
RANK	Receptor Ativador do NF- κ B, do inglês <i>receptor activator of NF-κB</i> .
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição, do Inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> .
RHD	Domínio de homologia Rel, do inglês <i>Rel Homology Domain</i>

RTA	Ativador de replicação e transcrição, do inglês <i>Replication and Transcription Activator</i>
SK	Sarcoma de Kaposi, do inglês <i>Kaposi's sarcoma</i> .
SK/aids	Sarcoma de Kaposi associado a aids
SNPs	Polimorfismo de Único Nucleotídeo, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> .
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3, do inglês <i>signal transducers and activators of transcription 3</i>
TAD	Domínios de ativação da transcrição, do inglês <i>Transactivation domain</i>
TARV	Terapia Antirretroviral
TNFR	Superfamília do receptor de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TR	Repetições Terminais, do inglês <i>Terminal Repeats</i> .
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade Internacional
vBcl-2	Linfoma viral de células B, do inglês <i>viral B-cell Lymphoma-2</i>
vCyc-D	ciclina viral <i>D</i> , do inglês <i>viral cyclin D</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular endotelial growth factor</i>
vFLIP	Proteína inibitória Flice viral, do inglês <i>viral Flice Inhibitory Protein</i>
vGPCR	Receptor viral acoplado à proteína G, do inglês <i>viral G protein-coupled receptor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Aspectos gerais dos Herpesvirus.....	18
2.2.1	Herpesvírus humano tipo 8.....	19
2.2	Fases transcrpcionais do HHV-8.....	20
2.3	Epidemiologia e transmissão do HHV-8.....	23
2.4	Coinfecção HIV/HHV-8.....	25
2.5	Fator nuclear <i>kappa</i> B.....	26
2.5.1	NFκB1 e NFκBIA.....	30
2.5.2	HHV-8 e o NFκB.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Desenho, população e locais do estudo.....	36
4.1.1	Desenho e locais do estudo.....	36
4.1.2	População do estudo.....	36
4.2	Definição do tamanho amostral.....	37
4.3	Critérios de inclusão.....	37
4.4	Critérios de exclusão.....	37
4.5	Definição e categorização das variáveis do estudo.....	37
4.5.1	Variáveis dependentes.....	37
4.5.2	Variáveis independentes.....	38
4.6	Coleta de dados.....	39

4.7	Coleta e armazenamento das amostras.....	39
4.8	Imunoensaio Enzimático para HHV-8.....	40
4.9	Imunofluorescência indireta.....	40
4.10	Cultura celular.....	42
4.11	Imunofenotipagem do NFκB-p65 e TNF-α.....	42
4.12	Análises dos Polimorfismos do <i>NFκB1</i> e <i>NFκBIA</i>	43
4.13	Análise estatística.....	44
4.14	Aspectos éticos.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Avaliação da expressão de NFκB e TNF-α em células CD19+ e CD3+ sobre o ciclo de vida do HHV-8 em pacientes infectados pelo HIV.....	45
5.2	Associação dos polimorfismos no promotor do NFκB1 e no gene do NFκBIA com ciclo de replicação do HHV-8 em indivíduos infectados pelo HIV.....	59
6	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	80
	APÊNDICE B- EVALUATION OF NFκB AND TNF-α EXPRESSION IN CD19 + AND CD3 + CELLS OVER HHV-8 LIFE CYCLE IN HIV-INFECTED PATIENTS.....	82
	APÊNDICE C- ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN NFκB1 PROMOTER AND NFκBIA GENE WITH THE HHV-8 REPLICATION CYCLES IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS.....	97
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	107
	ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1.....	108
	ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2.....	109

1 INTRODUÇÃO

O Herpesvirus humano 8 (*Human gammahesvirus 8*, HHV-8) pertence à família *Herpesviridae*, sendo um dos vírus mais oncogênicos em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010; TORRE et al., 2015). Os herpesvírus têm como característica a capacidade de suportar dois ciclos replicativos: ciclo lítico e latência. A latência ocorre após a infecção primária e se caracteriza pela persistência do genoma viral no núcleo da célula com expressão de um pequeno número de genes virais (PURUSHOTHAMAN et al., 2016). O ciclo lítico ocorre após a infecção *de novo* ou reativação da latência, resultando na expressão de uma grande quantidade de genes e formação de novas partículas virais (ANEJA; YUAN, 2017; SUN et al., 1998).

O impacto da infecção do HHV-8 sobre a história natural do HIV ainda não foi totalmente esclarecido. No entanto, sabe-se que a proteína Tat do HIV pode interagir com o HHV-8 induzindo a expressão de genes líticos através da via de sinalização STAT3 (CASPER, 2008; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014; ZENG et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o HHV-8 estimula a replicação do HIV através da interação de alguns antígenos específicos, sendo a coinfeção um fator importante para o desenvolvimento de doenças associadas ao HHV-8 (CASELLI et al., 2003, 2005; DI LUCA et al., 2001; HYUN et al., 2001).

Os fatores que podem induzir a reativação do HHV-8 ainda não estão elucidados, entretanto, fatores como estresse oxidativo, alterações no níveis de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), desequilíbrio na resposta imune e alguns fatores genéticos, como a presença dos polimorfismos, poderiam estar implicados na regulação entre as duas fases transcricionais (ANEJA; YUAN, 2017; STEBBING; GAZZARD; BOWER, 2006). Fatores imunogenéticos, o fator nuclear *Kappa B* (NF κ B), de acordo com estudos, pode estar relacionado com a manutenção da latência e/ou indução do ciclo lítico (BLATTMAN et al., 2014; KELLER et al., 2006; MERCURIO; MANNING, 1999; SGARBANTI et al., 2004; YU; ZHONG; YANG, 2004).

Em pacientes infectados pelo HHV-8, a proteína viral *Fllice Inibitory Protein* (vFLIP) demonstrou ter a capacidade de ativar a via clássica do NF κ B através da ligação e ativação do complexo quinase IkK, com consequente fosforilação de Ik β α , liberando o NF κ B da influência inibitória com migração para núcleo e expressão dos genes alvos (FIELD et al., 2003; LIU et al., 2002; MATTA; CHAUDHARY, 2004). Assim como, as proteínas líticas (K1, K15 e vGPCR) foram associadas na indução da atividade do NF κ B, favorecendo a

replicação viral e a patogênese das doenças associadas ao vírus (JÄRVILUOMA; OJALA, 2006; KONRAD et al., 2009; WU et al., 2015). Alguns estudos, *in vitro*, demonstraram que a superexpressão do receptor viral acoplado à proteína G (*viral G protein-coupled receptor*, vGPCR) induz o NFκB no Sarcoma de Kaposi (SK) e linfoma de efusão primária (*Primary Effusion Lymphoma*, PEL) (CANNON; PHILPOTT; CESARMAN, 2003; CHIOU et al., 2002; MONTANER et al., 2001; SMIT et al., 2002).

Os polimorfismos no NFκB, bem como, em seus inibidores, podem influenciar na regulação da expressão final da proteína. Estudo envolvendo o polimorfismo do *NFκB1* (-94 ins/del ATTG) demonstrou que, no alelo que apresentava a deleção (del/ATTG), as proteínas ligavam-se fracamente, enquanto que os alelos com inserção (ins/ATTG) apresentavam uma maior afeição, sugerindo que o polimorfismo poderia afetar a atividade promotora do gene *NFκB1* (KARBAN et al., 2004). Da mesma forma, as alterações na expressão da proteína do IκBα estavam relacionadas com o polimorfismo *NFκB1A* (3'UTR A →G), alterando a atividade do NFκB (GOTO et al., 2001).

Diante do exposto, o NFκB parece estar associado com a manutenção da latência e a atividade lítica do HHV-8, no entanto os estudos ainda são controversos e, em sua maioria, foram realizados *in vitro*. Além disso, não há estudos que investiguem a influência de polimorfismos no NFκB com a regulação do ciclo de replicação do HHV-8. Portanto, este trabalho pretende contribuir com informações sobre a associação da expressão do NFκB e seus polimorfismos genéticos *NFκB1* (-94 ins/del ATTG) e *NFκB1A* (3'UTR A →G) com o ciclo replicativo do HHV-8 em pessoas coinfectadas pelo HIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais dos Herpesvírus

Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*, sendo classificado em *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae* de acordo com o comitê internacional de taxonomia viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), para as classificações são considerados critérios moleculares e propriedades biológicas de cada vírus (EDELMAN, 2005; ICTV, 2018).

Os *alphaherpesvirus* incluem o herpes simples 1 (*Human alphaherpesvirus 1*, HHV-1) e 2 (*Human alphaherpesvirus 2*, HHV-2) e o vírus da varicela-zoster (*Human alphaherpesvirus 3*, HHV-3), possuindo um ciclo reprodutivo curto com disseminação rápida entre as células, com uma eficiente destruição das células em curto período de tempo (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). Os *betaherpesvirus* beta possuem tegumento maior quando comparado aos da família alfa e gama, diferenciando-os; pertencem a esta subfamília o citomegalovírus (*Human betaherpesvirus 5*), o herpesvírus humano tipo 6 (*Human betaherpesvirus 6*, HHV-6) e o herpesvírus humano tipo 7 (*Human betaherpesvirus 7*, HHV-7), tanto o HHV-6 e HHV-7 são associados, mais comumente, com roséola e exantema súbito. Acredita-se que os vírus da subfamília beta estão entre os mais disseminados na população, com cerca 85% da população mundial infectada (ABLASHI et al., 1999; EDELMAN, 2005)

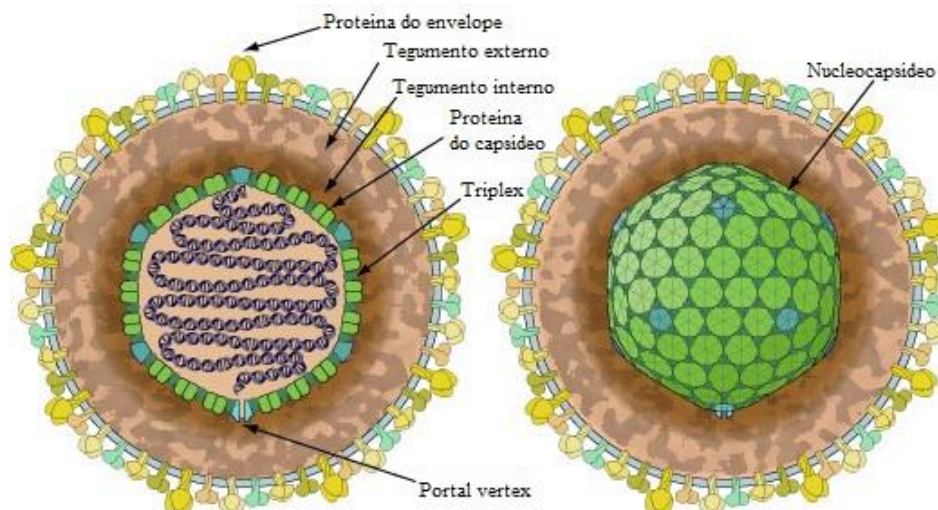
Já os *gammaherpesvirus* compreende os vírus Epstein-Barr (*Human gammaherpesvirus 4*, HHV-4), herpesvírus Saimiri (*Saimiriine herpesvirus* HSV) e o herpesvírus humano do tipo 8 (*Human gammaherpesvirus 8*, HHV-8), todos com potencial oncogênico (QUADRELLI et al., 2011). O HHV-8 é o único do seu gênero, *Rhadinovirus*, a infectar humanos (O'LEARY et al., 1998).

O HHV-8 foi identificado pelos pesquisadores Moore & Chang em 1994, a partir de tecidos de pacientes com SK relacionado à aids, posteriormente vários estudos relacionaram a infecção por HHV-8 com o SK/aids (KEDES et al., 1996; MARTIN et al., 1998; O'BRIEN et al., 1999; WHITBY et al., 1995), como também com a doença de Castleman multicêntrica (*Multicentric Castleman's Disease*, MCD) e o PEL (ASOU et al., 2000; ULDRICK; WHITBY, 2011).

2.1.1 O Herpesvírus humano tipo 8

O HHV-8 apresenta-se com com 120 a 160nm de diâmetro, sendo constituído pelo material genético de DNA; o nucleocapsídeo icosaédrico, com capsômeros que envolvem o núcleo, o envelope e o tegumento (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). (Figura 01)

Figura 1- Imagem ilustrativa da partícula viral do HHV-8



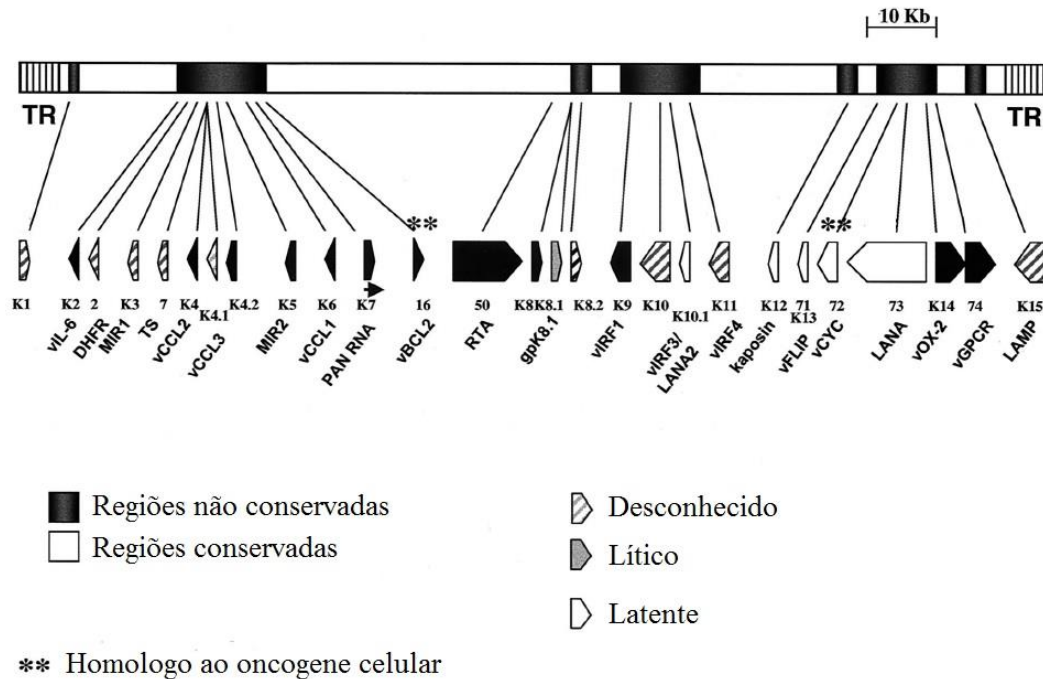
Fonte: adaptado de Viralzone (2019)

No genoma, as regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame*, ORF) ocupam aproximadamente 138-140kb de comprimento e são subdividida de K1 a K15, as extremidades apresentam regiões de repetição terminal (*Terminal Repeats*, TR) medindo 16-75 Kb e, sendo que algumas ORFs do HHV-8 são homologas aos genes celulares humano (DITTMER; DAMANIA, 2016; REZAEI et al., 2006). A partir do sequenciamento do vírus foi possível verificar a linearidade do genoma formado por uma única região de cadeia longa codificante (*Long Unique Region*, LUR) de 140kb, constituída por aproximadamente 53,5% de G+C. Enquanto que as extremidades que são constituídas por 801pb possuem 84,5% de G+C (JENNER; BOSHOF, 2002; RUSSO et al., 1996).

Os genes do HHV-8 codificam proteínas específicas que podem influenciar no controle do crescimento, diferenciação e inibição da apoptose celular. A maioria dessas proteínas possui homologia as proteínas do hospedeiro, como a ciclina viral D (*viral cyclin D*, vCyc-D) que compartilha 53% de homologia com a ciclina celular, tendo a capacidade de inativar proteínas supressoras de tumor, aumentando assim a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias (LI et al., 1997). A *viral B-cell Lymphoma-2* (vBcl-2)

compartilha 20% de homologia estando relacionada a apoptose e está presente no ciclo lítico viral; outra proteína relacionada com a inibição da apoptose é a vFLIP, intermediada pela inibição da Caspase-8 (Figura 02) (ABLASHI et al., 2002; DJERBI et al., 1999).

Figura 2- Representação esquemática da estrutura genômica do HHV-8



Fonte: Adaptado de Ablashi et al. (2002)

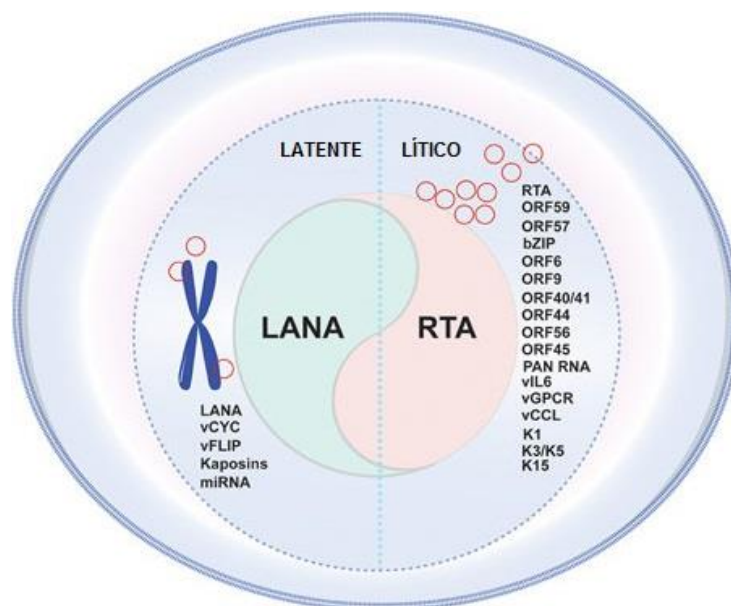
A ORF-K1 é altamente variável e codifica glicoproteínas do envelope, características que o torna um bom marcador para genotipagem. Foram descritos cinco subtipos moleculares principais do gene K1, identificados como A, B, C, D e E, a distribuição desses subtipos varia de acordo com a localização geográfica e a composição étnica da população (DE PAOLI, 2004; MOHANNA et al., 2005). Na maioria das regiões do genoma viral, a variação da sequência entre estes diferentes subtipos é muito baixa, variando menos que 3% (CAI et al., 2010).

2.2 Fases transcricionais do HHV-8

A infecção se inicia com o vírus sendo adsorvido aos receptores da superfície celular, seguido da fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, posteriormente, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado para o interior da célula (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). Após a entrada na célula ocorre a expressão dos genes

virais com replicação do genoma viral pela DNA polimerase (CHAKRABORTY; VEETIL; CHANDRAN, 2012). Assim como os outros herpesvírus, o HHV-8 pode expressar seus genes por duas fases transcricionais, a fase de latência e a fase lítica (figura 03).

Figura 3- Representação esquemática do ciclo de vida do HHV-8



Fonte: Adaptado de Purushothaman et al. (2016).

Na latência, os produtos gênicos são pouco expressos e com isso um número pequeno de antígeno é apresentado ao sistema imunológico (GANEM, 2010). Os locus da latência possuem três genes que codificam proteínas associadas a esta fase, a vCyclin, a vFLIP, as kaposinas e o antígeno nuclear associado à latência (*Latency-associated nuclear antigen*, LANA), sendo este último considerado o principal marcador de latência, possuindo um papel primordial para a persistência viral (BARBERA et al., 2006; GARBER; HU; RENNE, 2002; VIEJO-BORBOLLA et al., 2005).

Na fase latente não ocorre produção de partículas virais, o DNA do vírus se estabelece como epissoma nuclear e um pequeno número de genes virais são expressos, LANA, ORF-12, ORF-71, ORF-72 (PARRAVICINI et al., 2000; PURUSHOTHAMAN et al., 2016). A proteína LANA é a principal proteína expressa durante a latência e interfere na função celular, evitando a apoptose e aumentando a proliferação celular (VERMA et al., 2013). Essa proteína é importante para o estabelecimento da latência viral, uma vez que ela recruta repressores transcricionais (KAP1) para a região promotora do ativador de replicação e transcrição (*Replication and Transcription Activator*, RTA) para encerrar a expressão de genes de ciclo lítico (SUN et al., 2014).

A vFlip tem como principal função impedir a apoptose, essa proteína possui domínios que lhe permite interagir como as proteínas adaptadoras, FAAD (*Fas-Associated Death Domain*), sendo essa interação capaz de impedir o recrutamento da caspase 8, prevenindo a apoptose, como também impede a fosforilação do complexo de quinases I κ B, promovendo a ativação do NF κ B que irá estimular a produção de proteínas antiapoptóticas (DI DOMENICO et al., 2016; DJERBI et al., 1999; MATTA; CHAUDHARY, 2004; SUN; MATTA; CHAUDHARY, 2003).

A transição entre as duas fases transcricionais é regulada pelo RTA/ORF-50, sendo este suficiente para indução do ciclo lítico do HHV8 (SUN et al., 1998). Na replicação lítica, todos os genes são ativados com produção da progênie viral e morte das células infectadas. A ORF 50 está metilada na fase latente e ainda não se sabe o fator que promove a sua desmetilação com consequente ativação (CHEN et al., 2001). A proteína Rta contribui também para o aumento da sobrevivência da célula infectada através da transativação do gene codificador da proteína antiapoptótica, BCL-2 (LUKAC et al., 1998).

Outra proteína importante no ciclo lítico é o vGPCR, essa proteína é homóloga viral do receptor para IL-8, sendo esse receptor responsável por algumas vias de sinalização (Akt, PKC, MAPK e NF κ B), tendo como consequência o aumento da expressão de genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e transformação celular e indução de citocinas inflamatórias (GREENE et al., 2007). A vGPCR também promove o aumento de algumas citocinas (IL1- β , IL-6, IL-8, TNF- α), fatores de crescimento (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) e interage com o complexo I κ K do NF κ B para aumentar a sobrevivência celular (AZZI et al., 2014; BRINKMANN et al., 2007; NICHOLAS, 2003).

A K1 é expressa no ciclo lítico, essa proteína possui similaridade com o receptor de linfócitos B (*B-cell receptor*, BCR), sendo suprimida pela LANA na latência através da ligação ao promotor da ORF-K1, entretanto, a Rta ao ser expressa liga-se ao mesmo promotor e ativa K1 (VERMA et al., 2013). Estudos demonstraram que a proteína K1 aumenta a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endotelial growth factor*, VEGF), a qual contribui para os processos de angiogênese e invasão tecidual, além disso, atuam também na inibição da apoptose através da via de sinalização PI3K/Akt (LEE et al., 2005; TOMLINSON; DAMANIA, 2004).

A fase latente tem como objetivo primordial a sobrevivência e proliferação celular, enquanto que durante o ciclo lítico, as proteínas virais se tornam susceptíveis a sistema imunológico do hospedeiro (GANEM, 2010). Como resultado da expressão dos genes líticos, ocorre produção de substâncias pró angiogênicas e pró inflamatórias o que favorece o

ambiente para a proliferação da célula hospedeira e persistência viral, induzindo respostas inflamatórias importantes na patogênese do SK (GRUNDHOFF; GANEM, 2004).

2.3 Epidemiologia e transmissão do HHV-8

Após o desenvolvimento de estudos soro epidemiológicos baseados em ensaios por imunofluorescência (IF) e ensaio imunoenzimático (ELISA) foi possível evidenciar a distribuição do HHV-8. Ao contrário do vírus Epstein-Barr, a soroprevalência do HHV-8 varia muito, em regiões africanas e mediterrâneas as prevalências variam de 20 a 80% (DEDICAT; NEWTON, 2003; MARTRO et al., 2004; PELLET et al., 2003).

De acordo com a soroprevalência foi sugerido por Bhutani et al. (2015), três classificações endêmicas: alta (>25%), sendo mais comum em países africanos, intermediária (10-25%) comumente observada na região do mediterrâneo e a baixa (<10%) em parte da Ásia, Estados Unidos e Europa (BHUTANI et al., 2015).

Na China a prevalência varia de acordo com as diferentes províncias, tendo taxas de 7.3 a 16.1% (FU et al., 2009; MEI et al., 2007; WANG et al., 2011). Os países do norte da Europa, Ásia e Estados Unidos apresentaram uma prevalência <10%, já a região mediterrânea e leste europeu de 20-30%, enquanto que a África Central e do Sul >50% (ETTA et al., 2018; NEWTON et al., 2018; SHEBL et al., 2011).

No Brasil, o perfil de distribuição na população, de modo geral, segue os padrões da Europa (<10%), porém, em estudos com tribos de ameríndios da Amazônia foi demonstrado um perfil hiperendêmico para o HHV-8 (BORGES et al., 2012; ISHAK et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Em estudos brasileiros com indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), a prevalência do HHV-8 foi mais alta do que a encontrada na população em geral, variando de 15-38% (PIERROTI et al., 2000; ZAGO et al., 2000; SOUZA et al., 2004). No Pará, Ishak et al. (2007), relataram uma prevalência de 15.5% (74/477), assim como Batista et al. (2009), em São Paulo, demonstraram uma prevalência de 25.9% (59/228) (BATISTA et al., 2009; ISHAK et al., 2007). Em Pernambuco, um estudo realizado por Cahú et al. (2016), foi relatada uma soroprevalência de 28.6% (143/500) para o HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) (CAHÚ et al., 2016).

Magri et al. (2009), desenvolveu um estudo multicêntrico com pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) para descrever em qual fase de replicação se encontrava o HHV-8, dos 495 pacientes estudados, 20.4% (101/495) eram positivos para HHV-8, desses 89.1% (90/101) apresentavam anticorpos para as proteínas de fase lítica (MAGRI et al., 2009).

Os meios de transmissão são um fator importante para a distribuição da prevalência em uma população. A transmissão do HHV-8 não está totalmente elucidada; inicialmente foi demonstrado que a transmissão ocorre, principalmente, por contato sexual, particularmente entre homens que fazem sexo com homens (MBULAITEYE et al., 2003; BIGGAR, et al., 1996). Em regiões endêmicas, como os ameríndios, estudos demonstraram que a infecção pelo HHV-8 ocorre na infância e pode aumentar com a idade, o que indica uma transmissão horizontal, e não, apenas sexual (DE SOUZA et al., 2007; OLSEN et al., 1998).

O HHV-8 pode ser encontrado em células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), na saliva, mucosa da orofaringe, secreções cérvico-vaginal e no sêmen, podendo representar fontes de transmissão vertical e horizontal (CHEN; HUDNALL, 2006; MANTINA et al., 2001; MBULAITEYE et al., 2003). Estudos apontam que em áreas não endêmicas, a principal fonte de transmissão é a via sexual e a presença de outras infecções (HIV, sífilis e hepatite B) pode ser um fator de risco para a aquisição da infecção pelo HHV-8 (CANNON et al., 2001; DUKERS et al., 2000; SMITH et al., 1999).

