

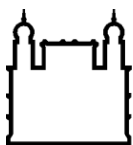
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Gammaherpesvírus humano 8* NO BRASIL E NO MUNDO

AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

**Rio de Janeiro
Março de 2021**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

Epidemiologia e diversidade genética do *Gammapherpesvírus humano 8* no Brasil e no mundo

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Ciência.**

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Março de 2021

de Oliveira Lopes, Amanda.

EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Gammaherpesvírus humano 8 NO BRASIL E NO MUNDO* / Amanda de Oliveira Lopes. - Rio de Janeiro, 2021.

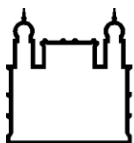
129 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Gammaherpesvírus humano 8. 2. Epidemiologia . 3. Diversidade genética. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

AUTOR: AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

**EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Gammapherpesvírus humano*
8 NO BRASIL E NO MUNDO**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: 29/03/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Luciane Almeida Amado Leon – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

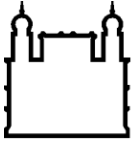
Prof. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (LIKA/UFPE)

Prof. Dr. Jorge Reis Almeida (LAMAP/UFF)

Prof. Dra. Paola Cristina Resende Silva (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Ivanildo Pedro de Souza Junior (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 29 de março de 2021



Ministério da Saúde


FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz




Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de Amanda de Oliveira Lopes, sob orientação da Dr^a. Vanessa Saete de Paula. Ao vigésimo nono dia do mês de março de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: "Epidemiologia e diversidade genética do Gammaherpesvírus humano 8 no Brasil e no mundo", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Luciane Almeida Amado Leon – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho– UFPE/PE, Dr. Jorge Reis Almeida – UFF/RJ, e como suplentes: Dr^a. Paola Cristina Resende Silva- IOC/FIOCRUZ e Dr. Ivanildo Pedro de Souza Junior - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de março de 2021.

Dr^a. Luciane Almeida Amado Leon (Presidente da Banca): 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: contatos@ioc.fiocruz.br Site: www.ioc.fiocruz.br

Dedico esta tese àqueles que necessitam desses conhecimentos para terem uma qualidade de vida mais digna e àqueles que podem fazer isso uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e, não podia ser diferente, agradeço a Deus, por ter me guiado até aqui. Nele pude encontrar forças para superar as dificuldades, que foram muitas ao longo desses anos de vida acadêmica. E com Ele eu sei que posso ir cada vez mais longe, em busca da saúde e do bem comum. Obrigada, Senhor, pelo seu amor incondicional!

Agradeço à minha família, minha mãe e irmão, que são pilares na minha vida, pelo amor e apoio. Essas palavras parecem tão simples e são, mas os significados são muito maiores do que a simplicidade delas. Foram tantas as atitudes e momentos que se resumem nisso, que guardarei comigo sempre. Minhas lutas também são por eles, e minhas vitórias também são para eles! Além deles, agradeço ao meu pai (*in memoriam*) que sei, que de onde estiver, está torcendo pelo meu sucesso! Carrego o meu amor por ele em forma de saudades. Obrigada por serem minha maior torcida! Meu amor por vocês é eterno!

À toda minha família, em especial à minha avó Yara e à minha madrinha Tâniapor todo o suporte, motivação e força para continuar seguindo os meus estudos e trabalho. Eles são meus maiores exemplos de luta, garra e persistência em busca de uma vida melhor. São meus exemplos de ética e humildade, e de amor ao próximo! Essa vitória também é para vocês! Amo todos vocês!

À Marcus Luna por ser um modelo de determinação, dedicação, responsabilidade e por sonhar grande junto comigo. Obrigada pelo apoio e positividade para a finalização do doutorado e por acreditar no meu potencial para continuar buscando mais por mim, por nós e por todos, mesmo quando eu mesma possa não ter acreditado por algum momento. Agradeço pelo seu amor e pela pessoa que és. O amo, muito!

Ao Daniel Moulin e família, por terem estado comigo desde o início da minha vida acadêmica me estimulando sempre a buscar pelos meus sonhos pessoais e profissionais. Muito obrigada por todo o amor traduzido em apoio fornecido a mim, que foi fundamental para que hoje eu pudesse estar concretizando mais esse sonho! Serei eternamente grata!

À todos os meus amigos, meu sincero e profundo agradecimento. Aos meus amigos de infância, amigos do colegial, amigos de faculdade, de laboratório, do mestrado e doutorado, amigos dos encontros da vida. Com eles

minha caminhada acadêmica se tornou mais leve e mais feliz! Amigos são anjos enviados por Deus parate ajudarem com o mais simples dos atos, como um sorriso. Eles nos fazem lembrar que a felicidade está no compartilhamento da existência! Obrigada por partilharem suas vidas comigo! Amo muito vocês!

Agradeço à minha chefe, orientadora e amiga Vanessa de Paula por esses 10anos de troca de experiência profissional e de vida. Além de uma grande líder, que incentiva e apoia sua equipe, é uma amiga para os mais diferentes momentos. Com ela amadureci como pessoa e a tenho como um grande exemplo de dedicação,de persistência e força, de amor, de ética, e de humildade. Muito obrigada por todos esses anos compartilhados, pela confiança, por todo o apoio, por todas as oportunidades, por lutar comigo e por fazer das minhas vitórias as suas também! Eu te amo muito!

À melhor equipe de laboratório que existe, meus colegas e amigas do Laboratório de Virologia Molecular! Compartilhamos o mesmo desejo de fazer pesquisa em prol de uma saúde de qualidade para todos! Com eles aprendi o real significado de equipe, que quando se trabalha em conjunto você nunca estará sozinho!E assim eu me senti no LVM, cercada de pessoas que eu podia contar, seja no profissional, ou até mesmo no pessoal. Essa conquista também é mais uma das muitas de nossa equipe! Obrigada por partilharem esse sonho comigo! Amo vocês!

As minhas amigas cientistas Andreza, Camilla, Sabrina e Karina, por serem exemplos para mim de determinação e persistência em busca de um futuro melhor para nós e em busca de uma Ciência que salva vidas. Muito obrigada por todo apoio durante minha jornada acadêmica, desde a iniciação científica, pelas colaborações e por fazerem parte da minha torcida e conquistas. Amo muito vocês!

Ao meu chefe e coorientador no período sanduíche, e amigo Christian Reis, por toda a confiança pelo meu trabalho e pessoa. Por me aceitar em sua equipe e me ajudar nessa rica troca de conhecimentos e experiências profissionais que tive nesse período. Por me lembrar nos momentos difíceis que pesquisa e ser um cientista requer ter fé e ser teimoso na busca de respostas, e que nunca devemos desistir diante das adversidades. Muito obrigada por ser um exemplo de profissional, mas principalmente de pessoa, que busca o melhor para o próximo, e não foi diferente comigo. Você tem minha sincera admiração!

