



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

THAÍSA REGINA ROCHA LOPES

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, CCL2 E CXCL10 EM
INDIVÍDUOS COM SARCOMA DE KAPOSI RELACIONADO À AIDS**

Recife

2019

THAÍSA REGINA ROCHA LOPES

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, CCL2 E CXCL10 EM
INDIVÍDUOS COM SARCOMA DE KAPOSÍ RELACIONADO À AIDS**

Dissertação 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 Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

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

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L864a Lopes, Thaísa Regina Rocha.

Avaliação dos níveis séricos de IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos com sarcoma de Kaposi relacionado à aids / Thaísa Regina Rocha Lopes. – 2019.

73 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2019.

616.979 2

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-066)

THAÍSA REGINA ROCHA LOPES

**AValiação dos NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6, IL-10, CCL2 E CXCL10 EM
INDIVÍDUOS COM SARCOMA DE KAPOSÍ RELACIONADO À AIDS**

Dissertação 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 Mestre em Medicina Tropical.

Aprovada em: 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Viviane Martha Santos de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Tânia Regina Tozetto Mendoza
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me deixar perder a fé, por me manter firme mesmo nos momentos mais difíceis e por me conceder a concretização de mais um sonho.

Aos meus pais, Jailson e Lourdes, por todo apoio e atenção a mim dedicados. Por sempre acreditarem em meu potencial e nunca me deixarem fraquejar. Amo muito vocês!

As minhas irmãs, Luana e Isabela, por sempre estarem ao meu lado e por todos momentos de descontração durante a vida e esses dois anos de correria. Amo-as!

Ao meu noivo, José Valter Jr., por toda paciência, todo crescimento (pessoal e profissional) que nossa convivência me proporcionou, por me apoiar e acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava. Te amo, muito obrigada, de verdade!

As minhas filhas peludas, Paçoca e Linda, pelas cabeçadas e arranhões em forma de carinho.

A minha orientadora Dr^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho por toda paciência, boa vontade e dedicação.

A todos que fazem parte do laboratório de virologia do LIKA (Viviane, Luan, Dayvson, Yan, Luana e Gabriel) pelo bom convívio.

Em especial gostaria de agradecer as minhas amigas Juliana, Regina, Melayne e Marcella que aguentaram tanto sufoco e lamúrias nesses dois anos. Obrigada pela parceria de sempre, meninas!

Aos amigos, aqueles que me acompanham desde o início dessa jornada (Gabriela, Matheus, Pierre, Renan e Heitor) e aqueles que me conhecem bem antes dessa começar (Alana, Mariany, Suziany e Taisa) muito obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e pela paciência. Vocês são muito importantes para mim!

E principalmente, agradeço aos participantes do estudo, que de boa vontade contribuíram para a realização do trabalho.

Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos.
(CURIE, 1921)

RESUMO

O Herpesvírus humano tipo 8 (*Human gammaherpesvirus 8*, HHV-8) é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/aids. Sugere-se que o desenvolvimento do SK esteja associado com o desequilíbrio do sistema imune, como o aumento dos níveis séricos de citocinas envolvidas no processo inflamatório. O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em pessoas coinfectadas HIV/HHV-8 com SK e correlacioná-los com a contagem de linfócitos TCD4. O estudo foi composto por três grupos: indivíduos monoinfectados pelo HIV (n=31), coinfectados HIV/HHV-8 sem SK (n=77) e coinfectados HIV/HHV-8 com SK (n=38). Os participantes do estudo eram acompanhados no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, no Instituto de Infectologia Emílio Ribas e no Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As citocinas foram dosadas por citometria de fluxo. Os níveis séricos da IL-6 foram maiores no grupo com SK em comparação aos indivíduos monoinfectados pelo HIV ($p=0,0380$), assim como nos coinfectados HIV/HHV-8 sem SK ($p=0,0210$). De forma semelhante, os níveis da IL-10 foram maiores no grupo com SK em comparação com o grupo monoinfectados pelo HIV ($p=0,0403$), assim como nos coinfectados HIV/HHV-8 ($p<0,0001$). A CXCL10 apresentou níveis maiores no grupo HIV/HHV-8 (SK) em comparação ao grupo HIV ($p=0,0025$) e HIV/HHV-8 ($p=0,0001$). Os níveis da CCL2 não se mostraram diferentes entre os grupos. A contagem de linfócitos TCD4 foi significativamente menor nos indivíduos com SK em comparação com os demais grupos ($p<0,0001$). No grupo com SK foi observado um coeficiente de correlação igual a -0,4037 entre a contagem dos linfócitos TCD4 e a IL-6 ($p=0,0120$) e de -0,4558 entre TCD4 e CXCL10 ($p=0,0040$). O aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e CXCL10 no grupo com SK pode estar relacionado à sua atuação na manutenção do tumor através da angiogênese. Os níveis elevados da IL-10 em pacientes com SK provavelmente estão relacionados à supressão da resposta imune Th1, favorecendo assim a progressão do tumor.

Palavras-chave: HIV. Aids. Herpesvírus humano tipo 8. Sarcoma de Kaposi. Patogênese.

ABSTRACT

Human gammaherpesvirus type 8 (HHV-8) is the Kaposi's sarcoma (KS) etiologic agent, one of the most common cancers in people living with HIV/AIDS. It is suggested that the development of KS is associated with imbalance of the immune system, such as serum increase of cytokines involved in the inflammatory process. The aim of the present study was to evaluate the IL-6, IL-10, CCL2 and CXCL10 cytokines serum levels in HIV/HHV-8 coinfecting patients with KS and to correlate them with TCD4 lymphocyte counts. The study was composed of three groups: HIV monoinfected individuals (n = 31), HIV/HHV-8 coinfecting individuals without KS (n = 77) and one group of HIV/HHV-8 coinfecting with KS (n = 38). The study participants were being followed at the Reference Service for Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic of the University Hospital at the Federal University of Pernambuco, at the Institute of Infectology Emílio Ribas and at the Department of Infectious and Parasitic Diseases at University of São Paulo Medical School. Cytokines were measured by flow cytometry. IL-6 serum levels were higher in the HIV/HHV-8 (KS) group compared to the HIV monoinfected ($p = 0.0380$) and HIV/HHV-8 coinfecting without KS ($p = 0.0210$) groups. Similarly, IL-10 levels were higher in the KS group compared to the HIV ($p = 0.0403$) and HIV/HHV-8 ($p < 0.0001$) groups. The CXCL10 had higher levels in the HIV/HHV-8 (KS) group compared to the HIV ($p = 0.0025$) and HIV/HHV-8 ($p = 0.0001$) individuals. The CCL2 levels were not different among the groups. TCD4 lymphocyte levels were significantly lower in the HIV/HHV-8 group (KS) compared to the other groups ($p < 0.0001$). In the HIV/HHV-8 (KS) group a correlation coefficient of -0.4037 was found between TCD4 and IL-6 lymphocyte count ($p = 0.0120$) and -0.4558 between TCD4 and CXCL10 ($p = 0.0040$). Increased levels of IL-6 and CXCL10 proinflammatory cytokines in the KS group may be related to their performance in tumor maintenance through angiogenesis. Elevated levels of IL-10 in patients with KS are probably related to the suppression of the Th1 immune response, favoring tumor progression.

Keywords: HIV. Aids. Human gammaherpesvirus type 8. Kaposi's sarcoma. Pathogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Estrutura molecular do HHV-8.....	15
Figura 2-	Genoma do HHV-8.....	16
Figura 3-	Liberação do genoma do HHV-8 no núcleo da célula hospedeira.....	17
Figura 4-	Número de casos do sarcoma de Kaposi clássico, prevalência e subtipos do HHV-8 na América do Sul.....	20
Figura 5-	Células fusiformes do sarcoma de Kaposi.....	24
Figura 6-	Lesões do sarcoma de Kaposi clássico.....	24
Figura 7-	Nódulos infiltrados na mão e braço de paciente com o sarcoma de Kaposi endêmico.....	25
Figura 8-	<i>Patch</i> irregulares na ponta do nariz e coxa de pacientes com sarcoma de Kaposi relacionado à aids.....	26
Tabela 1-	Proteínas acessórias do HHV-8 e suas funções.....	19

Artigo

Figura 1-	Concentrações séricas da IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos infectados pelo HIV, coinfectados HIV/HHV-8 com e sem sarcoma de Kaposi.....	41
Tabela 1-	Distribuição dos participantes do estudo de acordo com a média de idade e frequência dos sexos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aids	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> , síndrome da imunodeficiência adquirida
CCL	<i>C-C motif ligand</i>
CV	Carga viral
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DNA_v	DNA viral
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HHV-8	<i>Human gammaherpesvirus 8</i> , Herpesvirus humano tipo 8
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> , Vírus da imunodeficiência humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IF	Imunofluorescência
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMT	Instituto de Medicina Tropical
LANA	<i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i> , antígeno nuclear associado à latência
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
NFκB	<i>Factor nuclear kappa B</i> , fator nuclear kappa B
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , matriz de leitura
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , célula mononuclear do sangue periférico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/AIDS

qPCR	<i>Quantitative PCR</i> , PCR quantitativa
SK	Sarcoma de Kaposi
SK-aids	Sarcoma de Kaposi relacionado à aids
TARV	Terapia antirretroviral
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i> , fator de necrose tumoral- α
TR	<i>Terminal repeat</i> , sequência de repetição terminal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo
vCyclin	<i>Viral cyclin</i> , Ciclina viral
vFLIP	<i>viral FLICE inhibitory protein</i> , proteína viral inibitória de FLICE
vIRF	<i>Viral Interferon regulatory fator</i> , fator regulador do interferon de origem viral
vGPCR	<i>Viral G protein-coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteína G de origem viral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Características moleculares e replicação do HHV-8.....	15
2.2	Histórico e epidemiologia do HHV-8.....	20
2.3	Transmissão do HHV-8.....	21
2.4	Diagnóstico do HHV-8 e do sarcoma de Kaposi.....	22
2.5	Sarcoma de Kaposi.....	23
2.5.1	Patogênese do Sarcoma de Kaposi.....	26
2.6	Sarcoma de Kaposi relacionado à aids.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Desenho e população do estudo.....	32
4.1.1	Critérios de inclusão.....	32
4.1.2	Critérios de exclusão.....	32
4.2	Locais do estudo.....	32
4.3	Definição e categorização das variáveis.....	33
4.3.1	Variáveis dependentes.....	33
4.3.2	Variáveis independentes.....	33
4.4	Coleta de dados.....	34
4.5	Armazenamento das amostras.....	34
4.6	Dosagem das citocinas.....	34
4.7	Análise estatística.....	35
4.8	Aspectos éticos.....	35
5	RESULTADOS.....	36
6	CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	APÊNDICE A - EVALUATION OF IL-6, IL-10, CCL2 AND CXCL10 CYTOKINES SERUM LEVELS IN INDIVIDUALS WITH AIDS- ASSOCIATED KAPOSI'S SARCOMA.....	59

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.....	72
ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.....	73

1 INTRODUÇÃO

O sarcoma de Kaposi (SK) é um distúrbio angioproliferativo do endotélio vascular que foi descrito pela primeira vez em 1872 por Moritz Kaposi como “sarcoma pigmentado múltiplo idiopático da pele” (BRAUN, 1982; GANEM, 2006; FATAHZADEH, 2012). São descritas quatro variantes do SK: clássico, endêmico, iatrogênico e epidêmico relacionado à síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immune deficiency syndrome, aids*) (SK-aids) (ANTMAN; CHANG, 2000). O Herpesvírus humano tipo 8 (*Human gammaherpesvirus 8, HHV-8*), também conhecido como herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi, foi identificado pela primeira vez em 1994, e é o agente etiológico de todas as formas do SK (CHANG et al., 1994).

O SK-aids é a variante clínica mais agressiva e disseminada, acometendo pulmões e trato gastrointestinal, causando desde insuficiência respiratória à sangramento do sistema digestivo (GANEM, 2006; FATAHZADEH, 2012). A causa do curso clínico mais grave deste tipo de SK ainda é desconhecida, no entanto, outros fatores além da imunodeficiência relacionada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus, HIV*) podem estar envolvidos (ENSOLI et al., 2001). Em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) foi observado que citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) -1, fator de necrose tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α*) e interferon (IFN) - γ , já relacionadas à patogênese do HIV, induzem também a diferenciação de células endoteliais em células fusiformes do SK, as células específicas do tumor (LANE; FAUCI, 1985; BROWNING et al., 1994).

O processo inflamatório envolvido na infecção pelo HHV-8 também tem sido apontado como um importante fator no desenvolvimento do SK (WANG et al., 2004; DOUGLAS et al., 2010). Níveis elevados de citocinas inflamatórias podem estar associados ao desenvolvimento do SK, principalmente devido a sua função angiogênica, necessária ao crescimento e manutenção do tumor (ENSOLI; STÜRZL; MONINI, 2000; JENSEN; LIRA, 2004; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010).

Assim como a resposta inflamatória, o HHV-8 também codifica proteínas com atividade pró-inflamatória e angiogênica, a exemplo da CCL (*C-C motif ligand*) -1 viral (CCL1v), CCL2v, CCL3v e a IL-6 viral (IL-6v), as quais foram implicadas no desenvolvimento e manutenção do tumor (NICHOLAS, 2005). O receptor acoplado à proteína G de origem viral (*viral G protein-coupled receptor, vGPCR*) também é capaz de induzir a

secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-2 e IL-4 (SCHWARZ; MURPHY, 2001).

Em estudo realizado com sobrenadante de cultura de monócitos THP-1 infectados pelo HHV-8 foi relatada uma elevada expressão da CXCL10 (WEST; DAMANIA, 2008) e em lesões do SK foi observada a secreção de CCL2 (SCIACCA et al., 1994). Estudo *in vitro* realizado por Miles et al. (1990) mostrou que a IL-6 favorece o crescimento das células do SK. Em relação à IL-10, Machado et al. (2014) mostraram níveis elevados em pacientes com a forma disseminada do SK em relação àqueles com a forma localizada.

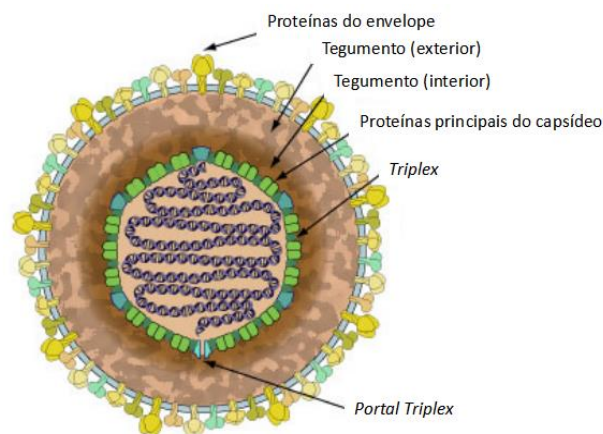
Considerando que o SK-aids é um dos cânceres mais comuns encontrados em PVHA mesmo após o advento da terapia antirretroviral (TARV) (PORTSMOUTH et al., 2003; TORRE et al., 2015). E que a maioria dos achados relacionando citocinas inflamatórias ao desenvolvimento do SK, foram realizados *in vitro*, o presente trabalho objetivou quantificar e avaliar os níveis da IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em soro de pacientes com SK-aids, correlacionando-os à contagem de linfócitos TCD4.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Característica moleculares e replicação do HHV-8

O HHV-8, atualmente denominado *Human gammaherpesvirus 8*, pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus* (ICTV, 2016). A partícula viral se assemelha aos demais herpesvírus, é envelopada, possui capsídeo de simetria icosaédrica e entre o capsídeo e o envelope há uma camada amorfa, mas extremamente organizada de proteínas, chamada tegumento (Figura 1) (DAMANIA; CESARMAN, 2013).