Embora o HHV-8 seja detectado em linfócitos circulantes em até 50% dos pacientes com SK, a transmissão sanguínea ainda não foi efetivamente comprovada, visto que vários estudos não conseguiram detectar o DNA do vírus em doadores de sangue que foram soropositivos para o HHV-8 (CANNON et al., 2009; LEVI et al., 2011). Entretanto Hladik et al., 2006, demonstraram uma soroconversão de 41 dos 991 pacientes que participaram do estudo, apontando a possibilidade de transmissão por transfusão sanguínea, porém outros estudos não observaram a transmissão por essa via (HLADIK et al., 2006).

Em áreas endêmicas foi observado uma alta prevalência em crianças, sugerindo a possibilidade de transmissão vertical de mãe para filho; como o HHV-8 é encontrado em secreções vaginais, o trato genital feminino pode ser uma possível via de transmissão (LISCO et al., 2006). Além disso, estudos sugerem que o leite materno pode ser outra possível fonte de transmissão, pois assim como o HHV-5 (CMV), o HHV-8 também infecta monócitos, sendo que essas células estão presentes no leite materno (MINHAS; WOOD, 2014).

Além da transmissão sexual e vertical, outros estudos associam a saliva como uma possível fonte de transmissão, uma vez que demonstraram a replicação do HHV-8 nas células do epitélio oral (DUUS et al., 2004; VIEIRA et al., 1997).

2.4 Coinfecção HIV/HHV-8

Em PVHA, a infecção pelo HHV-8 é identificada pela presença de anticorpos específicos e/ou pela detecção do DNA viral. Essa população é considerada de maior risco para coinfecção, uma vez que esses vírus compartilham as mesmas vias de transmissão (MAGRI et al., 2009; PELLETT et al., 2003; REINHEIMER; ALLWINN; STÜRMER, 2011).

O impacto da infecção do HHV-8 sobre a história natural do HIV ainda não foi inteiramente esclarecido, sabe-se que o HIV pode ser um importante fator para a patogênese do HHV-8 e no desenvolvimento do SK (CASPER, 2008; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014). A proteína Tat codificada pelo HIV, pode interagir com o HHV-8 induzindo o ciclo lítico através da via de sinalização STAT3 (ZENG et al., 2007).

De forma semelhante, a presença da infecção pelo HHV-8 tem um impacto no HIV, antígenos específicos, como o LANA, podem ativar o HIV, assim como a ORF 50 (gene do ciclo lítico) interage com a proteína Tat e aumenta a susceptibilidade celular a infecção pelo HIV (CASELLI et al., 2003; DI LUCA et al., 2001; HYUN et al., 2001). Estudo demonstrou que o HHV-8 estimula a replicação do HIV em células infectadas na fase aguda, assim como, reativa células infectadas cronicamente (CASELLI et al., 2005).

Atualmente, não existe um padrão ouro para detectar a infecção pelo HHV-8. Os testes disponíveis incluem o ensaio por imunofluorescência indireta (IFI), no qual foi o primeiro teste a ser utilizado nos inquéritos epidemiológicos (MOHANNA et al., 2005; ULDRICK; WHITBY, 2011).

A IFI pode detectar anticorpos contra antígenos da fase latente (LANA), como também, antígenos da fase lítica (ORF-65 e ORF-8), apesar de ser possível verificar a distribuição do HHV-8 na população, a técnica possui um custo e um tempo de execução superior ao imunoensaio enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (NASCIMENTO et al., 2007). O ELISA detecta anticorpos contra o LANA, proteínas codificadas pela ORF-65, proteínas do capsídeo viral (p19) e do envelope (GP35/37), sendo

esse, o teste utilizado para estudos epidemiológicos, podendo detectar anticorpos IgM e IgG (SPIRA et al., 2000; SULLIVAN et al., 2008).

No diagnóstico molecular é possível detectar o DNA viral em tecidos, no PBMC, e na saliva, para se detectar a carga viral nessas células e tecido, a técnica mais utilizada PCR quantitativa (*quantitative PCR*, qPCR) que consegue quantificar as partículas virais a partir de 1 cópia (QU; JENKINS; TRIULZI, 2010). Entretanto, em pacientes sem doenças associadas, apenas 15% irão apresentar carga viral detectável e em pacientes com SK a carga viral é detectável de 10-60% dos pacientes (GANTT; CASPER, 2011).

2.5 Fator nuclear *kappa* B

O fator nuclear *kappa* B (NFκB) foi inicialmente descrito por Sen et al. (1986) em linfócitos B maduros, sendo responsável pela transcrição do gene da cadeia leve *kappa* da imunoglobulina. Esse fator atua em processos como a diferenciação e desenvolvimento celular, apoptose e resposta adaptativa a mudanças no balanço redox celular (MERCURIO; MANNING, 1999). Durante muito tempo acreditava-se que esse fator nuclear seria exclusivo de linfócitos B maduros, posteriormente, observou-se que estava presente no citoplasma da maioria das células, associado a uma proteína inibitória (IκB) que inativa sua função (GHOSH; KARIN, 2002).

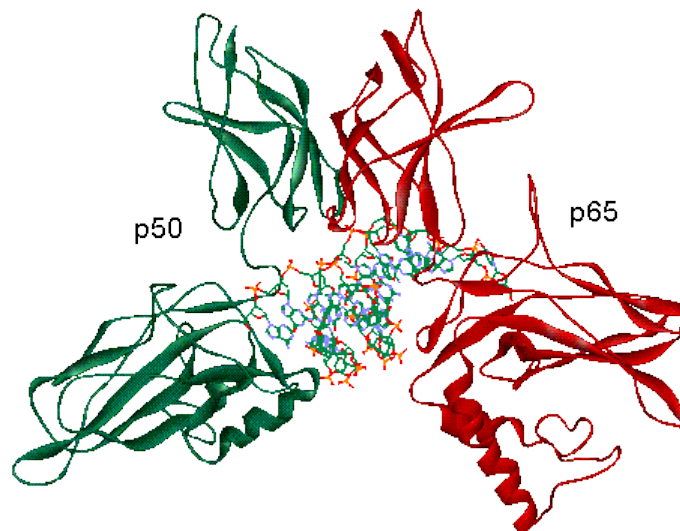
O NFκB representa uma família de fatores de transcrição indutíveis, que regula uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos de resposta imune e inflamatória (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). A ativação do NFκB é controlada por vários elementos reguladores positivos e negativos, em estado de repouso, os dímeros do NFκB são mantidos inativos no citoplasma através da associação com proteínas IκB (GHOSH; KARIN, 2002; HAYDEN; GHOSH, 2012). Os estímulos indutores desencadeiam a ativação do complexo IκB quinase, levando à fosforilação, ubiquitinação e degradação das proteínas IκB (HAYDEN; GHOSH, 2012).

Vários genes utilizam NFκB através de variações de uma sequência de DNA quase palíndrômica, 5'-GGGRNWYYCC-3' (N, qualquer base; R, purina; W, adenina ou timina; Y, pirimidina), denominado *kB*, encontrado em seus promotores ou potenciadores (LENARDO; PIERCE; BALTIMORE, 1987), esse sítio liga dímeros de cinco proteínas que compõem a família do fator de transcrição Rel: p50, p52, Rel A (p65), Rel B e c-Rel, todos compartilham homologia N-terminal com o oncogene v-Rel (HAYDEN; GHOSH, 2008).

O domínio de homologia Rel (*Rel Homology Domain*, RHD) possui 300 aminoácidos contendo dois subdomínios do tipo beta da imunoglobulina (Ig) com três funções: ligação ao DNA por especificação de sequência, dimerização e ligação às proteínas inibitórias (HAYDEN; GHOSH, 2012; SMALE, 2012). O subdomínio N-terminal se assemelha ao domínio de ligação ao DNA p53 e especifica o reconhecimento do DNA, enquanto que o subdomínio C-terminal possui resíduos hidrofóbicos que formam interfaces de dimerização e proteína inibitória (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017).

As cinco proteínas da família Rel são classificadas em duas classes: p50 e p52 que surgem a partir das proteínas precursoras p105 (NFκB1) e p100 (NFκB2), respectivamente (BEINKE; LEY, 2004). A partir delas a região C-terminal contendo repetições de anquirina (AnkR) é clivada pos-translacionalmente; já a Rel A (p65), Rel B e c-Rel são sintetizados como proteínas maduras com domínios de transativação da transcrição (TADs) (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). Os dois dímeros paradigmáticos são 50: p65 e p52: RelB, embora outras combinações incluindo os homodímeros p50: p50 e p52: p52 ou heterodímeros p52: RelA ou p50:RelB existam com funções distintas (figura 04) (SMALE, 2012; TRASK, 2004)

Figura 4- Imagem ilustrativa da estrutura cristalográfica do NFκB1



Fonte: adaptado de Trask (2004)

Homodímero NFκB1-p50 (verde) e RelA-p65 (vermelho) ligada ao DNA.

Uma vez que combinações de dímeros podem reconhecer variantes distintas do local κB com diferentes afinidades, muitos padrões reguladores de genes podem ser gerados a partir destas proteínas (WAJANT; SCHEURICH, 2011). Em células não estimuladas, como linfócitos antes da ligação com o antígeno, o NFκB é principalmente citoplasmáticos devido à

ligação a um conjunto dedicado de proteínas inibidoras compreendendo a família do Inibidor de κB (inibitor *of kappa B*, I κB) (HAYDEN; GHOSH, 2008). Além disso, existe uma diferença na capacidade de transativação de cada tipo de NF κB , ou seja, diferentes combinações podem ser menos ou mais eficiente em induzir a expressão ou ativação de certos genes (GHOSH; KARIN, 2002; WAJANT; SCHEURICH, 2011).

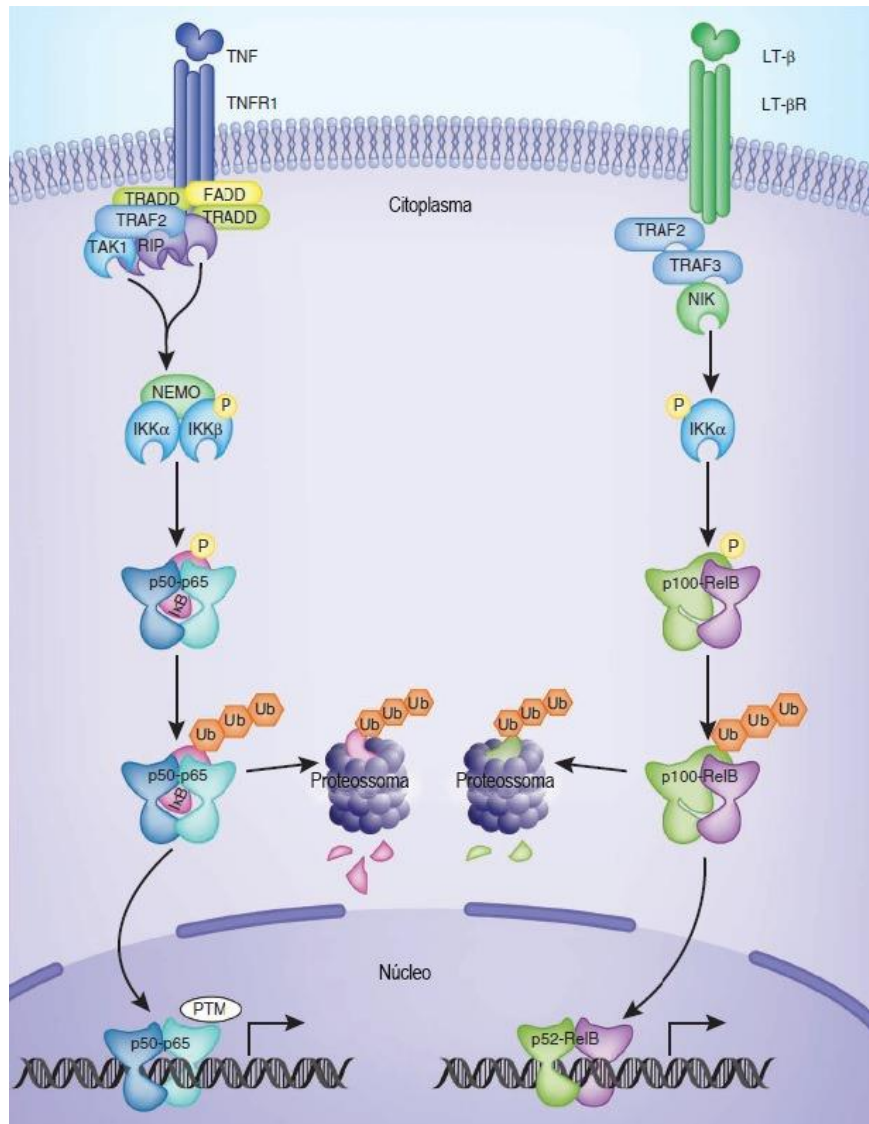
Quando ocorre a ativação da célula por um determinado estímulo, a I κB é fosforilada degradando-se rapidamente, em seguida, o NF κB é translocado para o núcleo ligando-se a um potencializador intrínico de genes alvos para induzir a transcrição do gene (YU; ZHONG; YANG, 2004). O NF κB pode ser ativado por três vias de sinalização: a clássica, também, conhecida como canônica; a alternativa ou não canônica e a atípica (OECKINGHAUS et al., 2011)

A via canônica está associada a processos inflamatórios, anti apoptose, resposta imune inata e sobrevivência celular, envolvendo, predominantemente, a ativação de p50 e p65 e c-Rel, contendo os dímeros do NF κB , assim, a fosforilação e degradação da I κB é necessária para que ocorra a translocação para o núcleo (FRANCO, 2010; VLANTIS; PASPARAKIS, 2010). Sinais pró-inflamatórios como citocinas, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados, ativam uma cascata de sinalização que leva à ativação de I κK , que libera NF κB de seu complexo inibitório. Como também, a superfamília do receptor de necrose tumoral (TNFR) após se ligarem ao TNF- α tem a capacidade de promover a sinalização com ativação do I κK , sendo que as cascatas de sinalização desencadeadas pela superfamília do TNFR podem induzir o NF κB ou a apoptose (GHOSH; KARIN, 2002; HUANG et al., 2000; YIN et al., 2009) (figura 05).

A fosforilação de I κB ocorre pela ação de quinases específicas denominadas de complexo I κB -quinase, composta por duas subunidades catalíticas I $\kappa K\alpha$ e a I $\kappa K\beta$ e uma outra subunidade não catalítica, NEMO (NF κB *essencial modulator*), considerada a subunidade que regula o complexo I κK (FRANCO, 2010). Existe a possibilidade de várias combinações entre essas subunidades, podendo ser homo ou heterodímeros IKK α ou IKK β , associadas ou não ao NEMO, sendo mais comum o complexo IKK α -IKK β -NEMO (FRANCO, 2010).

A via não canônica pode ser ativada pelo conjunto de receptores, TNFR, que incluem receptores para linfotoxina β , BAFF (*C cell-activating fator receptor*), RANK (*receptor activator of NF κB*) e CD40L, sendo a ativação mediada pela quinase NIK (*NF κB inducing Kinase*) sinaliza, preferencialmente, para I $\kappa K\alpha$ fosforilar a p100 associada a Rel B (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

Figura 5- Representação esquemática das vias de ativação do NFκB



Fonte: Adaptado de Oeckinghaus et al. (2011).

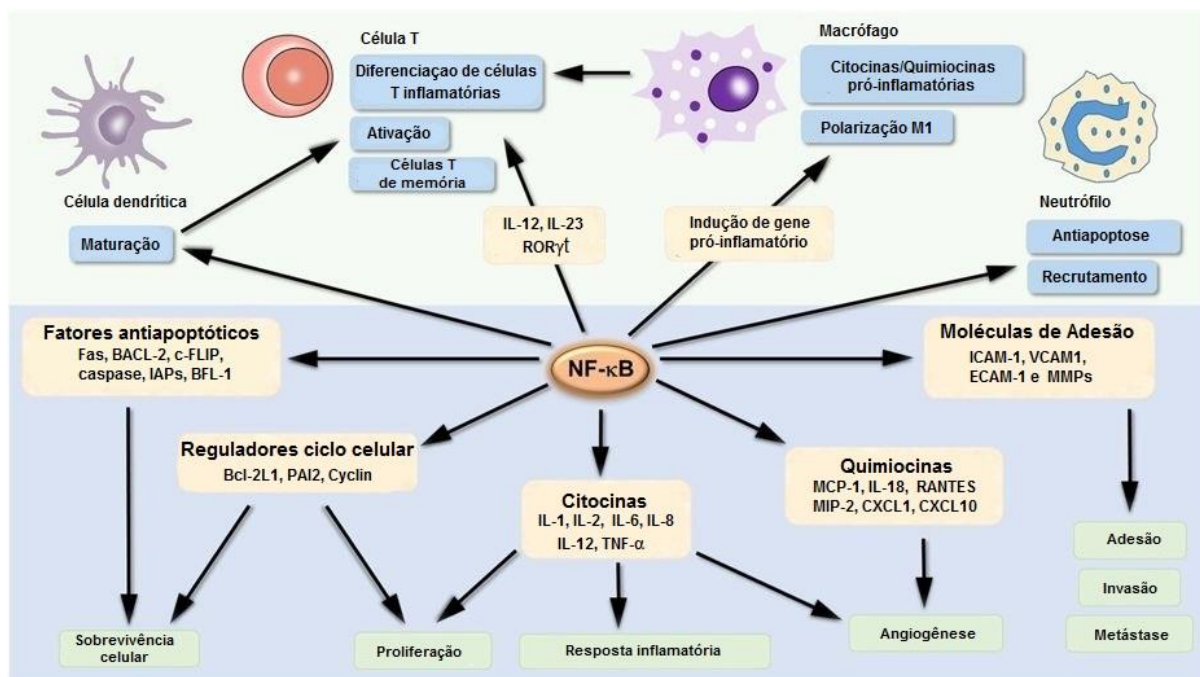
A via canônica (esquerda) é induzida por diferentes estímulos, nesse esquema, o estímulo é representado pelo TNF e TNFR1 e está associado com a expressão do heterodímero p50-p65 (RelA). A via não canônica (direita) é estimulada pela linfotoxina-β (LT-β) e expressa o heterodímero p52-RelB.

Funcionalmente, o NFκB canônico está envolvido em quase todos os aspectos das respostas imunes, enquanto a via não-canônica parece estar evoluindo como um eixo suplementar de sinalização que coopera com a via canônica na regulação de funções específicas do sistema imune adaptativo (SUN; LIU, 2011). Já na via atípica o desencadeamento ocorre pelo reconhecimento do DNA lesado decorrente de radiações

ultravioleta e situações de stress celular; esses estímulos induzem a fosforilação do I κ B através de um mecanismo independente do complexo I κ K (TERGAONKAR, 2006). As subunidades ativadas nesta via são as mesmas da clássica e atuam no controle dos genes inflamatórios, genes de reparo de DNA e antioxidantes importantes em doenças crônicas (TERGAONKAR, 2006).

Por ser um fator de transcrição indutível, o NF κ B, após a ativado promove a transcrição de vários genes que irão regular o processo inflamatório com produção de citocinas, moléculas de adesão, regulando a proliferação, apoptose e diferenciação celular (Figura 06) (LIU et al., 2017). Estudos têm demonstrado, através da expressão gênica, que os fatores de transcrição do NF κ B influenciam o fenótipo oncogênico (BASSÈRES; BALDWIN, 2006). Assim como, o NF κ B desempenha um papel crucial na supressão da apoptose, indução da proliferação celular e inflamação, estando intimamente associada com o desenvolvimento de câncer de colón, próstata e melanoma (SHUKLA et al., 2004).

Figura 6- Vias de sinalização do NF κ B



Fonte: Adaptado de Liu et al. (2017).

2.5.1 NF κ B1 e NF κ BIA

O NF κ B1 foi mapeado no cromossomo 4q23-q24, sendo composto por 24 exons. Este gene codifica a proteína p105 que por ter um precursor inativo precisa ser ativada pela p50, essa proteína tem a capacidade de se ligar ao DNA por degradação mediada por proteassoma

(GAO et al., 2014b; MATHEW et al., 1993). Inúmeros polimorfismos genéticos foram descritos no gene do *NFκB1*, sendo o polimorfismo funcional de inserção e deleção, -94 ins/del ATTG (rs28362491), na região promotora do *NFκB1* foi investigado em diversas doenças, como: doença de Graves (KURYLOWICZ et al., 2007), colite ulcerativa (BORM et al., 2005), artrite reumatoide (OROZCO et al., 2005) e vários cânceres (CURRAN; WEINSTEIN; GRIFFITHS, 2002; GAO et al., 2014b; YU et al., 2012).

A variante ATTG desse polimorfismo pode codificar três genótipos distintos: inserção homozigótica do tipo selvagem (ins/ins), deleção variante heterozigótica (del/del) e a variante heterozigótica (ins/del) (KARBAN et al., 2004; KOC et al., 2014). Karban et al., 2004 demonstram que no alelo que continham a deleção (del/ATTG) as proteínas ligavam-se fracamente e não completamente, enquanto que os alelos com inserção (ins/ATTG) apresentavam uma maior afeição, sugerindo que o polimorfismo poderia afetar a atividade promotora do gene *NFκB1*, devido a uma sinalização diminuída, tendo como consequência a diminuição da produção da proteína p50/p105 (KARBAN et al., 2004)

O IκBα tem a função de inibir o *NFκB1* sendo codificado pelo gene *NFκBIA* que foi mapeado no cromossomo 14q13 e possui 6 exons com aproximadamente 3,5kb, a família do IκB tem importante função regulatória da expressão final do fator transcricional, por isso a disfunção ou regulação negativa do IκBα pode ocasionar a ativação excessiva do NFκB (GAO et al., 2014b; LE BEAU et al., 1992; SENOL TUNCAY; OKYAY; BARDAKCI, 2010). O polimorfismo, *NFκBIA* 3'UTR A →G (rs696), localizado na região 30 não traduzida, pode regular a expressão do IκBα e como consequência afetar na ativação do NFκB (GAO et al., 2014b; SENOL TUNCAY; OKYAY; BARDAKCI, 2010). A troca de nucleotídeo nesse polimorfismo pode codificar três genótipos diferentes: a homozigose no alelo comum (AA), a variante heterozigótica (AG) e a variante homozigótica (GG) (KOC et al., 2014).

Estudo realizado por Goto et al., 2001, mostrou que as alterações na expressão da proteína do IκBα estavam relacionadas com o polimorfismo *NFκBIA* 3'UTR A →G, alterando a atividade do NFκB. Como também, Song et al., 2011 demonstraram, *in vitro*, que as variantes AG podem afetar a estabilidade no RNA mensageiro (mRNA) e o alelo A fortalece a ligação com o micro RNA 449a (miR-449a) com o 3UTR do *NFκBIA*, gerando a inibição da expressão desse gene. A alteração do alelo A para o G pode afetar a estabilidade do mRNA ou a eficácia translacional, tendo como consequência a diminuição dos níveis da proteína (SONG et al., 2011).

A maioria dos estudos, utilizaram os polimorfismos combinados, uma vez que o *NFκBIA* codifica inibidor do produto codificado pelo *NFκB1*, mutações em ambos

polimorfismos ou em combinações específicas, podem gerar alterações mais proeminentes nos níveis de NFκB. Não existem dados na literatura que associem os polimorfismos do NFκB com o ciclo replicativo do HHV-8 e nem com as doenças associadas ao vírus.

2.5.2 HHV-8 e o NFκB

Os herpesvírus têm como característica a capacidade de suportar dois ciclos distintos: o ciclo lítico e de latência. A latência ocorre após a infecção e se caracteriza pela persistência do genoma viral no núcleo da célula e a expressão de um pequeno número de genes virais, enquanto que o ciclo lítico ocorre após a infecção *de novo* ou reativação de um vírus em ciclo latente, resultando na replicação viral. (SUN et al., 1998). Alguns estudos têm demonstrado a importância do ciclo lítico em processos oncogênicos, no qual a reativação viral ou infecção *de novo* seria um importante fator para o desenvolvimento do SK (LUKAC et al., 1998; BROWN et al., 2003).

As proteínas virais líticas possuem homologia com proteínas humanas, mimetizando as proteínas hospedeiras que regulam o ciclo celular, contribuindo para a sobrevivência e proliferação das células endoteliais, como também induzem um efeito imunomodulador que favorece a replicação viral (KNOWLTON et al., 2014). A expansão das células B proporciona alvos para a infecção inicial do HHV-8 e replicação do ciclo lítico, ainda não está elucidado se há uma transição na infecção pelo HHV-8 nas células B não diferenciadas para células B de memória (MOIR; FAUCI, 2009). Entretanto, o vírus estimula a diferenciação de células plasmáticas, como também a coinfeção com o HIV poderia ser um fator contribuinte, uma vez que os pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam quantidade anormais de linfócitos B (LB) imaturos e plasmoblastos (MOIR; FAUCI, 2009; KNOWLTON et al., 2014).

Embora a ativação de NFκB por uma infecção viral tem o objetivo de ativar a resposta imune a patógenos invasores, vários vírus, como o HHV-8, desenvolveram estratégias para aproveitar essa via para direcionar a expressão e replicação gênica viral, bem como evitar a apoptose (SGARBANTI et al., 2004). A ativação do NFκB protegeria a célula hospedeira do apoptose e assegurariam o estabelecimento da latência viral e infecção estável, entretanto, essa seria uma via importante para a linfomagenese viral, favorecendo a patogênese das doenças associadas, principalmente o PEL (GUASPARRI et al., 2012; GUASPARRI; KELLER; CESARMAN, 2004).

Em pacientes infectados pelo HHV-8, a vFLIP demonstrou ter a capacidade de ativar a via clássica do NFκB através da ligação e ativação do complexo quinase IκK, com consequente fosforilação de IκBα, liberando o NFκB da influência inibitória com migração

para núcleo e expressão dos genes alvos (FIELD et al., 2003; LIU et al., 2002; MATTA; CHAUDHARY, 2004).

Estudos reportaram que a atividade do NFκB poderia inibir a ativação dos genes líticos, favorecendo a latência viral (BROWN et al., 2003; GROSSMANN; GANEM, 2008; EHRLICH et al., 2014). Brown et al. (2003), em estudo com *gammaherpesvirus* apontaram que a superexpressão do NFκB poderia inibir a ativação dos genes líticos nessa família, sendo um regulador do equilíbrio entre a latência e a replicação lítica. Como também, Ehrlich et al. (2014), observaram uma diminuição nos níveis da proteína vFLIP e na ativação do NFκB na presença da proteína de gatilho para o ciclo lítico, RTA (EHRLICH et al., 2014). Grossman et al. (2008), demonstram que a inibição do NFκB em algumas populações celulares levaria ao aumento da expressão de genes líticos no PEL, entretanto, em condições de infecção *de novo*, o contexto inibitório do NFκB levaria a reativação lítica, aumento da citotoxicidade e apoptose (GROSSMANN; GANEM, 2008).