Ao Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz Pernambuco, principalmente ao Departamento de Microbiologia e ao Departamento de Virologia e Terapia Experimental. Muito obrigada principalmente pela confiança, que através dela tive o apoio para trabalhar em uma das maiores Instituições de pesquisa científica do Brasil! Desde o pessoal da gestão/administração, à plataforma tecnológica e às equipes dos laboratórios, meu sincero agradecimento pela prontidão em ajudar! Os aprendizados que tive foram imensuráveis e me fizeram amadurecer como cientista e pessoa! Os levarei comigo sempre, pois agora fazem parte de mim!

Aos meus muitos colaboradores de diferentes Instituições, em especial Tania Tozetto-Mendoza (IMT/USP), que confiaram e acreditaram no projeto e no potencial do grupo, assim como em mim, para que juntos pudéssemos fazer mais. Muito obrigada por estarem sempre dispostos a contribuir, não somente para o desenvolvimento deste, mas também para minha formação profissional! Sou grata por ter tantos bons exemplos de profissionais que me estimulam a continuar buscando com garra e perseverança por uma Ciência de qualidade!

À Pós-graduação em Biologia Parasitária, por ter me proporcionado uma formação de excelência em Ciência que levarei comigo pelo resto da minha vida. Meu sincero agradecimento pela confiança e farei ainda mais jus a esse investimento para o país!

À Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz e ao Instituto Oswaldo Cruz/IOC pela oportunidade de fazer parte deste grande instituto de pesquisa científica e, assim, poder colaborar para a saúde pública e ciência brasileira! Ao longo desses anos pude confirmar com o IOC/Fiocruz que é possível fazer Ciência e de qualidade no Brasil quando se tem o amor e dedicação como força!

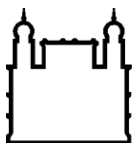
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ pelo auxílio financeiro e por resistirem as dificuldades geradas pela crise econômica do país durante esses anos, visando a permanência das instituições e, conseqüentemente, da Ciência brasileira!

À minha banca examinadora e à revisora Luciane Leon por terem aceitado o convite de participar da conclusão de mais uma etapa importante para mim! Muito obrigada!

E por fim, a todos, de um modo geral, que contribuíram para que essa tese

fosse desenvolvida, meu sincero agradecimento!

**“Se teu olho é bom, todo seu corpo se
encherá de luz.”
(Jesus Cristo)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

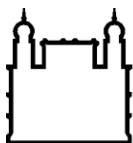
EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Gammaherpesvírus humano 8* NO BRASIL E NO MUNDO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Amanda de Oliveira Lopes

O *Gammaherpesvírus humano 8* (HHV-8) está associado a várias neoplasias que podem ocorrer em indivíduos infectados pelo *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV), como mulheres grávidas coinfetadas com HIV/HHV-8. Essas gestantes apresentam alto risco de desenvolvimento de neoplasias associadas, como sarcoma de Kaposi (SK), além de aumento da carga viral e transmissão vertical desses vírus. O HHV-8 consiste em seis clados principais (A-F) com base na sequência genética da fase de leitura aberta (ORF) K1. Esses clados exibem claro agrupamento entre indivíduos de diferentes grupos étnicos e de diferentes regiões geográficas. No entanto, existem relatos conflitantes sobre a distribuição global dos diferentes genótipos do HHV-8, incluindo as informações sobre os genótipos do HHV-8 que circulam atualmente no Brasil, país com população humana que varia muito na etnia. Os objetivos deste estudo foram (i) estimar a prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes portadoras de HIV no Rio de Janeiro, Brasil; (ii) caracterizar isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 e (iii) analisar as origens putativas desses isolados; e (iv) determinar a distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1. Como principais resultados, destacamos: (i) a baixa soroprevalência do HHV-8 em gestantes com HIV residentes no Brasil; (ii) a identificação dos genótipos A, B e C presentes em pacientes brasileiros com HIV/SK; (iii) a identificação das origens putativas desses isolados: os isolados de HHV-8/A parecem estar associados a vírus detectados da Ucrânia, Rússia e do grupo étnico tártaro; os isolados de HHV-8/B parecem estar associados a vírus detectados do Congo e da República Democrática do Congo; e os isolados de HHV-8/C parecem estar associados a vírus detectados da Austrália, Argélia, Inglaterra e Guiana Francesa; (iv) a descrição da distribuição global dos genótipos HHV-8, no qual os genótipos A e C estão presentes em todos os continentes, mas são altamente prevalentes na Europa e na África; o genótipo B é mais prevalente na África, mas também foi identificado na América Central e do Sul e na Europa; o genótipo D é raro e foi relatado no Leste Asiático e na Oceania; o genótipo incomum E foi identificado em populações ameríndias na América do Sul; e o genótipo F também é raro, mas foi identificado na África, América e Europa; e (v) a identificação do Brasil sendo o país com maior diversidade de genótipos de HHV-8 do mundo, apresentando cinco genótipos (A, B, C, E e F). Esses resultados fornecem novas informações sobre a epidemiologia e a diversidade do HHV-8 no Brasil e no mundo, fornecendo uma base para futuros estudos epidemiológicos e evolutivos do HHV-8.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGY AND GENETIC DIVERSITY OF *Human gammaherpesvirus 8* IN BRAZIL AND THE WORLD

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITIC BIOLOGY

Amanda de Oliveira Lopes

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) is associated with several neoplasias that may occur in individuals infected with *Human immunodeficiency virus* (HIV), such as pregnant women coinfecting with HIV/HHV-8. These pregnant women are at high risk of development of neoplasias, such as Kaposi's sarcoma (KS), increased viral load, and vertical transmission of these viruses. HHV-8 consists of six major clades (A-F) based on genetic sequence of open reading frame (ORF) K1. These clades exhibit clear clustering among individuals in different ethnic groups and from different geographic regions. However, there are few conflicting reports regarding the global distribution of the different HHV-8 genotypes, including the information about the HHV-8 genotypes currently circulating in Brazil, country with human population that varies greatly in ethnicity. The objectives of this study were (i) to estimate the prevalence of infection caused by HHV-8 in pregnant women with HIV in Rio de Janeiro, Brazil; (ii) to characterize HHV-8 isolates from HIV/KS patients residing in Brazil based on phylogenetic analysis of ORF K1 coding region and (iii) to analyze the putative origins of these isolates; and (iv) to determine the worldwide distribution of different HHV-8 genotypes based on the phylogenetic analysis of ORF K1 coding region. As main results, we highlight (i) the low seroprevalence of HHV-8 in pregnant women with HIV living in Brazil; (ii) the identification of genotypes A, B and C present in Brazilian patients with HIV/SK; (iii) the identification of putative origins of these isolates: HHV-8/A isolates appear to be from Ukraine, Russia and the Tartar ethnic group; the HHV-8/B isolates appear to be from Congo and the Democratic Republic of Congo; and the HHV-8/C isolates appear to be from Australia, Algeria, England and French Guiana; (iv) the description of global distribution of HHV-8 genotypes, which genotypes A and C are present on all continents, but highly prevalent in Europe and Africa; genotype B is more prevalent in Africa, but has also been identified in Central and South America and Europe; genotype D is rare and has been reported in East Asia and Oceania; the unusual genotype E has been identified in Amerindian populations in South America; and the F genotype is also rare, but has been identified in Africa, America and Europe; (v) the identification of country with the greatest genotypic diversity in the world founded in the Brazil, presenting five HHV-8 genotypes (A, B, C, E and F). These results provide new information on the epidemiology and diversity of HHV-8 in Brazil and in the world, providing a basis for future epidemiological and evolutionary studies of HHV-8.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos	vii
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
Índice	xiv
Índice de figuras	xvi
Lista de siglas e abreviaturas.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Gammapherpesvírus humano 8</i>.....	1
1.2. Morfologia e ciclo replicativo do HHV-8.....	2
1.3. Diversidade genética do HHV-8.....	7
1.4. Epidemiologia do HHV-8	10
1.5. Patologia associada ao HHV-8	12
1.6. Diagnóstico, tratamento e prevenção da infecção causada por HHV-8	15
1.7. Indivíduos coinfectados com HHV-8 e HIV	18
1.8. Justificativa.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Investigação da prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes infectadas com HIV no Brasil.....	23
3.1.1. <i>Artigo 1</i>.....	23
3.2. Caracterização de isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 e análise das origens putativas desses isolados de HHV-8 no país.....	29
3.2.1 <i>Artigo 2</i>.....	29