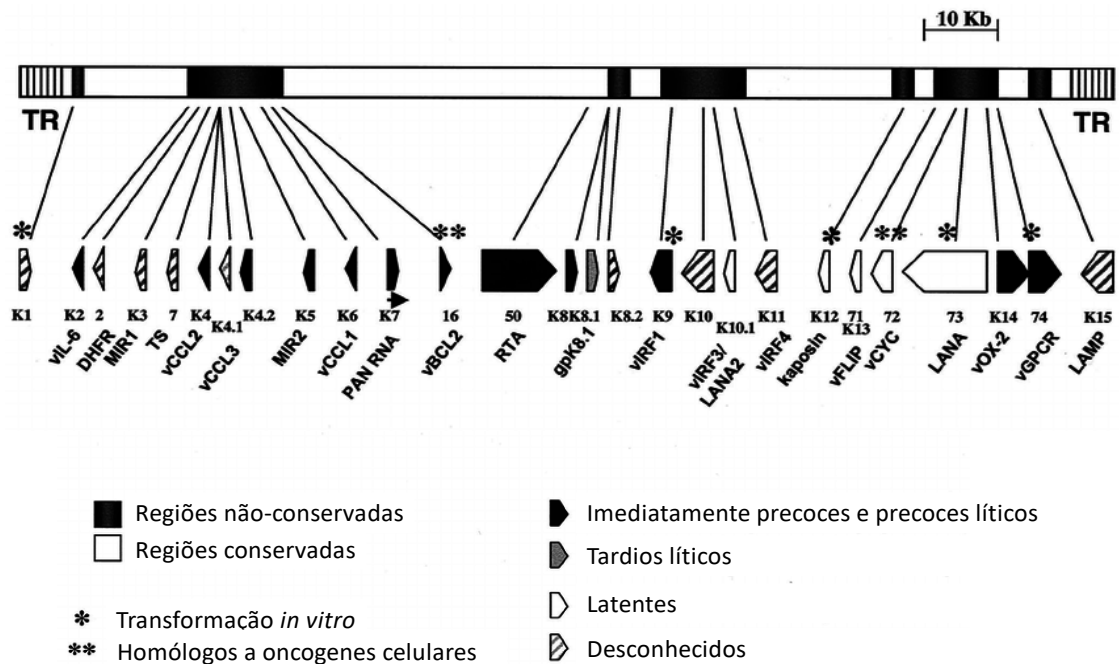
Figura 1 - Estrutura molecular do HHV-8



Fonte: Adaptado de ViralZone (2017)

O genoma do HHV-8 é formado por uma molécula de DNA linear fita dupla (DNA viral, DNA_v) com 165 a 170 kb e extremidades flanqueadas por sequências de repetições terminais (*Terminal Repeat*, TR) (RUSSO et al., 1996; WEN; DAMANIA, 2010). O tamanho de TR pode variar de 16 a 75 kb entre os isolados do HHV-8, o que explica a variação no tamanho do genoma entre os isolados do vírus (DUPREZ et al., 2007; WEN; DAMANIA, 2010). As matrizes de leitura aberta (*Open Reading Frame*, ORF) são numeradas de 1 a 75. Algumas ORFs não são conservadas em outros herpesvírus e assim recebem a denominação de “K”- ORF e vão de K1 a K15 (Figura 2) (DAMANIA; CESARMAN, 2013).

Figura 2 - Genoma do HHV-8



Fonte: Adaptado de Ablashi (2002)

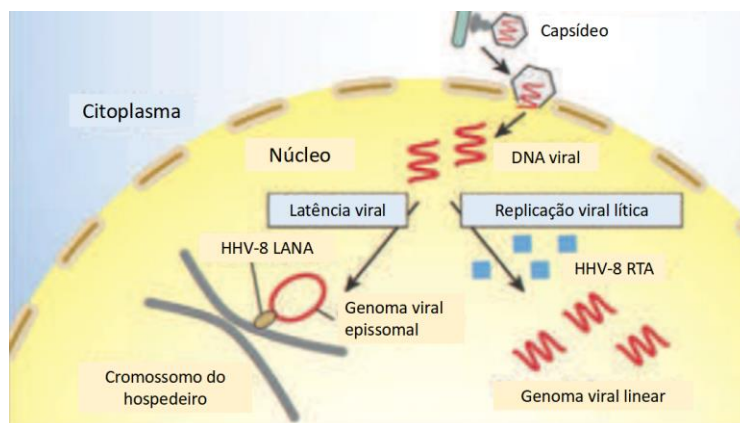
Onze ORFs do HHV-8 codificam proteínas homólogas às proteínas celulares e que são relacionadas à transdução de sinal, regulação do ciclo celular e inibição da apoptose (RUSSO et al., 1996). Por exemplo, o gene K9, o fator regulador do interferon de origem viral (*Viral Interferon regulatory fator*, vIRF) (ZIMRING; GOODBOURN; OFFERMANN, 1998), ORF-74, o vGPCR (BAIS et al., 1998), ORF-K1 (LEE et al., 1998) e a ORF-K12 (kaposina) (MURALIDHAR et al., 2000) possuem a capacidade de transformar células de roedores e causar tumores em modelos animais. Além desses, o HHV-8 também codifica interleucinas e quimiocinas homólogas às celulares, como as IL-6v, CCL1v, CCL2v e CCL3v (WEBER et al., 2001).

O HHV-8 possui diversas glicoproteínas na superfície do envelope viral, entretanto apenas as glicoproteínas gB, gH e gL são necessárias para a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (DAMANIA; CESARMAN, 2013). A adsorção viral ocorre através da interação da gB com os receptores celulares sulfato de heparano, DC-SIGN e integrinas (AKULA et al., 2001; VEETTIL et al., 2008; DAMANIA; CESARMAN, 2013).

Após a ligação ao receptor celular, o vírus é então endocitado, o nucleocapsídeo tegumentado é liberado no citoplasma, desnudo e o DNAv entra no núcleo da célula (CHAKRABORTY; VEETTIL; CHANDRA, 2012). A partir da entrada do DNAv no núcleo,

o vírus pode seguir o ciclo latente ou lítico, embora o padrão pareça ser o estado de latência (Figura 3) (DAMANIA; CESARMAN, 2013).

Figura 3 - Liberação do genoma do HHV-8 no núcleo da célula hospedeira



Fonte: Adaptado de Damania, Cesarman (2013)

A figura mostra a liberação do DNA viral no núcleo da célula hospedeira. No núcleo, o genoma viral pode seguir para a latência, com auxílio da proteína LANA, e permanecer em formato epissomal, ou seguir para o ciclo lítico, com o auxílio da proteína RTA e resultar na formação de novas partículas virais.

Na latência, o genoma viral permanece na forma circular (epissomal) e é mantido com moderada replicação. Nesse momento, o promotor do antígeno nuclear associado à latência (*Latency-associated nuclear antigen*, LANA) induz principalmente a transcrição dos genes LANA (ORF73), ciclina viral (*viral Cyclin*, vCyclin) (ORF72) e proteína viral inibitória de FLICE (*viral FLICE inhibitory protein*, vFLIP) (ORF71), e do *locus* kaposina, todos relacionados à fase de latência do vírus (DAMANIA; CESARMAN, 2013).

O HHV-8 estabelece um longo período de latência nas células infectadas com reativação periódica ou reinfecção (CHAKRABORTY; VEETIL; CHANDRA, 2012). *In vitro*, o HHV-8 infecta diversas linhagens celulares humanas aderentes, como células epiteliais, fibroblastos e queratinócitos e *in vivo* já foi observado seu tropismo por linfócitos B, células endoteliais, monócitos, queratinócitos e células epiteliais (GANEM, 2007). Evidências indicam que os linfócitos B e monócitos são os principais reservatórios da infecção latente *in vivo* (CHAKRABORTY; VEETIL; CHANDRA, 2012).

Quando reativado, o HHV-8 entra em ciclo lítico e inicia a produção da progênie viral infecciosa. Embora a proteína viral RTA, codificada pela ORF50, induza ao ciclo lítico, a conclusão desse se dá com o auxílio de proteínas celulares (KUANG et al., 2008). No ciclo lítico, os genes virais são transcritos em momentos diferentes, sendo agrupados em

imediatamente precoces, precoces e tardios. De maneira geral, os genes precoces codificam proteínas associadas à regulação da replicação do vírus e os genes tardios codificam proteínas estruturais, que são as proteínas do capsídeo e envelope viral (STRAUS, 1990; COLIMON; MICHELSON, 1990).

Seguida da expressão de genes virais precoces, ocorre a replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral (CHAKRABORTY et al., 2012). No núcleo, a nova fita de DNA é incorporada ao capsídeo pré-formado e o conjunto é transportado para o citoplasma mediante a aquisição temporária do envelope primário oriundo da membrana nuclear. Adiante, com a expressão de genes virais tardios, ocorre a aquisição das proteínas do tegumento e do envelope viral final a partir do complexo de Golgi. Ao final do ciclo, o vírus sai da célula, acarretando a lise celular (AKULA et al., 2001). A distribuição de algumas das proteínas acessórias do HHV-8 de acordo com o ciclo replicativo e suas funções está descrita resumidamente na tabela 1.

Tabela 1- Proteínas acessórias do HHV-8 e suas funções

Proteína	Tipo de expressão	Alvo	Atividade	Referência
LANA	Latente	p53, Angiogenina, annexin A2	Sobrevivência celular	Friberg et al. (1999), Paudel et al. (2012)
		pRb	Mitogênica	Radkov et al. (2000)
vFLIP	Latente	IKK α/β	Ativação do NF κ B	Matta et al. (2007)
		Procaspase-8	Inibição da ativação da Caspase	Belanger et al. (2001)
Kaposina A	Latente	Citosina-1, Septina 4 variante	Transdução de sinal mediada por GTPase, ativação de várias quinases de sinalização; Sobrevivência celular	Kliche et al. (2001), Lin et al. (2007)
Kaposina B	Latente	Quinase MK2	Ativação do MK2, mitogênica	McCormick; Ganem (2005)
IL-6v	Lítico e latente	gpl30/gp80	Ativação da via STAT/MAPK, sobrevivência celular	Chow et al. (2001), Boulanger et al. (2004)
CCL1v	Lítico	CCR8	Agonista, polarização para resposta Th2, sobrevivência celular	Dairaghi et al. (1999), Choi and Nicholas (2008)
CCL2v	Lítico	CCR3, CCR8, CCR5	Agonista, polarização para resposta Th2, sobrevivência celular	Choi; Nicholas (2008), Nakano et al. (2003)
CCL3v	Lítico	CCR4, XCR1	Agonista, polarização para resposta Th2	Stine et al. (2000), Luttichau et al. (2007)
vGPCR	Lítico	Proteína SHP2, G α (i, q, 12/13)	Ativação de vias de sobrevivência e divisão celular, replicação viral	Couty et al. (2001), Liu et al. (2004), Philpott et al. (2011),
vIRF-1	Lítico	p53, ATM, p300-CBP, IRF1, IRF3	Sobrevivência celular, inibição da sinalização por IFN	Li et al. (2000), Nakamura et al.(2001), Seo et al. (2005), Choi et al. (2012)
vIRF-2	Lítico	PKR, IRF1, IRF2, p65, p300	Inibição da sinalização por IFN	Burysek; Pitha (2001)
vIRF-3	Latente	p53, IRF3, IRF5, IRF7, HIF-1 α , Foxo3a	Inibição da sinalização por IFN, sobrevivência celular	Muñoz-Fontela et al. (2007), Rivas et al. (2001),
K1	Lítico e latente	Quinases Src, PI3K, SHP2, PLC γ	Sobrevivência celular	Lee et al. (2005)
K15	Lítico e latente	Quinases Src, TRAFs, HAX-1	Sobrevivência celular	Brinkmann et al. (2003), Sharp et al. (2002), Pietrek et al. (2010)

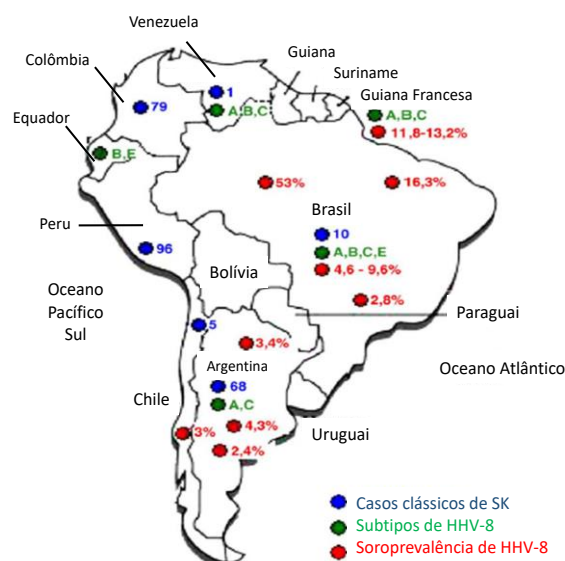
2.2 Histórico e epidemiologia do HHV-8

O HHV-8 foi descrito pela primeira vez em 1994 e a partir de então associado a todas as formas do SK, além de também ser o agente etiológico da doença multicêntrica de Castleman, do linfoma de efusão primário e da síndrome de citocinas inflamatórias (CESARMAN et al., 1995; SOULIER et al., 1995; ULDRICK et al., 2010). Diferente dos demais herpesvírus, o HHV-8 não possui distribuição uniforme ao redor do mundo e sua prevalência varia dependendo da região geográfica (HULANIUK et al., 2017).

A África Subsaariana possui uma alta prevalência para o HHV-8, a exemplo de Uganda, que possui uma prevalência de 50% na população geral (BIRYAHWAHO et al., 2010; BUTLER et al., 2011). Em países do mediterrâneo e em alguns países da América do Sul, a prevalência é intermediária, variando de 3 a 20% (MARIGGIÒ; KOCH; SCHULZ, 2017). Nos Estados Unidos da América, a prevalência reportada é de até 6% (ENGELS et al., 2007) e números semelhantes a esse também foram encontrados no norte da Europa e Ásia (MOORE, 2000).

Na América do Sul, estudo realizado por Mohanna et al. (2005) mostrou uma variação na taxa de anticorpos contra o HHV-8, de 2,8 a 16,3%, na população geral, enquanto que elevadas taxas (53%) foram identificadas especificamente em ameríndios do Brasil e Equador. A figura 4 traz a distribuição da prevalência encontrada para o HHV-8 em países da América do Sul, além de casos de SK clássico e distribuição dos genótipos virais.

Figura 4 - Número de casos do sarcoma de Kaposi clássico, prevalência e subtipos do HHV-8 na América do Sul



Fonte: Adaptado de Mohanna et al. (2005)

No Brasil, estudo realizado por Zago et al. (2000) nas cidades de Vitória (ES) e São Paulo (SP) encontrou uma frequência de anticorpos contra HHV-8 de 4,6% (34/747) em doadores de sangue e de 3,7% (5/136) em indivíduos HIV negativos. Em estudo realizado por Nascimento et al. (2008) nas cidades de São Paulo (SP), Salvador (BA) e Manaus (AM) foi encontrada uma prevalência de 25,1% (878/3.493) em doadores de sangue.