As proteínas virais líticas, K1, K15 e v-GPCR também foram associadas na indução da atividade do NFκB, favorecendo a replicação viral e a patogênese das doenças associadas ao vírus (AZZI et al., 2014; BRINKMANN et al., 2003; BRINKMANN; SCHULZ, 2006; JÄRVILUOMA; OJALA, 2006; KONRAD et al., 2009; MATTA; CHAUDHARY, 2005). Foi demonstrado, *in vitro*, que a superexpressão da proteína lítica vGPCR induz o NFκB no PEL (CANNON, M.; PHILPOTT; CESARMAN, 2003;). Sgarbanti et al. (2004), mostraram que a atividade do NFκB é necessária para o ciclo lítico do HHV-8, sugerindo que esse fator poderia ser um facilitador do ciclo replicativo e importante para a maturação do vírion, sendo a ativação do complexo IκKα/IκKβ necessária para a regulação dos aspectos da infectividade do HHV-8 (SGARBANTI et al., 2004).

Estudo realizado por Blatman et al., 2014, apontaram o NFκB como necessário para a produção de virions competentes, os virions produzidos em condições de inibição do fator nuclear, apresentaram um defeito na ligação ou na entrada para infectar novas células. Esses mesmos autores sugerem que estratégias terapêuticas para a inibição do NFκB podem ser válidas em pacientes com viremia não controlada, como os imunossuprimidos por terapia supressora, pacientes com aids ou pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento das doenças associadas ao HHV-8 (SK, PEL, MCD) (BLATTMAN et al., 2014). O inibidor de proteassoma, Bortozomib®, age na atividade no NFκB e poderia ser útil na diminuição da atividade replicativa do HHV-8 e no tratamento de doenças associadas (BLATTMAN et al., 2014; MATTA; CHAUDHARY, 2005).

O NFκB tem um importante papel no estabelecimento da latência (BROWN et al., 2003; GROSSMANN; GANEM, 2008; GUASPARRI et al., 2012), como também, estaria associado com atividade lítica do HHV-8 e produção de virions viáveis (BLATTMAN et al., 2014; CANNON; PHILPOTT; CESARMAN, 2003; SGARBANTI et al., 2004), entretanto a maioria dos estudos foram realizados com doenças associadas e/ou *in vitro*. Este trabalho pretende contribuir com informações sobre a associação da expressão do NFκB e seus polimorfismos genéticos (*NFκB1*-94 ins/del ATTG e *NFκB1A* 3'UTR A →G) com o ciclo replicativo do HHV-8 em pessoas coinfectadas pelo HIV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre a infecção latente ou lítica pelo HHV-8 com a expressão do NFκB e TNF-α em linfócitos B (CD19+) e T (CD3+) e com os polimorfismos do *NFκB1* e *NFκBIA* em pessoas coinfectadas pelo HIV.

3.2 Objetivos específicos

Em pessoas coinfectadas HIV/HHV-8 com infecção latente ou lítica pelo HHV-8:

- Associar a expressão do NFκB e/ou TNF-α em células CD19+ ou CD3+;
- Correlacionar a expressão do NFκB e/ou TNF-α em células CD3+ com as contagens de linfócitos T CD4 ou T CD8;
- Descrever as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do *NFκB1* (94 ins/del ATTG);
- Descrever as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do *NFκBIA* (3'UTR A → G);
- Verificar a associação do ciclo lítico ou latente com o polimorfismo nos genes *NFκB1* e/ou *NFκBIA*;
- Verificar a correlação dos polimorfismos nos genes *NFκB1* e/ou *NFκBIA* com a contagem de linfócitos T CD4 ou T CD8.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho, população e locais do estudo.

4.1.1 Desenho e locais do estudo

O estudo, do tipo comparação entre grupos, foi composto por pessoas coinfectadas HIV/HHV-8, atendidas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Recife – PE. Os dados laboratoriais (contagem de linfócitos TCD4, TCD8 e carga viral do HIV) foram obtidos a partir da análise dos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME). O processamento das amostras, análises imunológicas e moleculares foram realizadas no Setor de Virologia do Laboratório Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – IMT/USP e no Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco - IAM/FIOCRUZ/PE.

4.1.2 População do estudo

Participaram do estudo 738 pessoas com o diagnóstico confirmado para a infecção pelo HIV desse, 189 foram reagentes para anti-HHV-8. A amostra de soro dos 189 foram submetidas a imunofluorescência indireta para antígenos do ciclo lítico e latente, sendo 75 reagentes para antígenos da latência, 63 para antígenos líticos, 41 apresentaram anticorpos para ambos os ciclos e 10 foram negativos. Os 138 pacientes que apresentaram anticorpos para antígenos de ciclos distintos foram incluídos no estudo (75 latentes e 63 líticos). Para as análises das expressões celulares foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam carga viral do HIV detectável (43 latentes e 40 líticos) e para as análises genéticas foram excluídos do estudo 6 pacientes por decorrência da baixa qualidade de DNA após a extração (69 latentes e 63 líticos). Todos os pacientes que foram incluídos no estudo faziam uso da terapia antirretroviral (TARV)

4.2 Definição do tamanho amostral

O cálculo amostral foi realizado utilizando o programa Epi Info versão 7.2.2.6, assumindo um erro alfa de 0,05, com nível de confiabilidade de 95% e um “power” de 80 %. O cálculo foi realizado com base na prevalência do HHV-8 e 10% foi adicionado ao valor final a fim de suprir eventuais perdas. Por fim, o cálculo apontou a necessidade de um grupo com 48 indivíduos em latência e 48 indivíduos em ciclo lítico do HHV-8.

4.3 Critérios de inclusão

Pessoas de ambos os sexos, com idade maior que 18 anos, diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV, estabelecido de acordo com a portaria nº 151, de 14 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009) e sorologia positiva para a infecção pelo HHV-8.

4.4 Critérios de exclusão

- Uso de inibidores de NF- κ B (Bortezomib);
- Mulheres Grávidas;
- Outras coinfeções (HBV, HCV, HTLV I/II)
- Doenças autoimunes;
- Uso de medicamentos imunossupressores;
- Outras infecções no momento da coleta.

4.5 Definição e categorização das variáveis do estudo

4.5.1. Variáveis dependentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL
Indivíduos HIV/ HHV-8 em latência para o HHV-8	Infecção latente determinada por Imunofluorescência indireta.
Indivíduos HIV/HHV-8 na fase lítica pelo HHV-8	Infecção lítica determinada por Imunofluorescência indireta.

4.5.2 Variáveis independentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	CATEGORIZAÇÃO
Expressão do NFκB-p65	Quantificação da emissão de fluorescência (PE) intracelular nas populações de linfócitos CD19 ⁺ e CD3 ⁺ por citometria de fluxo. Variável contínua.	—
Expressão celular do TNF-α	Quantificação da emissão de fluorescência (PE) intracelular nas populações de linfócitos CD19 ⁺ e CD3 ⁺ por citometria de fluxo. Variável contínua.	—
<i>NFκB1</i> 94 ins/del ATG	Presença de uma variação na sequência que afeta somente um nucleotídeo definido por RFLP em tempo Real. Variável nominal.	1. Inserção/Inserção 2. Inserção/Deleção 3. Deleção/Deleção
<i>NFκB1A</i> 3'UTR A → G	Presença de uma variação na sequência que afeta somente um nucleotídeo definido por RFLP em tempo Real. Variável nominal.	1. AA 2. AG 3. GG
Sexo	Gênero apresentado pelo paciente. Variável nominal dicotômica.	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea. Variável contínua.	—
Etnia	Indicado pelo paciente, através de entrevista, a qual etnia pertence.	1. Parda/Mulato 2. Negra 3. Branca 4. Indígena 5. Amarelo
-Número de linfócitos T CD4 ⁺	Quantificação do marcador de superfície celular CD3 associado a CD4, sendo referida no prontuário do paciente desde que realizada no período máximo de três meses anteriores a data de coleta da amostra	—

	sanguínea, resultado expresso em células/mm ³ . Variável contínua.	
Número de linfócitos T CD8 ⁺	Quantificação do marcador de superfície celular CD3 associado a CD8, sendo referida no prontuário do paciente desde que realizada no período máximo de três meses anteriores a data de coleta da amostra sanguínea, resultado expresso em células/mm ³ . Variável contínua.	
Carga viral do HIV	Número de cópias/mL do HIV-RNA quantificadas no soro do paciente, sendo referida no prontuário do paciente desde que realizada no período máximo de três meses anteriores a data de coleta da amostra sanguínea. Variável contínua.	—
Tempo de uso da TARV	Referida no prontuário do paciente. Variável contínua.	—

4.6 Coleta de dados

Ao aceitar participar da pesquisa, o paciente assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que lhe assegura o cumprimento das normas da resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde (APÊNDICE A). Posteriormente, dados sociais foram coletados no momento da assinatura do TCLE e os valores da contagem de linfócitos TCD4, TCD8 e carga viral do HIV foram obtidos através do prontuário.

4.7 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em quatro tubos de 4 ml: um contendo K3-EDTA, dois contendo heparina e um tubo seco. Em seguida as amostras foram encaminhadas para o Setor de Virologia do LIKA e para o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ/PE. As amostras de sangue contendo EDTA e as amostras de soro foram armazenadas em microtubos de 2mL a -20°C, para posterior extração de DNA e realização da sorologia, respectivamente. As amostras com Heparina foram processadas e cultivadas para a imunofenotipagem.

4.8 Imunoensaio Enzimático para HHV-8

Para detecção da presença da infecção pelo HHV-8 foi realizado o imunoensaio enzimático indireto *in house* de vírus total. O teste detecta anticorpos IgG contra proteínas estruturais e não estruturais do vírus, utilizando a linhagem celular do linfoma de células B de cavidades do corpo (*Body Cavity Based Lymphom*, BCBL-1). As células foram cultivadas em garrafas de 125mL com meio RPMI 1640 (Gibco®, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 2.5µ de anfotericina B e 100U/mL de penicilina/estreptomicina em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO². O lisado de antígenos foi obtido através da mistura do conteúdo do material cultivado, sendo uma garrafa induzida com acetato de ester de forbol tetradecanoil (TPA), 1 µg/mL de TPA (Sigma®, USA) por 96 horas ao abrigo da luz, e outra não induzida. As alíquotas utilizadas em cada placa foram obtidas por sonicação e foram estocadas a -80 °C.

As microplacas (Nuncpolysorp®, Waltham, MA, EUA) foram sensibilizadas com 100 µl de antígeno diluído 1:100 e incubadas *Overnight*, posteriormente as placas foram lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfatos pH=7.2, 0.05 Tween 20) e bloqueadas (leite desnatado 5%) por uma hora. Após o bloqueio, o soro do paciente, previamente diluído (1:200), foi adicionado e incubado por uma hora à 25°C, posteriormente foram realizadas quatro lavagens e adicionado o conjugado (anti human IgG peroxidase conjugate-P0214 DAKO®) e uma nova incubação a 25°C por 40 minutos foi realizada. Após nova lavagem, a placa foi incubada com o substrato (substrate/chromogen (tetramethylbenzidine; Dade Behring®, Deerfield, IL, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente. A reação foi parada com ácido sulfúrico e a leitura realizada em espectrofotômetro (Biochrom Asys Expert Plus®) no comprimento de onda de 450nm/620nm. O cálculo do cut-off foi realizado através da média dos controles positivos, subtraindo o branco, os valores superiores ao cut-off foram considerados positivos, todas as amostras com resultado positivo foram novamente testadas para confirmação do diagnóstico. Protocolo adaptado de Nascimento et al. (2007)

4.9 Imunofluorescência indireta

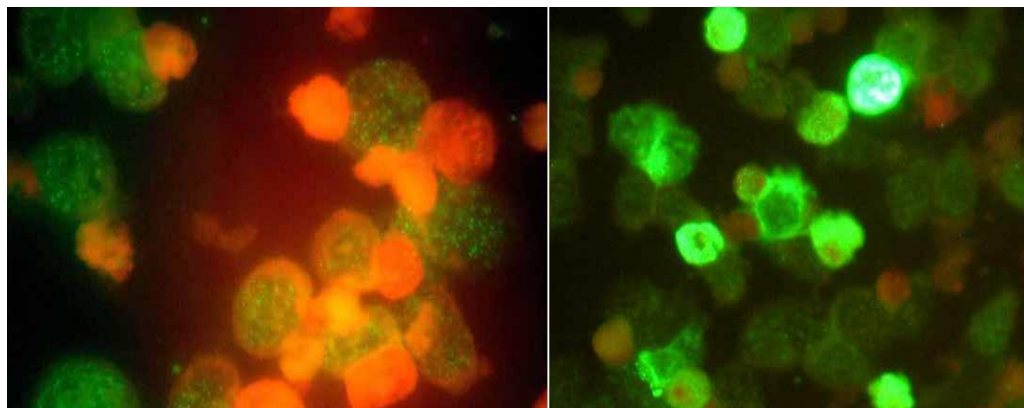
A fim de identificar se os pacientes estavam em ciclo lítico ou latente do HHV-8 foi realizada a imunofluorescência indireta. Para confecção das lâminas, células BCBL-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de

soro bovino fetal, 100mg/mL de estreptomicina, 2µg/mL de anfotericina B e 100U/mL de Benzilpenicilina. Para a detecção da fase lítica, as células foram cultivadas por 96 horas com 20ng/mL de TPA, a fim de induzir a transcrição do genoma viral, e para a detecção da fase latente foram utilizadas células que não foram submetidas a indução por TPA. As células foram lavadas com PBS (pH=7.2) e ressuspensas em uma concentração de 10 células/mL, posteriormente, 10µl da suspensão foi adicionada na área demarcada da lâmina sendo deixada à temperatura ambiente para secagem e foram fixadas com acetona gelada por 20 minutos. As lâminas foram congeladas a -80°C para posterior utilização.

Após o descongelamento, as lâminas foram hidratadas com uma solução de 30µl de leite desnatado a 1% por 5 minutos em temperatura ambiente. Após aspirar o leite, 25µl do soro do paciente foi adicionado, sendo diluído de 1:100 para detecção da latência e 1:40 para detecção do ciclo lítico, posteriormente as lâminas foram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. Após lavagem, foi adicionado 30µl do conjugado (anti-IgG humano com isoticionato de fluoresceína- Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA), diluído 1:50 em azul de Evans, e a lâmina foi novamente incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Seguido os 30 minutos, a lâmina foi lavada e montada com glicerina tamponada (pH 9.2) e lida em microscópio de imunofluorescência Zeiss com aumento de 400 vezes (Figura 07). A análise do ciclo lítico e latente foram realizadas em lâminas diferentes e em duplicata.

Para controle interno em todas as lâminas foram adicionados um controle negativo e um controle positivo e para cada análise foi testado um controle positivo em diluições seriadas de 1:50 a 1:12.500 a fim de verificar a sensibilidade do teste. Protocolo adaptado de Nascimento et al. (2007)

Figura 7- Imunofluorescência indireta positiva antígenos latentes e líticos



Fonte: Sumita, 2009.

A esquerda IFI positiva para anticorpos contra o antígeno da fase latente e fase lítica e a direita positividade para anticorpos contra antígeno lítico.

4.10 Cultura celular

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de sangue heparinizado por centrifugação num gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare®, Uppsala, Suécia) como descrito anteriormente (LORENA et al., 2008). As células foram colocadas em tubos de cultura de polipropileno de 14 ml (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) suplementado com antibiótico a 1% (10.000 U de penicilina, 10.000 U de estreptomicina, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) e 10% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Os tubos de cultura foram estimulados com fito hemaglutinina (PHA) (Cultilab®, Campinas, SP, BR) (5µg/mL). Para cada paciente, foram utilizados dois tubos de cultura, um com estímulo (PHA+) e outro sem estímulo (PHA-). A Brefeldina A (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA®) (1µg /mL) foi adicionada para impedir a secreção de citocinas do complexo de Golgi. Os tubos foram incubados à 37°C com 5% de CO₂ por quatro horas. As culturas foram realizadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL

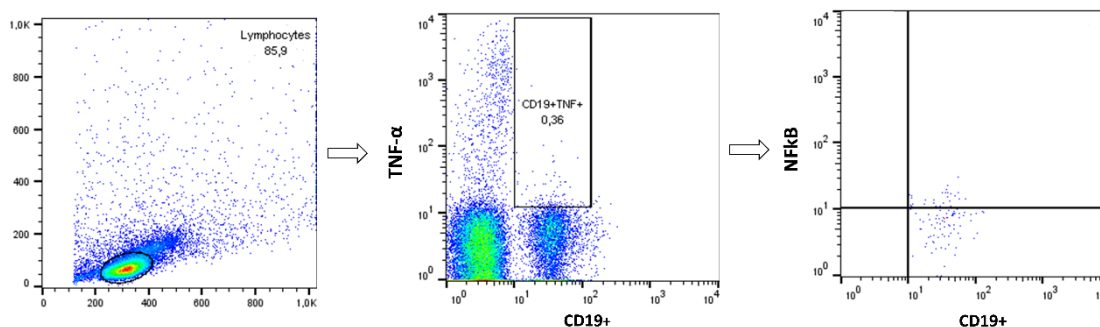
4.11 Imunofenotipagem do NFκB-p65 e TNF-α

Após as quatro horas de cultura, as células foram lavadas (400g/10 min/temperatura ambiente) com PBS suplementado com 0.5% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) e 0.1 %de azida de sódio (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) (PBS-Wash). Após lavadas as células foram marcadas com CD3- peridinina-clorofila-proteína (PerCP) e CD19-isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os tubos foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, posteriormente as células foram permeabilizadas com solução *Permwash* (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) por 10 minutos ao abrigo da luz. Então as células foram incubadas com TNF-α-aloficocianina (APC) e NFκB-p65-ficoeritrina (PE) por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, após incubação, as células foram lavadas, fixadas e armazenada a 4 °C para posterior aquisição de fluorescência por citometria de fluxo.

A aquisição das amostras foi realizada no FACScalibur (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) e foram adquiridos 30.000 eventos por tubo, inicialmente foi selecionado um gradiente para a seleção da população de linfócitos por meio do gráfico do canal de dispersão (FSC) *versus* o canal de dispersão lateral (SSC). Após a aquisição, os dados foram analisados utilizando o programa Flowjo (Flowjo®, USA). Para avaliar o NFκB foi utilizado os canais

FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) *versus* o FL2 (NF κ B) e para avaliar a produção de TNF- α os quadrantes FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) *versus* o FL4 (TNF- α). Para avaliar as marcações do TNF- α +NF κ B+ em linfócitos CD19 (Figura 08) ou CD3 foi selecionado um quadrante de interesse, R2, em FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) *versus* o FL4 (TNF- α) e posteriormente foi avaliado esse quadrante R2 *versus* FL2 (NF κ B) para obtenção de dois gráficos bidimensionais.

Figura 8- Representação da análise com marcação tripla



Fonte: Do autor (2018).

4.12 Análises dos Polimorfismos do *NFκB1* e *NFκBIA*

Os polimorfismos, *NFκB1*-94 ins/del ATTG e *NFκBIA* 3'UTR A $\rightarrow$ G, foram determinados pela reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de DNA (PCR-RFLP). A PCR foi realizada com Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), os primers e as enzimas utilizados nas reações estão descritos na tabela XX. As condições da PCR foram otimizadas para ambos polimorfismos, 95°C por 3 minutos para a desnaturação inicial, 32 ciclos a 95°C por 30 segundos para desnaturação, 52°C por 30 segundos para o anelamento dos primers, 72°C por 1 minuto para a extensão seguido de 72°C por 5 minutos para extensão final.

O produto da PCR foi digerido com 1U da enzima de restrição, *overnight* a 37°C e posteriormente foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% por 30 minutos (120v). Após a eletroforese, foram analisadas as bandas presentes no gel. Para o polimorfismo do *NFκB1* as variantes com inserção foram clivadas pela enzima em dois fragmentos, 240pb e 45pb, e a variante com deleção não foi digerida, apresentando um produto de 281pb, os indivíduos heterozigotos apresentaram três fragmentos (281pb, 240pb e 45pb). Para o polimorfismo do *NFκBIA*, o homozigoto do alelo comum (AA) não foi clivado pela enzima,

apresentando um fragmento de 424pb, enquanto que o homozigoto do alelo variante (GG) apresentou dois fragmentos, 316pb e 108pb, o heterozigoto apresentou três fragmentos (424pb, 316pb e 108pb). O DNA utilizado nas análises foi extraído por kit comercial (Promega® Madison, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 1- Sequência de primers e enzimas de restrição

Polimorfismo	Primers	Enzima
<i>NFκB1</i> -94 ins/del ATTG	F: TGG GCA CAA GTC GTT TAT G R: CTG GAG CCG GTA GGG AAG	Van91 (Fermentas®)
NFκBIA 3'UTR A → G	F: GGC TGA AAG AAC ATG GAC TTG R: GTA CAC CAT TTA CAG GGA GGG	HaeIII (Fermentas®)

4.13 Análise estatística

Para verificar a associação das expressões de NFκB-p65 e TNF-α entre os dois grupos do estudo foi aplicado o teste de Mann-Whitney e para a correlação entre a expressão e a contagem de linfócitos TCD4 ou TCD8 foi utilizado a correlação de Spearman. As análises da associação dos alelos e genótipos dos polimorfismos e variáveis como sexo e etnia foram realizadas através do teste Qui-quadrado (χ^2) com a correção de Yates. Em todos os testes foi utilizado um intervalo de confiança de 95% e considerado significativo um valor de $p < 0.05$. O programa utilizado para as análises foi o GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4.14 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE - 45156215.5.0000.5208).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da expressão de NFκB e TNF-α em células CD19+ e CD3+ sobre o ciclo de vida do HHV-8 em pacientes infectados pelo HIV

- Título do periódico: Medical Microbiology and Immunology
- Área de avaliação: Medicina II

Resumo

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) pode apresentar duas fases de replicação, ciclo lítico e latente, ambos modulados por fatores virais e hospedeiros. Embora vários estudos tenham mostrado a influência do NFκB na replicação do HHV-8, os resultados de sua participação na infecção latente são discordantes. É possível que os resultados divergentes sejam influenciados pelo modelo *in vitro* utilizado. Aqui, nós avaliamos a associação da expressão de NFκB e/ou TNF-α em linfócitos B (CD19 +) e T (CD3 +) de pessoas vivendo com HIV/AIDS com a infecção latente ou lítica do HHV-8. Analisamos também a correlação da expressão de NFκB e / ou TNF-α com as contagens de linfócitos TCD4 e TCD8. Em condições *ex vivo*, a expressão de NFκB e/ou TNF-α em linfócitos B (CD19+) esteve fortemente associada ao ciclo lítico do HHV-8 ($p < 0,0001$). Da mesma forma, as células CD19+TNF-α+NFκB+ e CD3+TNF-α+NFκB+ também foram fortemente relacionadas à infecção lítica ($p < 0,0001$). Células CD3+ TNF-α+ do grupo lítico foram correlacionadas com a contagem de linfócitos TCD8 ($r = 0,70$, $p < 0,0001$). Acreditamos que essas análises realizadas com células de pacientes infectados forneçam achados mais consistentes sobre o papel da resposta imune na regulação da replicação do HHV-8. Finalmente, levando em conta o papel das proteínas do ciclo lítico na patogênese das doenças relacionadas ao HHV-8 (sarcoma de Kaposi, doença de Castleman multicêntrica e linfoma de efusão primária) acreditamos que o NFκB e o TNF-α poderiam ser explorados no futuro como potenciais biomarcadores para estas condições clínicas.

Keywords: HHV-8; replication cycle; immune response; NFκB; TNF-α

Introdução

O Herpesvírus humano 8 (*Human gammaherpesvirus 8*, HHV-8), também conhecido como Herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi, é um membro da família *Herpesviridae* e gênero *Rhadinovirus* [1]. Atualmente, o sarcoma de Kaposi (SK) é um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) [2]. O HHV-8 também é o agente etiológico da doença multicêntrica de Castleman (MCD) e do linfoma de efusão primário (PEL) [3–5].

O HHV-8 pode expressar seus genes em duas fases transcricionais, a latente e lítica [6]. As proteínas de fase latente (LANA, vCyclin, vFLIP) tem por objetivo a persistência do vírus na célula, enquanto que as proteínas expressas no ciclo lítico (e.g vGPCR, K1, k15) medeiam a produção da progênie viral e a infecção de novas células [8]. Além dos elementos virais, alguns fatores do hospedeiro, como genéticos, estresse oxidativo e secreção de algumas citocinas (IL-4, IL-6, IL-10), também podem estar associados à replicação do HHV-8 [9–11].

O NFκB representa uma família de fatores de transcrição que podem ser ativados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como dsDNA e dsRNA viral, e também pelo TNF-α, uma potente citocina anti-viral [12]. Uma vez ativado, o NFκB regula a expressão de uma ampla variedade de genes envolvidos na resposta inflamatória e imunológica, como TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IL-12, MCP-1, IL-18, RANTES, MIP-2, CXCL1 e CXCL10 [13]. A ativação inapropriada das vias de sinalização do NFκB tem sido associada à autoimunidade, inflamação crônica e alguns tipos de câncer [14–16].

A família NFκB atua como dímeros sendo formados por cinco membros, RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p100/p52) e NFκB2 (p105/50) [17,18]. RelA, RelB, c-Rel possuem um domínio de transativação C-terminal, que permite a ativação da expressão do gene alvo e o NFκB1 e NFκB2 possuem atividade de ligação ao DNA [15,17,19]. Embora outras combinações possam ocorrer, os dímeros mais frequentes são p50: RelA e p52: RelB [20,21].

Numerosos estudos relataram a influência do NFκB no ciclo lítico ou latente do HHV-8 [12,22,31,32,23–30]. Experimentos realizados com o HHV-8, Vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) e Gammaherpesvirus murino 68 (*Murine gammaherpesvirus 68*, MHV-68) relataram a associação da superexpressão do NFκB com a inibição de genes líticos [26]. Ehrich et al. (2014) observaram que a presença da proteína viral RTA resultou na diminuição da ativação de NFκB durante a reativação lítica [27]. Grossmann e Ganem (2008)

demonstraram que a inibição do NFκB pode levar ao aumento da expressão de genes líticos no PEL. Em infecções *de novo*, a inibição do NFκB resultou em reativação lítica, aumento da citotoxicidade e apoptose [31]. Por outro lado, vários estudos também associaram as proteínas virais do ciclo lítico, como a ORF 75, K1, K13, K15 e vGPCR, com a ativação do NFκB, favorecendo a replicação viral e o desenvolvimento de doenças associadas ao HHV-8 [22,24,25,33–35].