3.3. Determinação da distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1.....	54
3.3.1 Artigo 3.....	54
4. DISCUSSÃO	80
5. CONCLUSÕES	90
6. PERSPECTIVAS.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8. PRODUÇÃO COMPLEMENTAR	110
8.1. <i>Longitudinal study on oral shedding of human betaherpesviruses 6 and 7 in renal transplant recipients reveals active replication</i>	110
8.2. <i>Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV-positive patients.....</i>	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Partículas virais do HHV-8.....	2
Figura 2 - Elementos estruturais do HHV-8.....	2
Figura 3 - Entrada do HHV-8 nas células hospedeiras.....	3
Figura 4 - Ciclo de replicação do HHV-8.....	5
Figura 5 - Envelopamento e liberação das partículas virais.....	6
Figura 6 - Mapa genético do HHV-8	8
Figura 7 - Gene K1 de HHV-8.....	9
Figura 8 - Diversidade genotípica do HHV-8	9
Figura 9 - Soroprevalência de HHV-8.....	11
Figura 10 - Manifestações clínicas de Sarcoma de Kaposi.....	14
Figura 11 - Imunohistoquímica de LANA-1	16
Figura 12 - Imunofluorescência indireta (IFA).....	17

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácidos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês <i>Acquiredimmunodeficiency syndrome</i>
BCBL-1	Linfoma de células B de cavidades do corpo, do inglês <i>bodycavity based lymphoma</i>
C	Citosina
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD4+	Grupamento de diferenciação 4, do inglês <i>cluster ofdifferentation 4</i>
CI	Intervalo de confiança, do inglês <i>Confidence intervals</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos, do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>enzyme-linkedimmunosorben assay</i>
EUA/USA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America</i>
FAM	5(6)-carboxyfluorescein
FAPERJ	Fundação de amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMUSP	Faculdade de medicina da universidade de São Paulo
G	Guanina
GLOBOCAN	Observatório global do câncer, do inglês <i>Global câncer observatory</i>
HHV-8	<i>Gammaherpesvírus humano 8</i> , do inglês <i>Humangammaherpesvirus 8</i>
HIV	<i>Vírus da imunodeficiência humana</i> , do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
HIV-1	<i>Vírus da imunodeficiência humana 1</i> , do inglês <i>Human immunodeficiency vírus 1</i>

HSH	Homens que fazem sexo com homens
ICHHC	Instituto central do hospital das clínicas
ICTV	Comitê internacional de taxonomia dos vírus, do inglês <i>International comitee for viruses taxonomy</i>
IFA	Ensaio de imunofluorescência indireta, do inglês <i>indirect immunofluorescence assay</i>
INI	Instituto nacional de infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITAM	Motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina, do inglês <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Ka	Kiloannum (um milênio)
kb	Quilobase
KSHV	Vírus associado ao sarcoma de Kaposi, do inglês <i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LANA-1	Antígeno nuclear associado a latência 1, do inglês <i>latency-associated nuclear antigen 1</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
mRNA	RNA mensageiro
n/N/No	Número
NCBI	<i>National center for biotechnology information search database</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta, do inglês <i>open reading frame</i>
Pb/bp	Pares de bases, do inglês <i>base pairs</i>
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polimerase chain reaction</i>
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos

paraSaúde

pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês <i>Real time polimerase chain reaction</i>
RJ	Estado do Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>Standard deviation</i> SK/KS Sarcoma de Kaposi, do inglês <i>Kaposi's Sarcoma</i> SP Estado de São Paulo
TPA	Acetato de éster de forboltetradecanoil ou <i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TR	Regiões terminais, do inglês <i>terminal regions</i>
U	Unidade
UV	Ultravioleta
VR1	Região variável 1, do inglês <i>variable region 1</i>
VR2	Região variável 2, do inglês <i>variable region 2</i>
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Gammapesvívirus humano 8*

O *Gammapesvívirus humano 8* (HHV-8), também conhecido como vírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), é membro da família *Herpesviridae* (que contém vírus de mamíferos, aves e répteis) e é um dos nove herpesvírus que infectam humanos. O HHV-8 pertence ao gênero *Rhadinovirus* da subfamília *Gammapesvirinae*, subfamília esta que também inclui o *Gammapesvívirus humano 4* conhecido como vírus Epstein Barr. Essa subfamília tem como principais características causarem infecções latentes nas células linfóides (ICTV, 2019).

O HHV-8 foi identificado em 1994 por Chang e colaboradores, que identificaramo DNA de HHV-8 em biópsias de sarcoma de Kaposi (SK) de pessoas infectadas com

o *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) que apresentavam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Chang *et al.*, 1994).

Desde então, o HHV-8 foi associado a um amplo espectro de neoplasias malignas reconhecidas pela Organização Mundial de saúde, como todas as formas deSK, linfoma de derrame primário, doença de Castleman multicêntrica, linfoma difuso de grandes células B e distúrbio linfoproliferativo germinotrópico. Outras doenças vêm sendo associadas ao HHV-8 e incluem: hiperplasia linfóide reativa HHV- 8-positiva, proliferação plasmablástica da polpa vermelha esplênica, insuficiência da medula óssea em pacientes imunossuprimidos após o transplante e síndrome de citocinas inflamatórias (Chang *et al.*, 1994; Vega, Miranda e Medeiros, 2020).

Na figura 1 pode-se observar uma microscopia eletrônica evidenciando a presença de partículas virais do HHV-8 em biópsia de SK.