O HHV-8 possui seis grandes subtipos moleculares baseados no gene K1, A, B, C, D, E e N que podem influenciar na prevalência do vírus (MOHANNA et al., 2005). O subtipo C, por exemplo, predomina no continente asiático, enquanto o subtipo E foi reportado em populações ameríndias da Amazônia brasileira e equatoriana e o subtipo N foi identificado apenas na África do Sul (HAYWARD, 1999; ALAGIOZOGLOU; SITAS; MORRIS, 2000; BIGGAR et al., 2000). Além disso, as diferenças étnicas também podem influenciar a prevalência do HHV-8, a exemplo da alta prevalência de HHV-8 na população Uighur, região de Xinjiang, China (FU et al., 2009), em populações de origem judaica (DAVIDOVICI et al., 2001) e em ameríndios do Brasil (BIGGAR et al., 2000; MOHANNA et al., 2005). Em regiões não endêmicas, a infecção pelo HHV-8 acomete principalmente homens que fazem sexo com homens (HSH) e imigrantes africanos (REGAMEY et al., 1998; O'BRIEN et al., 1999; DUKERS et al., 2000; TEJADA et al., 2011).

2.3 Transmissão do HHV-8

As vias de transmissão do HHV-8 ainda não estão completamente elucidadas (ROHNER et al., 2014). Formas de transmissão sexual e não-sexual foram sugeridas, mas essas variam a depender da endemicidade local (MBULAITEYE; GOEDERT, 2008). Em áreas não endêmicas, por exemplo, a transmissão por via sexual desempenha um importante papel na disseminação do vírus, principalmente entre HSH (MINHAS; WOOD, 2014). Nesse grupo, a prevalência do HHV-8 pode variar de 25 a 60% e o risco de adquirir a infecção está diretamente relacionado com o número de parceiros sexuais (KEDES et al., 1996; DUKERS et al., 2000). Entretanto, nas áreas endêmicas, como na África Subsaariana, há uma elevada prevalência (>50%) do HHV-8 entre os usuários de droga injetável e receptores de transfusão de sangue e/ou hemoderivados. Dessa forma, nesses locais, as transfusões de sangue são consideradas risco substancial na transmissão viral (LEVI et al., 2011).

O HHV-8 já foi detectado em células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), saliva, mucosa orofaríngea, sêmen, secreções cervico-vaginais e glândulas prostáticas, o que pode sugerir rotas de transmissão vertical e horizontal

(MANTINA et al., 2001; CHEN; HUDNALL, 2006). Precisamente sobre a saliva, foi detectada uma elevada carga viral do HHV-8 em indivíduos infectados (PAUK et al., 2000), sugerindo que a saliva poderia ser um meio de transmissão compatível com as vias sexual e não-sexual (MINHAS; WOOD, 2014). A transmissão parenteral através de transfusão sanguínea já foi relatada e pode ocorrer de forma rara em áreas não endêmicas (DAMANIA; CESARMAN, 2013).

2.4 Diagnóstico do HHV-8 e do sarcoma de Kaposi

Apesar da descoberta do HHV-8 em 1994, ainda não existe um teste padrão ouro para o diagnóstico da infecção. No entanto, o estabelecimento de uma linhagem celular infectada pelo HHV-8 em 1996 possibilitou o desenvolvimento de diversos testes sorológicos e moleculares para detecção da infecção (CHANG et al., 1994; RENNE et al., 1996; MOHANNA et al., 2005).

Para o diagnóstico da infecção são utilizados testes sorológicos e moleculares. Os testes sorológicos incluem o ensaio de imunofluorescência (IF), *immunoblot* e ensaios imunoenzimáticos. A IF pode identificar tanto anticorpos contra proteínas do ciclo lítico quanto do ciclo latente, a exemplo da detecção de anticorpos contra o LANA, que é bastante específica, apesar de laboriosa (SPIRA et al., 2000; SOUZA et al., 2007). O *immunoblot* e ensaios imunoenzimáticos são capazes de detectar uma variedade de proteínas virais, esse último utilizando desde de lisado viral a peptídeos sintéticos conjugados, ou não, a proteínas virais (GAO et al., 1996; SCHATZ et al., 1997; CHATLYNNE, et al., 1998; DAVIS et al., 1997; PAU et al., 1998). Apesar da importância do uso de testes sorológicos, uma atenção especial deve ser voltada para SK-AIDS, pois devido à possibilidade de imunodeficiência grave, a detecção de anticorpos contra o antígeno LANA pode não ser possível (SOUZA et al., 2007).

Em relação aos testes moleculares, a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*, PCR) e PCR quantitativa (*Quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) têm sido utilizadas para o diagnóstico em diversos tecidos e fluidos corporais, como PBMCs, saliva, secreções nasais e sêmen (HUMPHREY et al., 1996; BOLDOGH et al., 1996; HOWARD et al., 1997; BLACKBOURN et al., 1998). A qPCR apresenta boa sensibilidade com limite de detecção de oito cópias de DNA_v (QU; JENKINS; TRIULZI, 2010). Além disso, diferente dos testes sorológicos, os testes moleculares não sofrem interferência

decorrente dos níveis de linfócitos TCD4 (HUDNALL et al., 1998; FARGE et al., 1999; MAGRI et al., 2009).

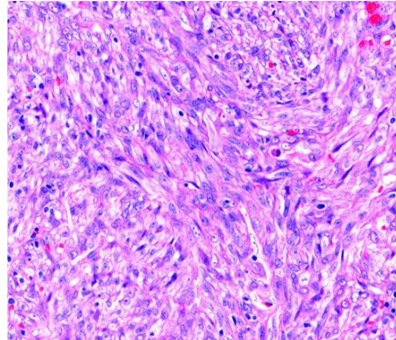
Em indivíduos com SK, é realizado o diagnóstico clínico seguido da confirmação laboratorial. O primeiro se baseia na identificação das lesões, com cores que variam de rosa a vermelho-arroxeadado e que se assemelham a acometimentos vasculares, enquanto que a confirmação do diagnóstico é dada através de exame histopatológico (HENGGE et al., 2002; MOHANNA et al., 2007). A imunohistoquímica é bastante utilizada no diagnóstico do SK através do uso de anticorpos contra o antígeno LANA. Além dela, o HHV-8 pode ser identificado em biópsias do SK através da PCR (HAMMOCK et al., 2005).

2.5 Sarcoma de Kaposi

O SK é um distúrbio angioproliferativo multifocal do endotélio vascular que afeta principalmente tecidos mucocutâneos, possuindo a capacidade de comprometimento de outros órgãos (GANEM, 2006; FATAHZADEH, 2012). As lesões do SK se apresentam nos estágios de *patch*, placa e nódulo (tumor), podendo o mesmo paciente apresentar simultaneamente os diferentes tipos de lesões, as planas (*patch* ou placa) ocupando uma área extensa e lesões elevadas (nódulo ou tumor) com acometimento mais localizado (EL AMARI et al., 2008).

O *patch* é a lesão inicial do SK e se caracteriza por lesões planas com abundante infiltrado inflamatório e intensa angiogênese, o que as torna vermelhas a olho nu (GANEM, 2010). Diferente da maior parte dos cânceres, a neovascularização no SK se inicia antes do estabelecimento do tumor (HANAHAHAN; FOLKMAN, 1996). Nesse tipo de lesão já há presença das células fusiformes do SK (Figura 5) e com o tempo a lesão do tipo *patch* progride para a fase de placa e se torna mais rígida, edematosa e de cor violácea (GANEM, 2010). Com a proliferação das células do SK, as lesões progridem para o estágio nodular e a lesão frequentemente apresenta edema e enrijecimento local significativo, com massas visíveis repletas de células do SK e presença de macrófagos carregados de hemossiderina em decorrência da hemorragia vascular (COCKERELL, 1991).

Figura 5 - Células fusiformes do sarcoma de Kaposi



Fonte: Douglas et al. (2010)

Na imagem é possível observar a predominante presença das células em formato fusiforme presente em lesão nodular do sarcoma de Kaposi.

Como citado anteriormente, quatro formas de SK foram descritas: clássico, endêmico, iatrogênico e epidêmico relacionado à aids (ANTMAN; CHANG, 2000). O SK clássico foi identificado pela primeira vez por Moritz Kaposi (1872) e é caracterizado por lesões benignas roxas ou azuis avermelhadas que inicialmente aparecem nas mãos e nos pés e progridem para os braços e pernas ao longo de um período de anos ou décadas, raramente progredindo de forma agressiva (Figura 6) (ANTMAN; CHANG, 2000; GIFFIN; DAMANIA, 2014). Apesar dessa forma ser descrita principalmente no leste europeu e na bacia do Mediterrâneo, alguns casos foram descritos em outras regiões geográficas, como em povos indígenas do Peru e em outros países da América do Sul (ANTMAN; CHANG, 2000; MOHANNA et al., 2007).

Figura 6 – Lesões do sarcoma de Kaposi clássico



Fonte: Antman; Chang, (2000)

A forma endêmica do SK ocorre nos países do leste e centro da África (STEIN et al., 1994) e antes da pandemia da aids essa forma correspondia a 10% dos cânceres no continente. A taxa de incidência da forma endêmica do SK tende a aumentar com a idade, mas diferente

do SK clássico, em que a média de idade é de 70 anos, os picos ocorrem entre 35 e 39 anos em homens e 25 e 39 anos em mulheres (ISCOVICH et al., 2000).

O curso clínico do SK endêmico é variável, podendo apresentar lesões de pele indolores, lesões locais infiltrativas nas extremidades do corpo e envolvimento visceral agressivo com sequelas potencialmente fatais (ISCOVICH et al., 2000; MOHANNA et al., 2007). Quatro variantes do SK endêmico são descritas: nodular, florida, infiltrativa e linfadenopática (TSCHACHLER, 2008).

A forma linfadenopática é encontrada quase que exclusivamente em crianças e causa mortalidade significativa (DUTZ; STOUT, 1960). Na África oriental e meridional, o sarcoma de Kaposi constitui 25 a 50% dos sarcomas de partes moles em crianças e 2 a 10% de todos os cânceres em crianças (ANTMAN; CHANG, 2000). Na figura 7 é possível observar a presença de nódulos infiltrados acastanhados no antebraço e mão direita de um paciente com a forma endêmica do SK.

Figura 7 – Nódulos infiltrados na mão e braço de paciente com o sarcoma de Kaposi endêmico



Fonte: Travassos et al. (2010)

O SK iatrogênico ou SK associado ao transplante está associado a imunossupressão ocasionada pelo uso de terapia supressiva para a prevenção da rejeição de órgãos (ANDREONI et al., 2001). Um dos primeiros casos de SK iatrogênico foi descrito por Myers et al. (1974) e posteriormente outros casos foram relatados. Interessantemente, esse tipo de SK ocorre de forma mais frequente em indivíduos infectados com HHV-8 e receptores de

órgãos negativos para HHV-8, em vez de receptores negativos para o HHV-8 que recebem um órgão de um doador positivo (BAROZZI et al., 2003). Além disso, a ocorrência dessa forma do SK acomete principalmente homens, na proporção de três homens para uma mulher (ANTMAN; CHANG, 2000). Esse tipo de SK tende a ter um curso clínico grave, comprometendo linfonodos, mucosa e órgãos viscerais em cerca de metade dos pacientes e algumas vezes não ocorre manifestação cutânea (WANG et al., 1998; ANTMAN; CHANG, 2000)

O SK-aids ocorre em indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 e além do envolvimento dérmico generalizado e muitas vezes desfigurante, ocorre frequentemente comprometimento de locais extracutâneos (MITSUYASU, 1988; GANEM, 2006). O SK-aids frequentemente afeta tecidos mucocutâneos, formando lesões multifocais com predileção pela face e extremidades inferiores (Figura 8) (FATAHZADEH, 2012). Nessa forma clínica, há um extenso edema local, hemorragia e enrijecimento da pele. As complicações mais graves de comprometimento visceral são o sangramento gastrointestinal, dor abdominal e insuficiência respiratória (ANTMAN; CHANG, 2000).

Figura 8 - *Patch* irregulares na ponta do nariz e coxa de pacientes com sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS



Fonte: Fatahzadeh (2012)

2.5.1 Patogênese do sarcoma de Kaposi

As lesões do SK são formadas pelas células fusiformes do SK, também chamadas de células do SK (MESRI; CESARMAN; BOSHOF, 2010). As células do SK apresentam marcadores de diversas linhagens celulares, incluindo linhagem endotelial, monocítica e do músculo liso, sugerindo que essas células não formam uma população uniforme e também dificultando a determinação de sua origem (GANEM, 2010). Apesar disso, acredita-se que um progenitor hematopoiético, da linhagem endotelial ou mesenquimal, ao ser infectado pelo

HHV-8, possa originar as células fusiformes da lesão (TADDEO et al., 2008). Essa hipótese adquiriu mais força quando Pyakurel et al. (2006) identificaram a presença de células progenitoras endoteliais não infectadas pelo HHV-8 em amostras do SK, sugerindo um recrutamento dessas células ao sítio de infecção.

Após a infecção da célula alvo, proteínas do ciclo lítico e latente do HHV-8 podem alterar o ciclo celular e predispor o desenvolvimento do SK. As proteínas de latência podem promover a divisão e sobrevivência celular através da inativação da p53 e da proteína do retinoblastoma (pRb) pelo LANA (RADKOV; KELLAM; BOSHOF, 2000), da neutralização da cinase dependente de ciclina p21 e p27 pela vCyclin (SWANTON et al., 1997) e pela ativação do fator nuclear kappa B (*Factor nuclear kappa B*, NFκB) e regulação positiva do gene antiapoptótico BCL2 pela vFLIP (GUASPARRI; KELLER; CESARMAN, 2004). No ciclo lítico, a proteína K1 pode inibir a apoptose mediada pelo FAS, bloqueando a ativação da caspase 8 (WANG et al., 2007), enquanto que as proteínas vIRF-1 (MA et al., 2013), RTA (GWACK et al., 2001), K7 (WANG et al., 2002), K8 (PARK et al., 2000) e vBCL2 (SARID et al., 1997) interagem diretamente com a p53 inibindo a apoptose celular. Hipotetiza-se que a ação anti-apoptótica das proteínas líticas pode ter função apenas de aumentar a produção da progênie viral, enquanto que a ação anti-apoptótica na latência teria por objetivo a manutenção da infecção (DOUGLAS et al., 2010).

Apesar das interações supracitadas, as infecções latentes ou líticas por si só não são capazes de levar ao desenvolvimento do SK (GANEM, 2010; MESRI; CESARMAN; BOSHOF, 2010). Estudos *in vitro* apontam a necessidade de estímulos presentes no microambiente tumoral para o crescimento do SK (MILES et al., 1990; FLORE et al., 1998) e estudo *in vivo* mostrou que na presença de citocinas inflamatórias, células do SK foram capazes de induzir lesões semelhantes às do SK em camundongos imunodeficientes (SALAHUDDIN et al., 1988).

A inflamação crônica associada à infecção pelo HHV-8 também pode desempenhar um importante papel na patogênese do tumor (WANG et al., 2004; DOUGLAS et al., 2010): proteínas virais com atividade pró-inflamatória e angiogênica, a exemplo da CCL1v, CCL2v, CCL3v e a vIL-6, já foram implicadas no desenvolvimento e manutenção do SK (NICHOLAS, 2005). A princípio essa inflamação é mediada por uma hiperativação da resposta Th2 acompanhada por uma diminuição da resposta Th1, sendo essa última a principal resposta no combate às infecções virais. Essa polarização da resposta Th2 está relacionada às viroquinas CCL1v, CCL2v e CCL3v, as quais podem se ligar aos receptores CCR8, CCR3 e CCR4 expressos na superfície de células Th2, ocasionando a quimiotaxia de

linfócitos Th2 para o local de infecção (WEBER et al., 2001). Além disso, a IL-6v pode se ligar ao receptor celular gp130 e ativar genes responsivos à IL-6, promovendo assim a sobrevivência de células B e contribuindo para o perfil Th2 (ABLASHI et al., 2002).