Embora todos esses resultados apontem a relação entre o ciclo NFκB e HHV-8, seus achados, às vezes conflitantes, foram quase todos obtidos de experimentos *in vitro*, realizados com linhagens de células de laboratório, que podem não ser verdadeiramente representativas do paciente infectado. Aqui, nós avaliamos a associação da expressão do NFκB (RelA) e/ou TNF-α em linfócitos B (CD19+) e T (CD3+) de PVHA com infecção latente ou lítica do HHV-8. Além disso, também analisamos a correlação da expressão do NFκB (RelA) e/ou TNF-α com as contagens de linfócitos TCD4 e TCD8.

Material e métodos

População do estudo

Participaram do estudo pessoas de ambos os sexos, maiores de 18 anos, acompanhadas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os participantes (n=83) tiveram diagnóstico confirmado de infecção por HIV e HHV-8, todos sem SK, MCD ou PEL. Os indivíduos estavam sob terapia anti-retroviral regular (TARV) e apresentavam carga viral indetectável para o HIV. As características gerais, sexo, tempo de uso da TARV e contagem de linfócitos TCD4 e TCD8, são demonstradas na tabela 1. Após imunofluorescência indireta [36], os pacientes foram divididos em dois grupos: latente (n=43) e lítico (n=40). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo: 45156215.5.0000.5208).

Tabela 1 – Caracterização da população

Grupo	Número de Indivíduos	Idade [#]	Masculino	Feminino	Uso da Tarv (meses)*	LTCD4*	LTCD8*
Latente	43	44.5 (±10.1)	72.1% (31)	27.9% (12)	156	566	740
Lítico	40	41.5 (±10.9)	57.5% (23)	42.5% (17)	99	774	735
Total	83	43 (±10.6)	65.1% (54)	34.9% (29)	115	566	736

[#]Resultado expresso em média ±DP; *mediana

Cultura celular

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de sangue heparinizado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare®, Uppsala, Suécia), como descrito anteriormente [37]. As células foram colocadas em tubos de cultura de polipropileno 14mL (Becton Dickinson®, San Jose, Califórnia, EUA), contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) suplementado com antibiótico a 1% (10.000U de penicilina e 10.000U de stock de estreptomicina) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Para cada paciente, foram utilizados dois tubos de cultura, um com estímulo [fitohemaglutinina (PHA+), 5µg / mL] (Cultilab®, Campinas, SP, BR) e o outro sem estímulo (PHA-). foram realizadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas a 37 com 5% de CO₂ durante 4 horas. A Brefeldina A (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA®) (1µg/ mL) foi adicionada para impedir a secreção de citocinas do complexo de Golgi.

Imunofenotipagem

As células foram lavadas por centrifugação (400g/10min/à temperatura ambiente) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) e 0,1% de azida sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) (PBS-Wash). As amostras foram marcadas com CD3-peridina-clorofila-proteína (PerCP) e isotiocianato de fluoresceína CD19 (FITC) (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os tubos foram então incubados por 30 min em temperatura ambiente e as células foram permeabilizadas com solução de Perm/Wash (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) por 10 min no escuro. Posteriormente, as células foram incubadas com TNF- α -Aloficocianina (APC) e NF κ B-p65-Fitoeritrina (PE) (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) por 30 min no escuro e à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas, fixadas com Cytotfix (Becton Dickinson®, San Jose, CA, EUA) por 15 minutos e armazenadas a 4 ° C até o momento da aquisição.

Aquisição e análise por Citometria de Fluxo

Inicialmente foi selecionado um *gate* para a seleção da população de linfócitos por meio do *Forward Scatter Channel* (FSC) versus o *Scatter Side Channel* (SSC). As amostras imunomarcadas foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur® Becton

Dickinson®, San Jose, CA, EUA) e um mínimo de 30.000 eventos foram coletados. As análises foram realizadas utilizando o software Flowjo, versão 10. O quadrante estatístico FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) versus FL2 (NFκB) foi utilizado para avaliar a presença de NFκB. Para avaliar a produção de TNF-α utilizou-se o quadrante estatístico FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) versus FL4 (TNF-α). Para realizar a análise da expressão de TNF-α + NFκB-p65 + em linfócitos CD3 + ou CD19 +, selecionou-se a janela de interesse R2 no gráfico FL1 (CD19) ou FL3 (CD3) versus FL2 (NFκB), e FL1 versus FL2 dois Gráficos bidimensionais foram obtidos.

Análise estatística

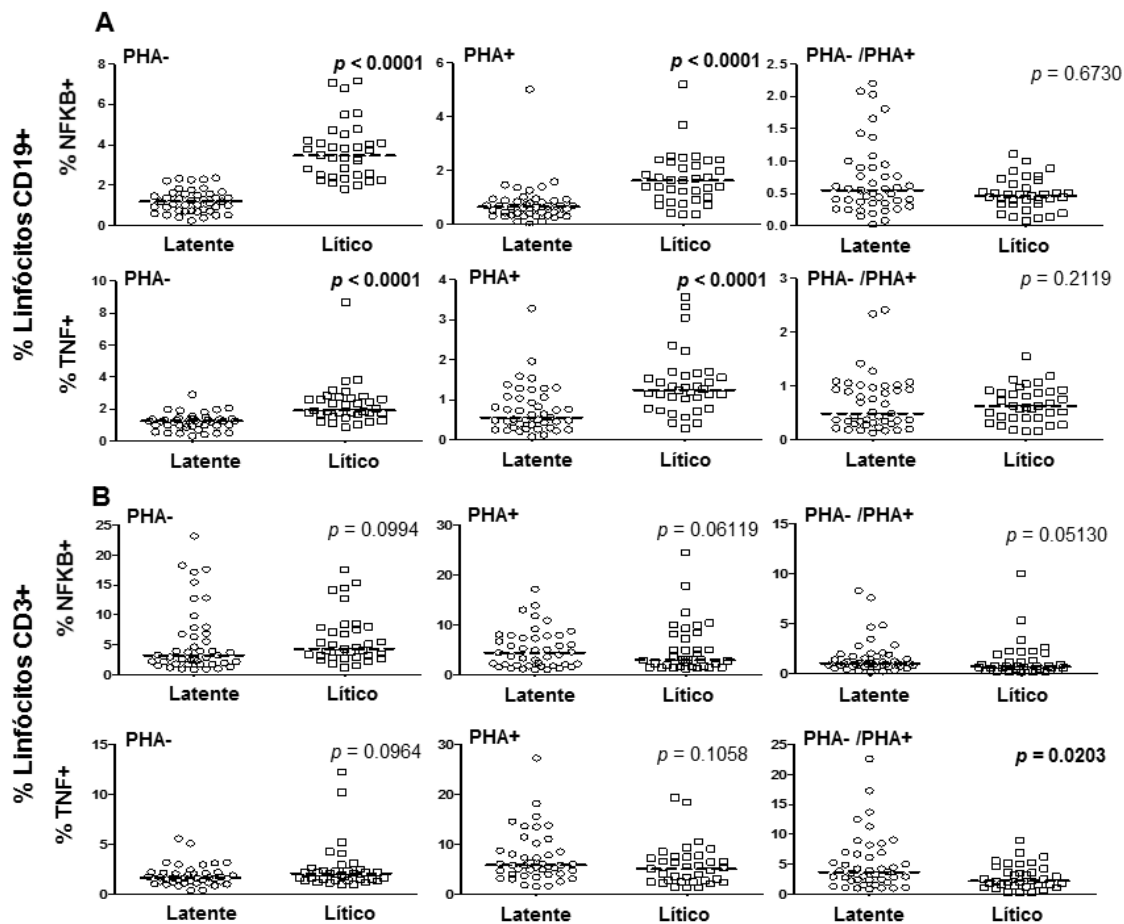
A associação da expressão de NFκB e TNF-α com infecção latente e lítica foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e a correlação entre as expressões e as contagens de linfócitos TCD4 ou TCD8 foi pela correlação de Spearman. O valor de $p < 0,05$ e IC 95% foi considerado em todas as análises e o software utilizado foi o GraphPad Prism 6.07.

Resultados

Nos linfócitos CD19+, cultivados com ou sem estímulo por PHA, a expressão do NFκB e TNF-α foi significativamente maior em PVHA com o HHV-8 em ciclo lítico que nos indivíduos com infecção latente ($p < 0.0001$) (Figura 1A). A razão entre a cultura com e sem estímulo (PHA+/PHA-) não foi significativamente diferente nas expressões de NFκB ($p = 0.6730$) e TNF-α ($p = 0.2119$) (Figura 1A).

A expressão do NFκB em linfócitos CD3+ não foi significativamente diferente entre PVHA com a infecção lítica ou latente na presença ($p = 0.06119$) ou ausência de estímulo ($p = 0.0994$) (Figura 1B). De forma semelhante, a expressão de TNF-α em linfócitos CD3+ não diferiu em indivíduos com o ciclo lítico ou latente do HHV-8, na presença ($p = 0.1058$) ou ausência de estímulo ($p = 0.0964$) (Figura 1B). A razão PHA+/PHA- foi significativamente diferente apenas no TNF-α em indivíduos com a infecção latente ($p = 0.0203$) (Figura 1B).

Figura 1- Expressão do NFκB ou TNF-α em linfócitos CD3+ e CD19+ de pacientes infectados pelo HIV em infecção lítica ou latente pelo HHV-8

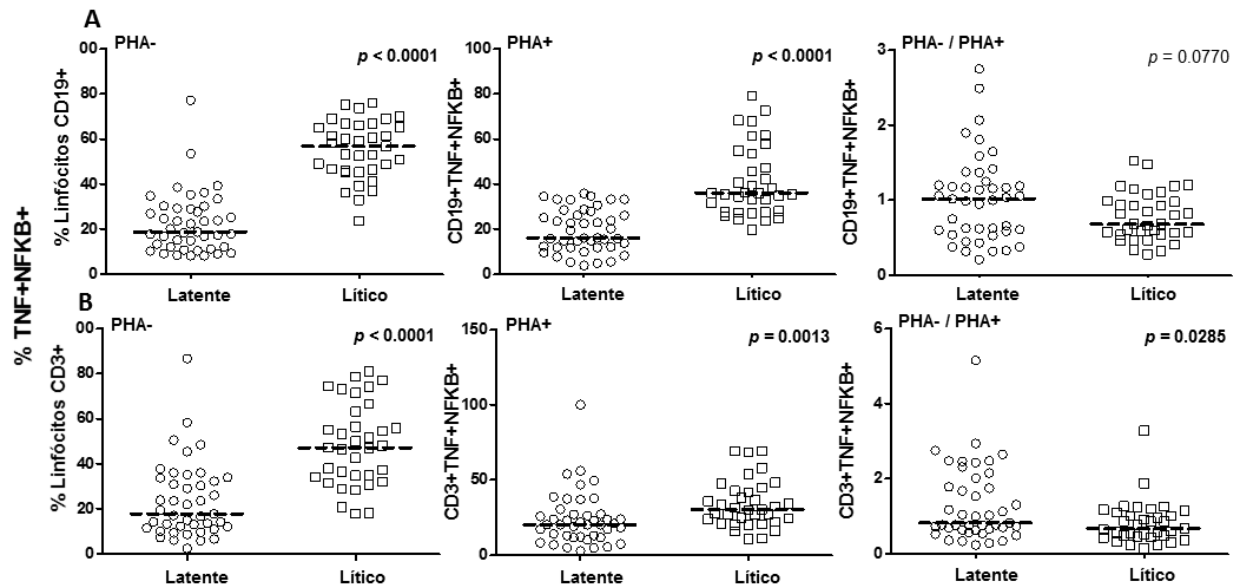


Valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney.

Em relação as células triplo marcadas, CD19+ TNF-α+ NFκB+, indivíduos no ciclo lítico do HHV-8 tiveram uma maior expressão desse perfil em comparação ao grupo latente na cultura com e sem estímulo ($p < 0.0001$) (Figura 2A).

A expressão de CD3 + TNF-α + NFκB + também foi maior no grupo lítico na cultura com ($p < 0.0001$) e sem estímulo ($p = 0.0013$) quando comparado ao grupo latente (Figura 2B). Em células CD3 + TNF-α + NFκB +, foi observada maior resposta ao PHA no grupo latente ($p = 0.0285$) (Figura 2B).

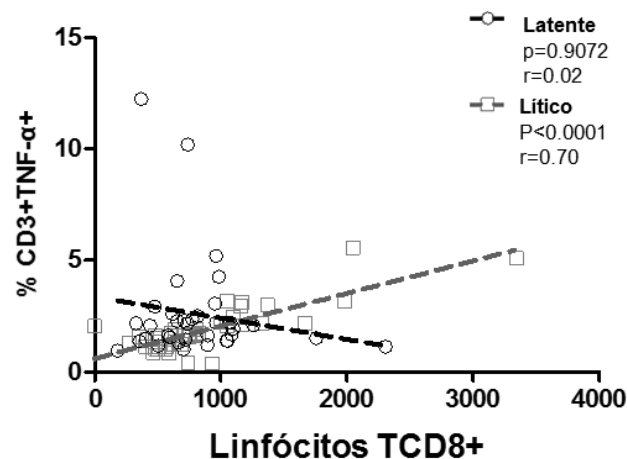
Figura 2- Expressão simultânea de NFκB e TNF-α em linfócitos CD3 + e CD19 + de pacientes infectados pelo HIV em infecção latente ou lítica por HHV-8.



Valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney.

Quando correlacionamos CD3+ TNF-α+, CD3+ NFκB+ e CD3+ TNF-α+ NFκB+ com linfócitos TCD4 e TCD8, apenas as células CD3+ TNF-α+ apresentaram correlação significativa, precisamente com a contagem de linfócitos TCD8 em indivíduos com infecção lítica ($r = 0,70$, $p < 0,0001$) (Figura 3).

Figura 3- Correlação da expressão de CD3 + TNF-α + com contagem de linfócitos TCD8 de pacientes infectados pelo HIV em infecção latente ou lítica por HHV-8



Valor de *p* obtido pela correlação de Spearman.

Discussão

A regulação entre o ciclo lítico e latente do HHV-8 é o resultado de um equilíbrio entre a resposta imune e a expressão de proteínas virais [8,38]. Em relação aos fatores do hospedeiro, muitos estudos associaram a ativação do NFκB com o ciclo lítico ou latente do HHV-8 [12,22–31]. Apesar do papel do NFκB na replicação do HHV-8 seja inquestionável, sua influência na dinâmica do ciclo de vida viral ainda está em discussão. Acreditamos que o uso excessivo de modelos *in vitro* seja um dos fatores responsáveis pela divergência de resultados. De acordo com dados da literatura até o presente momento, experimentos realizados com células de indivíduos infectados são raros, como no trabalho de Azzi et al. (2014) [22].

Em nosso estudo, a avaliação da expressão de NFκB e TNF-α foi realizada em linfócitos B (CD19+) e T (CD3+) de PVHA com infecção latente e lítica pelo HHV-8. A elevada expressão de NFκB nas células B de PVHA com infecção lítica corrobora os achados de Azzi et al. (2014). No estudo mencionado, realizado em células do PEL e células primárias de indivíduos infectados pelo HHV-8 negativos para o HIV, foi possível associar a expressão de vGPCR, proteína viral do ciclo lítico, à ativação de NFκB [22].

Várias proteínas do ciclo lítico também foram relacionadas à ativação do NFκB, como a ORF 75, K1, K13, K15 e vGPCR, e corroboram com nosso estudo [22,24,25,32,34,35,39,40]. Esses resultados, no entanto, foram obtidos em linhagens imortalizadas laboratoriais, que possivelmente apresentam diferenças consideráveis em relação às células primárias. Embora alguns relatos sugiram o uso de células imortalizadas como modelo de estudo [41–44], outros têm ressalvas sobre sua aplicação [41,45], inclusive destacando diferenças significativas de perfil transcricional entre linhagens primárias e imortalizadas [46].

Em particular no HHV-8, Grossmann e Ganem (2008) observaram que a associação do NFκB com o ciclo lítico ou latente depende do tipo de célula avaliada [31]. Além disso, a influência dessas proteínas na ativação do NFκB foi observada através da expressão de genes clonados, o que muitas vezes resulta em superexpressão em relação à quantidade encontrada no ciclo de replicação viral.

Contrariamente, quando a via do NFκB foi analisada em células de origem linfocítica, HR-1, KS-1 e BCBL1, infectadas por EBV ou HHV-8, Brown et al. (2013) relacionaram a ativação do NFκB a latência viral. Como os estudos citados acima, este experimento foi

realizado com linhas celulares de laboratório, apresentando as mesmas ressalvas discutidas anteriormente.

Também observamos um aumento da expressão de TNF- α em linfócitos B (CD19+) de indivíduos com infecção lítica. Até onde sabemos, este é o primeiro relato da associação do TNF- α com o ciclo de vida do HHV-8. É possível que a expressão aumentada do TNF- α esteja relacionada à participação dessa citocina na via do NF κ B. Uma vez ativado, o NF κ B pode levar à expressão de várias citocinas inflamatórias, como o TNF- α [12,47]. Secretado, o TNF- α pode se ligar aos receptores TNFR1 e TNFR2, ambos expressos nos linfócitos B e T, resultando em retroalimentação positiva da via NF κ B [47,48]. Portanto, nós acreditamos que a retroalimentação entre o NF κ B e o TNF- α pode estar relacionado à infecção lítica pelo HHV-8. Esta possibilidade é também apoiada pela observação de que a associação da expressão de NF κ B e TNF- α com o ciclo lítico foi mantida quando as duas proteínas foram identificadas simultaneamente em ambos os linfócitos B (CD19+) e T (CD3+).

Ao analisar a expressão individual de NF κ B e TNF- α em linfócitos T (CD3+), não observamos diferença entre células de PVHA com infecção lítica ou latente pelo HHV-8. Como os linfócitos B são os alvos iniciais da infecção pelo HHV-8 [49,50], é possível que a diferença da expressão de NF κ B e TNF- α entre os linfócitos B e T esteja associada ao tropismo viral. Curiosamente, quando a expressão de NF κ B e TNF- α foi analisada em células B e T com e sem a estímulo por PHA, um forte indutor da via Th1, apenas células CD3+ TNF- α + e CD3+ NF κ B+ TNF- α + apresentaram diferença significativa entre as condições. Esse achado corrobora com um estudo que apontou uma supressão seletiva da resposta Th2, aumento do perfil Th1 e inibição da via NF κ B pelo PHA [51].

Nós identificamos uma forte associação entre CD3+ TNF- α + e contagem de linfócitos TCD8 em PVHA com infecção lítica por HHV-8. É possível que essa relação seja baseada na participação da resposta imune celular contra a infecção pelo HHV-8, principalmente na infecção lítica, que é fortemente imunogênica [8]. Consistente com os nossos resultados, alguns estudos *in vitro* demonstraram a reatividade dos linfócitos TCD8 de indivíduos HIV/HHV-8 contra antígenos do ciclo lítico e latente do HHV-8 [52–56].

Em resumo, nossos resultados mostram uma forte relação da expressão do NF κ B e do TNF- α com o ciclo lítico do HHV-8. Além dos importantes achados sobre a replicação do HHV-8, o uso do modelo *ex vivo* também nos permitiu fazer uma associação importante da resposta imune celular com a replicação do vírus. Finalmente, levando em conta o papel das proteínas do ciclo lítico na patogênese das doenças relacionadas ao HHV-8, SK, PEL e MCD

[38,57–60], acreditamos que o NF κ B e o TNF- α poderiam ser explorados futuramente como potenciais biomarcadores para estas condições clínicas.

Agradecimentos

Lopes TRR e Gonçalves JP são apoiados por bolsas de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Silva Júnior J.V.J, é apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referência

1. ICTV (2018) International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 11 Jan 2019
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108.
3. Sullivan RJ, Pantanowitz L, Casper C, et al (2008) HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Clin Infect Dis* 47:1209–15.
4. Carbone A, De Paoli P, Gloghini A, Vaccher E (2015) KSHV-associated multicentric Castleman disease: A tangle of different entities requiring multitarget treatment strategies. *Int J Cancer* 137:251–261.
5. Uldrick TS, Whitby D (2011) Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett* 305:150–162.
6. Purushothaman P, Dabral P, Gupta N, et al (2016) KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front Microbiol* 7:54.
7. Ganem D (2010) KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: Listening to human biology and medicine. *J. Clin. Invest.* 120:939–949
8. Ganem D (2010) KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest* 120:939–949.
9. Aneja KK, Yuan Y (2017) Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. *Front Microbiol* 8:613.
10. Stebbing J, Gazzard B, Bower M (2006) The Host Control of Lytic and Latent Infection with Human Herpesvirus-8. *J Infect Dis* 193:1051–1053.
11. Uldrick TS, Bhutani M, Polizzotto MN, et al (2014) Inflammatory cytokines,

- hyperferritinemia and IgE are prognostic in patients with KSHV-associated lymphomas treated with curative intent therapy. *ASH* 2014 124:3001a
12. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
 13. Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000034–a000034.
 14. Bassères DS, Baldwin AS (2006) Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25:6817–6830.
 15. Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys* 42:443–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338>
 16. Courtois G, Gilmore TD (2006) Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25:6831–6843.
 17. Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26:203–234.
 18. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132:344–362.
 19. Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006) NF- κ B and the immune response. *Oncogene* 25:6758–6780.
 20. Smale ST (2012) Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunol Rev* 246:193–204.
 21. Trask OJ (2004) Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
 22. Azzi S, Smith SS, Dwyer J, et al (2014) YGLF motif in the Kaposi sarcoma herpes virus G-protein-coupled receptor adjusts NF- κ B activation and paracrine actions. *Oncogene* 33:5609–5618.
 23. Blattman NN, Lagunoff M, Blattman JN, Corey L (2014) Nuclear factor kappa B is required for the production of infectious human herpesvirus 8 virions. *Front Microbiol* 5:129.
 24. Brinkmann MM, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, et al (2007) Modulation of Host Gene Expression by the K15 Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 81:42–58.
 25. Brinkmann MM, Glenn M, Rainbow L, et al (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

- K15 membrane protein. *J Virol* 77:9346–58
26. Brown HJ, Song MJ, Deng H, et al (2003) NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* 77:8532–40
 27. Ehrlich ES, Chmura JC, Smith JC, et al (2014) KSHV RTA Abolishes NFκB Responsive Gene Expression during Lytic Reactivation by Targeting vFLIP for Degradation via the Proteasome. *PLoS One* 9:e91359.
 28. Field N, Low W, Daniels M, et al (2003) KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK. *J Cell Sci* 116:3721–8.
 29. Guasparri I, Keller SA, Cesarman E (2004) KSHV vFLIP Is Essential for the Survival of Infected Lymphoma Cells. *J Exp Med* 199:993–1003.
 30. Guasparri I, Hassane DC, Roshal M, Cesarman E (2012) The Viral Oncoprotein vFLIP Encoded by KSHV/HHV-8 Is Responsible for the Unique Transcriptional Signature and Phenotypic Features of Primary Effusion Lymphoma. *Blood* 120:900
 31. Grossmann C, Ganem D (2008) Effects of NFkappaB activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology* 375:94–102.
 32. Hävemeier A, Gramolelli S, Pietrek M, et al (2014) Activation of NF-κB by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 protein involves recruitment of the NF-κB-inducing kinase, IκB kinases, and phosphorylation of p65. *J Virol* 88:13161–72.
 33. Järviluoma A, Ojala PM (2006) Cell signaling pathways engaged by KSHV. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1766:140–158.
 34. Matta H, Mazzacurati L, Schamus S, et al (2007) Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) Oncoprotein K13 Bypasses TRAFs and Directly Interacts with the IκB Kinase Complex to Selectively Activate NF-κB without JNK Activation. *J Biol Chem* 282:24858–24865.
 35. Konrad A, Wies E, Thureau M, et al (2009) A systems biology approach to identify the combination effects of human herpesvirus 8 genes on NF-kappaB activation. *J Virol* 83:2563–2574.
 36. Caterino-De-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Carbone PHL, et al (2003) Human herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies in women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Braz J Infect Dis* 7:395–401.
 37. Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, et al (2008) Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal* 22:91–98.
 38. Grundhoff A, Ganem D (2004) Inefficient establishment of KSHV latency suggests an

- additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113:124–136.
39. Wu H, Liu L, Xiao J, et al (2015) Glycosylation of KSHV encoded vGPCR functions in its signaling and tumorigenicity. *Viruses* 7:1627–41.
 40. Chiou C-J, Poole LJ, Kim PS, et al (2002) Patterns of Gene Expression and a Transactivation Function Exhibited by the vGCR (ORF74) Chemokine Receptor Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 76:3421–3439.
 41. Boerma M, Burton GR, Wang J, et al (2006) Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: Changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:173–180.
 42. Hou A, Voorhoeve PM, Lan W, et al (2013) Comparison of gene expression profiles in primary and immortalized human pterygium fibroblast cells. *Exp Cell Res* 319:2781–2789.
 43. Fichorova RN, Rheinwald JG, Anderson DJ (1997) Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biol Reprod* 57:847–55
 44. Fichorova RN, Anderson DJ (1999) Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod* 60:508–14
 45. Andreghetto FM, Klingbeil MFG, Soares RM, et al (2011) Evaluation of microRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. *Einstein (São Paulo)* 9:442–448. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2149>
 46. Bramley JC, Drummond CG, Lennemann NJ, et al (2017) A Three-Dimensional Cell Culture System To Model RNA Virus Infections at the Blood-Brain Barrier. *mSphere* 2:. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00206-17>
 47. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12:695–708
 48. Kumar A, Takada Y, Boriek A, Aggarwal B (2004) Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 82:434–448. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0555-y>
 49. Lukac DM, Yuan Y (2007) Reactivation and lytic replication of KSHV. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. pp 434–460

50. Chakraborty S, Veettil MV, Chandran B (2012) Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. *Front Microbiol* 3:6.
51. Askari VR, Baradaran Rahimi V, Rezaee SA, Boskabady MH (2018) Auraptene regulates Th1/Th2/TReg balances, NF- κ B nuclear localization and nitric oxide production in normal and Th2 provoked situations in human isolated lymphocytes. *Phytomedicine* 43:1–10.
52. Osman M, Kubo T, Gill J, et al (1999) Identification of human herpesvirus 8-specific cytotoxic T-cell responses. *J Virol* 73:6136–40
53. Wang QJ, Jenkins FJ, Jacobson LP, et al (2000) CD8 + Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Lytic Proteins of Human Herpes Virus 8 in Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected and –Uninfected Individuals. *J Infect Dis* 194:1078–1088.
54. Guihot A, Dupin N, Marcelin A, et al (2006) Low T Cell Responses to Human Herpesvirus 8 in Patients with AIDS- Related and Classic Kaposi Sarcoma. *J Infect Dis* 194:1078–1088.
55. Lambert M, Gannage M, Karras A, et al (2006) Differences in the frequency and function of HHV8-specific CD8 T cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi sarcoma. *Blood* 108:3871–3880.
56. Robey RC, Lagos D, Gratrix F, et al (2009) The CD8 and CD4 T-Cell Response against Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is Skewed Towards Early and Late Lytic Antigens. *PLoS One* 4:e5890.
57. Cannon M, Cesarman E, Boshoff C (2006) KSHV G protein-coupled receptor inhibits lytic gene transcription in primary-effusion lymphoma cells via p21-mediated inhibition of Cdk2. *Blood* 107:277–284.
58. Polizzotto MN, Uldrick TS, Hu D, Yarchoan R (2012) Clinical Manifestations of Kaposi Sarcoma Herpesvirus Lytic Activation: Multicentric Castleman Disease (KSHV-MCD) and the KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome. *Front Microbiol* 3:73.
59. Montaner S, Sodhi A, Pece S, et al (2001) The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res* 61:2641–8
60. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C (2010) Kaposi's sarcoma herpesvirus/ Human herpesvirus-8 (KSHV/HHV8), and the oncogenesis of Kaposi's sarcoma. *Nat Rev Cancer* 10:707–719.