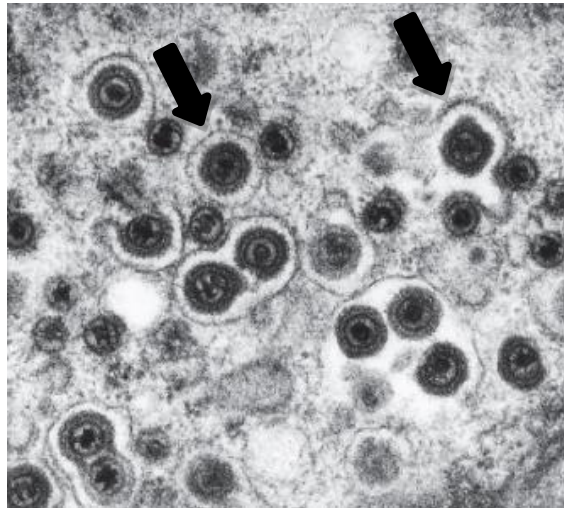


Figura 1. Partículas virais do HHV-8. Algumas partículas virais são evidenciadas por setas (preto). Microscopia eletrônica de um corte transversal de um SK do baço. Ampliação original:53 000x. Fonte: (Orenstein *et al.*, 1997)

1.2. Morfologia e ciclo replicativo do HHV-8

O HHV-8 possui 120-150 nm de diâmetro e consiste em três elementos estruturais distintos: a) o nucléocapsídeo, contendo o capsídeo icosaédrico e o DNA viral de fita dupla linear em seu interior; b) o envelope, bicamada lipídica derivada do hospedeiro contendo as glicoproteínas virais; e c) o tegumento, conjunto de proteínas e RNAs virais que ocupam o espaço entre o nucléocapsídeo e o envelope (Figura 2) (Li *et al.*, 2017; Dollery, 2019).

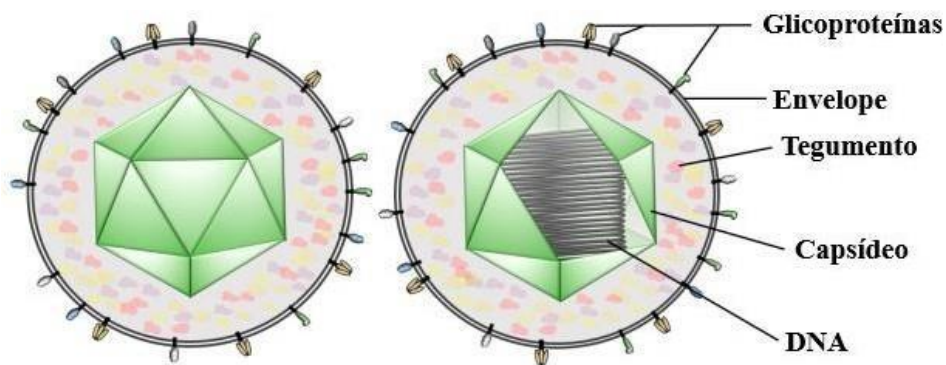


Figura 2. Elementos estruturais do HHV-8. Desenho esquemático evidenciando um vírion do HHV-8 e suas estruturas. As glicoproteínas virais, o envelope lipídico, o tegumento, o capsídeo e o DNA são indicados. À direita, o capsídeo é representado com uma seção em corte para revelar o genoma de DNA em seu interior. Adaptado de fonte: (Dollery, 2019)

As glicoproteínas do envelope viral são responsáveis pelas interações iniciais e entrada do HHV-8 nas células hospedeiras (Dollery, 2019). O HHV-8 apresenta diversas glicoproteínas que são responsáveis pelo seu vasto tropismo celular. Assim, o HHV-8 pode infectar células endoteliais humanas, epiteliais, queratinócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células de fibroblastos e vários tipos de células animais (Li *et al.*, 2017; Dollery, 2019).

As glicoproteínas inicialmente se ligam às células-alvo de uma maneira não específica através de múltiplas interações com receptores da superfície celular, facilitando a fixação viral e concentrando vírions na superfície da célula. Uma vez que os vírions se ligam à célula, as glicoproteínas virais ficam suficientemente próximas às moléculas específicas que funcionam como receptores para a endocitose da partícula viral. Após o início da endocitose e a diminuição do pH da vesícula endocítica, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana endocítica (pH dependente), permitindo a entrega do nucleocapsídeo e moléculas do tegumento no citoplasma (Figura 3) (Connolly *et al.*, 2011; Dollery, 2019).

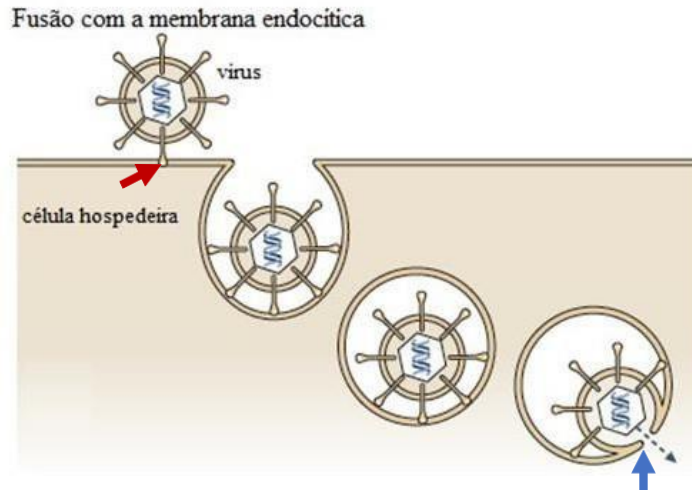


Figura 3. Entrada do HHV-8 nas células hospedeiras. Desenho esquemático mostrando o mecanismo de entrada do HHV-8 na célula hospedeira por fusão com a membrana endocítica. Seta vermelha indica a fixação do vírus na célula hospedeira. Seta azul indica a fusão do envelope viral com a membrana endocítica. Adaptado de fonte: (Connolly *et al.*, 2011; Dollery, 2019)

As proteínas do tegumento realizam as primeiras fases de replicação, também chamada de fase lítica, incluindo cessar a síntese de proteínas da célula hospedeira e ativar os genes virais. Por meio do sistema de microtúbulos, o núcleocapsídeo é levado em direção à membrana nuclear e é desmontado liberando o DNA viral no interior do núcleo (Johnson e Baines, 2011). A partir de então, inicia-se o processo de replicação viral no núcleo, com a expressão de genes imediatamente iniciais, que codificam proteínas relacionadas à regulação gênica das próximas etapas de transcrição. Após isso, são expressos genes precoces, que, por sua vez, codificam proteínas relacionadas à replicação do DNA viral. Os últimos a serem expressos são os genes tardios, os quais codificam as proteínas estruturais, ou seja, as proteínas que formam o capsídeo, o tegumento e o envelope (glicoproteínas) (Yan *et al.*, 2019)(Figura 4).