Em adição, a proteína vGPCR ativa o fator de transcrição NFκB, o qual está ligado à expressão de genes relacionados à inflamação crônica, prevenção da apoptose e indução da angiogênese (KARIN; GRETEN, 2005; ONO, 2008). Além disso, vGPCR é capaz de ocasionar a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-6; uma citocina pró-inflamatória com atividade pleiotrópica e que regula uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003). A síntese de outras citocinas inflamatórias, como IL-1β, TNFα, IL-2, IL-4, também pode ser estimulada pela vGPCR (SCHWARZ; MURPHY, 2001).

No que diz respeito à infecção pelo HHV-8, estudo realizado por Miles et al. (1990) mostrou que *in vitro* a IL-6 funciona como um fator de crescimento autócrino para as células do SK. Estudo em células HeLA transfectadas com o gene da proteína viral K15, expressa durante o ciclo lítico do HHV-8, observou que essa proteína estimula a secreção de IL-6 (BRINKMANN et al., 2007). Em estudo realizado em pacientes com a doença multicêntrica de Castleman, os níveis de IL-6 foram elevados e foram relacionados à gravidade da doença (OKSENHENDLER et al., 2000).

As citocinas inflamatórias produzidas nas lesões do SK também induzem a expressão de várias quimiocinas que medeiam o recrutamento de células para os tecidos, a exemplo da CCL2 (SIRIANNI et al., 1998). A secreção de CCL2 em lesões do SK já foi observada por Sciacca et al. (1994) em células e lesões do tumor. Em adição, experimento conduzido em sobrenadante de cultura de monócitos THP-1 infectados pelo HHV-8 observou elevada expressão da CXCL10. Após sua secreção, essa quimiocina pode interagir com vGPCR, codificado pelo HHV-8 e expresso em células endoteliais do SK, estimulando assim a migração de células endoteliais e o processo angioproliferativo (WEST; DAMANIA, 2008; COUTY et al., 2009).

Machado et al. (2014) mostraram níveis elevados de IL-10 em pacientes com a forma disseminada do SK em relação àqueles com a forma localizada. Os níveis elevados de IL-10 podem favorecer a progressão do SK ao reduzir a resposta do tipo Th1 (WEISS et al., 2004). Esse achado provavelmente está relacionado à atividade imunorreguladora da IL-10, que suprime a ação das células apresentadoras de antígenos, limitando a resposta imune mediada pela inflamação (MITTAL; ROCHE, 2015).

Diante dessas informações, duas hipóteses foram propostas para o desenvolvimento do SK, a oncogênese parácrina e a lítica abortiva (MESRI; CESARMAN; BOSHOF, 2010). A primeira propõe que células infectadas tanto na fase lítica, quanto na fase latente, expressam os genes líticos precoces, como vGPCR, K1 e ORF45 (CHANG; GANEM, 2013). Esses genes, por sua vez, promoveriam a produção de fatores de crescimento angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-6 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que somados à secreção das virocinas estimulariam a proliferação de células com infecção latente e a angiogênese de maneira parácrina (MONTANER et al., 2006; MESRI; CESARMAN; BOSHOF, 2010).

A segunda hipótese, lítica abortiva, sugere que células expressando os genes líticos precoces podem ser transformadas por alterações oncogênicas genéticas ou epigenéticas (CHANG; GANEM, 2013). Ao ser transformada, as células podem voltar para a forma latente e menos imunogênica, sendo estimuladas posteriormente de forma parácrina por células em ciclo lítico (BAIS et al., 2003). As hipóteses mencionadas são fundamentadas em estudos que mostram a capacidade da vGPCR de induzir tumores de maneira parácrina (JENSEN et al., 2005; SODHI et al., 2006) e a sua capacidade de suportar a tumorigenicidade dos genes latentes do HHV-8 por mecanismos parácrinos (MONTANER et al., 2006).

Em resumo, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores angiogênicos induzidos ou produzidos pelo HHV-8 podem favorecer tanto a manutenção do genoma viral quanto a reativação do HHV-8. Além disso, a infecção persistente atrai leucócitos de maneira crônica, levando assim a uma secreção de citocinas, quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento que favorecem o crescimento das células infectadas e contribuem para a progressão do SK.

2.6 Sarcoma de Kaposi relacionado à aids

O SK-aids ocorre em PVHA infectadas pelo HHV-8, no Brasil, ainda há poucos estudos epidemiológicos sobre a prevalência dessa coinfeção. Dentre os poucos achados, foi observada uma prevalência de 15,5% em Belém (PA) (ISHAK et al., 2007), uma variação de 13,9 a 25,9% em pessoas recrutadas de 1994 a 2002 em Santos e na cidade de São Paulo (PIERROTTI et al., 2005; BATISTA et al., 2009; MAGRI et al., 2009) e em Pernambuco, entre 2013 e 2014, foi encontrado o maior relato nacional, uma prevalência de 28,6% (CAHÚ et al., 2016).

A coinfeção HIV/HHV-8 pode acarretar diferentes manifestações clínicas, como o SK-aids, doença multicêntrica de Castleman e linfoma de efusão primário. Dentre as formas

de SK, o SK-aids é a forma mais agressiva, disseminada e resistente ao tratamento, destacando-se ainda como um dos cânceres mais comuns em PVHA (MOHANNA et al., 2005; GANEM, 2006; TORRE et al., 2015). A incidência do SK-aids está relacionada à via de infecção pelo HIV (FRISCH et al., 2001). Em homossexuais masculinos do hemisfério ocidental, o risco de desenvolvimento do SK-AIDS é de 5 a 10 vezes maior em comparação com outros grupos com comportamentos de alto risco (MARTELOTTA et al., 2009). Na África, o SK-AIDS acomete jovens de ambos os sexos, ainda que de forma desigual entre eles (MWANDA et al., 2005).

Após o advento da TARV em 1996, houve uma redução da morbidade em PVHA e uma regressão parcial ou completa do SK-aids em muitos pacientes e uma diminuição de 80% na incidência do SK-aids (PORTSMOUTH et al., 2003; ENGELS et al., 2006). Apesar disso, a ocorrência do SK continua substancialmente maior em PVHA quando comparados à população geral, mesmo em relação àqueles com carga viral controlada e níveis de linfócitos TCD4 acima dos valores associados à susceptibilidade a doenças oportunistas (GONÇALVES et al., 2017). Além disso, aproximadamente 50% dos pacientes com SK-aids não atingem a remissão total (NGUYEN et al., 2008).

Diante disso, além da contagem de linfócitos TCD4 e a carga viral do HIV, fatores como a carga viral do HHV-8 ou o estágio de desenvolvimento do SK podem influenciar na resposta do hospedeiro ao tratamento do SK (MARTIN-CARBONERO et al., 2004; MARTINEZ et al., 2006; BIHL et al., 2007).

Como dito anteriormente, o SK-aids possui o curso clínico mais grave em relação aos demais tipos de SK. A proteína Tat do HIV tem sido apontada como um dos fatores relacionados a essa maior severidade, reativando o HHV-8 ou através da via JAK/STAT ou pela indução da proteína Rta do HHV-8 (VARTHAKAVI et al., 2002; ZENG et al., 2007). Além disso, a inflamação crônica, com elevados níveis de citocinas inflamatórias, presentes nos pacientes com HIV, também podem estar associadas à reativação do HHV-8 (AOKI; TOSATO, 2007).

Foi observado que citocinas inflamatórias que aumentam a patogênese do HIV, como IL-1, fator de necrose tumoral- α e interferon- γ , promovem a proliferação de células do SK, induzem a morfologia fusiforme nas células endoteliais e a diferenciação fusiforme nas células progenitoras endoteliais circulantes (LANE; FAUCI, 1985; BROWNING et al., 1994). Esses achados indicam uma influência direta da resposta inflamatória ao HIV em relação à reativação do HHV-8, o que pode favorecer a proliferação de células infectadas e iniciar o processo oncogênico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos de IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos monoinfectados pelo HIV e em coinfectados HIV/HHV-8 com e sem SK e correlacioná-los com a contagem de linfócitos TCD4.

3.2 Objetivos específicos

Em indivíduos monoinfectados pelo HIV e coinfectados HIV/HHV-8 com e sem SK:

- Verificar se existe diferença nos níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10;
- Verificar se existe diferença na contagem de linfócitos TCD4;
- Verificar a existência de correlação entre os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 e a contagem de linfócitos TCD4.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho e população do estudo

Trata-se de um estudo analítico de comparação entre grupos, no qual os participantes foram divididos em um grupo de pessoas monoinfectadas pelo HIV (HIV), um grupo de pessoas coinfectadas HIV/HHV-8 sem SK (HIV/HHV-8) e um grupo de pessoas coinfectadas HIV/HHV-8 com SK [HIV/HHV-8 (SK)]. Os participantes do grupo HIV e HIV/HHV-8 eram acompanhados no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), enquanto que os participantes do grupo HIV/HHV-8 com SK foram provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP).

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa indivíduos com diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV e para HHV-8. O diagnóstico do SK-aids foi realizado através de critérios clínicos e histológico. Todos os participantes estavam sob TARV.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos menores de 18 anos, coinfectados com os vírus da hepatite B ou C e vírus linfotrópico de células T humanas 1/2, além daqueles com diagnóstico de sífilis e mulheres grávidas.

4.2 Locais do estudo

O estudo foi desenvolvido no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) da UFPE e no Setor de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) /Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

4.3 Definição e categorização das variáveis

4.3.1 Variáveis dependentes

Variável	Definição conceitual	Categorização
Indivíduos infectados pelo HIV	Indivíduos infectados pelo HIV e negativos para infecção pelo HHV-8	1. Sim 2. Não
Indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 sem SK	Indivíduos infectados com o HIV e HHV-8 sem diagnóstico clínico do SK	1. Sim 2. Não
Indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 com SK	Indivíduos infectados com o HIV e HHV-8 com diagnóstico clínico do SK	1.Sim 2.Não

4.3.2 Variáveis independentes

Variável	Definição conceitual	Categorização
Sexo	Sexo biológico do paciente. Variável nominal.	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea. Variável contínua	_____
Contagem de linfócitos TCD4	Quantificação do marcador de superfície celular CD3 associado a CD4, referida no prontuário e realizada no período máximo de três meses anteriores à data de coleta sanguínea. Valor expresso em células/mm ³ . Variável contínua	_____
Carga viral do HIV	Número de cópias/mL do RNA do HIV quantificadas no soro do paciente, sendo referida no prontuário do paciente realizada no período máximo de três meses anteriores à data de coleta da amostra sanguínea. Variável contínua	_____

IL-6	Níveis séricos de cada paciente em pg /mL. Variável contínua	_____
IL-10	Níveis séricos de cada paciente em pg/mL. Variável contínua	_____
CCL2	Níveis séricos de cada paciente em pg /mL. Variável contínua	_____
CXCL10	Níveis séricos de cada paciente em pg/ mL. Variável contínua	_____

4.4 Coleta de dados

Cada participante da pesquisa assinou, em duas vias de igual teor, o termo de consentimento livre e esclarecido que lhe assegura o cumprimento das normas da resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde. Em seguida, dados como sexo, idade, valores de carga viral do HIV e contagem de linfócitos TCD4 foram obtidos através do prontuário do participante.

4.5 Armazenamento das amostras

As amostras de soro utilizadas no estudo estavam armazenadas a -20°C no Setor de Virologia do LIKA (UFPE) e no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (USP).

4.6 Dosagem das citocinas

A avaliação das concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o método *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Bioscience, San Diego, Califórnia, EUA). O ensaio CBA utiliza *beads* de captura revestidas com anticorpo específico para determinada citocina possuindo fluorescência e tamanhos conhecidos. Para cada dosagem das citocinas, IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 foram utilizados 25µL de soro (não diluído) com limite de detecção de 2 a 2.500 pg/mL. A leitura do teste foi realizada no citômetro BD FACSCalibur™ em colaboração com o Setor de Imunopatologia do IAM/Fiocruz.

4.7 Análise estatística

Para verificar a normalidade amostral das concentrações de citocinas e contagem de linfócitos TCD4 foi utilizado o teste de D'Agostino. Em seguida, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação entre os grupos. A correlação entre a contagem de linfócitos TCD4 e as concentrações das citocinas foi verificada aplicando-se o teste de correlação de Spearman. Para todos os testes foi considerado como significativo o valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* v.6.0.7.

4.8 Aspectos éticos

A pesquisa faz parte dos projetos intitulados “Avaliação da associação entre a infecção latente/lítica pelo HHV-8 com os polimorfismos de base única dos genes NF- κ B1/NF- κ B2 e/ou genótipos do HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/AIDS em Pernambuco/Brasil” e “Comparação da variabilidade do herpesvírus humano do tipo 8 (HHV-8) entre grupos de indivíduos infectados por HIV sem e com sarcoma de Kaposi associado a AIDS”, aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (45156215.5.0000.5208) (Anexo A) e pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (55771116.0.1001.0065) (Anexo B), respectivamente.

5 RESULTADOS

Artigo no formato *short communication* submetido à revista *Medical Microbiology and Immunology*

Avaliação dos níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos com sarcoma de Kaposi relacionado à aids

Resumo

O Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/aids. O objetivo do estudo foi avaliar os níveis de IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos monoinfectados pelo HIV e em coinfectados HIV/HHV-8 com e sem SK. Os níveis séricos de citocinas IL-6, IL-10 e CXCL10 foram significativamente maiores no grupo SK em comparação com os indivíduos HIV e HIV/HHV-8. Os níveis de CCL2 não apresentaram diferença entre os grupos avaliados. Por fim, a elevação de citocinas inflamatórias e IL-10 no grupo SK possivelmente está relacionada à angiogênese e à supressão do perfil de resposta Th1, respectivamente.

Palavras-chave: HHV-8; HIV/AIDS; sarcoma de Kaposi; Patogênese; Citocinas

1. Introdução

O *Human gammaherpesvirus 8* (HHV-8), família *Herpesviridae* e gênero *Rhadinovirus* [1], é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), uma das doenças definidoras da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e um dos cânceres mais comuns em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) [2,3]. O SK é um distúrbio angioproliferativo multifocal do endotélio vascular e apresenta-se em quatro formas clínicas: clássico, endêmico, iatrogênico e epidêmico relacionado à aids (SK-aids) [4,5]. Dentre esses, o SK-aids destaca-se por ser mais agressivo, frequentemente comprometendo outros órgãos, causando desde insuficiência respiratória a sangramento do sistema digestivo [5,6].

Apesar das discussões e teorias sobre a maior gravidade do SK em PVHA, há um consenso que apenas a imunodeficiência causada pelo HIV não seria suficiente para o

desenvolvimento da doença [7]. A proteína Tat do HIV, por exemplo, tem sido apontada como um dos fatores envolvidos na patogênese do SK, participando da ativação do ciclo lítico do HHV-8 pela via de sinalização JAK/STAT ou pela indução da proteína Rta do HHV-8 [8,9]. Além disso, estudos *in vitro* sugerem que níveis elevados de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença, sobretudo devido a sua função angiogênica, necessária ao crescimento e manutenção do tumor [10,11,12].

Embora achados *in vitro* apontem o papel das citocinas inflamatórias no desenvolvimento do SK, poucos estudos avaliaram os níveis de citocinas em pacientes com a doença. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em pessoas monoinfectadas pelo HIV e em coinfectadas HIV/HHV-8 com e sem SK.