5.2 Associação dos polimorfismos no promotor do NFκB1 e no gene do NFκBIA com ciclo de replicação do HHV-8 em indivíduos infectados pelo HIV

- Título do periódico: Virus Research
- Área de avaliação: Medicina II

Resumo

O herpesvírus humano do tipo 8 (HHV-8) é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA). Igualmente aos outros herpesvírus, o HHV-8 pode apresentar replicação latente e lítica, ambas reguladas por fatores virais e do hospedeiro. Em relação aos fatores do hospedeiro, analisamos a associação de polimorfismos no promotor do gene NFκB1 (−94 ins/del ATTG) e no gene do NFκBIA (NFκBIA 3'UTR A → G) na regulação do ciclo latente e lítico do HHV-8. Um total de 838 PVHA foram avaliados quanto à presença de IgG contra o HHV-8. Posteriormente, os indivíduos foram classificados com infecção latente ou lítica pelo HHV-8 e os polimorfismos NFκB1-94 ins / del ATTG e NFκBIA 3'UTR A → G foram avaliados por PCR-RFLP. As associações genéticas com o ciclo de vida do HHV-8 foram avaliadas pelo teste de χ^2 com correção de Yates e com OR, IC 95% e $p < 0.05$. 132 PVHA apresentaram IgG para o HHV-8, dos quais 63 apresentaram infecção lítica e 69 infecção latente. Entre estes, a ins/del [OR 7.9 (IC 95% 3.3-19.1), $p < 0.001$], AG [OR 12.3 (IC 95% 4.3-34.9) $p < 0.001$], GG [OR 9.4 (IC 95% 3.2-27.9), $p < 0.001$], ins/del + AG [OR 94.5 (IC 95% 9.6-924.4), $p < 0.0001$], ins/del + GG [OR 50.4 (IC 95% 5.2-482.2), $p < 0.0001$] e o alelo G [OR 3.3 (95% CI 2.0-5.6), $p < 0.001$] estavam associados com a infecção lítica. Em conclusão, demonstramos pela primeira vez uma forte associação das alterações genéticas no promotor do gene NFκB1 e NFκBIA com o ciclo lítico do HHV-8.

Palavras-chave: HHV-8; polimorfismo; NFκB1; NFκBIA

O herpesvírus humano do tipo 8 (HHV-8), membro da família *Herpesviridae* e do gênero *Rhadinovirus* (ICTV, 2016), é o agente etiológico de todas as formas de sarcoma de Kaposi (SK) (Mbulaiteye et al., 2003). Desde a epidemia do HIV na década de 1980, o SK tem sido estudado, principalmente, em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e atualmente é um dos cânceres mais comuns nessa população (Torre et al., 2015).

Como outros herpesvírus, o HHV-8 pode apresentar dois modos de replicação, a fase lítica e a latente, ambos regulados por fatores virais e hospedeiros. As proteínas virais K9, K11/11.1, vGPCR, RTA e KCP, por exemplo, foram descritas durante o ciclo lítico, enquanto as proteínas LANA-1, vCyc e vFlip foram associadas à infecção latente (Douglas et al., 2010). Fatores do hospedeiro, como estresse oxidativo, hipóxia, desequilíbrio nas citocinas inflamatórias e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em citocinas e fator de crescimento também foram implicados na regulação entre infecção lítica e latente (Stebbing et al., 2006; Aneja and Yuan, 2017).

A identificação do HHV-8 pela resposta imune inata durante a infecção primária e/ ou reativação da latência ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), principalmente, receptores Toll-like (TLR) -3, -4, -7, -8, -9, NLRP1 e NLRP3 (família de receptores semelhantes a domínios de oligomerização de nucleótidos, NLR), IFI16 [*absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor family*] e cGAS-STING (sensor de DNA citosólico) (Dittmer and Damania, 2016). Uma vez estimulados, os PRRs podem iniciar a via de ativação do gene do fator nuclear kappa B (NFκB), resultando na transcrição de vários genes, incluindo citocinas inflamatórias e proteínas antiapoptóticas (Douglas et al., 2010). Além disso, a via NFκB também pode ser ativada por proteínas virais latentes (K1, vGPCR) e líticas (K13), além de miR-K1 a 12 (fase latente) e citocinas do hospedeiro (TNF-α, IL-1 e interferon α/β) (Douglas et al., 2010; Pfeffer, 2011; Liu et al., 2017).

Experimentos realizados em células epiteliais e fibroblastos sugeriram que o NFκB inibiria o ciclo lítico do HHV-8 (Brown et al., 2003). Em uma linhagem celular do linfoma de efusão primária, Sgarbanti et al. (2004), mostraram que o NFκB influenciou positivamente a expressão de genes líticos do HHV-8 (Sgarbanti et al., 2004).

Finalmente, ao avaliar a participação do NFκB na infecção lítica ou latente em várias linhagens celulares, Grossmann e Ganem (2008) demonstraram que a influência do NFκB nos ciclos de replicação do HHV-8 não é universal, mas dependente do tipo de célula avaliada (Grossmann e Ganem, 2008).

Embora esses achados forneçam informações importantes sobre o papel do NFκB no ciclo de vida do HHV-8, até onde sabemos, não há estudos genéticos que investiguem a influência de polimorfismos no NFκB e moléculas associadas na infecção pelo HHV-8.

Portanto, avaliamos a associação dos polimorfismos no promotor do gene do fator nuclear kappa B1 (NFκB1) (-94 ins / del ATTG, rs28362491) e no fator nuclear kappa B inibidor alfa de células B (NFκBIA 3'UTR A → G, rs696) na regulação do ciclo latente e lítico do HHV-8.

Foram avaliados 838 PHVA quanto a presença de IgG contra antígenos do HHV-8, de acordo com o protocolo descrito por Nascimento et al. (2007). Todos os participantes eram maiores de 18 anos, estavam em uso de terapia antirretroviral e foram acompanhados no Serviço de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A contagem de linfócitos CD4 foi obtida a partir dos prontuários e a informação étnica foi baseada na auto-identificação, de acordo com o sistema de classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Todos os pacientes que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética, protocolo número 5156215.5.0000.5208.

Amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo EDTA e armazenadas a -20 ° C. O DNA genômico foi extraído de 300μL da amostra usando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração e a pureza das amostras de DNA foram medidas usando o espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. O estudo foi realizado com amostras de DNA com razão (260/280nm) entre 1,8 e 2,0.

Os polimorfismos NFκB1-94 ins / del ATTG e NFκBIA 3'UTR A → G foram avaliados pelo método de reação em cadeia da polimerase - polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP). Para o polimorfismo NFκB1-94 ins / del ATTG, foram utilizados os primers *forward* 5'-TGGGCACAAGTCGTTTATG-3' e *reverse* 5'-CTGGAGCCGGTAGGGAAG-3'. Os primers *forward* 5'-GCTGAAAGAACATGGACTTG-3' e *reverse* 5'-GTACACCATTTACAGGGAGGG-3' foram utilizados para determinar o polimorfismo 3'UTR A → G do NFκBIA. A PCR foi realizada com DNA Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as condições: 95 ° C por 3min para desnaturação inicial, 32 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 52 ° C por 30s para anelamento, 72°C por 1min de extensão, seguido de uma extensão final de 72°C por 5min.

Para a identificação do polimorfismo NFκB1-94 ins/del ATTG, o fragmento (281bp) foi digerido com 1 unidade da enzima de restrição PflMI (Van911) (Fermentas, Waltham, MA,

EUA) por 18h a 37°C, de acordo com instruções do fabricante. Amostras de DNA com genótipo del/del não possuem sítio de digestão (281pb). As amostras com ins/ins possuem o sítio PflMI (Van911) e mostraram bandas de 240 pb e 45 pb. Heterozigotos apresentaram as três bandas.

Para o polimorfismo NFκBIA 3'UTR A → G, o fragmento de 424pb foi digerido pela enzima HaeIIIA (Fermentas, Waltham, MA, EUA) a 37°C por 18h com 1 unidade da enzima, de acordo com as instruções do fabricante. O genótipo AA não foi digerido (424 pb), homozigotos do alelo G apresentam duas bandas, 316 pb e 108 pb, e os heterozigotos as três bandas.

A associação dos alelos e genótipos únicos ou combinados no ciclo latente e lítico foi avaliada pelo teste do χ^2 com correção de Yates, odds ratio (OR) e intervalos de confiança (IC) de 95%. A avaliação da associação da primeira e última contagem de TCD4 foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism v.6.07.

Dos 838 PVHA avaliados, 132 apresentaram IgG para o HHV-8. Destes, 63 e 69 apresentaram infecção lítica e latente, respectivamente. Entre as características gerais, apenas a etnia mulata mostrou associação com a replicação do HHV-8, precisamente no ciclo lítico [OR 0,3 (IC95% 0,1-0,8), $p = 0,03$] (Tabela 1). Os polimorfismos NFκB1-94 ins / del ATTG e NFκBIA 3'UTR A → G foram genotipados com sucesso em todos os indivíduos com infecção latente e lítica pelo HHV-8. As frequências alélicas e genotípicas de ambos os polimorfismos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1- Caracterização da população do estudo

Variável	Latente (n=69)	Lítico (n=63)	OR (IC 95%)	p valor
Idade	45.2 (± 11.9) ^a	43.4 (± 11.6) ^a	-	-
Sexo				
Masculino	22 (31.9%)	25 (39.7%)	Reference	-
Feminino	47 (68.1%)	38 (60.7%)	0.7 (0.3-1.4)	0.45 ^b
Ethnia ^c				
Pardo	29 (42%)	41 (65.1%)	Reference	-
Negro	24 (34.8%)	15 (23.8%)	0.4 (0.2-0.9)	0.06 ^b
Branco	16 (23.2%)	07 (11.1%)	0.3 (0.1-0.8)	0.03 ^b
Primeira contagem TCD4 (cell/mm ³)	249 (08-728) ^d	206 (19-1045) ^d	-	0.46 ^e
Segunda contagem TCD4 (cell/mm ³)	641 (131-1674) ^d	576 (39-1336) ^d	-	0.18 ^e

^aResultados expressos em média mean $\pm$ DP; ^bp obtido pelo teste do χ^2 com correção de Yates; ^cBaseado na auto-identificação étnica, de acordo com o sistema de classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.; ^dMediana (mínimo-máximo); ^ep obtido pelo teste de Mann Whitney.

Em relação ao polimorfismo NFκB1-94 ins/del ATTG, observou-se associação entre o genótipo ins/del e o ciclo lítico do HHV-8 [OR 7,9 (IC95% 3,3-19,1), $p < 0,001$] e nenhum alelo associado ao lítico ou infecção latente. No polimorfismo NFκBIA 3'UTR A → G, os genótipos AG e GG foram associados à infecção lítica ($p < 0,001$), OR 12,3 (IC95% 4,3-34,9) e OR 9,4 (IC95% 3,2-27,9), respectivamente. Além disso, o alelo G também foi associado ao ciclo lítico [OR 3,3 (IC95% 2,0-5,6), $p < 0,001$] (Tabela 2). Quando combinados, ins/del + GG [OR 50,4 (95% IC 5,2-482,2), $p < 0,0001$] e ins/del + AG [OR 94,5 (95% IC 9,6-924,4), $< 0,0001$] estavam fortemente relacionados à infecção lítica.

Tabela 2- Associação dos genótipos e alelos dos polimorfismos NFκB1-94 ins/del

NFκB1-94 ins/del ATTG	Latente n=69 (%)	Lítico n=63 (%)	OR (IC 95%)	<i>p value</i> ^a
ins/ins	37 (53,62)	14 (22,22)	Reference	-
ins/del	13 (18,84)	39 (61,91)	7.9 (3.3-19.1)	< 0.001
del/del	19 (27,54)	10 (15,87)	1.4 (0.5-3.7)	0.61
ins allele frequency	87 (63,04)	67 (53,17)	Reference	-
del allele frequency	51 (36,96)	59 (46,83)	1.5 (0.9-2.4)	0.10
NFκBIA 3'UTR A→G				
AA	37 (53,62)	06 (09,52)	Reference	-
AG	17 (24,64)	34 (53,97)	12.3 (4.3-34.9)	< 0.001
GG	15 (21,74)	23 (36,51)	9.4 (3.2-27.9)	< 0.001
A alelo	91 (65,94)	46 (36,51)	Reference	-
G alelo	47 (34,06)	80 (63,49)	3.3 (2.0-5.6)	< 0.001

ATTG e NFκBIA 3'UTR A → G com a infecção latente e lítica do HHV-8 em PVHA

^a*p* obtido pelo teste exato de Fisher

Tabela 3- Avaliação dos genótipos combinados dos polimorfismos NFκB1-94 ins/del ATTG e NFκBIA 3'UTR A → G com a infecção latente e lítica pelo HHV-8 em PVHA

Genótipos combinados	Latente (n)	Lítico (n)	OR (IC 95%)	<i>p valor</i> ^a
ins/ins + AA	18	01	Reference	-
ins/ins + AG	11	09	14.7(1.6-132.7)	0.008
ins/ins + GG	08	04	9.0 (0.9-93.9)	0.06
ins/del + AA	10	04	7.2 (0.7-73.6)	0.13
ins/del + AG	04	21	94.5 (9.6-924.4)	<0.0001
ins/del + GG	05	14	50.4 (5.2-482.2)	<0.0001
del/del + AA	09	02	4.0 (0.3-50.2)	0.53
del/del + AG	02	03	27.0 (1.8-399.5)	0.01
del/del + GG	02	05	45.0 (3.3-604.4)	0.002

^a*p* obtido pelo teste exato de Fisher

O polimorfismo NFκB1-94 ins/del ATTG é uma inserção/deleção funcional no promotor do gene NFκB1, que codifica a subunidade p50 do NFκB (Karban et al., 2004; Koc et al., 2014). A variante ins/del codifica três genótipos: a inserção homozigótica do tipo selvagem (ins/ins), a deleção homozigótica variante (del/del) e a heterozigótica (ins/del)(Karban et al., 2004; Koc et al., 2014). Embora que ainda não foi investigado em infecções virais, o polimorfismo NFκB1-94 ins/del ATTG já foi avaliado em câncer (Cheng et al., 2013; Gao et al., 2014; Wang et al., 2016) e na desregulação da resposta imune, como doenças inflamatórias e autoimunes: colite ulcerosa (Borm et al., 2005), artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (Orozco et al., 2005) e tireoidite de Hashimoto (Koc et al., 2014).

Em nosso estudo, apenas o genótipo ins/del estava associado à infecção pelo HHV-8, precisamente na replicação lítica. Embora em algumas linhas celulares a alta expressão de NFκB esteja relacionada ao ciclo lítico do HHV-8, em nossa população de estudo, acreditamos que a expressão moderada de NFκB também esteja associada à infecção lítica. Esta hipótese é corroborada por um estudo anterior, que demonstrou que a deleção e inserção dos quatro nucleotídeos ATTG, podem resultar em perda e aumento da atividade do promotor NFκB1, respectivamente (Karban et al., 2004).

Curiosamente, a ins/del também mostrou associação com o câncer hepático (Gao et al., 2014; Wang et al., 2016), tireoidite de Hashimoto (Koc et al., 2014) e foi negativamente relacionado ao risco de lúpus eritematoso sistêmico (Gao et al., 2012). O genótipo ins/del, no entanto, não apresentou associação com a colite ulcerosa (Borm et al., 2005) e artrite reumatoide (Orozco et al., 2005).

Também não encontramos associação de alelos ou homozigotos (ins/ins ou del/del) com o ciclo lítico ou latente do HHV-8. Por outro lado, na colite ulcerosa (Borm et al., 2005), câncer colorretal (Lewander et al., 2007), doença de Graves (Kurylowicz et al., 2007) e câncer hepático (Gao et al., 2014) foi observada relação entre condição clínica e o alelo del. Além disso, indivíduos homozigotos para ATTG (ins/ins) teriam risco aumentado de artrite reumatoide (López-Mejías et al., 2012) e câncer hepático (Wang et al., 2016).

O gene NFκBIA codifica o IKBα, um inibidor da proteína NFκB1 (Koc et al., 2014). Vários polimorfismos no gene NFκBIA, incluindo NFκBIA 3'UTR A → G, foram investigados em vários tipos de câncer (Cheng et al., 2013; Li et al., 2017; Wang et al., 2016) e tireoidite de Hashimoto (Koc et al., 2014). No entanto, semelhante ao polimorfismo NFκB1-

94 ins / del ATG, nenhum estudo avaliou a influência do polimorfismo NFκBIA 3'UTR A → G nas infecções virais.

Em nossa população de estudo, o alelo G e os haplótipos contendo G (AG e GG) foram ambos associados ao ciclo lítico do HHV-8. No câncer hepático e gástrico, apenas haplótipos contendo o alelo A ou homozigotos AA podem estar relacionados à doença (Wang et al., 2016). Experimentos realizados em cultura de células indicaram que o miR-449a poderia ligar-se fortemente ao alelo A e que o alelo G diminuiria a estabilidade do mRNA ou a eficiência de tradução do NFκBIA (Song et al., 2011). Como consequência, no contexto específico, ambos os alelos poderiam reduzir a expressão de NFκBIA e consequentemente aumentar os níveis de NFκB (Song et al., 2011). É possível que essa participação dos alelos A e G na dinâmica da ativação do NFκB possa estar relacionada com a fase de infecção do HHV-8.

Quando combinamos os genótipos únicos que foram associados ao ciclo lítico do HHV-8, ins/del + AG ou ins/del + GG, foi possível observar um forte sinergismo com infecção lítica. Curiosamente, os genótipos combinados GG e ins/ins + ins/del foram associados a um risco aumentado de câncer colorretal (Song et al., 2011), e ins/ins + AG foi relacionado à proteção para tireoidite de Hashimoto (Koc et al., 2014).

Embora a totalidade desses resultados mostre pela primeira vez a associação de alterações genéticas no promotor do gene NFκB1 e no gene NFκBIA com o ciclo lítico HHV-8, acreditamos que essa relação deva ser estendida à investigação fenotípica. Uma vez que a patogênese do SK depende da expressão regulada de proteínas virais e celulares durante a infecção lítica e latente, é possível que os polimorfismos, NFκB1-94 ins/del ATG e NFκBIA 3'UTR A → G, associados aos estágios da infecção pelo HHV-8, possam influenciar a evolução clínica de PVHA coinfectados pelo HHV-8.

Além disso, esses polimorfismos também podem influenciar o desenvolvimento do SK via ativação do NFκB, que é conhecido por ser importante na cronicidade da inflamação e no desenvolvimento do SK, principalmente pela inibição da apoptose e estimulação da angiogênese (Douglas et al., 2010). A influência desses e de outros polimorfismos nos genes NFκB1 ou NFκBIA na ativação e produção de NFκB já foi sugerida experimentalmente (Karban et al., 2004; Song et al., 2011). Finalmente, apesar dos inúmeros aspectos que podem influenciar o curso clínico da infecção pelo HHV-8, acreditamos que o impacto clínico desses polimorfismos deva ser investigado em populações maiores com diferentes formas de SK.

Conflito de interesses

Todos os autores não têm potencial conflito de interesses.

Agradecimentos

Lopes TRR e Gonçalves JP são apoiados por bolsas de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Silva Júnior J.V.J. e Moraes V.M.S são apoiados pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referência

- Aneja, K.K., Yuan, Y., 2017. Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. *Front. Microbiol.* 8, 613.
- Borm, M.E.A., Van Bodegraven, A.A., Mulder, C.J.J., Kraal, G., Bouma, G., 2005. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int. J. Immunogenet.* 32, 401–405.
- Brown, H., Song, M., Deng, H., Wu, T., 2003. NF- κ B inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J. Virol.* 77, 8532–8540.
- Cheng, C.W., Su, J.L., Lin, C.W., Su, C.W., Shih, C.H., Yang, S.F., Chien, M.H., 2013. Effects of NFKB1 and NFKBIA Gene Polymorphisms on Hepatocellular Carcinoma Susceptibility and Clinicopathological Features. *PLoS One* 8, e56130.
- Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: immunobiology, oncogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 126, 3165–3175.
- Douglas, J.L., Gustin, J.K., Moses, A. V, Dezube, B.J., Pantanowitz, L., 2010. Kaposi Sarcoma Pathogenesis: A Triad of Viral Infection, Oncogenesis and Chronic Inflammation. *Transl. Biomed.* 1,1-29.
- Gao, J., Xu, H.L., Gao, S., Zhang, W., Tan, Y.T., Rothman, N., Purdue, M., Gao, Y.T., Zheng, W., Shu, X.O., Xiang, Y.B., 2014. Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: A nested case-control study in Shanghai, China. *BMJ Open* 4, 1–8.
- Gao, M., Wang, C.-H., Sima, X., Han, X.-M., 2012. *NFKB1* –94 Insertion/Deletion ATTG Polymorphism Contributes to Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *DNA Cell Biol.* 31, 611–615.
- Grossmann, C., Ganem, D., 2008. Effects of NF κ B activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology* 375, 94–102.
- ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. [cited 2018 Dec 10]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Karban, A.S., Okazaki, T., Panhuysen, C.I.M., Gallegos, T., Potter, J.J., Bailey-Wilson, J.E., Silverberg, M.S., Duerr, R.H., Cho, J.H., Gregersen, P.K., Wu, Y., Achkar, J.P., Dassopoulos, T., Mezey, E., Bayless, T.M., Novet, F.J., Brant, S.R., 2004. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative

- colitis. *Hum. Mol. Genet.* 13, 35–45.
- Koc, A., Batar, B., Celik, O., Onaran, I., Tasan, E., Sultuybek, G.K., 2014. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. *Immunobiology* 219, 531–536.
- Kurylowicz, A., Hiromatsu, Y., Jurecka-Lubieniecka, B., Kula, D., Kowalska, M., Ichimura, M., Koga, H., Kaku, H., Bar-Andziak, E., Nauman, J., Jarzab, B., Ploski, R., Bednarczuk, T., 2007. Association of NFKB1 -94ins/del ATTG promoter polymorphism with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. *Genes Immun.* 8, 532–8.
- Lewander, A., Butchi, A.K.R., Gao, J., He, L.J., Lindblom, A., Arbmán, G., Carstensen, J., Zhang, Z.Y., Sun, X.F., 2007. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand. J. Gastroenterol.* 42, 1332–1338.
- Li, D., Wu, C., Cai, Y., Liu, B., 2017. Association of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility of gastric cancer. *Tumor Biol.* 39, 1–6.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023.
- López-Mejías, R., García-Bermúdez, M., González-Juanatey, C., Castañeda, S., Miranda-Filloo, J.A., Gómez-Vaquero, C., Fernández-Gutiérrez, B., Balsa, A., Pascual-Salcedo, D., Blanco, R., González-Álvaro, I., Llorca, J., Martín, J., González-Gay, M.A., 2012. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 224, 426–429. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.008>
- Mbulaiteye, S.M., Biggar, R.J., Goedert, J.J., Engels, E.A., 2003. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 32, 527–33.
- Nascimento, M.C., De Souza, V.A., Sumita, L.M., Freire, W., Munoz, F., Kim, J., Pannuti, C.S., Mayaud, P., 2007. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 715–720.
- Orozco, G., Sanchez, E., Collado, M.D., Lopez-Nevot, M.A., Paco, L., Garcia, A., Jimenez-Alonso, J., Martin, J., 2005. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 65, 183–186.
- Pfeffer, L.M., 2011. The Role of Nuclear Factor κ B in the Interferon Response. *J. Interf. Cytokine Res.* 31, 553–559.
- Sgarbanti, M., Arguello, M., TenOever, B.R., Battistini, A., Lin, R., Hiscott, J., 2004. A requirement for NF- κ B induction in the production of replication-competent HHV-8 virions. *Oncogene* 23, 5770–5780.
- Song, S., Chen, D., Lu, J., Liao, J., Luo, Y., Yang, Z., Fu, X., Fan, X., Wei, Y., Yang, L., Wang, L., Wang, J., 2011. NF κ B1 and NF κ BIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a southern Chinese population. *PLoS One* 6, 1–10.
- Stebbing, J., Gazzard, B., Bower, M., 2006. The Host Control of Lytic and Latent Infection with Human Herpesvirus-8. *J. Infect. Dis.* 193, 1051–1053.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Wang, X., Hao, X., Wang, H., Wang, M., Sun, F., Fan, X., Fan, T., 2016. Impact of *NFKB1* and *NFKBIA* gene polymorphism and additional gene-gene interaction on liver cancer risk in Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol* 9, 12968–12975.

6 CONCLUSÕES

- O $\text{NF}\kappa\text{B}$ foi super expresso na população de células CD19^+ , estando associado com indivíduos em infecção lítica;
- O aumento da expressão do $\text{TNF-}\alpha$ em células CD19^+ está associado com a infecção lítica;
- Foi observado um aumento do perfil de expressão (CD19^+ ou CD3^+ $\text{TNF-}\alpha^+$ $\text{NF}\kappa\text{B}$) em indivíduos com infecção lítica;
- A expressão celular CD3^+ $\text{TNF-}\alpha^+$ apresentou uma forte correlação com a contagem de TCD8;
- O genótipo ins/del no *NFκB1* está associado com a infecção lítica, porém sem associação com os alelos;
- Os genótipos AG e GG no *NFκBIA* foram associados com a infecção lítica e o alelo G foi mais frequente;
- A combinação de genótipos ins/del + AG ou ins/del + GG apresentou associação com a infecção lítica;
- Não foi observada associação dos polimorfismos dos genes *NFκB1* e *NFκBIA* com a contagem de TCD4 e TCD8.