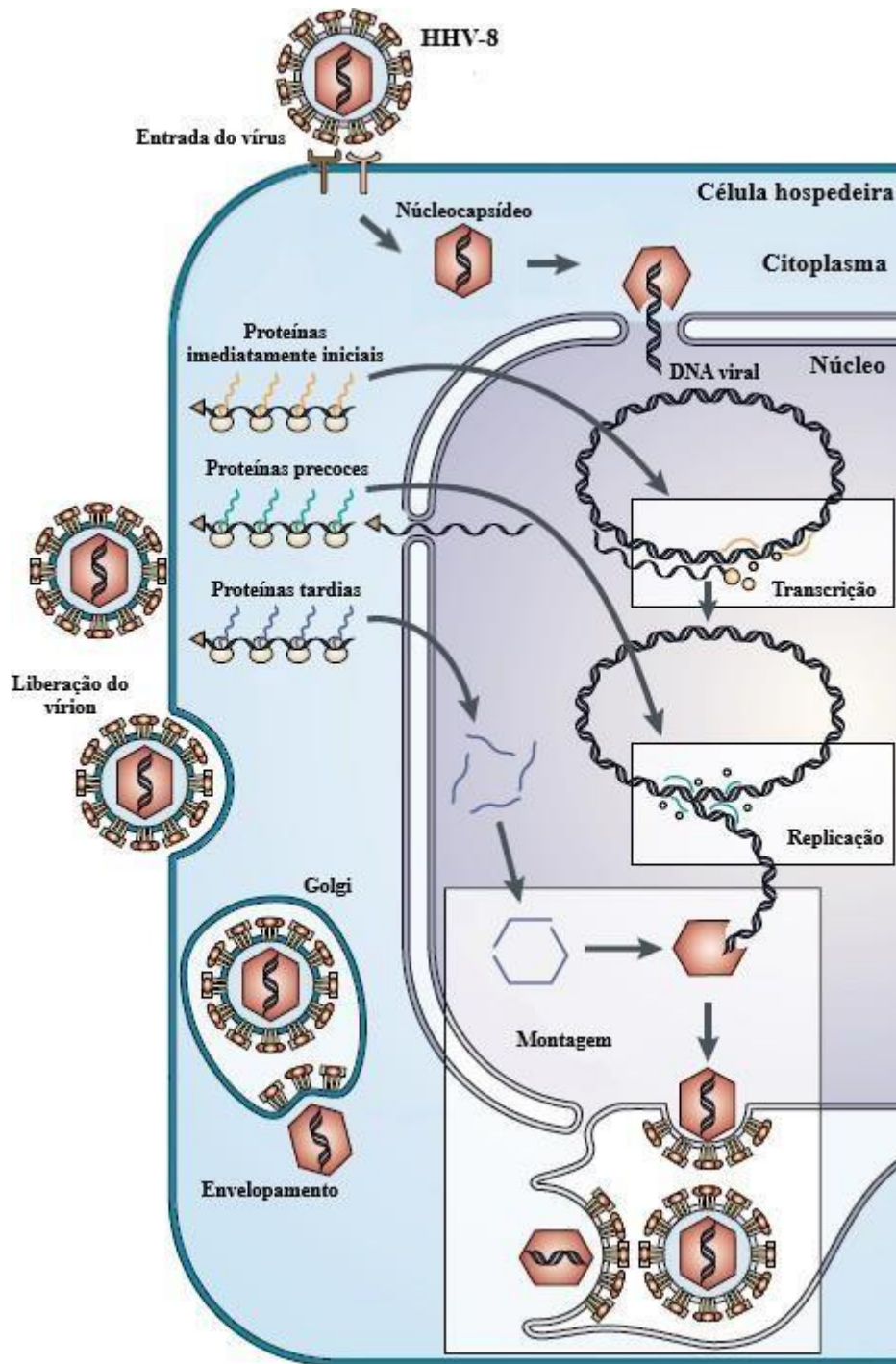


Figura 4. Ciclo de replicação do HHV-8. Após a entrada do vírus, liberando o núcleocapsídeo e proteínas do tegumento no citoplasma da célula hospedeira, ocorre a migração do núcleocapsídeo e a liberação do DNA viral no núcleo. Verifica-se, então, o processo de replicação viral com a transcrição dos genes virais, que codificam as proteínas imediatamente iniciais (amarelo), precoces (verde) e tardias (azul). Após a replicação do genoma viral, ocorre a montagem do núcleocapsídeo, com a encapsidação do DNA viral, e o brotamento do núcleocapsídeo pelas membranas nucleares. Posteriormente este é envelopado e liberado da célula hospedeira através de vesículas do complexo de Golgi. Adaptado de fonte: (Coen e Schaffer, 2003)

Depois que todas as classes de genes líticos são expressas e uma quantidade suficiente de proteínas tardias está disponível, a montagem do vírus começa no núcleo: o DNA viral é empacotado para formar o nucleocapsídeo revestido por uma camada de proteínas que formam o tegumento (Johnson e Baines, 2011; Yan *et al.*, 2019). Uma vez formados, os vírus realizam o brotamento através da membrana nuclear, e são liberados para o citoplasma da célula hospedeira (Johnson e Baines, 2011).

No citoplasma, os vírus são submetidos ao envelopamento por membranas do complexo de Golgi ou em endossomas, produzindo partículas virais infecciosas no interior dessas vesículas celulares, com glicoproteínas virais específicas na superfície dos seus envelopes. Estas vesículas citoplasmáticas transportam as partículas virais até a membrana celular, onde se fundem liberando a progênie viral da célula (Johnson e Baines, 2011) (Figura 5).

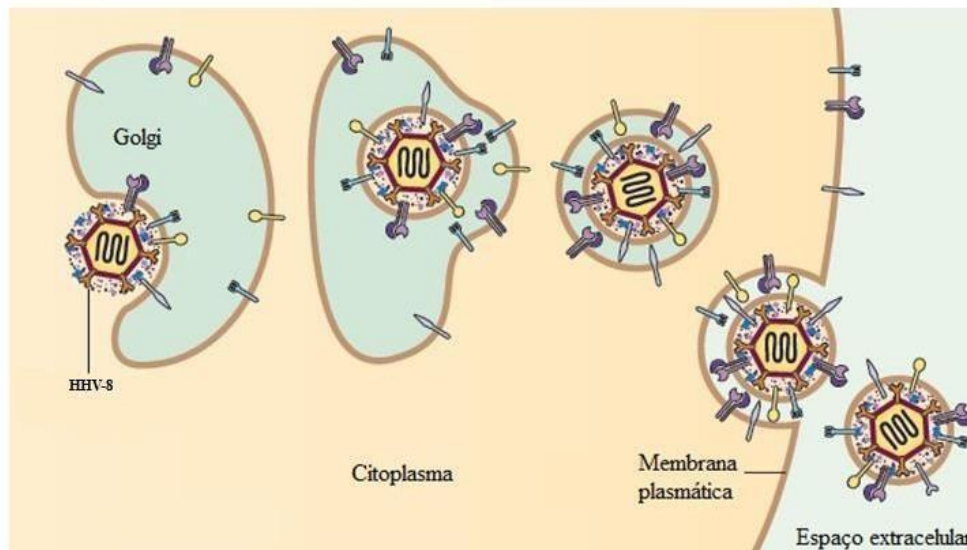


Figura 5. Envelopamento e liberação das partículas virais. No citoplasma da célula hospedeira, o HHV-8 é envelopado por membranas citoplasmáticas e, posteriormente, é secretado desta célula hospedeira. Adaptado de fonte: (Johnson e Baines, 2011)

Após a fase lítica, o HHV-8 estabelece infecção latente com o genoma viral persistindo nas células infectadas, fazendo com que o HHV-8 possa permanecer por toda a vida do hospedeiro. Nesta fase, o DNA viral se circulariza (episomal), para a supressão ou silenciamento da expressão dos genes líticos, e se liga ao DNA celular, para ser replicado simultaneamente com o DNA celular e ser precisamente passado para células filhas. Assim, na fase latente apenas uma

pequena porção do genoma HHV-8 é transcrita, como exemplo o gene que codifica a proteína LANA-1 (antígeno nuclear associado a latência 1), proteína mais abundante em células infectadas de forma latente, e que se liga a vários promotores líticos virais para inibir a transcrição de genes líticos. Entretanto, estudos recentes mostram que pode ocorrer um certo grau de expressão desses genes de fase lítica durante a infecção latente (Yan *et al.*, 2019).