2. Metodologia

2.1. População do estudo

Participaram do estudo PVHA de ambos os sexos, maiores de 18 anos, atendidas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e no Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP).

Os participantes foram divididos em três grupos: indivíduos monoinfectados pelo HIV (HIV), coinfectados HIV/HHV-8 sem SK (HIV/HHV-8) e coinfectados HIV/HHV-8 com SK [HIV/HHV-8 (SK)]. As informações sobre carga viral (CV) do HIV e contagem de linfócitos TCD4 foram obtidas dos prontuários dos pacientes. Todos os participantes estavam sob terapia antirretroviral. O estudo foi aprovado pelos comitês de ética das instituições, com os respectivos protocolos 45156215.5.0000.5208 (HC-UFPE) e 55771116.0.1001.0065 (IIER, HCFM-USP).

2.2. Dosagem das citocinas

A avaliação das concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 foi realizada através da citometria de fluxo, utilizando o método *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Bioscience, San Diego, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.3. Análise estatística

As concentrações das citocinas e as contagens de linfócitos TCD4 foram analisadas pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A fim de analisar a correlação entre a contagem de linfócitos TCD4 com as concentrações das citocinas foi realizado o teste de correlação de Spearman. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados como significantes. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* v.6.0.7.

3. Resultados

3.1. População do estudo

Participaram do estudo 146 PVHA com média de idade de 43,6 anos ($\pm 11,8$), das quais 72,6% (106/146) eram do sexo masculino. Dentre o total dos pacientes, 31 eram monoinfectados pelo HIV, 77 coinfectados HIV/HHV-8 e 38 coinfectados HIV/HHV-8 (SK). A distribuição dos indivíduos segundo a média de idade e frequência dos sexos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos participantes do estudo de acordo com a média de idade e frequência dos sexos

	HIV n = 31	HIV/HHV-8 n = 77	HIV/HHV-8 (SK) n = 38
Idade (anos)	43,9 ($\pm 11,4^*$)	47,5 ($\pm 10,3$)	35,3 ($\pm 10,8$)
Sexo			
Masculino	19 (61,3%)	50 (65%)	37 (97,4%)
Feminino	12 (38,7%)	27 (35%)	1 (2,6%)

*Desvio padrão

3.2. Contagem de linfócitos TCD4 e carga viral do HIV

A contagem dos linfócitos TCD4 mostrou que a mediana de 110,5 células/mm³, no grupo HIV/HHV-8 (SK), foi significativamente menor que os valores das medianas dos

grupos HIV e HIV/HHV-8, 782 e 635,5 células/mm³, respectivamente ($p<0,0001$). A CV do HIV foi indetectável em todos pacientes dos grupos HIV e HIV/HHV-8 e em nove indivíduos do grupo HIV/HHV-8 (SK). A mediana da CV do HIV foi de 7.589 cópias/mL em 29 pacientes do grupo HIV/HHV-8 (SK).

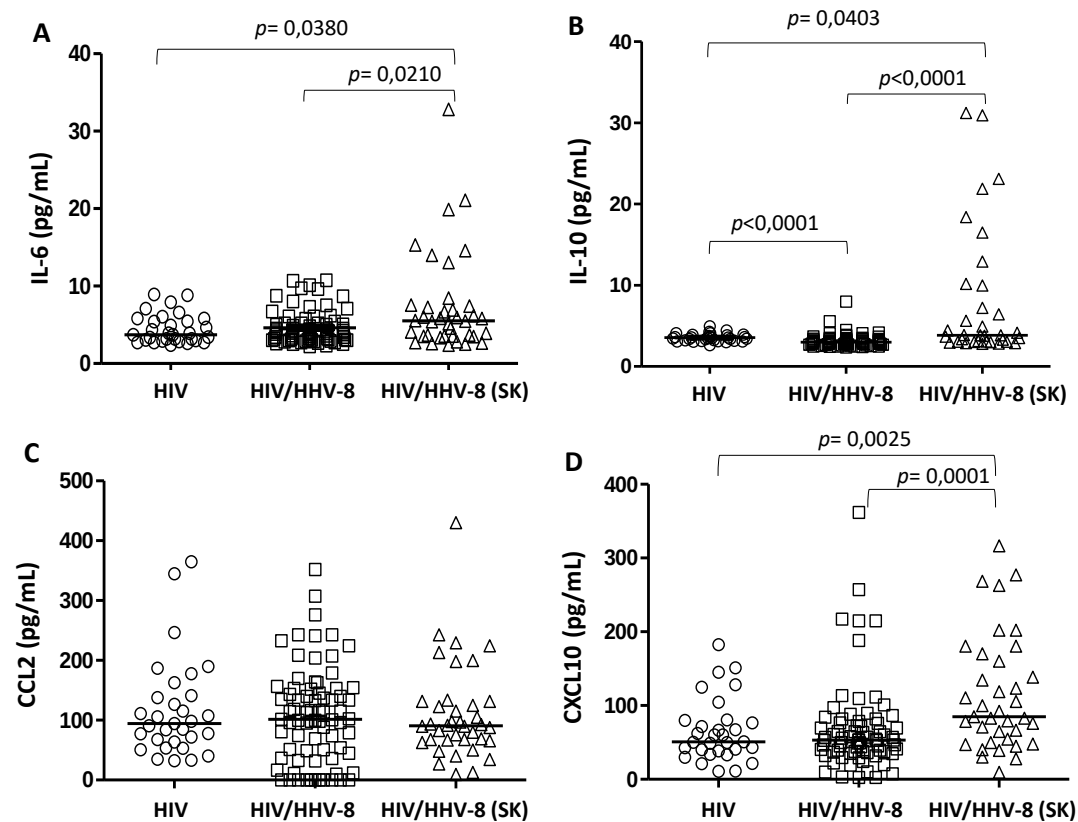
3.3. Dosagem e análises das citocinas

As medianas das concentrações séricas da IL-6 foram de 3,710, 4,040 e 5,515 pg/mL nos grupos HIV, HIV/HHV-8 e HIV/HHV-8 (SK), respectivamente. Ao comparar esses valores, foi observado que os níveis de IL-6 foram significativamente maiores no grupo HIV/HHV-8 (SK) em relação aos grupos HIV ($p=0,0380$) e HIV/HHV-8 ($p=0,0210$) (Fig. 1A).

Em relação aos níveis da IL-10, as medianas foram de 3,490, 2,980 e 4,005 pg/mL para os grupos HIV, HIV/HHV-8 e HIV/HHV-8 (SK), respectivamente. No grupo HIV/HHV-8 (SK), os níveis da IL-10 foram significativamente maiores em relação aos grupos HIV ($p=0,0403$) e HIV/HHV-8 ($p<0,0001$). Por outro lado, os níveis da IL-10 no grupo HIV/HHV-8 foram significativamente menores em comparação aos monoinfectados pelo HIV ($p<0,0001$) (Fig. 1B).

Em relação às quimiocinas, os níveis de CCL2 não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados, sendo os valores das medianas de 94,36, 101,5 e 90,56 pg/mL para os grupos HIV, HIV/HHV-8 e HIV/HHV-8 (SK), respectivamente (Fig. 1C). Quanto à dosagem da CXCL10, as medianas foram de 50,69, 53,22 e 88,48 pg/mL para os grupos HIV, HIV/HHV-8 e HIV/HHV-8 (SK), respectivamente. No grupo HIV/HHV-8 (SK), os níveis de CXCL10 foram significativamente maiores em comparação aos grupos HIV ($p=0,0025$) e HIV/HHV-8 ($p=0,0001$) (Fig. 1D).

Figura 1 - Concentrações séricas da IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 em indivíduos infectados pelo HIV, coinfectados HIV/HHV-8 com e sem sarcoma de Kaposi



Valores p obtidos através do teste de Mann-Whitney.

O coeficiente de correlação entre os níveis de linfócitos TCD4 e a IL-6 foi de $r = -0,4037$ ($p = 0,0120$) e a para CXCL10 foi de $r = -0,4558$ ($p = 0,0040$).

4. Discussão

Apesar do SK ser um dos cânceres mais comuns em PVHA, sua patogênese ainda não está totalmente elucidada [3]. Dentre os mecanismos responsáveis pela patogênese do SK, estudos *in vitro* têm sugerido que altos níveis de citocinas inflamatórias podem estar relacionados com o desenvolvimento do SK em indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 [11,12].

Em nosso estudo, os níveis elevados da IL-6 no grupo HIV/HHV-8 (SK), corroboram com os achados em células fusiformes do SK que associaram a secreção da IL-6 com o crescimento do tumor [13]. A relação entre a IL-6 e o crescimento do SK estaria associada à atividade angiogênica dessa citocina [12]. Além disso, também foi demonstrado que a proteína viral K15, expressa durante o ciclo lítico do HHV-8, estimula a secreção da IL-6 em

células HeLa [14]. Interessantemente, níveis elevados da IL-6 foram descritos em pacientes com a doença multicêntrica de Castleman, também relacionada à infecção pelo HHV-8, e foram correlacionados com a gravidade da doença [15].

No nosso estudo também foram encontrados níveis elevados da CXCL10 no grupo HIV/HHV-8 (SK), o que corrobora com recente achado do aumento da expressão dessa quimiocina em amostras de lesões do SK-AIDS [16]. A elevada expressão da CXCL10, também observada em sobrenadante de monócitos THP-1 infectados pelo HHV-8, pode estar associada à ativação da via do *toll-like receptor 3* pelo HHV-8 [17]. Após sua secreção, a CXCL10 pode interagir com o receptor acoplado à proteína G viral, codificado pelo HHV-8 e expresso em células endoteliais do SK, estimulando assim a migração de células endoteliais e o processo angioproliferativo [18].

Contrariamente aos nossos resultados, o estudo de Lidenge et al. (2018) encontrou níveis significativamente maiores da CXCL10 no grupo HIV/HHV-8 quando comparados ao grupo HIV/HHV-8 (SK) [19]. Entretanto, diferente da nossa população de estudo, alguns pacientes do estudo mencionado estavam com CV do HIV detectável. A discordância observada entre nossos resultados pode estar relacionada à viremia do HIV, a qual influencia nos níveis séricos da CXCL10 [20].

Apesar da observação *in vitro* da secreção da CCL2 por células fusiformes do SK [21] e da elevada transcrição do gene da CCL2 em monócitos THP-1 infectados pelo HHV-8 [17], em nosso estudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos HIV, HIV/HHV-8 e HIV/HHV-8 (SK). Em relação a esses achados discordantes, nós acreditamos que seja importante o desenvolvimento de modelos *in vivo* que investiguem a real participação da CCL2 na patogênese do SK.

Em relação à IL-10, nosso estudo mostrou níveis elevados no grupo HIV/HHV-8 (SK) quando comparados com indivíduos monoinfectados pelo HIV e coinfectados HIV/HHV-8. Esse achado corrobora com estudo realizado por Lidenge et al. (2018) que encontraram níveis significativamente maiores da IL-10 em pacientes HIV/HHV-8 (SK) quando comparados à pacientes HIV/HHV-8 [19]. De forma semelhante, Machado et al. (2014) encontraram maiores concentrações da IL-10 em pacientes HIV/HHV-8 (SK) quando comparados à pacientes monoinfectados pelo HIV [22]. Nesse mesmo estudo, também foi observado que os níveis de IL-10 aumentavam de acordo com o grau de disseminação do SK [22]. Esse aumento sérico de IL-10 provavelmente favorece a progressão da doença, uma vez que suprime a produção de citocinas pelos linfócitos Th1, reduzindo a resposta mediada por células ao HHV-8 [23].

No grupo HIV/HHV-8 (SK), a significativa diminuição na contagem de linfócitos TCD4 possivelmente está relacionada ao quadro de imunodepressão ocasionado pelo HIV [2,5]. Pacientes com SK geralmente possuem uma baixa contagem de linfócitos TCD4 e uma elevada CV do HIV [24]. Na maioria dos pacientes, o SK regride simultaneamente ao aumento da contagem de linfócitos TCD4 e diminuição da CV do HIV [24,25]. Apesar de significativo, o coeficiente de correlação encontrado entre os níveis de linfócitos TCD4 e as citocinas IL-6 e CXCL10 pode ser considerado moderado, indicando a necessidade de futuras investigações.

Por fim, apesar de mais estudos *in vivo* serem necessários para uma melhor compreensão das interações citocina-célula e vírus-célula na patogênese do SK, é possível concluir que: a) os níveis elevados da IL-6 e CXCL10 no grupo HIV/HHV-8 (SK) podem estar associados à suas atividades angiogênicas; b) os níveis elevados da IL-10 no grupo HIV/HHV-8 (SK) podem estar favorecendo a patogênese do SK como resultado da diminuição da resposta imune mediada por células; e c) novos estudos devem avaliar a real participação da CCL2 na patogênese do SK.

Referências

- [1] ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. [citado em 10/12/2018]. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- [2] Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ, Engels EA. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32 (5): 527-33.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65 (2): 87-108.
- [4] Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 2000; 342 (14): 1027-38.
- [5] Fatahzadeh M. Kaposi sarcoma: review and medical management update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113 (1): 2-16.
- [6] Ganem D. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 273-96.
- [7] Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001; 37 (10): 1251-69.
- [8] Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P. Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta. *Virology* 2002; 297 (2): 270-80.

- [9] Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, 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. *J Virol* 2007; 81 (5): 2401-17.
- [10] Ensoli B, Stürzl M, Monini P. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10 (5): 367-81.
- [11] Jensen KK, Lira SA. Chemokines and Kaposi's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 2004; 14 (3): 187-94.
- [12] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* 2010; 10 (10): 707-19.
- [13] Miles SA, Rezai AR, Salazar-González JF, Vander MM, Stevens RH, Logan DM, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 (11): 4068-72.
- [14] Brinkmann MM, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schulz TF. Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2007; 81 (1): 42-58.
- [15] Oksenhendler E, Carcelain G, Aoki Y, Boulanger E, Maillard A, Clauvel JP, et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castleman disease in HIV-infected patients. *Blood* 2000; 96 (6): 2069-73.
- [16] Tso FY, Kossenkova AV, Lidenge SJ, Ngalamika O, Ngowi JR, Mwaiselage J, et al. RNA-Seq of Kaposi's sarcoma reveals alterations in glucose and lipid metabolism. *PLoS Pathog* 2018; 14 (1): e1006844.
- [17] West J, Damania B. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. *J Virol* 2008; 82 (11): 5440-9.
- [18] Couty JP, Lupu-Meiri M, Oron Y, Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-G protein-coupled receptor-expressing endothelial cells exhibit reduced migration and stimulated chemotaxis by chemokine inverse agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329 (3): 1142-7.
- [19] Lidenge SJ, Tso FY, Ngalamika O, Ngowi JR, Mortazavi Y, Kwon EH, et al. Similar Immunological Profiles Between African Endemic and HIV1-associated Epidemic Kaposi's Sarcoma Patients Reveal the Primary Role of KSHV in KS Pathogenesis. *J Infect Dis* 2018.
- [20] Simmons RP, Scully EP, Groden EE, Arnold KB, Chang JJ, Lane K, et al. HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS* 2013; 27 (16): 2505-17.