REFERÊNCIAS

- ABLASHI, D. et al. Seroprevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 5, p. 893–897, 15 nov. 1999.
- ABLASHI, D. V et al. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 3, p. 439–64, jul. 2002.
- ANEJA, K. K.; YUAN, Y. Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 613, 2017.
- ASOU, H. et al. Co-infection of HHV-6 and HHV-8 is rare in primary effusion lymphoma. **Leukemia research**, v. 24, n. 1, p. 59–61, jan. 2000.
- AZZI, S. et al. YGLF motif in the Kaposi sarcoma herpes virus G-protein-coupled receptor adjusts NF- κ B activation and paracrine actions. **Oncogene**, v. 33, n. 49, p. 5609–5618, 2 dez. 2014.
- BARBERA, A. J. et al. The Nucleosomal Surface as a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 856–861, 10 fev. 2006.
- BASSÈRES, D. S.; BALDWIN, A. S. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6817–6830, 30 out. 2006.
- BATISTA, M. D. et al. High Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Prevalence, Clinical Correlates and High Incidence among Recently HIV-1-Infected Subjects in Sao Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5613, 19 maio 2009.
- BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 2, p. 393–409, set. 2004.
- BHUTANI, M. et al. Kaposi Sarcoma–Associated Herpesvirus-Associated Malignancies: Epidemiology, Pathogenesis, and Advances in Treatment. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 2, p. 223–246, abr. 2015.
- BLATTMAN, N. N. et al. Nuclear factor kappa B is required for the production of infectious human herpesvirus 8 virions. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 129, 4 abr. 2014.
- 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, 15 jun. 2012.
- BORM, M. E. A. et al. A NF κ B1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 32, n. 6, p. 401–405, 2005.
- BRINKMANN, M. M. et al. Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein. **Journal of virology**, v. 77, n. 17, p. 9346–58, set. 2003.
- BRINKMANN, M. M. et al. Modulation of Host Gene Expression by the K15 Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 1, p. 42–58, 1 jan.

2007.

BRINKMANN, M. M.; SCHULZ, T. F. Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 5, p. 1047–1074, 1 maio 2006.

BROWN, H. et al. NF- κ B inhibits gammaherpesvirus lytic replication. **Journal of virology**, v. 77, n. 15, p. 8532–8540, 2003.

CAHÚ DE OLIVEIRA MENDES, G. G. et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 11, p. 2016–2020, nov. 2016.

CAI, Q. et al. Molecular Biology of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus and Related Oncogenesis. In: **Advances in virus research**. v. 78p. 87–142.

CANNON, M. J. et al. Blood-Borne and Sexual Transmission of Human Herpesvirus 8 in Women with or at Risk for Human Immunodeficiency Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 9, p. 637–643, 20 mar. 2001.

CANNON, M. J. et al. Lack of Evidence for Human Herpesvirus–8 Transmission via Blood Transfusion in a Historical US Cohort. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 11, p. 1592–1598, 1 jun. 2009.

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.

CASELLI, E. et al. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated virus) ORF50 increases in vitro cell susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 5, p. 1123–1131, 1 maio 2003.

CASELLI, E. et al. Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2790–2797, 15 out. 2005.

CASPER, C. New approaches to the treatment of human herpesvirus 8-associated disease. **Reviews in medical virology**, v. 18, n. 5, p. 321–9, 2008.

CHAKRABORTY, S.; VEETIL, M. V.; CHANDRAN, B. Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 6, 2012.

CHEN, J. et al. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 7, p. 4119–24, 27 mar. 2001.

CHEN, T.; HUDNALL, S. D. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. **Modern Pathology**, v. 19, n. 5, p. 726–737, 10 maio 2006.

CHENG, C. W. et al. Effects of NFKB1 and NFKBIA Gene Polymorphisms on Hepatocellular Carcinoma Susceptibility and Clinicopathological Features. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56130, 2013.

- CHIOU, C.-J. et al. Patterns of Gene Expression and a Transactivation Function Exhibited by the vGCR (ORF74) Chemokine Receptor Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3421–3439, 1 abr. 2002.
- CURRAN, J. E.; WEINSTEIN, S. R.; GRIFFITHS, L. R. Polymorphic variants of NFkB1 and its inhibitory protein NFkBIA, and their involvement in sporadic breast cancer. **Cancer letters**, v. 188, n. 1–2, p. 103–7, 15 dez. 2002.
- DE PAOLI, P. Human herpesvirus 8: an update. **Microbes and infection**, v. 6, n. 3, p. 328–35, mar. 2004.
- 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 6, p. 844–852, 15 set. 2007.
- DEDICOAT, M.; NEWTON, R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 1–3, 28 jan. 2003.
- DI DOMENICO, E. et al. Activation of DNA Damage Response Induced by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 854, 1 jun. 2016.
- DI LUCA, D. et al. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 interacts synergistically with the tat gene product in transactivating the human immunodeficiency virus type 1 LTR. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1965–1970, 1 ago. 2001.
- DITTMER, D. P.; DAMANIA, B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: immunobiology, oncogenesis, and therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 9, p. 3165–3175, 1 set. 2016.
- DJERBI, M. et al. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 7, p. 1025–32, 4 out. 1999.
- DOUGLAS, J. L. et al. Kaposi Sarcoma Pathogenesis: A Triad of Viral Infection, Oncogenesis and Chronic Inflammation. **Translational biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 1–29, 2010.
- DOW, D. E.; CUNNINGHAM, C. K.; BUCHANAN, A. M. **A review of human herpesvirus 8, the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in the pediatric population** **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v.3, n.1, p. 66-76. 2014.
- DUKERS, N. H. et al. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. **American journal of epidemiology**, v. 151, n. 3, p. 213–24, 1 fev. 2000.
- 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. 4074–84, abr. 2004.
- EDELMAN, D. C. Human herpesvirus 8--a novel human pathogen. **Virology Journal**, v. 2, n. 1, p. 78, 2 set. 2005.

- EHRLICH, E. S. et al. KSHV RTA Abolishes NF κ B Responsive Gene Expression during Lytic Reactivation by Targeting vFLIP for Degradation via the Proteasome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91359, 10 mar. 2014.
- ETTA, E. M. et al. HHV-8 Seroprevalence and Genotype Distribution in Africa, 1998–2017: A Systematic Review. **Viruses**, v. 10, n. 9, 2018.
- FIELD, N. et al. KSHV vFLIP binds to IKK- to activate IKK. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 18, p. 3721–3728, set. 2003.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (DAVID M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- FRANCO, D. G. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 35–39, jun. 2010.
- FU, B. et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and risk factors in Xinjiang, China. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 8, p. 1422–31, ago. 2009.
- GANEM, D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 939–949, 1 abr. 2010.
- GANTT, S.; CASPER, C. Human herpesvirus 8-associated neoplasms. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 295–301, ago. 2011.
- GAO, J. et al. Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: A nested case-control study in Shanghai, China. **BMJ Open**, v. 4, n. 2, p. 1–8, 2014.
- GAO, M. et al. *NFKB1* –94 Insertion/Deletion ATTG Polymorphism Contributes to Risk of Systemic Lupus Erythematosus. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 4, p. 611–615, 2012.
- GARBER, A. C.; HU, J.; RENNE, R. Latency-associated Nuclear Antigen (LANA) Cooperatively Binds to Two Sites within the Terminal Repeat, and Both Sites Contribute to the Ability of LANA to Suppress Transcription and to Facilitate DNA Replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 27401–27411, 26 jul. 2002.
- GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. **Cell**, v. 109, n. 2, p. 81–96, 2002.
- GOTO, Y. et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1952–6, jul. 2001.
- GREENE, W. et al. Molecular biology of KSHV in relation to AIDS-associated oncogenesis. **Cancer treatment and research**, v. 133, p. 69–127, 2007.
- GROSSMANN, C.; GANEM, D. Effects of NF κ B activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. **Virology**, v. 375, n. 1, p. 94–102, 2008.
- GRUNDHOFF, A.; GANEM, D. Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 1, p. 124–136, 1 jan. 2004.
- GUASPARRI, I. et al. The Viral Oncoprotein vFLIP Encoded by KSHV/HHV-8 Is

Responsible for the Unique Transcriptional Signature and Phenotypic Features of Primary Effusion Lymphoma. **Blood**, v. 120, n. 21, 2012.

GUASPARRI, I.; KELLER, S. A.; CESARMAN, E. KSHV vFLIP Is Essential for the Survival of Infected Lymphoma Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 7, p. 993–1003, 5 abr. 2004.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 8 fev. 2008.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 1 fev. 2012.

HLADIK, W. et al. Transmission of Human Herpesvirus 8 by Blood Transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 13, p. 1331–1338, 28 set. 2006.

HUANG, T. T. et al. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 3, p. 1014–9, 1 fev. 2000.

HYUN, T. S. et al. Latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with Tat and activates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 in human cells. **Journal of virology**, v. 75, n. 18, p. 8761–71, set. 2001.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

ISHAK, M. DE 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.

JÄRVILUOMA, A.; OJALA, P. M. Cell signaling pathways engaged by KSHV. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1766, n. 1, p. 140–158, ago. 2006.

JENNER, R. G.; BOSHOF, C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1602, n. 1, p. 1–22, 14 mar. 2002.

KARBAN, A. S. et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 1, p. 35–45, 2004.

KEDES, D. H. et al. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. **Nature medicine**, v. 2, n. 8, p. 918–24, ago. 1996.

KELLER, S. A. et al. NF- κ B is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. **Blood**, v. 107, n. 8, p. 3295–3302, 15 abr. 2006.

KNOWLTON, E. R. et al. Human Herpesvirus 8 Induces Polyfunctional B Lymphocytes That Drive Kaposi's Sarcoma. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01277-14, 2 set. 2014.

KOC, A. et al. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. **Immunobiology**, v. 219, n. 7, p. 531–536,

2014.

KONRAD, A. et al. A systems biology approach to identify the combination effects of human herpesvirus 8 genes on NF-kappaB activation. **Journal of virology**, v. 83, n. 6, p. 2563–74, mar. 2009.

KURYLOWICZ, A. et al. Association of NFKB1 –94ins/del ATTG promoter polymorphism with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. **Genes & Immunity**, v. 8, n. 7, p. 532–538, 9 out. 2007.

LE BEAU, M. M. et al. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. **Genomics**, v. 14, n. 2, p. 529–31, out. 1992.

LEE, B.-S. et al. Characterization of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K1 Signalosome. **Journal of Virology**, v. 79, n. 19, p. 12173–12184, 1 out. 2005.

LENARDO, M.; PIERCE, J. W.; BALTIMORE, D. Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. **Science (New York, N.Y.)**, v. 236, n. 4808, p. 1573–7, 19 jun. 1987.

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, p. e23546, 8 ago. 2011.

LEWANDER, A. et al. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 11, p. 1332–1338, 2007.

LI, D. et al. Association of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility of gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 1–6, 2017.

LI, M. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 1984–91, mar. 1997.

LISCO, A. et al. Pregnancy and Human Herpesvirus 8 Reactivation in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3863–3871, 1 nov. 2006.

LIU, L. et al. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I kappa B kinase complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13745–51, 19 abr. 2002.

LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. March, p. 17023, 2017.

LÓPEZ-MEJÍAS, R. et al. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 426–429, out. 2012.

LUKAC, D. M. et al. Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection from Latency by Expression of the ORF 50 Transactivator, a Homolog of the EBV R Protein. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 304–312, 20 dez. 1998.

- 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, jul. 2009.
- MANTINA, H. et al. Vertical transmission of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus. **International journal of cancer**, v. 94, n. 5, p. 749–52, 1 dez. 2001.
- MARTIN, J. N. et al. Sexual Transmission and the Natural History of Human Herpesvirus 8 Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 14, p. 948–954, 2 abr. 1998.
- MARTRO, E. et al. Comparison of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus seropositivity among children in areas endemic and non-endemic for Kaposi’s sarcoma. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 1, p. 126–131, jan. 2004.
- MATHEW, S. et al. Chromosomal localization of genes encoding the transcription factors, c-rel, NF-kappa Bp50, NF-kappa Bp65, and lyt-10 by fluorescence in situ hybridization. **Oncogene**, v. 8, n. 1, p. 191–3, jan. 1993.
- MATTA, H.; CHAUDHARY, P. M. Activation of alternative NF- B pathway by human herpes virus 8-encoded Fas-associated death domain-like IL-1 -converting enzyme inhibitory protein (vFLIP). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 25, p. 9399–9404, jun. 2004.
- MATTA, H.; CHAUDHARY, P. M. The proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) inhibits growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma cells. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 1, p. 77–82, jan. 2005.
- MBULAITEYE, S. M. et al. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 32, n. 5, p. 527–33, 15 abr. 2003.
- MBULAITEYE, S. M. et al. Human Herpesvirus 8 Infection within Families in Rural Tanzania. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 11, p. 1780–1785, 1 jun. 2003.
- MEI, Q. et al. HHV-8 seroprevalence in blood donors and HIV-positive individuals in Shandong area, China. **Journal of Infection**, v. 55, n. 1, p. 89–90, jul. 2007.
- MERCURIO, F.; MANNING, A. M. NF-κB as a primary regulator of the stress response. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6163–6171, 4 nov. 1999.
- MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOFF, C. Kaposi’s sarcoma herpesvirus/ Human herpesvirus-8 (KSHV/HHV8), and the oncogenesis of Kaposi’s sarcoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707–719, 2010.
- MINHAS, V.; WOOD, C. Epidemiology and Transmission of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4178–4194, 4 nov. 2014.
- MOHANNA, S. et al. Epidemiology and clinical characteristics of classic Kaposi’s sarcoma, seroprevalence, and variants of human herpesvirus 8 in South America: A critical review of an old disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 239–250, set. 2005.
- MOIR, S.; FAUCI, A. S. **B cells in HIV infection and disease** *Nature Reviews Immunology* NIH Public Access, , abr. 2009.

MONTANER, S. et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. **Cancer research**, v. 61, n. 6, p. 2641–8, 15 mar. 2001.

NASCIMENTO, M. C. et al. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 715–720, 2007.

NEWTON, R. et al. Kaposi Sarcoma–Associated Herpesvirus in a Rural Ugandan Cohort, 1992–2008. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 2, p. 263–269, 4 jan. 2018.

NICHOLAS, J. Human Herpesvirus-8-Encoded Signalling Ligands and Receptors. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 5, p. 475–489, 2003.

O'BRIEN, T. R. et al. Evidence for Concurrent Epidemics of Human Herpesvirus 8 and Human Immunodeficiency Virus Type 1 in US Homosexual Men: Rates, Risk Factors, and Relationship to Kaposi's Sarcoma. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1010–1017, out. 1999.

O'LEARY, J. J. et al. Hypothesis. HHV-8 in multiple myeloma: is this the first paracrine model of human tumorigenesis and do Koch's postulates apply? **Molecular pathology : MP**, v. 51, n. 4, p. 201–3, ago. 1998.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a000034–a000034, 1 out. 2009.

OLSEN, S. J. et al. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. **AIDS (London, England)**, v. 12, n. 14, p. 1921–5, 1 out. 1998.

OROZCO, G. et al. Analysis of the functional NFkB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 2, p. 183–186, fev. 2005.

PARRAVICINI, C. et al. Differential Viral Protein Expression in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Infected Diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 743–749, mar. 2000.

PELLETT, P. E. et al. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. **Transfusion**, v. 43, n. 9, p. 1260–8, set. 2003.

PFEFFER, L. M. The Role of Nuclear Factor kB in the Interferon Response. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 7, p. 553–559, 2011.

PURUSHOTHAMAN, P. et al. KSHV Genome Replication and Maintenance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 54, 1 fev. 2016.

QU, L.; JENKINS, F.; TRIULZI, D. J. Human herpesvirus 8 genomes and seroprevalence in United States blood donors. **Transfusion**, v. 50, n. 5, p. 1050–1056, 15 jan. 2010.

QUADRELLI, C. et al. β -HHVs and HHV-8 in Lymphoproliferative Disorders. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. e2011043,

2011.

REINHEIMER, C.; ALLWINN, R.; STÜRMER, M. Do fewer cases of Kaposi's sarcoma in HIV-infected patients reflect a decrease in HHV8 seroprevalence? **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, n. 3, p. 161–164, 19 ago. 2011.

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.

RUSSO, J. J. et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14862–7, 10 dez. 1996.

SENOL TUNCAY, S.; OKYAY, P.; BARDAKCI, F. Identification of NF- κ B1 and NF- κ BIA Polymorphisms Using PCR–RFLP Assay in a Turkish Population. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 1–2, p. 104–112, 26 fev. 2010.

SGARBANTI, M. et al. A requirement for NF- κ B induction in the production of replication-competent HHV-8 virions. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5770–5780, 2004.

SHEBL, F. M. et al. Human Herpesvirus 8 Seropositivity Among Sexually Active Adults in Uganda. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21286, 21 jun. 2011.

SHUKLA, S. et al. Nuclear Factor- κ B/p65 (Rel A) Is Constitutively Activated in Human Prostate Adenocarcinoma and Correlates with Disease Progression. **Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 390–400, jul. 2004.

SMALE, S. T. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 193–204, mar. 2012.

SMIT, M. J. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor ORF74 constitutively activates p44/p42 MAPK and Akt via G(i) and phospholipase C-dependent signaling pathways. **Journal of virology**, v. 76, n. 4, p. 1744–52, fev. 2002.

SMITH, N. A. et al. Serologic Evidence of Human Herpesvirus 8 Transmission by Homosexual but Not Heterosexual Sex. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 3, p. 600–606, set. 1999.

SONG, S. et al. NF κ B1 and NF κ BIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a southern Chinese population. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1–10, 2011.

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. 1003–6, jun. 2010.

SPIRA, T. J. et al. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2174–80, jun. 2000.

STEBBING, J.; GAZZARD, B.; BOWER, M. The Host Control of Lytic and Latent Infection with Human Herpesvirus–8. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1051–1053, 2006.

SULLIVAN, R. J. et al. HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and

multicentric Castleman disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 9, p. 1209–15, 1 nov. 2008.

SUN, Q.; MATTA, H.; CHAUDHARY, P. M. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1956–1961, 1 mar. 2003.

SUN, R. et al. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 18, p. 10866–71, 1 set. 1998.

SUN, R. et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded LANA Interacts with Host KAP1 To Facilitate Establishment of Viral Latency. **Journal of Virology**, v. 88, n. 13, p. 7331–7344, 1 jul. 2014.

SUN, S.-C.; LIU, Z.-G. A special issue on NF-κB signaling and function. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 1–2, 3 jan. 2011.

TERGAONKAR, V. NFκB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 10, p. 1647–1653, 1 jan. 2006.

TOMLINSON, C. C.; DAMANIA, B. The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. **Journal of virology**, v. 78, n. 4, p. 1918–27, fev. 2004.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.

TRASK, O. J. **Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

TREM-BALA. [Compositor e intérprete]: Ana Vilela. Som livre [2017]. Disponível em: < <https://www.youtube.com/watch?v=sWhy1VcvvgY> >. Acesso: 10 jan. 2019.

ULDRICK, T. S.; WHITBY, D. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. **Cancer Letters**, v. 305, n. 2, p. 150–162, 28 jun. 2011.

VERMA, S. C. et al. Comprehensive Analysis of LANA Interacting Proteins Essential for Viral Genome Tethering and Persistence. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74662, 11 set. 2013.

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. 7083–7, set. 1997.

VIEJO-BORBOLLA, A. et al. Brd2/RING3 Interacts with a Chromatin-Binding Domain in the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency-Associated Nuclear Antigen 1 (LANA-1) That Is Required for Multiple Functions of LANA-1. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13618–13629, 1 nov. 2005.

- VLANTIS, K.; PASPARAKIS, M. Role of TNF in pathologies induced by nuclear factor κ B deficiency. In: **TNF Pathophysiology: Molecular and Cellular Mechanisms**. [s.l.] Karger Publishers, v. 11p. 80–93. 2010.
- WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. **FEBS Journal**, v. 278, n. 6, p. 862–876, abr. 2011.
- WANG, H. et al. Seroprevalence and risk factors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among the general Uygur population from south and north region of Xinjiang, China. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 539, 14 dez. 2011.
- WANG, X. et al. Impact of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism and additional gene-gene interaction on liver cancer risk in Chinese population. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 9, n. 12, p. 12968–12975, 2016.
- WHITBY, D. et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. **Lancet (London, England)**, v. 346, n. 8978, p. 799–802, 23 set. 1995.
- WU, H. et al. Glycosylation of KSHV encoded vGPCR functions in its signaling and tumorigenicity. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1627–41, 31 mar. 2015.
- YIN, Q. et al. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 658–666, 24 jun. 2009.
- YU, H. ; ZHONG, X.; YANG, Y. Increased expression of nuclear faction- KB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. **Int J colorectal Dis**, v. 19, p. 18–22, 2004.
- YU, Y. et al. The Joint Association of REST and NFKB1 Polymorphisms on the Risk of Colorectal Cancer. **Annals of Human Genetics**, v. 76, n. 4, p. 269–276, jul. 2012.
- ZENG, Y. et al. Intracellular Tat of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Role of JAK/STAT Signaling. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2401–2417, 1 mar. 2007.
- ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 37–57, 12 jan. 2017.

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA DOS GENES NF- κ B1/NF- κ B2 E A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO NF- κ B COM A CARGA VIRAL E A INFECÇÃO LATENTE/LÍTICA PELO HHV-8 EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM HIV/aids, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Juliana Prado Gonçalves, com endereço: Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. Cidade Universitária 50670-420/Telefone: (81) 21268586, e-mail: julianapgoncales@gmail.com; para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação da Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho. Telefone para contato: 21268586, e-mail: rcoelholika@gmail.com.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

O objetivo desta pesquisa é investigar os fatores envolvidos no tipo de infecção pelo HHV-8, além de descrever os genótipos do HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids, para isso será necessária a coleta de duas amostras de 05 mL de sangue de uma veia. Serão utilizados materiais novos, estéreis e descartáveis na coleta de sangue, o que diminuirá o risco de contaminação. Além disso, os profissionais de coleta são experientes e tomarão os cuidados para diminuir o risco de que o local fique arroxado e/ou dolorido. Poderá ter riscos de constrangimento, que serão minimizados através de um adequado aconselhamento e conversa amigável, lembrando sempre que a participação é voluntária e toda a informação dada será confidencial, a entrevista para o preenchimento do formulário será realizada em sala reservada e de modo individual.

Em relação aos benefícios, o tipo de infecção pelo HHV-8 será informado ao médico que o acompanha, a fim de auxiliá-lo a decidir sobre a conduta clínica neste caso. Sua participação será muito importante e ajudará a criar mais informação sobre as infecções virais no contexto das pessoas vivendo com HIV/aids.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre

os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, através do formulário aplicado pela pesquisadora, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora e da orientada, no endereço, acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA DOS GENES NF- κ B1/NF- κ B2 E A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NF- κ B COM A CARGA VIRAL E A INFECÇÃO LATENTE/LÍTICA PELO HHV-8 EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM HIV/aids, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do participante (ou responsável legal): _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Assinatura da testemunha 1: _____

Assinatura da testemunha 2: _____

APÊNDICE B- EVALUATION OF NF κ B AND TNF- α EXPRESSION IN CD19 + AND CD3 + CELLS OVER HHV-8 LIFE CYCLE IN HIV-INFECTED PATIENTS

Juliana Prado Gonçalves¹, Thaisa Regina Rocha Lopes¹, Virginia Maria Barros de Lorena², Melayne Rocha Aciole¹, José Valter Joaquim Silva Júnior^{3,4}, Tania Regina Tozetto-Mendoza⁵, Paulo Henrique Braz-Silva⁶, Maria Rosangela Cunha Duarte Coêlho^{1,7*}.

¹ Virology Section, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

² Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Virology Section, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

⁵ Laboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁶ Division of Pathology, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁷ Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Abstract

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) can exhibit two replication phases, lytic and latent cycle, both modulated by viral and host factors. Although several studies have shown the influence of NF κ B on HHV-8 replication, the results of its participation in the lytic and latent infection are discordant. It is possible that the divergent results are influenced by the used *in vitro* model. Here, we evaluated the association of NF κ B and/or TNF- α expression in B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes from people living with HIV/AIDS with the HHV-8 latent or lytic infection. We also analyzed the correlation of NF κ B and/or TNF- α expression with TCD4 and TCD8 lymphocyte counts. In *ex vivo* condition, expression of NF κ B and/or TNF- α in B lymphocyte (CD19+) was strongly associated with the HHV-8 lytic cycle ($p < 0.0001$). Similarly, CD19+ TNF- α + NF κ B+ and CD3+ TNF- α + NF κ B+ cells were also strongly related to lytic infection ($p < 0.0001$). CD3+ TNF- α + cells from lytic replication were correlated with the TCD8 lymphocyte count ($r = 0.70$, $p < 0.0001$). We believe that these analyzes performed with cells from infected patients provide more consistent insights into the role of the immune response in the regulation of HHV-8 replication. Finally, taking into account the role of lytic cycle proteins in the pathogenesis of HHV-8 related diseases, Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease and primary effusion lymphoma, we believe that NF κ B and TNF- α could be explored in the future as potential biomarkers for these clinical conditions.

Keywords: HHV-8; replication cycle; immune response; NF κ B; TNF- α

Introduction

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8), also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, is a member of the *Herpesviridae* family and *Rhadinovirus* genus [1]. Currently, Kaposi's sarcoma (KS) is one of the most common cancers in people living with HIV/AIDS (PLHA) [2]. HHV-8 is also the etiologic agent of multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL) [3–5].

HHV-8 can express its genes in two transcriptional phases, latent and lytic [6]. The latent phase proteins (e.g. LANA, vCyclin, vFLIP) have as their main objective the viral persistence, whereas the proteins expressed in the lytic cycle (e.g. vGPCR, K1, k15) mediate the viral progeny production and the infection of new cells [8]. In addition to the viral elements, some host factors, such as genetic background, oxidative stress and secretion of some cytokines (e.g. IL-4, IL-6, IL-10), may also be associated to HHV-8 replication [9–11].

NFκB represents a family of transcription factors that may be activated by recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMPs), such as dsDNA and dsRNA viral, and also by TNF-α, a potent anti-viral cytokine [12]. Once activated, NFκB regulates the expression of a wide variety of genes involved in the inflammatory and immune response, such as TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IL-12, MCP-1, IL-18, RANTES, MIP-2, CXCL1 and CXCL10 [13]. Inappropriate activation of NFκB signaling pathways has been associated with autoimmunity, chronic inflammation and some cancers [14–16].

The NFκB family acts as transcription dimers that may be formed by five members, RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p100/p52) and NFκB2 (p105/50) [17, 18]. RelA, RelB, c-Rel have a C-terminal transactivation domain, which allows activation of the expression of the target gene, and NFκB1 and NFκB2 have DNA-binding activity [15, 17, 19]. Although other combinations may occur, the most frequent dimers are p50:RelA and p52:RelB [20, 21].