O estado latente da infecção por HHV-8 pode ser interrompido por fatores fisiológicos ou um estímulo exógeno (estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e imunossupressão) (Perng e Jones, 2010). Assim, o vírus inicia a reativação lítica, expressando consecutivamente os genes líticos (genes imediatos, iniciais e tardios) resultando na produção de vírions para infectar outras células suscetíveis e para a transmissão a um novo hospedeiro (Yan *et al.*, 2019). Entretanto, essa reativação da latência pode resultar em doença, devido a uma combinação dos danos celulares e teciduais causados diretamente pela elevada replicação lítica do vírus, além das respostas imunológicas à replicação lítica reativada (Le, Gantt e Practice, 2013).

1.3. Diversidade genética do HHV-8

Como material genético, o HHV-8 apresenta uma dupla fita de DNA a qual se encontra linearmente dentro da partícula, com cerca de 165-170 kb. O genoma compreende uma região codificadora central única de aproximadamente 145 kb e duas repetições terminais altamente ricas em GC (TRs) de aproximadamente 30 kb (Figura 6) (Yan *et al.*, 2019).

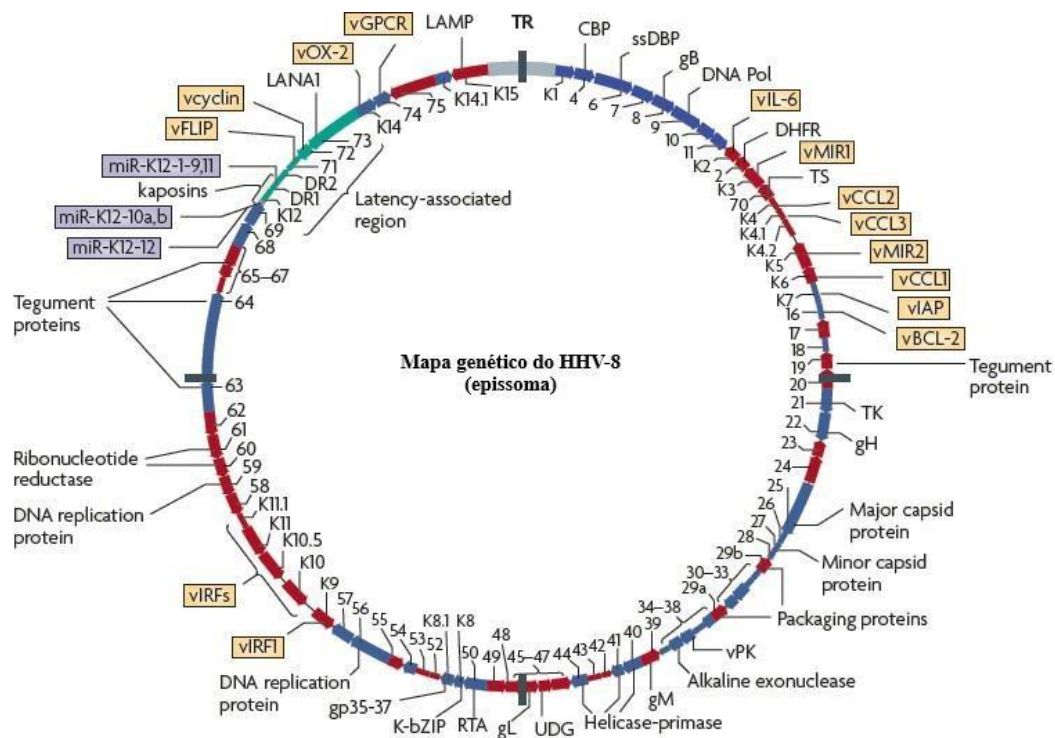


Figura 6. Mapa genético do HHV-8. Esquema evidenciando o mapa genético do HHV-8 na forma de epissoma (DNA circular de cadeia dupla formada após infecção celular). As ORFs que codificam proteínas da fase lítica (setas azuis e vermelhas) e da fase latente (setas verdes), os microRNAs (quadros roxos), ortólogos celulares (quadro amarelo) e demais proteínas codificadas são indicados na figura. Adaptado de fonte: (Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010)

O HHV-8 codifica 87 ORFs que têm papéis múltiplos na infecção viral (Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010). Algumas dessas ORFs também são comuns a outros herpesvírus, enquanto outras, designados com o prefixo K (K1-K15), são específicos do HHV-8 (Vega, Miranda e Medeiros, 2020).

A ORF K1 codifica uma glicoproteína transmembranar, chamada K1, possuindo um domínio extracelular, que demonstra uma homologia com a família de imunoglobulina, um domínio transmembranar, e uma cauda citoplasmática curta contendo um motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) (Tamanaha-Nakasone *et al.*, 2019; Choiet *al.*, 2020). K1 é expressa em células infectadas e está associada ao desenvolvimento de tumor (Cordiali-Fei *et al.*, 2015) inibindo a apoptose, promovendo a sobrevivência celular e produzindo citocinas inflamatórias e fatores pró-angiogênicos (Choi *et al.*, 2020).

Apesar de ser de amplo conhecimento que os genótipos A, B e C apresentam uma maior distribuição mundial, e que os genótipos D, E e F são mais identificados em grupos étnicos e geográficos específicos, a distribuição desses genótipos no mundo ainda não é tão clara. Os poucos estudos de genotipagem de HHV-8 muitas vezes estão desatualizados havendo confusão quanto a essas informações (Isaacs *et al.*, 2016; Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016; Pérez e Tous, 2017).

Alguns autores propuseram que possivelmente a diversidade e distribuição genotípica do HHV-8 ocorrem em conjunto com as migrações humanas contemporâneas. Assim, estes sugeriram, por exemplo, que o genótipo B, o mais ancestral (Figura 8), tenha surgido a 100 mil anos atrás e se divergiu conforme as migrações do homem moderno, dando origem aos demais genótipos identificados até o momento (Hayward, 1999; Zong *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2002). Entretanto, essas informações estão desatualizadas, uma vez que recentes estudos sobre migrações dos humanos contemporâneos foram realizados trazendo novas informações sobre o assunto (Bae, Douka e Petraglia, 2017; Chan *et al.*, 2019; Rito *et al.*, 2019).