- [21] Sciacca FL, Stürzl M, Bussolino F, Sironi M, Brandstetter H, Zietz C, et al. Expression of adhesion molecules, platelet-activating factor, and chemokines by Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 1994; 153 (10): 4816-25.
- [22] Machado PR, Farias KJ, Genre J, Oliveira CJ, Guedes PM, da Fonseca BA. Disseminated Kaposi's sarcoma in patients with HIV infection correlates to high serum levels of IL-10. *Viral Immunol* 2014; 27 (7): 356-60.
- [23] Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, Wang B, Feliciani C, Tulli A, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Ac Dermatol* 2004;50:657–675.
- [24] Stebbing J, Sanitt A, Nelson M, Powles T, Gazzard B, Bower M. A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2006; 367 (9521): 1495-502.
- [25] Gallafent JH, Buskin SE, De Turk PB, Aboulafia DM. Profile of patients with Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23 (6): 1253-60.

6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Os níveis séricos de IL-6, IL-10 e CXCL10 foram maiores no grupo com SK em comparação aos monoinfectado pelo HIV e coinfectados HIV/HHV-8 sem SK;
- Os níveis séricos da CCL2 não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados;
- As contagens de linfócitos TCD4 foram significativamente menores no grupo com SK.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Elevados níveis séricos da IL-6 e CXCL10, em pacientes HIV com SK, podem estar relacionados à atividade angiogênica dessas citocinas, contribuindo para a manutenção do SK. Por sua vez, os elevados níveis da IL-10 neste grupo sugerem uma supressão do perfil de resposta Th1, levando à progressão do tumor. As contagens de linfócitos TCD4 significativamente menores observadas nos indivíduos com SK poderia estar relacionada à imunodepressão ocasionada pelo HIV.

REFERÊNCIAS

- Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. **Clin Microbiol Rev.** 15(3):439-64, 2002.
- Akula SM, Wang FZ, Vieira J, Chandran B. Human herpesvirus 8 interaction with target cells involves heparan sulfate. **Virology.** 282(2):245-55, 2001.
- Alagiozoglou L, Sitas F, Morris L. Phylogenetic analysis of human herpesvirus-8 in South Africa and identification of a novel subgroup. **J Gen Virol.** 81(8):2029-38, 2000.
- Andreoni M, Goletti D, Pezzotti P, Pozzetto A, Monini P, Sarmati L, et al. Prevalence, incidence and correlates of HHV-8/KSHV infection and Kaposi's sarcoma in renal and liver transplant recipients. **J Infect.** 43(3):195-9, 2001.
- Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. **N Engl J Med.** 342(14):1027-38, 2000.
- Aoki Y, Tosato G. Interactions between HIV-1 Tat and KSHV. **Curr Top Microbiol Immunol.** 312:309-26, 2007.
- Bais C, Santomaso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, et al. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. **Nature.** 391(6662):86-9, 1998.
- Bais C, Van Geelen A, Eroles P, Mutlu A, Chiozzini C, Dias S, et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein-coupled receptor immortalizes human endothelial cells by activation of the VEGF receptor-2/ KDR. **Cancer Cell.** 3(2):131-43, 2003.
- Bélanger C, Gravel A, Tomoiu A, Janelle ME, Gosselin J, Tremblay MJ, Flamand L. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. **J Hum Virol.** 4(2):62-73, 2001.
- Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. **J Infect Dis.** 181(5):1562-8, 2000.
- Bihl F, Mosam A, Henry LN, Chisholm JV, Dollard S, Gumbi P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific immune reconstitution and antiviral effect of combined HAART/chemotherapy in HIV clade C-infected individuals with Kaposi's sarcoma. **AIDS.** 21(10):1245-52, 2007.
- Biryahwaho B, Dollard SC, Pfeiffer RM, Shebl FM, Munuo S, Amin MM, et al. Sex and geographic patterns of human herpesvirus 8 infection in a nationally representative population-based sample in Uganda. **J Infect Dis.** 202(9):1347-53, 2010.
- Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. **J Infect Dis.** 177(1):213-6, 1998.

- Boldogh I, Szaniszló P, Bresnahan WA, Flaitz CM, Nichols MC, Albrecht T. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in the saliva of individuals infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis.** 23(2):406-7, 1996.
- Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova E, Martick M, Sandford G, Nicholas J, Garcia KC. Molecular mechanisms for viral mimicry of a human cytokine: activation of gp130 by HHV-8 interleukin-6. **J Mol Biol.** 335(2):641-54, 2004.
- Braun, M. Classics in Oncology Moriz Kaposi. **Can J Clin**, v. 32, n. 6, p. 340-1, 1982.
- Brinkmann MM, Glenn M, Rainbow L, Kieser A, Henke-Gendo C, Schulz TF. Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein. **J Virol.** 77(17):9346-58, 2003.
- Brinkmann MM, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schulz TF. Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **J Virol.** 81(1):42-58, 2007.
- Browning PJ, Sechler JM, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, et al. Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. **Blood.** 84(8):2711-20, 1994.
- Burýsek L, Pitha PM. Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. **J Virol.** 75(5):2345-52, 2001.
- Butler LM, Were WA, Balinandi S, Downing R, Dollard S, Neilands TB, et al. Human herpesvirus 8 infection in children and adults in a population-based study in rural Uganda. **J Infect Dis.** 203(5):625-34, 2011.
- Cahú GGOM, Morais VM, Lopes TR, da Silva DM, Tozetto-Mendoza TR, Pannuti CS, et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **J Med Virol.** 88(11):2016-20, 2016.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. **N Engl J Med.** 332(18):1186-91, 1995.
- Chakraborty S, Veetil MV, Chandran B. Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Entry into Target Cells. **Front Microbiol.** 3:6, 2012.
- Chang HH, Ganem D. A unique herpesviral transcriptional program in KSHV-infected lymphatic endothelial cells leads to mTORC1 activation and rapamycin sensitivity. **Cell Host Microbe.** 13(4):429-40, 2013.
- Chang J, Renne R, Dittmer D, Ganem D. Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. **Virology.** 266(1):17-25, 2000.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science.**

266(5192):1865-9, 1994.

Chatlynne LG, Lapps W, Handy M, Huang YQ, Masood R, Hamilton AS, et al. Detection and titration of human herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. **Blood**. 92(1):53-8, 1998.

Chen T, Hudnall SD. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. **Mod Pathol**. 19(5):726-37, 2006.

Choi YB, Nicholas J. Autocrine and paracrine promotion of cell survival and virus replication by human herpesvirus 8 chemokines. **J Virol**. 82(13):6501-13, 2008.

Choi YB, Sandford G, Nicholas J. Human herpesvirus 8 interferon regulatory factor-mediated BH3-only protein inhibition via Bid BH3-B mimicry. **PLoS Pathog**. 8(6):e1002748, 2012.

Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. **Science**. 291(5511):2150-5, 2001.

Cockerell CJ. Histopathological features of Kaposi's sarcoma in HIV infected individuals. **Cancer Surv**. 10:73-89, 1991.

Couty JP, Geras-Raaka E, Weksler BB, Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor signals through multiple pathways in endothelial cells. **J Biol Chem**. 276(36):33805-11, 2001.

Couty JP, Lupu-Meiri M, Oron Y, Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-G protein-coupled receptor-expressing endothelial cells exhibit reduced migration and stimulated chemotaxis by chemokine inverse agonists. **J Pharmacol Exp Ther**. 329(3):1142-7, 2009.

Curie, M. 1921. Citações. Acesso em: 10/12/2018. Disponível em: <www.citacoes.in/citacoes/104263-marie-curie-nada-na-vida-deve-ser-temido-somente-compreendido/>.

Dairaghi DJ, Fan RA, McMaster BE, Hanley MR, Schall TJ. HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. Agonist and antagonist profiles of viral chemokines. **J Biol Chem**. 274(31):21569-74, 1999.

Damania BA, Cesarman E. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. In Eds . M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello e B. Roizman. **Fields Virology**, 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 2080-2128.

Davidovici B, Karakis I, Bourboulia D, Ariad S, Zong J, Benharroch D, et al. Seroepidemiology and molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among Jewish population groups in Israel. **J Natl Cancer Inst**. 93(3):194-202, 2001.

Davis DA, Humphrey RW, Newcomb FM, O'Brien TR, Goedert JJ, Straus SE, et al. Detection of serum antibodies to a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific peptide.

J Infect Dis. 175(5):1071-9, 1997.

Dukers NH, Renwick N, Prins M, Geskus RB, Schulz TF, Weverling GJ, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. **Am J Epidemiol.** 151(3):213-24, 2000.

Duprez R, Lacoste V, Brière J, Couppié P, Frances C, Sainte-Marie D, et al. Evidence for a multiclonal origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma. **J Natl Cancer Inst.** 99(14):1086-94, 2007.

Dutz W, Stout AP. Kaposi's sarcoma in infants and children. **Cancer.** 13:684-94, 1960.

El Amari EB, Toutous-Trellu L, Gayet-Ageron A, Baumann M, Cathomas G, Steffen I, et al. Predicting the evolution of Kaposi sarcoma, in the highly active antiretroviral therapy era. **AIDS.** 22(9):1019-28, 2008.

Engels EA, Atkinson JO, Graubard BI, McQuillan GM, Gamache C, Mbisa G, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 infection among adults in the United States and evidence for sexual transmission. **J Infect Dis.** 196(2):199-207, 2007.

Engels EA, Pfeiffer RM, Goedert JJ, Virgo P, McNeel TS, Scoppa SM, et al. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. **AIDS.** 20(12):1645-54, 2006.

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

Ensoli B, Stürzl M, Monini P. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. **Semin Cancer Biol.** 10 (5): 367-81, 2000.

Farge D, Lebbé C, Marjanovic Z, Tuppin P, Mouquet C, Peraldi MN, et al. Human herpes virus-8 and other risk factors for Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients. Groupe Cooperatif de Transplantation d' Ile de France (GCIF). **Transplantation.** 67(9):1236-42, 1999.

Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Nature.** 394(6693):588-92, 1998.

Friberg J, Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. **Nature.** 402(6764):889-94, 1999.

Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ, Group A-CMRS. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. **JAMA.** 285(13):1736-45, 2001.

Fu B, Sun F, Li B, Yang L, Zeng Y, Sun X, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and risk factors in Xinjiang, China. **J Med Virol.** 81(8):1422-31, 2009.

Ganem D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. **J Clin Invest.** 120(4):939-49, 2010.

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

GANEM, D. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. In Eds D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman e S. E. Straus. **Fields Virology**, 5th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2875–2888

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. **Nat Med.** 2(8):925-8, 1996.

Guasparri I, Keller SA, Cesarman E. KSHV vFLIP is essential for the survival of infected lymphoma cells. **J Exp Med.** 199(7):993-1003, 2004.

Gwack Y, Hwang S, Byun H, Lim C, Kim JW, Choi EJ, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis. **J Virol.** 75(13):6245-8, 2001.

Hammock L, Reisenauer A, Wang W, Cohen C, Birdsong G, Folpe AL. Latency-associated nuclear antigen expression and human herpesvirus-8 polymerase chain reaction in the evaluation of Kaposi sarcoma and other vascular tumors in HIV-positive patients. **Mod Pathol.** 18(4):463-8, 2005.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** 86(3):353-64, 1996.

Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. **Semin Cancer Biol.** 9(3):187-99, 1999.

Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. **Lancet Infect Dis.** 2(5):281-92, 2002.

Howard MR, Whitby D, Bahadur G, Suggett F, Boshoff C, Tenant-Flowers M, et al. Detection of human herpesvirus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. **AIDS.** 11(2):F15-9, 1997.

Hudnall SD, Rady PL, Tyring SK, Fish JC. Serologic and molecular evidence of human herpesvirus 8 activation in renal transplant recipients. **J Infect Dis.** 178(6):1791-4, 1998.

Hulaniuk ML, Torres O, Bartoli S, Fortuny L, Burgos Pratx L, Nuñez F, et al. Increased prevalence of human herpesvirus type 8 (HHV-8) genome among blood donors from North-Western Argentina. **J Med Virol.** 89(3):518-27, 2017.

ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. Acesso em: 10/11/2018. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.

Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. **Cancer.** 88(3):500-17, 2000.

- Ishak MeO, Martins RN, Machado PR, de Souza LL, Machado LF, Azevedo VN, et al. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: evidence of an ancient human infection. **J Med Virol.** 79(10):1537-44, 2007.
- Jensen KK, Lira SA. Chemokines and Kaposi's sarcoma. **Semin Cancer Biol.** 14(3):187-94, 2004.
- Jensen KK, Manfra DJ, Grisotto MG, Martin AP, Vassileva G, Kelley K, et al. The human herpes virus 8-encoded chemokine receptor is required for angioproliferation in a murine model of Kaposi's sarcoma. **J Immunol.** 174(6):3686-94, 2005.
- Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** 149:1-38, 2003.
- Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol.** 5(10):749-59, 2005.
- Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. **Nat Med.** 2(8):918-24, 1996.
- Kliche S, Nagel W, Kremmer E, Atzler C, Ege A, Knorr T, Koszinowski U, Kolanus W, Haas J. Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1. **Mol Cell.** 7(4):833-43, 2001.
- Kuang E, Tang Q, Maul GG, Zhu F. Activation of p90 ribosomal S6 kinase by ORF45 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and its role in viral lytic replication. **J Virol.** 82(4):1838-50, 2008.
- Lane HC, Fauci AS. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. **Annu Rev Immunol.** 3:477-500, 1985.
- Lee H, Guo J, Li M, Choi JK, DeMaria M, Rosenzweig M, et al. Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Mol Cell Biol.** 18(9):5219-28, 1998.
- Lee BS, Lee SH, Feng P, Chang H, Cho NH, Jung JU. Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. **J Virol.** 79(19):12173-84, 2005.
- Levi JE, Nascimento MC, Sumita LM, de Souza VA, Freire WS, Mayaud P, et al. Non-detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-seropositive blood donors from three Brazilian regions. **PLoS One.** 6(8):e23546, 2011.
- Li M, Damania B, Alvarez X, Ogryzko V, Ozato K, Jung JU. Inhibition of p300 histone acetyltransferase by viral interferon regulatory factor. **Mol Cell Biol.** 20(21):8254-63, 2000.
- Lin CW, Tu PF, Hsiao NW, Chang CY, Wan L, Lin YT, Chang HW. Identification of a novel septin 4 protein binding to human herpesvirus 8 kaposin A protein using a phage display cDNA library. **J Virol Methods.** 143(1):65-72, 2007.

- Liu C, Sandford G, Fei G, Nicholas J. Galpha protein selectivity determinant specified by a viral chemokine receptor-conserved region in the C tail of the human herpesvirus 8 g protein-coupled receptor. **J Virol.** 78(5):2460-71, 2004.
- Lüttichau HR, Johnsen AH, Jurlander J, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Kaposi sarcoma-associated herpes virus targets the lymphotactin receptor with both a broad spectrum antagonist vCCL2 and a highly selective and potent agonist vCCL3. **J Biol Chem** 282(24):17794-805, 2007.
- Ma Q, Cavallin LE, Leung HJ, Chiozzini C, Goldschmidt-Clermont PJ, Mesri EA. A role for virally induced reactive oxygen species in Kaposi's sarcoma herpesvirus tumorigenesis. **Antioxid Redox Signal.** 18(1):80-90, 2013.
- Magri MC, Carbone PH, de los Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. 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. **J Med Virol.** 81(7):1292-7, 2009.
- Mantina H, Kankasa C, Klaskala W, Brayfield B, Campbell J, Du Q, et al. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Int J Cancer.** 94(5):749-52, 2001.
- Mariggì G, Koch S, Schulz TF. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 372(1732), 2017.
- Martellotta F, Berretta M, Vaccher E, Schioppa O, Zanet E, Tirelli U. AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies. **Curr HIV Res.** 7(6):634-8, 2009.
- Martin-Carbonero L, Barrios A, Saballs P, Sirera G, Santos J, Palacios R, et al. Pegylated liposomal doxorubicin plus highly active antiretroviral therapy versus highly active antiretroviral therapy alone in HIV patients with Kaposi's sarcoma. **AIDS.** 18(12):1737-40, 2004.
- Martinez V, Caumes E, Gambotti L, Ittah H, Morini JP, Deleuze J, et al. Remission from Kaposi's sarcoma on HAART is associated with suppression of HIV replication and is independent of protease inhibitor therapy. **Br J Cancer.** 94(7):1000-6, 2006.
- Matta H, Mazzacurati L, Schamus S, Yang T, Sun Q, Chaudhary PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) oncoprotein K13 bypasses TRAFs and directly interacts with the IkappaB kinase complex to selectively activate NF-kappaB without JNK activation. **J Biol Chem.** 282(34):24858-65, 2007.
- McCormick C, Ganem D. The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. **Science.** 307(5710):739-41, 2005.
- Miles SA, Rezai AR, Salazar-González JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 87(11):4068-72, 1990.
- Minhas V, Wood C. Epidemiology and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Viruses.** 6(11):4178-94, 2014.