Numerous studies have reported the influence of NFκB on the HHV-8 lytic or latent cycle [12, 22, 31, 32, 23–30]. Experiments performed with HHV-8, *Epstein-Barr virus* (EBV) and *Murine gammaherpesvirus 68* (MHV-68) reported the association of NFκB overexpression with inhibition of lytic genes [26]. Ehrlich et al. (2014) observed that the presence of RTA viral protein resulted in decreased activation of NFκB during lytic reactivation [27]. Grossmann and Ganem (2008) demonstrate that inhibition of NFκB may lead to increased expression of lytic genes in PEL. In *de novo* infection, NFκB inhibition

resulted in lytic reactivation, increased cytotoxicity and apoptosis [31]. On the other hand, several studies have also associated the viral proteins of lytic cycle, such as ORF 75, K1, K13, K15 e vGPCR, with the NF κ B activation, favoring viral replication and the development of HHV-8 associated diseases [22, 24, 25, 33–35].

Although all of these results strongly point the relationship between NF κ B and HHV-8 cycle, their findings, sometimes conflicting, were almost all obtained from *in vitro* experiments, performed with laboratory cell lines, which may not be truly representative of the infected patient. Here, we evaluated the association of NF κ B (RelA) and/or TNF- α expression in B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes from PLHA with HHV-8 latent or lytic infection. In addition, we also analyzed the correlation of NF κ B (RelA) and/or TNF- α levels with TCD4 and TCD8 lymphocyte counts.

Material and methods

Study population

Participated of the study persons of both sexes, over 18 years old, attending the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco. Participants (n = 83) had confirmed diagnosis for HIV and HHV-8 infection, all without SK, MCD or PEL. The individuals were under regular antiretroviral therapy (ART) and had HIV undetectable viral load. General characteristics, sex, ART use time and TCD4 and TCD8 lymphocytes counts, are showed in table 1. After indirect immunofluorescence [36], patients were divided into two groups, latent (n=43) and lytic (n=40). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (protocol number: 45156215.5.0000.5208).

Table 1 - Patient characterization

Group	Number of individuals	Age [#]	Male	Female	ART use (months)*	LTCD4*	LTCD8*
Latent	43	44.5 ($\pm$ 10.1)	72.1% (31)	27.9% (12)	156	566	740
Lytic	40	41.5 ($\pm$ 10.9)	57.5% (23)	42.5% (17)	99	774	735
Total	83	43 ($\pm$ 10.6)	65.1% (54)	34.9% (29)	115	566	736

[#]The results are expressed as mean $\pm$ SD; *medians

Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood by centrifugation in Ficoll-Paque density gradient (GE Healthcare®, Uppsala, Sweden), as described previously [37]. The cells were placed in 14mL polypropylene culture tubes (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA), containing RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) supplemented with 1% antibiotic (10,000U of penicillin and 10,000U of streptomycin stock) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) and 10% of fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). For each patient, two culture tubes were used, one with stimulation [phytohemagglutinin (PHA+), 5µg/mL] (Cultilab®, Campinas, SP, BR) and the other without stimulation (PHA-). The cultures were carried out at a concentration of 1×10^6 cells/mL and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 4 hours. The Brefeldin A (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA[®]) (1µg/mL) was added in order to impede the cytokines secretion from the Golgi complex.

Immunophenotyping

The cells were washed by centrifugation (400g/10min/at room temperature) in phosphate buffer saline (PBS), containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) (PBS-Wash). Samples were immunostained with CD3-peridinin-chlorophyll-protein (PerCP) and CD19-fluorescein isothiocyanate (FITC) (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The tubes were then incubated for 30 min at room temperature and the cells were permeabilized with Perm/Wash solution (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA) for 10 min in the dark. After, the cells were incubated with TNF- α -Allophycocyanin (APC) and NF κ B-p65-Phycoerythrin (PE) (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA) for 30 min in the dark and at room temperature. Finally, the cells were washed, fixed with Cytofix (Becton Dickinson®, San Jose, CA, USA) for 15 min and stored at 4°C until the flow cytometric analysis.

Flow cytometry acquisition and analysis

The acquisition strategy began by selecting the gate of the lymphocyte population by means of the dot plot Forward Scatter Channel (FSC) *versus* Side Scatter Channel (SSC). Immunostained samples were run in a FACScalibur® flow cytometer Becton Dickinson®,

San Jose, CA, USA) and a minimum of 30,000 events were collected. The analyzes were performed using Flowjo software, version 10. The statistical quadrant FL1 (CD19) or FL3 (CD3) *versus* FL2 (NFκB) was used to evaluate the presence of NFκB. To evaluate the production of TNF-α was used the statistical quadrant FL1 (CD19) or FL3 (CD3) *versus* FL4 (TNF-α). To undertake the analysis of the TNF-α+NfκB-p65+ expression in CD3+ or CD19+ lymphocytes, the window of interest R2 in the FL1 (CD19) or FL3 (CD3) *versus* FL2 (NFκB) graph was selected, and FL1 *versus* FL2 two-bidimensional graphs were obtained.

Statistical analysis

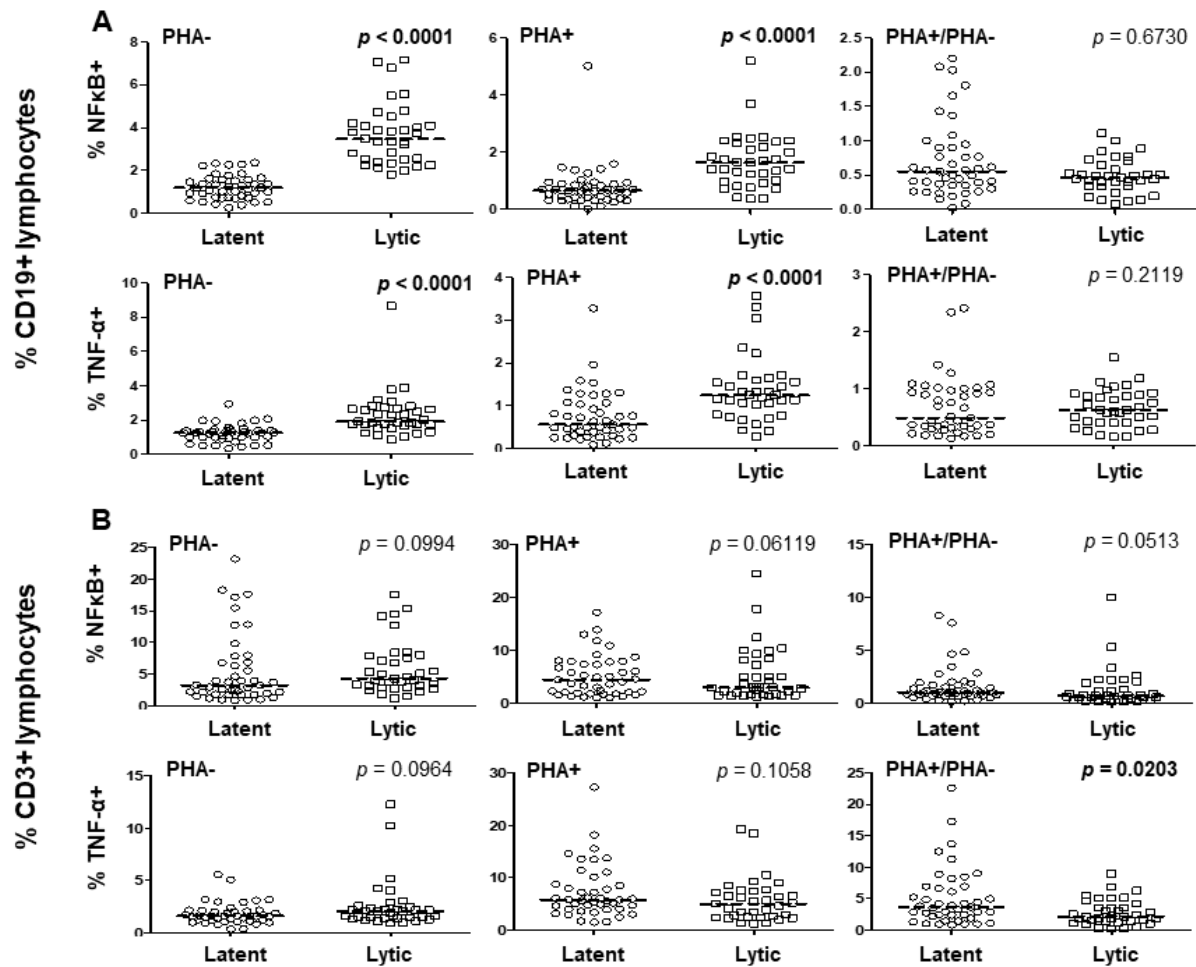
The association of the NFκB and TNF-α expression with latent and lytic infection was performed by Mann-Whitney test and the correlation between the expressions and TCD4 or TCD8 lymphocytes counts was by Spearman's correlation. The *p value* < 0.05 and CI 95% was considered in all analyses and the software used was GraphPad Prism 6.07.

Results

In CD19+ lymphocytes, cultured with or without PHA stimulation, NFκB and TNF-α expression was significantly higher in PLHA with HHV-8 lytic infection than in latently infected individuals ($p < 0.0001$) (Figure 1A). The with/without stimulus ratio (PHA+/PHA-) was not significantly different to NFκB ($p = 0.6730$) and TNF-α ($p = 0.2119$) expression (Figure 1A).

The NFκB expression in CD3+ lymphocytes did not differ significantly between PLHA with lytic or latent infection in the presence ($p = 0.06119$) or absence ($p = 0.0994$) of stimulus (Figure 1B). Similarly, TNF-α expression in CD3+ lymphocytes did not differ in individuals with HHV-8 lytic or latent cycle, in the presence ($p = 0.1058$) or absence of stimulus ($p = 0.0964$) (Figure 1B). Regarding the PHA+/PHA- ratio, this was significantly different only to TNF-α in the viral latency ($p = 0.0203$) (Figure 1B).

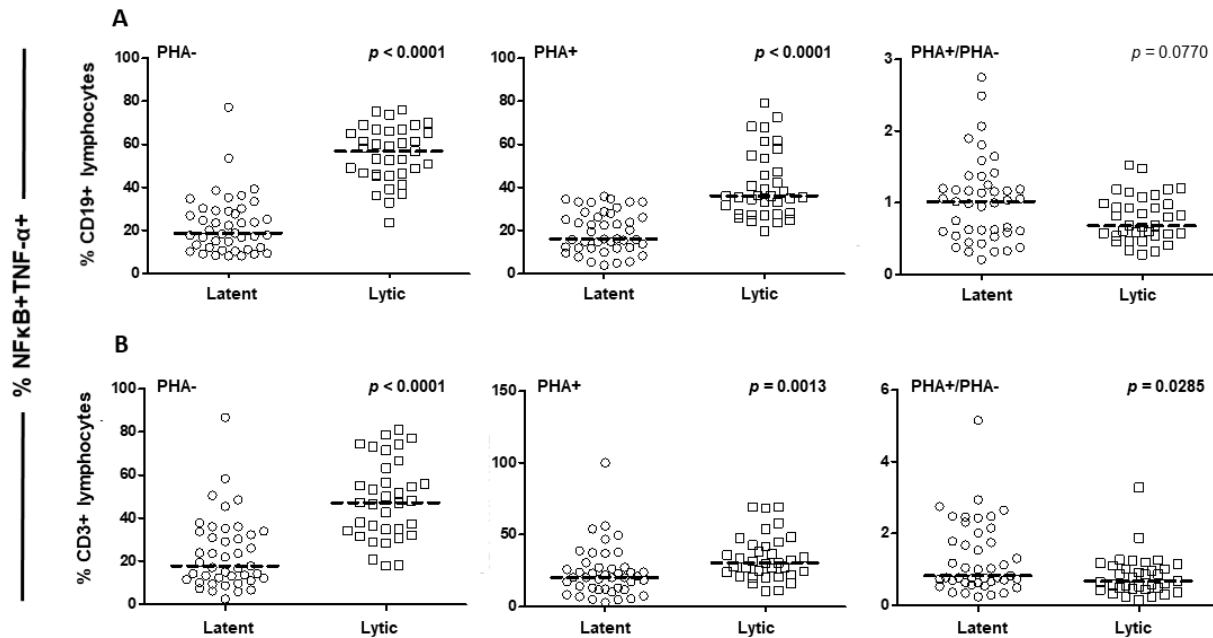
Figure 1- Expression of NF κ B or TNF- α in CD3+ and CD19+ lymphocytes from HIV infected patients in HHV-8 latent or lytic infection



p obtained by the Mann-Whitney test.

In the CD19+ TNF- α + NF κ B+ evaluation, individuals in lytic cycle had a higher amount of triple-labeled cells compared to the latent group in the culture with and without stimulus ($p < 0.0001$) (Figure 2A). The CD3+ TNF- α + NF κ B+ expression was also higher in the lytic group in the culture with ($p < 0.0001$) and without stimulus ($p = 0.0013$) when compared to the latent group (Figure 2B). In CD3+ TNF- α + NF κ B+ cells, was observed a higher response to PHA in the latent group ($p = 0.0285$) (Figure 2B).

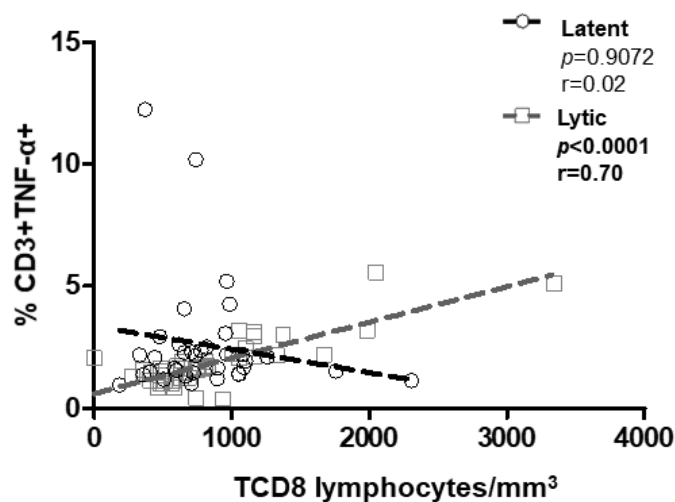
Figure 2- Simultaneous expression of NF κ B and TNF- α in CD3+ and CD19+ lymphocytes from HIV infected patients in HHV-8 latent or lytic infection



p obtained by the Mann-Whitney test.

When we correlated CD3+ TNF- α +, CD3+ NF κ B+ and CD3+ TNF- α + NF κ B+ with TCD4 and TCD8 lymphocytes count, only CD3+ TNF- α + cells showed significant correlation, precisely with TCD8 lymphocytes counts in individuals with lytic infection ($r = 0.70$, $p < 0.0001$) (Figure 3).

Figure 3- Correlation of CD3+ TNF- α + expression with TCD8 lymphocytes count from HIV infected patients in HHV-8 latent or lytic infection



p obtained by Spearman's correlation.

Discussion

The regulation between the HHV-8 lytic and latent cycle is the result of a fine balance between immune response and expression of viral proteins [8, 38]. Regarding the host factors, many studies have associated the NF κ B activation with the HHV-8 lytic or latent cycle [12, 22, 31, 32, 23–30]. Although NF κ B's involvement in HHV-8 replication is unquestionable, its influence on the dynamics of the viral life cycle is still under discussion. We believe that the excessive use of *in vitro* models is one of the most responsible factors for the divergence of results. To our knowledge, experiments performed with cells from infected individuals are rare, as in the work of Azzi et al. (2014) [22].

In our study, an *ex vivo* evaluation of NF κ B and TNF- α expression was performed in B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes from PLHA with HHV-8 lytic and latent infection. The higher NF κ B expression in B cells from lytic infection corroborates the findings of Azzi et al. (2014). In the mentioned study, performed in PEL cells and primary cells of HIV-negative HHV-8 infected individuals, it was possible to associate the expression of vGPCR, lytic viral protein, to NF κ B activation [22].

Several lytic cycle proteins have also been related to NF κ B activation, such as ORF 75, K1, K13, K15 and vGPCR, and may be consistent with our study [22, 24, 25, 32, 34, 35, 39, 40]. These results, however, were obtained in laboratory immortalized cell lines, which possibly show considerable differences in relation to primary cells. Although some reports suggest the use of immortalized cell as study model [41–44], some others have reservations about its application [41, 45], including highlighting significant differences of transcriptional profile between primary and immortalized lineages [46].

In particular on HHV-8, Grossmann and Ganem (2008) observed that the association of NF κ B with the lytic or latent cycle depends of the cell type evaluated [31]. In addition to this bias, the influence of these proteins on the NF κ B activation was observed through the expression of cloned genes, which often results in overexpression in relation to amount found in the viral replication cycle.

Contrary to our finding, when the NF κ B pathway was analyzed in cells from lymphocytic origin, HR-1, KS-1 and BCBL1, infected by EBV or HHV-8, Brown et al. (2013) related the NF κ B activation in viral latency. Like the studies cited above, this

experiment was carried out with laboratory cell lines, presenting the same caveats previously discussed.

We also observed an increase of TNF- α expression in B lymphocytes (CD19+) from individuals with lytic infection. To our knowledge, this is the first report of the association of TNF- α with the HHV-8 life cycle. Is possible that the increased expression of TNF- α is related to the participation of this cytokine in the NF κ B pathway. Once activated, NF κ B can lead to the expression of various inflammatory cytokines, such as TNF- α [12, 47]. Secreted, TNF- α can bind to TNFR1 and TNFR2 receptors, both expressed in B and T lymphocytes, resulting in positive feedback of the NF κ B pathway [47, 48]. Therefore, we believe that the feedback between NF κ B and TNF- α can be related to HHV-8 lytic infection. This possibility is also supported by the observation that the association of NF κ B and TNF- α expression with the lytic cycle was maintained when the two proteins were simultaneously identified in both B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes.

When analyzed the individual expression of NF κ B and TNF- α in T lymphocytes (CD3+), we observed no difference between cells from PLHA with lytic or latent infection. Since B lymphocytes are the initial targets of HHV-8 infection [49, 50], it is possible that the difference of NF κ B and TNF- α expression between B and T lymphocytes is associated to the viral tropism. Interestingly, when expression of NF κ B and TNF- α were analyzed in B and T cells with and without the PHA stimulation, a strong inducer of Th1 pathway, only CD3+ TNF- α + and CD3+ NF κ B + TNF- α + cells showed significant difference between the conditions. This finding corroborates with the selective suppression of Th2 response, increase of Th1 profile and inhibition of the NF κ B pathway by PHA [51].

We have identified a strong association between CD3+TNF- α + and TCD8 lymphocyte count in PLHA with HHV-8 lytic infection. It is possible that this relationship is based in the participation of the cellular immune response against HHV-8 infection, mainly in lytic infection, which is strongly immunogenic [8]. Consistent with our results, some *in vitro* studies have shown the reactivity of TCD8 lymphocyte from HIV/HHV-8 individuals against HHV-8 lytic and latent cycle antigens [52–56].

In summary, our results show a strong relationship of NF κ B and TNF- α expression with the HHV-8 lytic cycle. In addition to insights into HHV-8 replication, the use of *ex vivo* model also allowed us to make a important association of the cellular immune response with virus replication. Finally, taking into account the role of lytic cycle proteins in the pathogenesis of HHV-8 related diseases, KS, PEL and MCD [38, 57–60], we believe that

NF κ B and TNF- α could be explored in the future as potential biomarkers for these clinical conditions.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Reference

1. ICTV (2018) International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 11 Jan 2019
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108.
3. Sullivan RJ, Pantanowitz L, Casper C, et al (2008) HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Clin Infect Dis* 47:1209–15.
4. Carbone A, De Paoli P, Gloghini A, Vaccher E (2015) KSHV-associated multicentric Castleman disease: A tangle of different entities requiring multitarget treatment strategies. *Int J Cancer* 137:251–261.
5. Uldrick TS, Whitby D (2011) Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett* 305:150–162.
6. Purushothaman P, Dabral P, Gupta N, et al (2016) KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front Microbiol* 7:54.
7. Ganem D (2010) KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: Listening to human biology and medicine. *J. Clin. Invest.* 120:939–949
8. Ganem D (2010) KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest* 120:939–949.
9. Aneja KK, Yuan Y (2017) Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. *Front Microbiol* 8:613.
10. Stebbing J, Gazzard B, Bower M (2006) The Host Control of Lytic and Latent Infection with Human Herpesvirus–8. *J Infect Dis* 193:1051–1053.
11. Uldrick TS, Bhutani M, Polizzotto MN, et al (2014) Inflammatory cytokines, hyperferritinemia and IgE are prognostic in patients with KSHV-associated lymphomas

- treated with curative intent therapy. *ASH* 2014 124:3001a
12. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
 13. Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000034–a000034.
 14. Bassères DS, Baldwin AS (2006) Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25:6817–6830.
 15. Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys* 42:443–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338>
 16. Courtois G, Gilmore TD (2006) Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25:6831–6843.
 17. Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26:203–234.
 18. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132:344–362.
 19. Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006) NF- κ B and the immune response. *Oncogene* 25:6758–6780.
 20. Smale ST (2012) Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunol Rev* 246:193–204.
 21. Trask OJ (2004) Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
 22. Azzi S, Smith SS, Dwyer J, et al (2014) YGLF motif in the Kaposi sarcoma herpes virus G-protein-coupled receptor adjusts NF- κ B activation and paracrine actions. *Oncogene* 33:5609–5618.
 23. Blattman NN, Lagunoff M, Blattman JN, Corey L (2014) Nuclear factor kappa B is required for the production of infectious human herpesvirus 8 virions. *Front Microbiol* 5:129.
 24. Brinkmann MM, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, et al (2007) Modulation of Host Gene Expression by the K15 Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 81:42–58.
 25. Brinkmann MM, Glenn M, Rainbow L, et al (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein. *J Virol* 77:9346–58
 26. Brown HJ, Song MJ, Deng H, et al (2003) NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic

- replication. *J Virol* 77:8532–40
27. Ehrlich ES, Chmura JC, Smith JC, et al (2014) KSHV RTA Abolishes NF κ B Responsive Gene Expression during Lytic Reactivation by Targeting vFLIP for Degradation via the Proteasome. *PLoS One* 9:e91359.
 28. Field N, Low W, Daniels M, et al (2003) KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK. *J Cell Sci* 116:3721–8.
 29. Guasparri I, Keller SA, Cesarman E (2004) KSHV vFLIP Is Essential for the Survival of Infected Lymphoma Cells. *J Exp Med* 199:993–1003.
 30. Guasparri I, Hassane DC, Roshal M, Cesarman E (2012) The Viral Oncoprotein vFLIP Encoded by KSHV/HHV-8 Is Responsible for the Unique Transcriptional Signature and Phenotypic Features of Primary Effusion Lymphoma. *Blood* 120:900
 31. Grossmann C, Ganem D (2008) Effects of NFkappaB activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology* 375:94–102.
 32. Hävemeier A, Gramolelli S, Pietrek M, et al (2014) Activation of NF- κ B by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 protein involves recruitment of the NF- κ B-inducing kinase, I κ B kinases, and phosphorylation of p65. *J Virol* 88:13161–72.
 33. Järviluoma A, Ojala PM (2006) Cell signaling pathways engaged by KSHV. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1766:140–158.
 34. Matta H, Mazzacurati L, Schamus S, et al (2007) Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) Oncoprotein K13 Bypasses TRAFs and Directly Interacts with the I κ B Kinase Complex to Selectively Activate NF- κ B without JNK Activation. *J Biol Chem* 282:24858–24865.
 35. Konrad A, Wies E, Thureau M, et al (2009) A systems biology approach to identify the combination effects of human herpesvirus 8 genes on NF-kappaB activation. *J Virol* 83:2563–2574.
 36. Caterino-De-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Carbone PHL, et al (2003) Human herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies in women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Braz J Infect Dis* 7:395–401.
 37. Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, et al (2008) Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal* 22:91–98.
 38. Grundhoff A, Ganem D (2004) Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113:124–136.

39. Wu H, Liu L, Xiao J, et al (2015) Glycosylation of KSHV encoded vGPCR functions in its signaling and tumorigenicity. *Viruses* 7:1627–41.
40. Chiou C-J, Poole LJ, Kim PS, et al (2002) Patterns of Gene Expression and a Transactivation Function Exhibited by the vGCR (ORF74) Chemokine Receptor Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* 76:3421–3439.
41. Boerma M, Burton GR, Wang J, et al (2006) Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: Changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17:173–180.
42. Hou A, Voorhoeve PM, Lan W, et al (2013) Comparison of gene expression profiles in primary and immortalized human pterygium fibroblast cells. *Exp Cell Res* 319:2781–2789.
43. Fichorova RN, Rheinwald JG, Anderson DJ (1997) Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biol Reprod* 57:847–55
44. Fichorova RN, Anderson DJ (1999) Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod* 60:508–14
45. Andreghetto FM, Klingbeil MFG, Soares RM, et al (2011) Evaluation of microRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. *Einstein (São Paulo)* 9:442–448. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2149>
46. Bramley JC, Drummond CG, Lennemann NJ, et al (2017) A Three-Dimensional Cell Culture System To Model RNA Virus Infections at the Blood-Brain Barrier. *mSphere* 2:. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00206-17>
47. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12:695–708
48. Kumar A, Takada Y, Boriek A, Aggarwal B (2004) Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 82:434–448. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0555-y>
49. Lukac DM, Yuan Y (2007) Reactivation and lytic replication of KSHV. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. pp 434–460
50. Chakraborty S, Veettil MV, Chandran B (2012) Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. *Front Microbiol* 3:6.

51. Askari VR, Baradaran Rahimi V, Rezaee SA, Boskabady MH (2018) Auraptene regulates Th1/Th2/TReg balances, NF- κ B nuclear localization and nitric oxide production in normal and Th2 provoked situations in human isolated lymphocytes. *Phytomedicine* 43:1–10.
52. Osman M, Kubo T, Gill J, et al (1999) Identification of human herpesvirus 8-specific cytotoxic T-cell responses. *J Virol* 73:6136–40
53. Wang QJ, Jenkins FJ, Jacobson LP, et al (2000) CD8 + Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Lytic Proteins of Human Herpes Virus 8 in Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected and –Uninfected Individuals. *J Infect Dis* 194:1078–1088.
54. Guihot A, Dupin N, Marcelin A, et al (2006) Low T Cell Responses to Human Herpesvirus 8 in Patients with AIDS- Related and Classic Kaposi Sarcoma. *J Infect Dis* 194:1078–1088.
55. Lambert M, Gannage M, Karras A, et al (2006) Differences in the frequency and function of HHV8-specific CD8 T cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi sarcoma. *Blood* 108:3871–3880.
56. Robey RC, Lagos D, Gratrix F, et al (2009) The CD8 and CD4 T-Cell Response against Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is Skewed Towards Early and Late Lytic Antigens. *PLoS One* 4:e5890.
57. Cannon M, Cesarman E, Boshoff C (2006) KSHV G protein-coupled receptor inhibits lytic gene transcription in primary-effusion lymphoma cells via p21-mediated inhibition of Cdk2. *Blood* 107:277–284.
58. Polizzotto MN, Uldrick TS, Hu D, Yarchoan R (2012) Clinical Manifestations of Kaposi Sarcoma Herpesvirus Lytic Activation: Multicentric Castleman Disease (KSHV-MCD) and the KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome. *Front Microbiol* 3:73.
59. Montaner S, Sodhi A, Pece S, et al (2001) The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res* 61:2641–8
60. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C (2010) Kaposi's sarcoma herpesvirus/ Human herpesvirus-8 (KSHV/HHV8), and the oncogenesis of Kaposi's sarcoma. *Nat Rev Cancer* 10:707–719.