No Brasil são poucos os estudos sobre a diversidade do HHV-8. Após genotipagem de HHV-8 baseado na região codificante da ORF K1, Tozetto-Mendoza e colaboradores identificaram no estado de São Paulo a circulação dos genótipos A, B e C em pacientes sem SK ativo, infectados com HIV/AIDS, e, além desses genótipos, o genótipo F também foi identificado em pacientes com SK com HIV/AIDS (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016). Além deste estudo, Biggar *et al.* detectaram o genótipo E, um novo genótipo de HHV-8 relatado e hiperendêmico em ameríndios brasileiros no Norte do país (Biggar *et al.*, 2000). Apesar dessa alta diversidade genotípica do HHV-8 identificada no Brasil a origem desses genótipos no país não foi investigada.

1.4. Epidemiologia do HHV-8

A soroprevalência de HHV-8 varia muito no mundo e, de acordo com estudos com população em geral, a soroprevalência de HHV-8 é mais alta na África Subsaariana, onde em algumas populações a soroprevalência em adultos é maior que 90%. No Mediterrâneo, a soroprevalência é de 20-30%, e no norte da Europa, Ásia e EUA, a soroprevalência é menor que 10%. No Brasil, a taxa de

soroprevalência de HHV-8 normalmente é relatada como sendo baixa, variando de 1-5% (Cesarman *et al.*, 2019) (Figura 9).

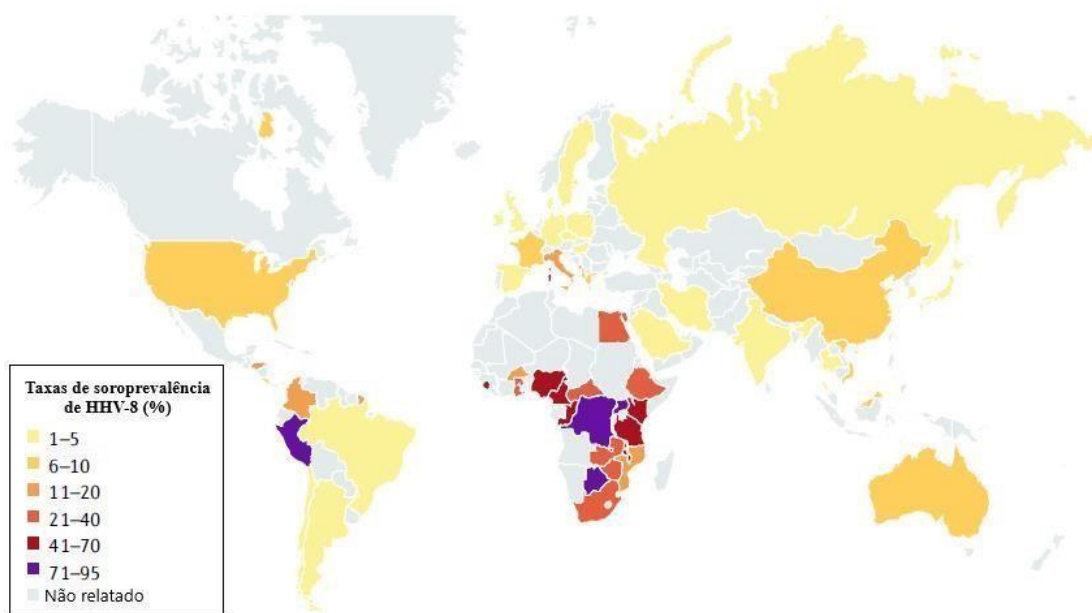


Figura 9. Soroprevalência de HHV-8. As taxas de soroprevalência foram compiladas a partir de vários estudos. Os valores representam a população em geral. A soroprevalência da infecção causada por HHV-8 no norte da Europa, Ásia e EUA é menor que 10%, mas na maior parte da África Subsaariana, a soroprevalência geral é superior a 40%. A região mediterrânea (ou seja, Itália, Sicília e Sardenha) tem taxas de soroprevalência intermediárias de 10–30%. Adaptado de fonte: (Cesarman *et al.*, 2019)

As razões para a variação geográfica na soroprevalência de HHV-8 não são claras, mas há algumas evidências de que fatores ambientais, como a coinfeção com malária e outras infecções parasitárias, podem aumentar a liberação de HHV-8 na saliva, aumentando assim as taxas de transmissão deste vírus (Cesarman *et al.*, 2019). Além disso, essa variação na soroprevalência pode estar relacionada às rotas específicas de transmissão do HHV-8 nas diferentes regiões geográficas. Em áreas altamente endêmicas onde a infecção é adquirida na infância, o compartilhamento de saliva através de práticas como a pré-mastigação de alimentos para bebês, compartilhamento de doces entre crianças e compartilhamento de escovas de dentes, podem ser rotas específicas de transmissão de HHV-8 nessas regiões. Entretanto, estas vias ainda não são muito bem compreendidas (Cesarman *et al.*, 2019). Outros fatores, como fatores genéticos do vírus e hospedeiro podem estar envolvidos nessa soroprevalência não ubíqua do HHV-8 no mundo (Liu *et al.*, 2018). O *pool* genético limitado em

grupos isolados, como em populações hiperendêmicas para a infecção causada por HHV-8, em alguns grupos de ameríndios brasileiros por exemplo, pode permitir a transmissão mais frequente de um vírus com baixa prevalência em populações heterogêneas (Biggar *et al.*, 2000).

A soroprevalência de HHV-8 também se apresenta maior em grupos como emportadores do HIV (Miller *et al.*, 2006; de França *et al.*, 2011) provavelmente devido a essa coinfeção. A Turquia e Índia apresentaram taxas intermediárias de soroprevalência de HHV-8 neste grupo (25,4% e 26,06%, respectivamente) (Munawwar *et al.*, 2014; Altuğlu *et al.*, 2016). Já outros países, como EUA, China e países Africanos (Camarões e Nigéria) exibiram altas taxas de soroprevalência de HHV-8 em indivíduos infectados com HIV, variando de 38,1% a 62% (Ogoina *et al.*, 2011; Mbondji-Wonje *et al.*, 2013; Labo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

O Brasil apresenta soroprevalência de infecção causada por HHV-8 em portadores de HIV variando de 13,9% a 30% (Pierrotti *et al.*, 2005; de Souza *et al.*, 2007; Ishak *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2009; Magri *et al.*, 2009 Machado *et al.*, 2015; Cahú *et al.*, 2016).

Além disso, apesar dos poucos estudos publicados, sabe-se que a soroprevalência do HHV-8 no grupo de gestantes infectadas pelo HIV varia de 1,7% a 80,7% no mundo, sendo as maiores taxas encontradas em países endêmicos (Rohner *et al.*, 2016). No Brasil essa informação é desconhecida.

1.5. Patologia associada ao HHV-8

O HHV-8 pode ser detectado em diferentes fluidos corporais, principalmente nasaliva (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016), que contém um elevado número de cópias virais em indivíduos infectados com HHV-8. Sendo assim, a principal via de transmissão deste herpesvírus é através da saliva (Katano, 2018) e acredita-se ser a principal rota de transmissão em regiões endêmicas para a infecção por HHV-8, uma vez que a detecção deste herpes é observada em crianças (possivelmente pelos contatos com membros da família infectados com HHV-8 na infância, principalmente o contato materno) (Li *et al.*, 2017; Katano, 2018).