Mitsuyasu RT. Kaposi's sarcoma in the acquired immunodeficiency syndrome. **Infect Dis Clin North Am.** 2(2):511-23, 1988.

Mohanna S, Bravo F, Ferrufino JC, Sanchez J, Gotuzzo E. Classic Kaposi's sarcoma presenting in the oral cavity of two HIV-negative Quechua patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 12(5):E365-8, 2007.

Mohanna S, Maco V, Bravo F, Gotuzzo, E. 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. **Int J Infect Dis.** 9(5): 239-250, 2005.

Montaner S, Sodhi A, Ramsdell AK, Martin D, Hu J, Sawai ET, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor as a therapeutic target for the treatment of Kaposi's sarcoma. **Cancer Res.** 66(1):168-74, 2006.

Moore PS. The emergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). **N Engl J Med.** 343(19):1411-3, 2000.

Muñoz-Fontela C, Marcos-Villar L, Gallego P, Arroyo J, Da Costa M, Pomeranz KM, Lam EW, Rivas C. Latent protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with 14-3-3 proteins and inhibits FOXO3a transcription factor. **J Virol.** 81(3):1511-6, 2007.

Muralidhar S, Veytsmann G, Chandran B, Ablashi D, Doniger J, Rosenthal LJ. Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF K12). **J Clin Virol.** 16(3):203-13, 2000.

Mwanda OW, Fu P, Collea R, Whalen C, Remick SC. Kaposi's sarcoma in patients with and without human immunodeficiency virus infection, in a tertiary referral centre in Kenya. **Ann Trop Med Parasitol.** 99(1):81-91, 2005.

Myers BD, Kessler E, Levi J, Pick A, Rosenfeld JB, Tikvah P. Kaposi sarcoma in kidney transplant recipients. **Arch Intern Med.** 133(2):307-11, 1974.

Nakamura H, Li M, Zarycki J, Jung JU. Inhibition of p53 tumor suppressor by viral interferon regulatory factor. **J Virol.** 75(16):7572-82, 2001.

Nakano K, Isegawa Y, Zou P, Tadagaki K, Inagi R, Yamanishi K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded vMIP-I and vMIP-II induce signal transduction and chemotaxis in monocytic cells. **Arch Virol.** 148(5):871-90, 2003.

Nguyen HQ, Magaret AS, Kitahata MM, Van Rompaey SE, Wald A, Casper C. Persistent Kaposi sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy: characterizing the predictors of clinical response. **AIDS.** 22(8):937-45, 2008.

Nicholas J. Human gammaherpesvirus cytokines and chemokine receptors. **J Interferon Cytokine Res.** 25(7):373-83, 2005.

O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, 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. **J Infect Dis.**

180(4):1010-7, 1999.

Oksenhendler E, Carcelain G, Aoki Y, Boulanger E, Maillard A, Clauvel JP, et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castelman disease in HIV-infected patients. **Blood**. 96(6):2069-73, 2000.

Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci**. 99(8):1501-6, 2008.

Park J, Seo T, Hwang S, Lee D, Gwack Y, Choe J. The K-bZIP protein from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with p53 and represses its transcriptional activity. **J Virol**. 74(24):11977-82, 2000.

Pau CP, Lam LL, Spira TJ, Black JB, Stewart JA, Pellett PE, et al. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. **J Clin Microbiol**. 36(6):1574-7, 1998.

Paudel N, Sadagopan S, Balasubramanian S, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen and angiogenin interact with common host proteins, including annexin A2, which is essential for survival of latently infected cells. **J Virol**. 86(3):1589-607, 2012.

Philpott N, Bakken T, Pennell C, Chen L, Wu J, Cannon M. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif that activates Shp2. **J Virol**. 85(2):1140-4, 2011.

Pierrotti LC, Etzel A, Sumita LM, Braga PE, Eluf-Neto J, de Souza VA, et al. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. **Sex Transm Dis**. 32(1):57-63, 2005.

Pietrek M, Brinkmann MM, Glowacka I, Enlund A, Hävemeier A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Lewitzky M, Saksela K, Feller SM et al. Role of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 SH3 binding site in inflammatory signaling and B-cell activation. **J Virol**. 84(16):8231-40, 2010.

Portsmouth S, Stebbing J, Gill J, Mandalia S, Bower M, Nelson M, et al. A comparison of regimens based on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or protease inhibitors in preventing Kaposi's sarcoma. **AIDS**. 17(11):F17-22, 2003.

Prakash O, Tang ZY, Peng X, Coleman R, Gill J, Farr G, et al. Tumorigenesis and aberrant signaling in transgenic mice expressing the human herpesvirus-8 K1 gene. **J Natl Cancer Inst**. 94(12):926-35, 2002.

Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Heiden T, Biberfeld P. Lymphatic and vascular origin of Kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development. **Int J Cancer**. 119(6):1262-7, 2006.

Qu L, Jenkins F, Triulzi DJ. Human herpesvirus 8 genomes and seroprevalence in United

States blood donors. **Transfusion**. 50(5):1050-6, 2010.

Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. **Nat Med**. 6(10):1121-7, 2000.

Regamey N, Cathomas G, Schwager M, Wernli M, Harr T, Erb P. High human herpesvirus 8 seroprevalence in the homosexual population in Switzerland. **J Clin Microbiol**. 36(6):1784-6, 1998.

Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, et al. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. **Nat Med**. 2(3):342-6, 1996.

Rivas C, Thlick AE, Parravicini C, Moore PS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. **J Virol**. 75(1):429-38, 2001.

Rohner E, Wyss N, Trelle S, Mbulaiteye SM, Egger M, Novak U, et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. **Syst Rev**. 3:11, 2014.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). **Proc Natl Acad Sci U S A**. 93(25):14862-7, 1996.

Salahuddin SZ, Nakamura S, Biberfeld P, Kaplan MH, Markham PD, Larsson L, et al. Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long-term culture in vitro. **Science**. 242(4877):430-3, 1988.

Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. **Nat Med**. 3(3):293-8, 1997.

Schulz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. **J Antimicrob Chemother**. 45 Suppl T3:15-27, 2000.

Schwarz M, Murphy PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. **J Immunol**. 167(1):505-13, 2001.

Seo T, Park J, Choe J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IFN regulatory factor 1 inhibits transforming growth factor-beta signaling. **Cancer Res**. 65(5):1738-47, 2005.

Sirianni, M.C. et al. Production of human cytokines and chemokines in AIDS-Kaposi's sarcoma patients, in **International Proceedings Division 12th World AIDS Conference**, Geneva (Switzerland), June 28– July 3, 1998.

Sharp TV, Wang HW, Koumi A, Hollyman D, Endo Y, Ye H, Du MQ, Boshoff C. K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. **J Virol**. 76(2):802-16, 2002.

Sodhi A, Chaisuparat R, Hu J, Ramsdell AK, Manning BD, Sausville EA, et al. The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. **Cancer Cell**. 10(2):133-43, 2006.

Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. **Blood**. 86(4):1276-80, 1995.

Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. **J Infect Dis**. 196(6):844-52, 2007.

Stein ME, Spencer D, Ruff P, Lakier R, MacPhail P, Bezwoda WR. Endemic African Kaposi's sarcoma: clinical and therapeutic implications. 10-year experience in the Johannesburg Hospital (1980-1990). **Oncology**. 51(1):63-9, 1994.

Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, Endo Y, Sasaki T, Simmons G, Boshoff C et al. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. **Blood**. 95(4):1151-7, 2000.

Swanton C, Mann DJ, Fleckenstein B, Neipel F, Peters G, Jones N. Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. **Nature**. 390(6656):184-7, 1997.

Taddeo A, Presicce P, Brambilla L, Bellinvia M, Villa ML, Della Bella S. Circulating endothelial progenitor cells are increased in patients with classic Kaposi's sarcoma. **J Invest Dermatol**. 128(8):2125-8, 2008.

Tejada BM, Steffen I, Cantero P, Posfay-Barbe KM, Irion O, Hirschel B, et al. Human herpes virus type 8 seroprevalence in pregnant women in Geneva, Switzerland. **J Matern Fetal Neonatal Med**. 24(1):183-5, 2011.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **Cancer J Clin**. 65(2):87-108, 2015.

Uldrick TS, Wang V, O'Mahony D, Aleman K, Wyvill KM, Marshall V, et al. An interleukin-6-related systemic inflammatory syndrome in patients co-infected with Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and HIV but without Multicentric Castlemann disease. **Clin Infect Dis**. 51(3):350-8, 2010.

Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P. Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta. **Virology**. 297(2):270-80, 2002.

Wang AY, Li PK, To KF, Lai FM, Lai KN. Coexistence of Kaposi's sarcoma and tuberculosis in a renal transplant recipient. **Transplantation**. 66(1):115-8, 1998.

Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles

a spliced variant of human survivin. **EMBO J.** 21(11):2602-15, 2002.

Wang S, Maeng H, Young DP, Prakash O, Fayad LE, Younes A, et al. K1 protein of human herpesvirus 8 suppresses lymphoma cell Fas-mediated apoptosis. **Blood.** 109(5):2174-82, 2007.

Wang L, Wakisaka N, Tomlinso CC, DeWire SM, Krall, S., Pagano JS, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors. **Can Res.** 64(8): 2774-81, 2004.

Weber KS, Gröne HJ, Röcken M, Klier C, Gu S, Wank R, et al. Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. **Eur J Immunol.** 31(8):2458-66, 2001.

Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. **Cancer Lett.** 289(2):140-50, 2010.

West J, Damania B. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. **J Virol.** 82(11):5440-9, 2008.

Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, 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. **J Virol.** 81(5):2401-17, 2007.

Zimring JC, Goodbourn S, Offermann MK. Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. **J Virol.** 72(1):701-7, 1998.

APÊNDICE A- EVALUATION OF IL-6, IL-10, CCL2 AND CXCL10 CYTOKINES SERUM LEVELS IN INDIVIDUALS WITH AIDS-RELATED KAPOSI'S SARCOMA

Thaísa Regina Rocha Lopes^a, Juliana Prado Gonçalves^a, José Valter Joaquim Silva Júnior^{b,c},
Virginia Maria Barros de Lorena^d, Ana Luiza Castro Conde Toscano^e, Sandra Mitie
Akamatsu^e, Angela Christina Salles^e, Tania Regina Tozetto-Mendoza^f, Viviane Martha Santos
de Moraes^a, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{a,g*}

^a Virology Sector, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of
Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Virology Sector, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of
Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

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

^d Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife,
Pernambuco, Brazil.

^e Institute of Infectology Emílio Ribas, São Paulo, Brazil.

^f LIM 52, Laboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine of Sao Paulo, University of
São Paulo, São Paulo, Brazil.

^g Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biosciences, Federal University of
Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

* Correspondence to: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho. Tel.: + 55 81 21268586. E-
mail: rcoelholika@gmail.com. Virology Section, Laboratory of Immunopathology Keizo

Asami, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária,
50.670-901, Recife, 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. It is suggested that the KS development is associated with imbalance of the immune system, such as the serum increase of cytokines involved in the inflammatory process. Here, we evaluated the IL-6, IL-10, CCL2 and CXCL10 levels in HIV mono- and HIV/HHV-8-coinfected individuals with and without KS, and correlated them with TCD4 lymphocyte counts. Serum IL-6 levels were higher in the HIV/HHV-8 (KS) group compared to the HIV monoinfected group ($p = 0.0380$) and HIV/HHV-8 coinfecting without KS ($p = 0.0210$). Similarly, IL-10 levels were higher in the KS group compared to the HIV ($p = 0.0403$) and HIV/HHV-8 ($p < 0.0001$) groups. CXCL10 had higher levels in the HIV/HHV-8 (KS) group compared to the HIV ($p = 0.0025$) and HIV/HHV-8 ($p = 0.0001$) individuals. The CCL2 levels were not different between the groups. TCD4 lymphocyte levels were significantly lower in the KS group compared to the other groups ($p < 0.0001$) and these had a correlation coefficient of $r = -0.4037$ ($p = 0.0120$) with IL-6 and $r = -0.4558$ ($p = 0.0040$) with CXCL10. Finally, the elevation of inflammatory cytokines and IL-10 in HIV/HHV-8 (KS) group possibly is related to the angiogenesis and suppression of the Th1 response profile, respectively.

Keywords: HIV/AIDS; HHV-8; Kaposi's sarcoma; Pathogenesis; Cytokines

1. Introduction

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8), *Herpesviridae* family and *Rhadinovirus* genus [1], is the etiologic agent of Kaposi's sarcoma (KS), one of the defining diseases of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and one of the most common cancers in people living with HIV/AIDS (PLHA) [2,3]. KS is a multifocal angioproliferative disorder of the vascular endothelium with four clinical forms: classic, endemic, iatrogenic and epidemic (AIDS-related) [4,5]. Among these, AIDS-related KS stands out as being more aggressive, often compromising several organs, ranging from respiratory failure to bleeding of the digestive system [5,6].

Despite the discussions about the greater severity of KS in PLHA, there is a consensus that only immunodeficiency caused by HIV would not be enough for the disease development [7]. HIV Tat protein, for instance, has been identified as one of the factors involved in the KS pathogenesis, activating the HHV-8 lytic cycle by the JAK/STAT signaling pathway either by the induction of the HHV-8 Rta protein [8,9]. In addition, studies *in vitro* suggest that high levels of inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α , may be related to the disease development, mainly due to its angiogenic function, which is necessary for the growth and maintenance of the tumor [10,11,12].

Although *in vitro* findings report the role of inflammatory cytokines in KS development, few studies have evaluated the cytokines levels in patients with the disease. Here, we evaluated the IL-6, IL-10, CCL2 and CXCL10 serum cytokines levels in HIV mono- and HIV/HHV-8-coinfected individuals with and without KS.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study included PLHA of both sexes, older than 18 years, treated in the Reference Service for Infectious and Parasitic Diseases of the University Hospital at the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), Institute of Infectology Emílio Ribas (IIER) and in the Department of Infectious and Parasitic Diseases at University of São Paulo Medical School (HCFM-USP).

Participants were separated into three groups: HIV-monoinfected (HIV), HIV/HHV-8-coinfected without KS (HIV/HHV-8) and HIV/HHV-8 with KS [HIV/HHV-8 (KS)]. Information about HIV viral load and TCD4 lymphocyte counts were obtained from patients' records. All participants were receiving antiretroviral therapy. The ethics committees of the institutions approved the study, process number 45156215.5.0000.5208 (HC-UFPE) and 55771116.0.1001.0065 (IIER, HCFM-USP).