APÊNDICE C- ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN NF κ B1 PROMOTER AND NF κ BIA GENE WITH THE HHV-8 REPLICATION CYCLES IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS

Juliana Prado Gonçalves¹, José Valter Joaquim Silva Júnior^{2,3}, Thaisa Regina Rocha Lopes¹, Tania Regina Tozetto-Mendoza⁴, Deborah de Farias Guimarães³, Viviane Martha Santos de Moraes¹, Maria Rosangela Cunha Duarte Coêlho^{1,5*}

¹ Virology Section, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

² Virology Section, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine of Sao Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵ Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Abstract

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) is the etiologic agent of Kaposi's sarcoma (KS), one of the most common cancers in people living with HIV/aids (PLHA). Like other herpesviruses, HHV-8 can exhibit lytic and latent replication, both regulated by viral and host factors. Regarding host factors, we analyzed the association of polymorphisms in the promoter of the NFκB1 (−94 ins/del ATTG) and in NFκBIA gene (NFκBIA 3'UTR A →G) on the regulation of the HHV-8 latent and lytic cycle. A total of 838 PLHA was evaluated for the presence of IgG against HHV-8. Subsequently, individuals were classified with HHV-8 lytic or latent infection and the NFκB1-94 ins/del ATTG and NFκBIA 3'UTR A→G polymorphisms were evaluated by PCR-RFLP. The genetic associations with the HHV-8 lifecycle was evaluated by χ^2 test and Yates correction with OR, 95% CI and *p-value* <0.05. 132 PLHA presented IgG for HHV-8, of whom 63 and 69 presented lytic and latent infection, respectively. Among these, the ins/del [OR 7.9 (95% CI 3.3-19.1), *p* <0.001], AG [OR 12.3 (95% CI 4.3-34.9) *p* <0.001], GG [OR 9.4 (95% CI 3.2-27.9), *p* <0.001], ins/del + AG [OR 94.5 (95% CI 9.6-924.4), <0.0001], ins/del + GG [OR 50.4 (95% CI 5.2-482.2, *p* <0.0001] and G allele [OR 3.3 (95% CI 2.0-5.6), *p* <0.001] were related to lytic infection. In conclusion, we show for the first time a strong association of genetic changes in the promoter of the NFκB1 and in NFκBIA gene on the HHV-8 lytic cycle.

Keywords: HHV-8; polymorphism; NFκB1; NFκBIA

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8), a member of the *Herpesviridae* family and *Rhadinovirus* genus (ICTV, 2016), is the etiologic agent of all clinical forms of Kaposi's sarcoma (KS) (MBULAITEYE et al., 2003a). Since the HIV epidemic in the 1980s, KS has been studied mainly in people living with HIV/aids (PLHA), and is currently one of the most common cancers in this population (TORRE et al., 2015b).

Like other herpesviruses, HHV-8 can exhibit two modes of replication, the lytic and latent phase, both regulated by viral and host factors. Viral proteins K9, K11/11.1, vGPCR, RTA and KCP, for example, have been described during the lytic cycle, whereas Lana-1, vCyc and vFlip proteins have been associated with latent infection (DOUGLAS et al., 2010). Host factors, such as oxidative stress, hypoxia, unbalanced inflammatory cytokines and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokines and growth factor have also been implicated in the regulation between lytic and latent infection (ANEJA; YUAN, 2017a; STEBBING; GAZZARD; BOWER, 2006).

The identification of HHV-8 by the innate immune response during both primary infection and/or reactivation from latency occurs via pattern recognition receptors (PRRs), mainly Toll like-receptors (TLR) -3, -4, -7, -8, -9, NLRP1 and NLRP3 (nucleotide oligomerization domain-like receptors family, NLR), IFI16 [absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor family] and cGAS-STING (cytosolic DNA sensor) (DITTMER; DAMANIA, 2016b). Once stimulated, the PRRs can initiate the activation pathway of the nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF κ B), which results in the transcription of several genes, including of inflammatory cytokines and anti-apoptotic proteins (DOUGLAS et al., 2010). In addition, the NF κ B pathway may also be activated by latent (e.g K13, vFLIP) and lytic (e.g. K1, vGPCR) viral proteins, besides viral miR-K1 through 12 (latent phase) and host cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 and interferon α/β) (DOUGLAS et al., 2010; LIU et al., 2017a; PFEFFER, 2011).

Experiments performed in epithelial cells and fibroblasts suggested that NF κ B would inhibit the HHV-8 lytic cycle (BROWN et al., 2003b). In a cell line from primary effusion lymphoma, Sgarbanti et al. (2004) showed that NF κ B positively influenced the expression of HHV-8 lytic genes (SGARBANTI et al., 2004a). Finally, when evaluating the participation of NF κ B on lytic or latent infection in several cell lines, Grossmann and Ganem (2008) demonstrated that the influence of NF κ B on the HHV-8 replication cycles is not universal, but dependent of the cell type evaluated.

Although these findings provide important insights into the role of NF κ B in the HHV-8 lifecycle, to our knowledge, there are no genetic studies that investigate the influence

of polymorphisms in NF κ B and associated-molecules on the HHV-8 infection. Therefore, we evaluated the association of polymorphisms in the promoter of the nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NF κ B1) (-94 ins/del ATTG polymorphism, rs28362491) and in the nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NF κ BIA) (NF κ BIA 3'UTR A $\rightarrow$ G polymorphism, rs696) on the regulation of the latent and lytic cycle of HHV-8.

A total of 838 PLHA was evaluated for the presence of IgG against HHV-8 antigens, according to the protocol described by (NASCIMENTO et al., 2007a). Subsequently, individuals were classified with HHV-8 lytic or latent infection by indirect immunofluorescence (Nascimento et al., 2007). Ethnic information was based on ethnic self-identification, according to the classification system of the Brazilian Institute of Geography and Statistics. CD4 lymphocyte count was obtained from patients' records. All participants were receiving antiretroviral therapy and were accompanied at the Referral Service for Infectious and Parasitic Diseases of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. The patients were more than 18 years old and signed a free and informed consent form. The study was approved by the ethics committee, protocol number 5156215.5.0000.5208.

Whole blood samples were collected in tubes containing EDTA and stored at -20°C. Genomic DNA was extracted from 300 μ L of the sample using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. After extraction, the concentration and purity of the DNA samples were measured using the Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer. The study was performed with DNA samples with OD ratio (260/280nm) between 1.8 and 2.0.

The NF κ B1-94 ins/del ATTG and NF κ BIA 3'UTR A $\rightarrow$ G polymorphisms were evaluated by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. For the NF κ B1-94 ins/del ATTG polymorphism, were used the forward 5'-TGGGCACAAGTCGTTTATG-3' and reverse 5'-CTGGAGCCGGTAGGGAAG-3' primers. The forward 5'-GCTGAAAGAACATGGACTTG-3' and reverse 5'-GTACACCATTACAGGGAGGG-3' primers were used to determine the NF κ BIA 3'UTR A $\rightarrow$ G polymorphism. PCR was performed with Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the conditions: 95°C for 3min for initial denaturation, 32 cycles of 95°C for 30s for denaturation, 52°C for 30s for annealing, 72 ° for 1min of extension, followed by a final extension of 72°C for 5min.

For identification of the NFκB1-94 ins/del ATTG polymorphism, the amplicon (281bp) was digested with 1 unit of the restriction enzyme PflMI (Van911) (Fermentas, Waltham, MA, EUA) for 18h at 37 °C, according to the manufacturer's instructions. DNA samples with del/del genotype do not have the digestion site and remain undigested, 281bp band. Samples with ins/ins have the PflMI site (Van911) and showed 240bp and 45bp bands. Heterozygotes presented the three bands.

For the NFκBIA 3'UTR A→G polymorphism, the 424bp amplicon was digested by the enzyme HaeIIIA (Fermentas, Waltham, MA, EUA) at 37 °C for 18h with 1 unit of the enzyme, according to the manufacturer's instructions. The AA genotype were not digested and presented the band of 424bp. Homozygotes from the G allele revealed two bands, 316bp and 108bp. Heterozygotes showed the three bands.

The association of the alleles and single or combined genotypes on the latent and lytic cycle was evaluated by χ^2 test and Yates correction with Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI). The evaluation of the association of the first and last TCD4 counts was performed by the Mann-Whitney test. The results with *p-value* <0.05 were considered significant. Statistical analyzes were performed in the GraphPad Prism program v.6.07.

Of the 838 PLHA evaluated, 132 presented IgG for HHV-8. Of these, 63 and 69 presented lytic and latent infection, respectively. Among the general characteristics, only mulattos ethnicity showed association with the HHV-8 replication, precisely on the lytic cycle [OR 0.3 (95% CI 0.1-0.8), *p* = 0.03] (Table 1). The NFκB1-94 ins/del ATTG and NFκBIA 3'UTR A→ G polymorphisms were successfully genotyped in all individuals with HHV-8 lytic and latent infection. The allele and genotype frequencies of both polymorphisms are described in Table 2.

Table 1- Characterization of study population

Variable	Latent (n=69)	Lytic (n=63)	OR (95% CI)	<i>p value</i>
Age	45.2 (±11.9) ^a	43.4 (±11.6)	-	-
Sex				
Male	22 (31.9%)	25 (39.7%)	Reference	-
Female	47 (68.1%)	38 (60.7%)	0.7 (0.3-1.4)	0.45 ^b
Ethnicity ^c				
Mulattos	29 (42%)	41 (65.1%)	Reference	-
Black	24 (34.8%)	15 (23.8%)	0.4 (0.2-0.9)	0.06 ^b
White	16 (23.2%)	07 (11.1%)	0.3 (0.1-0.8)	0.03 ^b
First count of TCD4 (cell/mm ³)	249 (08-728) ^d	206 (19-1045)	-	0.46 ^e
Last count of TCD4 (cell/mm ³)	641 (131-1674) ^d	576 (39-1336)	-	0.18 ^e

^aThe results are expressed as mean ±SD; ^b*p value* obtained by χ^2 test; ^cBased on ethnic self-identification, according to the classification system of the Brazilian Institute of Geography and Statistics; ^dMedian (minimum-maximum); ^e*p value* obtained by Mann Whitney test

Regarding NFκB1-94 ins/del ATTG polymorphism, was observed association between the ins/del genotype and the lytic cycle of HHV-8 [OR 7.9 (95% CI 3.3-19.1), $p < 0.001$] and no alleles were associated with lytic or latent infection. In the NFκB1A 3'UTR A→G polymorphism, AG and GG genotypes were related to the lytic infection, OR 12.3 (95% CI 4.3-34.9) and OR 9.4 (95% CI 3.2-27.9), respectively ($p < 0.001$). In addition, the G allele was also associated with the lytic cycle [OR 3.3 (95% CI 2.0-5.6), $p < 0.001$] (Table 2). When combined, ins/del + GG [OR 50.4 (95% CI 5.2-482.2, $p < 0.0001$)] and ins/del + AG [OR 94.5 (95% CI 9.6-924.4), < 0.0001] were strongly related to lytic infection (Table 3).

Table 2-Association of genotypes and alleles of NFκB1-94 ins/del ATTG and NFκB1A 3'UTR A→G polymorphisms with HHV-8 lytic and latent infection in PLHA

NFκB1-94 ins/del ATTG	Latent n=69 (%)	Lytic n=63 (%)	OR (95% CI)	<i>p value</i> ^a
ins/ins	37 (53.62)	14 (22,22)	Reference	-
ins/del	13 (18,84)	39 (61,91)	7.9 (3.3-19.1)	< 0.001
del/del	19 (27,54)	10 (15,87)	1.4 (0.5-3.7)	0.61
ins allele frequency	87 (63,04)	67 (53,17)	Reference	-
del allele frequency	51 (36,96)	59 (46,83)	1.5 (0.9-2.4)	0.10
NFκB1A 3'UTR A→G				
AA	37 (53.62)	06 (09,52)	Reference	-
AG	17 (24.64)	34 (53,97)	12.3 (4.3-34.9)	< 0.001
GG	15 (21.74)	23 (36.51)	9.4 (3.2-27.9)	< 0.001
A allele frequency	91 (65,94)	46 (36.51)	Reference	-
G allele frequency	47 (34.06)	80 (63,49)	3.3 (2.0-5.6)	< 0.001

^a*p value* obtained by Fisher's exact test.

Table 3- Evaluation of combined genotypes of NFκB1-94 ins/del ATTG and NFκB1A 3'UTR A→G polymorphisms with HHV-8 lytic and latent infection in PLHA

Combined genotypes	Latent (n)	Lytic (n)	OR (95% CI)	<i>p value</i> ^a
ins/ins + AA	18	01	Reference	-
ins/ins + AG	11	09	14.7(1.6-132.7)	0.008
ins/ins + GG	08	04	9.0 (0.9-93.9)	0.06
ins/del + AA	10	04	7.2 (0.7-73.6)	0.13
ins/del + AG	04	21	94.5 (9.6-924.4)	<0.0001
ins/del + GG	05	14	50.4 (5.2-482.2)	<0.0001
del/del + AA	09	02	4.0 (0.3-50.2)	0.53
del/del + AG	02	03	27.0 (1.8-399.5)	0.01
del/del + GG	02	05	45.0 (3.3-604.4)	0.002

^a*p value* obtained by Fisher's exact test.

The NFκB1-94 ins/del ATTG polymorphism is a functional insertion/deletion in the promoter of the NFκB1 gene, which encodes the p50 subunit of NFκB (KARBAN et al., 2004; KOC et al., 2014). The ins/del variant encodes for three genotypes: the wild-type homozygous insertion (ins/ins), variant homozygous deletion (del/del) and heterozygous (ins/del) (KARBAN et al., 2004; KOC et al., 2014). Although not yet investigated in viral infections, the NFκB1-94 ins/del ATTG polymorphism has already been evaluated in cancer (CHENG et al., 2013; GAO et al., 2014; WANG et al., 2016) and in deregulation of the immune response, such as inflammatory and autoimmune diseases: ulcer colitis (BORM et al., 2005a), rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (KOC et al., 2014; OROZCO et al., 2005b) and Hashimoto's disease (KOC et al., 2014).

In our study, only the ins/del genotype was associated with HHV-8 infection, precisely on lytic replication. Although in some cell lines the high expression of NFκB is related to the HHV-8 lytic cycle, in our study population, we believe that the moderate expression of NFκB is also associated with lytic infection. This hypothesis is supported by previous report that the deletion and insertion of the four ATTG nucleotides may result in loss and increase of NFκB1 promoter activity, respectively (KARBAN et al., 2004).

Interestingly, ins/del variant also showed association with hepatic cancer (GAO et al., 2014a; WANG et al., 2016), Hashimoto's disease (KOC et al., 2014) and was negatively related to the risk for systemic lupus erythematosus (GAO et al., 2012). The ins/del genotype, however, showed no association with ulcer colitis (BORM et al., 2005) and rheumatoid arthritis (OROZCO et al., 2005b).

We also no found association of alleles or homozygotes (ins/ins or del/del) with the HHV-8 lytic or latent cycle. On the other hand, in ulcer colitis (BORM et al., 2005a), colorectal cancer (LEWANDER et al., 2007), Graves disease (KURYLOWICZ et al., 2007b) and liver cancer (GAO et al., 2014) was observed relation between clinical condition and del allele. In addition, homozygous individuals for ATTG (ins/ins) would have increased risk of rheumatoid arthritis (LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012) and liver cancer (WANG et al., 2016).

The NFκBIA gene encodes IκBα, an inhibitory of the NFκB1 protein (KOC et al., 2014). Numerous polymorphisms in NFκBIA gene, including NFκBIA 3'UTR A→G, have also been investigated in several cancers types (CHENG et al., 2013; LI et al., 2017; WANG et al., 2016) and Hashimoto's disease (KOC et al., 2014). However, similar to the NFκB1-94 ins/del ATTG polymorphism, no study evaluated the influence of NFκBIA 3'UTR A→G polymorphism on the viral infections.

In our study population, the G allele and haplotypes containing G (AG and GG) were both associated with the HHV-8 lytic cycle. In hepatic and gastric cancer only haplotypes containing the A allele or AA homozygotes could be related to disease (WANG et al., 2016). Experiments carried out in cell culture indicated that miR-449a could bind strongly to A allele and that the G allele would decrease mRNA stability or translation efficiency of NFκBIA. As consequence, in specific context, both alleles could reduce the expression of NFκBIA and consequently increase the NFκB levels (SONG et al., 2011). It is possible that this participation of the A and G alleles in the NFκB activation dynamic may be related to infection phase of HHV-8.

When the single genotypes that were associated with the HHV-8 lytic cycle were combined, ins/del + AG or ins/del + GG, it was possible to observe a strong synergism to the lytic infection. Interestingly, the combined genotypes GG and ins/ins + ins/del were associated with an increased risk of colorectal cancer (SONG et al., 2011), and ins/ins + AG has already been related to protection for Hashimoto's disease (KOC et al., 2014).

Although the overall of these results shows for the first time the association of genetic changes in the promoter of the NFκB1 and in NFκBIA gene with the HHV-8 lytic cycle, we believe that this relationship should be extended to phenotypic investigation. Since the KS pathogenesis depends of the regulated expression of viral and cellular proteins during the lytic and latent infection, it is possible that the NFκB1-94 ins/del ATTG and NFκBIA 3'UTR A→G polymorphisms, being associated with the HHV-8 infection stages, can influence the clinical evolution of PLHA HHV-8-coinfected. In addition, these polymorphisms could also influence the KS development via NFκB activation, which is known to be important in the inflammation chronicity and KS development, mainly by inhibiting apoptosis and stimulating angiogenesis (DOUGLAS et al., 2010). The influence of these and others polymorphisms in NFκB1 or NFκBIA genes on the activation and production of NFκB has already been experimentally suggested (KARBAN et al., 2004; SONG et al., 2011). Finally, despite the numerous aspects that can influence the clinical course of the HHV-8 infection, we believe that the clinical impact of these polymorphisms should be investigated in larger populations with different forms of KS.

Conflicts of interest

All authors have no potential conflict of interest.

Acknowledgments

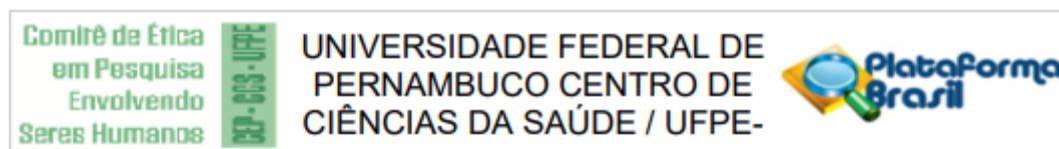
Lopes TRR and Gonçalves JP are supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) fellowships. Silva Júnior J.V.J. and Moraes V.M.S are supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

References

- Aneja, K.K., Yuan, Y., 2017. Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. *Front. Microbiol.* 8, 613.
- Borm, M.E.A., Van Bodegraven, A.A., Mulder, C.J.J., Kraal, G., Bouma, G., 2005. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int. J. Immunogenet.* 32, 401–405.
- Brown, H., Song, M., Deng, H., Wu, T., 2003. NF- κ B inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J. Virol.* 77, 8532–8540.
- Cheng, C.W., Su, J.L., Lin, C.W., Su, C.W., Shih, C.H., Yang, S.F., Chien, M.H., 2013. Effects of NFKB1 and NFKBIA Gene Polymorphisms on Hepatocellular Carcinoma Susceptibility and Clinicopathological Features. *PLoS One* 8, e56130.
- Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: immunobiology, oncogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 126, 3165–3175.
- Douglas, J.L., Gustin, J.K., Moses, A. V, Dezube, B.J., Pantanowitz, L., 2010. Kaposi Sarcoma Pathogenesis: A Triad of Viral Infection, Oncogenesis and Chronic Inflammation. *Transl. Biomed.* 1, 1-29.
- Gao, J., Xu, H.L., Gao, S., Zhang, W., Tan, Y.T., Rothman, N., Purdue, M., Gao, Y.T., Zheng, W., Shu, X.O., Xiang, Y.B., 2014. Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: A nested case-control study in Shanghai, China. *BMJ Open* 4, 1–8.
- Gao, M., Wang, C.-H., Sima, X., Han, X.-M., 2012. *NFKB1* –94 Insertion/Deletion ATG Polymorphism Contributes to Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *DNA Cell Biol.* 31, 611–615.
- Grossmann, C., Ganem, D., 2008. Effects of NF κ B activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology* 375, 94–102.
- ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. [cited 2018 Dec 10]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Karban, A.S., Okazaki, T., Panhuysen, C.I.M., Gallegos, T., Potter, J.J., Bailey-Wilson, J.E., Silverberg, M.S., Duerr, R.H., Cho, J.H., Gregersen, P.K., Wu, Y., Achkar, J.P., Dassopoulos, T., Mezey, E., Bayless, T.M., Nouvet, F.J., Brant, S.R., 2004. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum. Mol. Genet.* 13, 35–45.
- Koc, A., Batar, B., Celik, O., Onaran, I., Tasan, E., Sultuybek, G.K., 2014. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. *Immunobiology* 219, 531–536.

- Kurylowicz, A., Hiromatsu, Y., Jurecka-Lubieniecka, B., Kula, D., Kowalska, M., Ichimura, M., Koga, H., Kaku, H., Bar-Andziak, E., Nauman, J., Jarzab, B., Ploski, R., Bednarczyk, T., 2007. Association of NFKB1 -94ins/del ATTG promoter polymorphism with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. *Genes Immun.* 8, 532–8.
- Lewander, A., Butchi, A.K.R., Gao, J., He, L.J., Lindblom, A., Arbmán, G., Carstensen, J., Zhang, Z.Y., Sun, X.F., 2007. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand. J. Gastroenterol.* 42, 1332–1338.
- Li, D., Wu, C., Cai, Y., Liu, B., 2017. Association of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility of gastric cancer. *Tumor Biol.* 39, 1–6.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023.
- López-Mejías, R., García-Bermúdez, M., González-Juanatey, C., Castañeda, S., Miranda-Filloy, J.A., Gómez-Vaquero, C., Fernández-Gutiérrez, B., Balsa, A., Pascual-Salcedo, D., Blanco, R., González-Álvaro, I., Llorca, J., Martín, J., González-Gay, M.A., 2012. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 224, 426–429. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.008>
- Mbulaiteye, S.M., Biggar, R.J., Goedert, J.J., Engels, E.A., 2003. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 32, 527–33.
- Nascimento, M.C., De Souza, V.A., Sumita, L.M., Freire, W., Munoz, F., Kim, J., Pannuti, C.S., Mayaud, P., 2007. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 715–720.
- Orozco, G., Sanchez, E., Collado, M.D., Lopez-Nevot, M.A., Paco, L., Garcia, A., Jimenez-Alonso, J., Martin, J., 2005. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 65, 183–186.
- Pfeffer, L.M., 2011. The Role of Nuclear Factor κ B in the Interferon Response. *J. Interf. Cytokine Res.* 31, 553–559.
- Sgarbanti, M., Arguello, M., TenOever, B.R., Battistini, A., Lin, R., Hiscott, J., 2004. A requirement for NF- κ B induction in the production of replication-competent HHV-8 virions. *Oncogene* 23, 5770–5780.
- Song, S., Chen, D., Lu, J., Liao, J., Luo, Y., Yang, Z., Fu, X., Fan, X., Wei, Y., Yang, L., Wang, L., Wang, J., 2011. NF κ B1 and NF κ BIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a southern Chinese population. *PLoS One* 6, 1–10.
- Stebbing, J., Gazzard, B., Bower, M., 2006. The Host Control of Lytic and Latent Infection with Human Herpesvirus-8. *J. Infect. Dis.* 193, 1051–1053.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Wang, X., Hao, X., Wang, H., Wang, M., Sun, F., Fan, X., Fan, T., 2016. Impact of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism and additional gene-gene interaction on liver cancer risk in Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol* 9, 12968–12975.

ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA DOS GENES NF-kB1/NF-kB2 COM A INFECÇÃO LATENTE/LÍTICA PELO HHV-8 EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM HIV/aids

Pesquisador: Juliana Prado Gonçalves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45156215.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.135.049

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo de associação, caso-controle, onde a frequência de variáveis genéticas, consideradas de risco ou proteção, são comparadas, nos grupos de pacientes em questão.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto tente identificar, com a análise de fatores de risco genéticos, as variáveis interferentes na manifestação de uma doença complexa e dependente de fatores genético do hospedeiro e do vírus infectante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram devidamente esclarecidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O grupo tem experiência e publicações prévias com a metodologia em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Aprovação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

From: **Medical Microbiology and Immunology (MMIM)** <em@editorialmanager.com>
Date: dom, 10 de fev de 2019 às 23:47
Subject: MMIM-D-19-00034 - Submission Confirmation
To: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho <rcoelholika@gmail.com>

Dear Dra Coêlho,

Thank you for submitting your manuscript, Evaluation of NFκB and TNF-α expression in CD19 + and CD3 + cells over HHV-8 life cycle in HIV-infected patients, to Medical Microbiology and Immunology.

The submission id is: MMIM-D-19-00034
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's website.

Your username is: rcoelholika
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/mmim/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Medical Microbiology and Immunology

ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

De: **Virus Research** <Evisupport@elsevier.com>

Data: domingo, 13 de janeiro de 2019

Assunto: Successfully received: submission Association of polymorphisms in NFκB1 promoter and NFκBIA gene with the HHV-8 replication cycles in HIV-infected individuals for Virus Research

Para: rcoelholika@gmail.com

This message was sent automatically.

Ref: VIRUS_2019_25

Title: Association of polymorphisms in NFκB1 promoter and NFκBIA gene with the HHV-8 replication cycles in HIV-infected individuals

Journal: Virus Research

Dear Professor Coêlho,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Virus Research
Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into

EVISE® at: http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=VIRUS and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Virus Research