2.2. Cytokine dosage

Serum concentrations of the IL-6, IL-10, CCL2 and CXCL10 cytokines were measured by flow cytometry through the *Cytometric Bead Array* (CBA) platform (BD Bioscience, San Diego, California, USA), following the manufacturer's instructions.

2.3 Statistical analysis

Cytokine concentrations and TCD4 lymphocyte counts were analyzed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The Spearman correlation test was used to analyze the correlation between TCD4 lymphocyte count and cytokine concentrations. The $p < 0.05$ value was considered as significant. Statistical analyzes were performed in the GraphPad Prism program v.6.0.

3. Results

3.1. Study population

A total of 146 PLHA with mean of 43.6 (± 11.8) years old participated of the study, of which 72.6% (106/146) were male. Among the total of patients, 31 were HIV-monoinfected, 77 HIV/HHV-8 and 38 HIV/HHV-8 (KS). The distribution of individuals according to the mean age and sex frequency are showed in Table 1.

Table 1. Distribution of study participants according to the mean age and sex frequency

	HIV n = 31	HIV/HHV-8 n = 77	HIV/HHV-8 (KS) n = 38
Age (years)	43.9 ($\pm 11.4^*$)	47.5 (± 10.3)	35.3 (± 10.8)
Sex			
Male	19 (61.3%)	50 (65%)	37 (97.4%)
Female	12 (38.7%)	27 (35%)	1 (2.6%)

*Standard deviation

The analysis of TCD4 lymphocyte counts showed that the median of the HIV/HHV-8 (KS) group, 110.5 cells /mm³, was significantly lower than the values of the HIV- and HIV/HHV-8-infected individuals, 782 and 635.5, cells/mm³, respectively ($p < 0.0001$). HIV viral load was undetectable in all patients from the HIV and HIV/HHV-8 groups and only in nine HIV/HHV-8 (KS) individuals. The 29 participants from the HIV/HHV-8 (KS) group with detectable HIV viral load had a median of 7.589 copies/mL.

3.2. Dosage and cytokine analysis

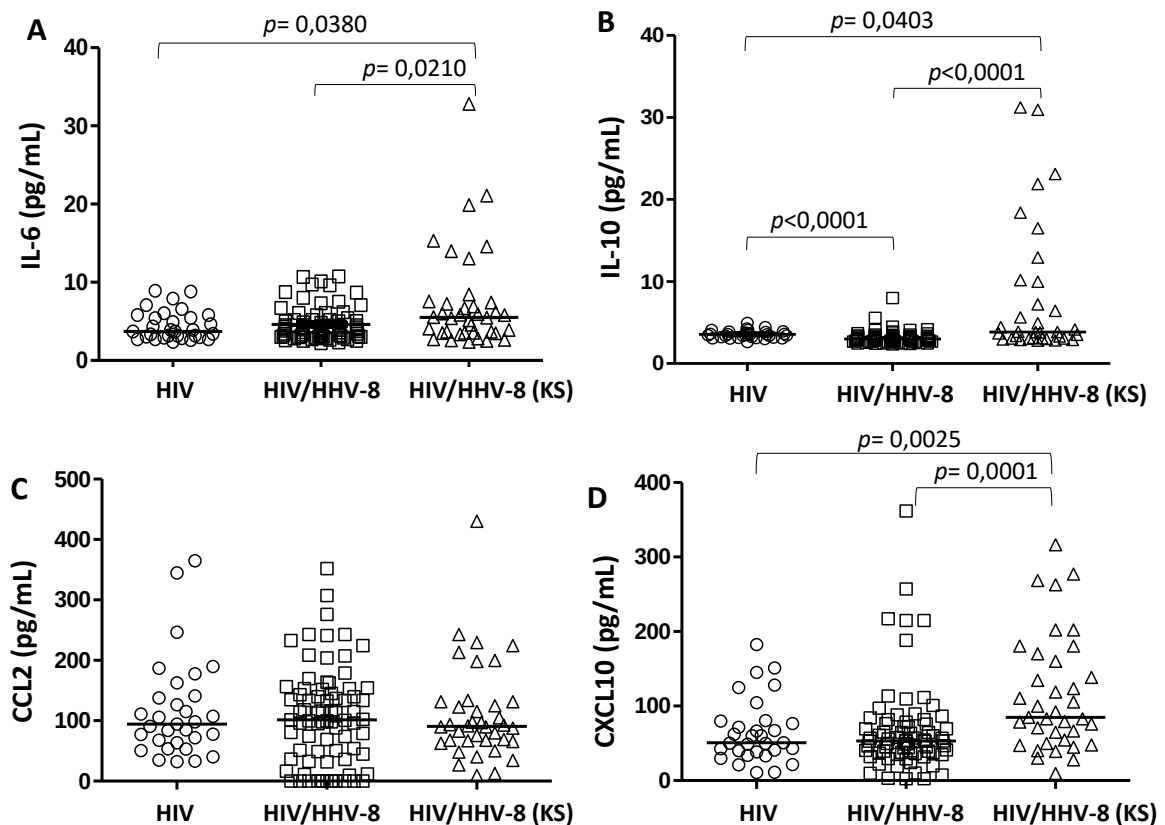
The medians of IL-6 serum levels for HIV, HIV/HHV-8 and HIV/HHV-8 (KS) groups were 3.710, 4.040 and 5.515 pg/mL, respectively. Comparing these values, it was observed that IL-6 levels were significantly higher into HIV/HHV-8 (KS) group than in the HIV ($p = 0.0380$) and HIV/HHV-8 ($p = 0.0210$) individuals (Fig. 1A).

Regarding IL-10 levels, the medians were 3.490, 2.980 and 4.005 pg/mL for HIV, HIV/HHV-8 and HIV/HHV-8 (KS) groups, respectively. In HIV/HHV-8 (KS) group, IL-10

levels were significantly higher in relation to the HIV ($p= 0.0403$) and HIV/HHV-8 ($p <0.0001$) groups. On the other hand, IL-10 levels in the HIV/HHV-8 group were significantly lower compared to HIV individuals ($p <0.0001$) (Fig. 1B).

In relation to chemokines, CCL2 levels did not present significant difference among the evaluated groups, and the medians values were 94.36, 101.5 and 90.56 pg/mL for HIV, HIV/HHV-8 and HIV/HHV-8 (KS) groups, respectively (Fig. 1C). Regarding CXCL10 levels, the medians were 50.69, 53.22 and 88.48 pg/mL for HIV, HIV/HHV-8 and HIV/HHV-8 (KS) groups, respectively. In HIV/HHV-8 (KS) group, CXCL10 levels were significantly higher compared to the HIV ($p= 0.0025$) and HIV/HHV-8 ($p= 0.0001$) individuals (Fig. 1D).

Figure 1. Serum concentrations of IL-6, IL-10, CCL2 and CXCL10 cytokines in HIV mono- and HIV/HHV-8-coinfected patients with and without Kaposi's sarcoma



p -values obtained by the Mann-Whitney test

When correlating TCD4 lymphocyte counts with cytokines, was observed the $r = -0.4037$ ($p = 0.0120$) correlation coefficient between TCD4 lymphocyte counts and IL-6 levels; and $r = -0.4558$ ($p = 0.0040$) between TCD4 lymphocyte counts and CXCL10 levels.

4. Discussion

Although KS is one of the most common cancers in PLHA, its pathogenesis is still unclear [3]. Among the mechanisms responsible for KS pathogenesis, *in vitro* studies have suggested that high levels of inflammatory cytokines may be related to KS development in HIV/HHV-8-coinfected individuals [11,12].

In our study, the high levels of IL-6 observed in HIV/HHV-8 (KS) group corroborate with the findings in KS spindle cells, which associated IL-6 secretion with tumor growth [13]. The relationship between IL-6 and KS growth would be associated with the angiogenic activity of this cytokine [12]. In addition, it has been demonstrated that the K15 viral protein, expressed during the lytic cycle of HHV-8, stimulates the secretion of IL-6 in HeLa cells [14]. Interestingly, elevated levels of IL-6 have been described in patients with multicentric Castleman's disease, also related to HHV-8 infection, and have been correlated with the disease severity [15].

We found high levels of CXCL10 in HIV/HHV-8 (KS) group, which corroborates the recent finding of increased expression of this chemokine in AIDS-related KS lesion samples [16]. The high expression of CXCL10, also seen in supernatant of THP-1 monocytes infected with HHV-8, may be associated with the activation of the toll-like receptor 3 pathway by HHV-8 [17]. After its secretion, CXCL10 can interact with the G protein coupled, encoded by HHV-8 and expressed on KS endothelial cells, stimulating endothelial cell migration and the angioproliferative process [18].

Different from our results, Lidenge et al. (2018) found higher levels of CXCL10 in the HIV/HHV-8 group when compared to HIV/HHV-8 (KS) individuals [19]. However, unlike our study population, some patients of the mentioned study had detectable HIV viral load. The disagreement between our results may be related to HIV viremia, which is known to influence the CXCL10 serum levels [20].

Despite *in vitro* observation of CCL2 secretion by KS spindle cells [21] and high transcription of the CCL2 gene into HHV-8-infected THP-1 monocytes [17], in our study there was no significant difference in CCL2 serum levels among HIV, HIV/HHV-8 and HIV/HHV-8 (KS) groups. In relation to these discordant findings, we believe that the development of *in vivo* models is important to provide new insights about the real participation of CCL2 in the KS pathogenesis.

Regarding IL-10, we showed high levels in HIV/HHV-8 (KS) group when compared with HIV and HIV/HHV-8 individuals. This finding corroborates with Lidenge et al. (2018), who found significantly higher levels of IL-10 in HIV/HHV-8 (KS) patients when compared to HIV/HHV-8 group [19]. Similarly, Machado et al. (2014) found higher concentrations of IL-10 in HIV/HHV-8 (KS) patients when compared to HIV-monoinfected individuals [22]. In this same study, it was also observed that IL-10 levels increased according to the degree of KS dissemination [22]. The serum increase of IL-10 probably favors the disease progression, since it suppresses production of cytokines by Th1 lymphocytes and reduces the cell-mediated response to HHV-8 [23].

In HIV/HHV-8 (KS) group, the significant decrease in TCD4 lymphocyte count is possibly related to immunosuppression caused by HIV [2,5]. Patients with KS usually have low TCD4 lymphocyte count and high HIV viral load [24]. In most patients, KS regresses simultaneously with increased TCD4 lymphocyte count and decreased HIV viral load [24,25]. Although significant, the correlation coefficient found between TCD4 lymphocyte counts and

IL-6 and CXCL10 cytokines may be considered moderate, indicating the need for further investigations.

Finally, despite the need for further *in vivo* studies for a better understanding of the cytokine-cell and virus-cell interactions in the KS pathogenesis, is possible to conclude that: a) high levels of IL-6 and CXCL10 cytokines in HIV/HHV-8 (KS) individuals may be associated with their angiogenic activities; b) further studies should evaluate the real *in vivo* CCL2 function; c) elevated IL-10 levels in HIV/HHV-8 (KS) individuals may be favoring the KS pathogenesis as a result of decreased cell-mediated immune response.

Conflicts of interest

All authors have no potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the study participants and to the professionals of Reference Service for Infectious and Parasitic Diseases of the University Hospital at the Federal University of Pernambuco. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for HealthPDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities. Lopes TRR and Gonçalves JP is supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) fellowships. Silva Júnior J.V.J. is supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

References

[1] ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. [cited 2018 Dec 10]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

- [2] Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ, Engels EA. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32 (5): 527-33.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65 (2): 87-108.
- [4] Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 2000; 342 (14): 1027-38.
- [5] Fatahzadeh M. Kaposi sarcoma: review and medical management update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113 (1): 2-16.
- [6] Ganem D. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 273-96.
- [7] Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001; 37 (10): 1251-69.
- [8] Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P. Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta. *Virology* 2002; 297 (2): 270-80.
- [9] Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, 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. *J Virol* 2007; 81 (5): 2401-17.
- [10] Ensoli B, Stürzl M, Monini P. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10 (5): 367-81.
- [11] Jensen KK, Lira SA. Chemokines and Kaposi's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 2004; 14 (3): 187-94.
- [12] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer* 2010; 10 (10): 707-19.

- [13] Miles SA, Rezai AR, Salazar-González JF, Vander MM, Stevens RH, Logan DM, et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 (11): 4068-72.
- [14] Brinkmann MM, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schulz TF. Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2007; 81 (1): 42-58.
- [15] Oksenhendler E, Carcelain G, Aoki Y, Boulanger E, Maillard A, Clauvel JP, et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castleman disease in HIV-infected patients. *Blood* 2000; 96 (6): 2069-73.
- [16] Tso FY, Kossenkova AV, Lidenge SJ, Ngalamika O, Ngowi JR, Mwaikelage J, et al. RNA-Seq of Kaposi's sarcoma reveals alterations in glucose and lipid metabolism. *PLoS Pathog* 2018; 14 (1): e1006844.
- [17] West J, Damania B. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. *J Virol* 2008; 82 (11): 5440-9.
- [18] Couty JP, Lupu-Meiri M, Oron Y, Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-G protein-coupled receptor-expressing endothelial cells exhibit reduced migration and stimulated chemotaxis by chemokine inverse agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329 (3): 1142-7.
- [19] Lidenge SJ, Tso FY, Ngalamika O, Ngowi JR, Mortazavi Y, Kwon EH, et al. Similar Immunological Profiles Between African Endemic and HIV1-associated Epidemic Kaposi's Sarcoma Patients Reveal the Primary Role of KSHV in KS Pathogenesis. *J Infect Dis* 2018.
- [20] Simmons RP, Scully EP, Groden EE, Arnold KB, Chang JJ, Lane K, et al. HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS* 2013; 27 (16): 2505-17.

- [21] Sciacca FL, Stürzl M, Bussolino F, Sironi M, Brandstetter H, Zietz C, et al. Expression of adhesion molecules, platelet-activating factor, and chemokines by Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 1994; 153 (10): 4816-25.
- [22] Machado PR, Farias KJ, Genre J, Oliveira CJ, Guedes PM, da Fonseca BA. Disseminated Kaposi's sarcoma in patients with HIV infection correlates to high serum levels of IL-10. *Viral Immunol* 2014; 27 (7): 356-60.
- [23] Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, Wang B, Feliciani C, Tulli A, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Ac Dermatol* 2004;50:657–675.
- [24] Stebbing J, Sanitt A, Nelson M, Powles T, Gazzard B, Bower M. A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2006; 367 (9521): 1495-502.
- [25] Gallafent JH, Buskin SE, De Turk PB, Aboulafia DM. Profile of patients with Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23 (6): 1253-60.

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	--

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 HIV-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 tem como objetivo 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. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (011) 2125-8888 E-mail: cepce@ufpe.br

ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP 
--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Tania Regina Tozetto Mendoza

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 55771116.0.1001.0055

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.470.526

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda para incluir 2 novos pesquisadores e solicitam a aprovação para adicionar testes para detectar níveis séricos de IL-6, IL-10, CCL-2 e CXCL-10, que são moléculas apontadas como marcadores no prognóstico de muitos tumores.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve alteração

Comparar os perfis de variantes da ORF K1 e de polimorfismos em regiões codificadoras de miRNA do Herpesvirus Humano do tipo 8 intra e inter indivíduos infectados por HIV com e sem Sarcoma de Kaposi.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

risco mínimo. As amostras já foram coletadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a única modificação foi a inclusão da detecção de citocinas que pode auxiliar na interpretação dos dados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não houve modificação.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	
Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.245-000
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3823-4401	E-mail: cep_fm@usp.br