O HHV-8 também pode ser transmitido através de secreções genitais, sendo a transmissão sexual a principal rota de transmissão em regiões não endêmicas para a infecção por HHV-8 (Li *et al.*, 2017). Já a via de transmissão

vertical do HHV-8 pode ocorrer na gravidez, durante o parto vaginal, com a exposição do HHV-8 ao recém-nascido pelas secreções cervicovaginais (Mantina *et al.*, 2001; Lisco *et al.*, 2006), e também através da ingestão de leite materno contendo partículas infecciosas deste vírus (Li *et al.*, 2017).

Além destas, a transmissão do HHV-8 também pode ocorrer através de transfusão de sangue e por transplante de órgãos (não há diretrizes formais para a triagem clínica de bolsas de sangue e de pacientes transplantados de órgãos) (Li *et al.*, 2017; Katano, 2018).

A primo-infecção causada por HHV-8 ocorre com frequência durante a primeira infância nas zonas de alta prevalência. Já em áreas de baixa prevalência, a primeira infecção ocorre com maior frequência a partir da adolescência e em jovens adultos (Blauvelt *et al.*, 1997; Mayama *et al.*, 1998; Le, Gantt e Practice, 2013). Além disso, a primeira infecção vem sendo descrita, quando sintomática, como tendo uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa (Blauvelt, 2001), com erupção cutânea maculopapular febril, artralgia e linfadenopatia (Katano, 2018).

Após a infecção, o vírus estabelece latência em seu hospedeiro, principalmente em linfócitos B, podendo ser reativado (Damania e Cesarman, 2013). Na célula hospedeira, o HHV-8 sintetiza proteínas que estão associadas a transformação celular e evasão do sistema imune do hospedeiro (Katano, 2018). Sendo assim, o HHV-8 está associado a diferentes neoplasias malignas como sarcoma de Kaposi (SK), linfoma de derrame primário ou linfoma primário de efusão, doença de Castleman multicêntrica, linfoma difuso de grandes células B e distúrbio linfoproliferativo germinotrópico (Katano, 2018; Vega, Miranda e Medeiros, 2020).

Além destas, outras doenças estão sendo amplamente aceitas como doenças relacionadas ao HHV-8 como hiperplasia linfoide reativa HHV-8-positiva, proliferação plasmablastica da polpa vermelha esplênica, insuficiência da medula óssea em pacientes imunossuprimidos após o transplante e síndrome de citocinas inflamatórias (Vega, Miranda e Medeiros, 2020).

Dentre essas doenças, o SK foi a primeira neoplasia maligna associada ao HHV-8 e é a mais amplamente estudada (Li *et al.*, 2017; Cesarman *et al.*, 2019). De acordo com dados atuais, o SK continua a ser a neoplasia mais comum observada em indivíduos que vivem com HIV de ambos os sexos (Dittmer e

Damania, 2019), com incidência mundial de 481,54 por 100.000 pessoas/ano (Liu *et al.*, 2018).

O SK foi inicialmente descrito pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi em 1872 (Li *et al.*, 2017; Cesarman *et al.*, 2019) e é caracterizada normalmente por lesões cutâneas disseminadas e pigmentadas, envolvendo grandes áreas da superfície do corpo, às vezes de forma simétrica, com uma aparência característica que varia do rosa ao roxo ou marrom e muitas vezes associada com envolvimento visceral (trato gastrointestinal, pulmões e linfonodos) (Martellotta *et al.*, 2009; La Ferla *et al.*, 2013). Na figura 10 pode-se observar algumas das manifestações clínicas associadas ao SK.



Figura 10. Manifestações clínicas de sarcoma de Kaposi. As diferentes manifestações do SK incluem (a) lesões maculares nas costas e nódulos no braço; (b) placas extensas de SK nas pernas com edema associado ao tumor; (c) lesões exofíticas de SK no pé; (d) nódulos de SK gengivais extensos; e (e) lesões violáceas planas no palato duro. A imagem na parte c é de um paciente com SK clássico; todas as outras imagens são de pacientes com SK relacionado à AIDS. Fonte: (Cesarman *et al.*, 2019)

Quatro formas epidemiológicas principais de SK são amplamente reconhecidas: SK clássico, SK endêmico, SK iatrogênico e SK relacionado à AIDS. O SK clássico ocorre principalmente em homens idosos de ascendência mediterrânea ou judaica e geralmente mostra um curso clínico indolente e prolongado, afetando principalmente a pele das pernas (Cesarman *et al.*, 2019). O SK endêmico, que é mais agressivo do que o SK clássico (Li *et al.*, 2017), foi descrito pela primeira vez na região da África subsaariana na década de 1940

(Cesarman *et al.*, 2019). O SK iatrogênico foi identificado entre pacientes imunossuprimidos, como em receptores de transplantes de órgãos. O SK relacionado à AIDS, a forma mais comum, apareceu de maneira robusta junto com a pandemia de HIV. Os sintomas do SK variam, desde indolência a tumores altamente agressivos, levando a morbidade e mortalidades significativas (Li *et al.*, 2017). Além disso, muitos casos de SK foram relatados em homens que fazem sexo com homens (HSH) sem infecção por HIV, e este SK está sendo cada vez mais reconhecido como uma possível quinta forma distinta de SK (Cesarman *et al.*, 2019).

Sabe-se que uma combinação de infecção por HHV-8 e imunidade do hospedeiro comprometida pode causar SK. O SK relacionado à AIDS e o SK iatrogênico estão associados a imunodeficiência bem definida (imunodeprimidos e imunossuprimidos, respectivamente). Atualmente a incidência de SK é relatada ~200 vezes maior em receptores de transplantes de órgãos sólidos (SK iatrogênica) do que na população em geral. Já a função imunológica prejudicada no SK clássico deve estar relacionada à 'imunosenescência'; ou seja, um sistema imunológico em envelhecimento; e a função imunológica prejudicada no SK endêmico deve estar relacionada a uma infecção crônica e desnutrição (Cesarman *et al.*, 2019).

1.6. Diagnóstico, tratamento e prevenção da infecção causada por HHV-8

O diagnóstico do HHV-8, assim como em outros herpesvírus que infectam humanos, é feito avaliando as características clínicas do paciente e as associando às confirmações laboratoriais da infecção. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial tem aplicação complementar para as manifestações clínicas características causadas por este vírus (Varella *et al.*, 2005; Penello *et al.*, 2010).

Diferentes amostras podem ser utilizadas para o diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo HHV-8, uma vez que ele pode estar presente em diferentes fluidos corpóreos. São estas: saliva, soro, plasma, sangue total, PBMC, secreções genitais, biópsias, entre outros (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016).

Não há um teste padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo HHV-8, o que dificulta a escolha de um teste para a detecção deste vírus (Nascimento *et al.*, 2007; Cahú *et al.*, 2016). A imunohistoquímica para detecção da proteína

LANA-1 (antígeno nuclear associado a latência-1) de HHV-8 é realizada a partir de biópsias de lesões de SK e são comumente expressas nessas amostras patológicas. A imunohistoquímica LANA-1 demonstra um padrão de coloração em forma de ponto no núcleo das células infectadas e é muito utilizado para a detecção de HHV-8 nessas amostras patológicas (Figura 11) (Katano, 2018).

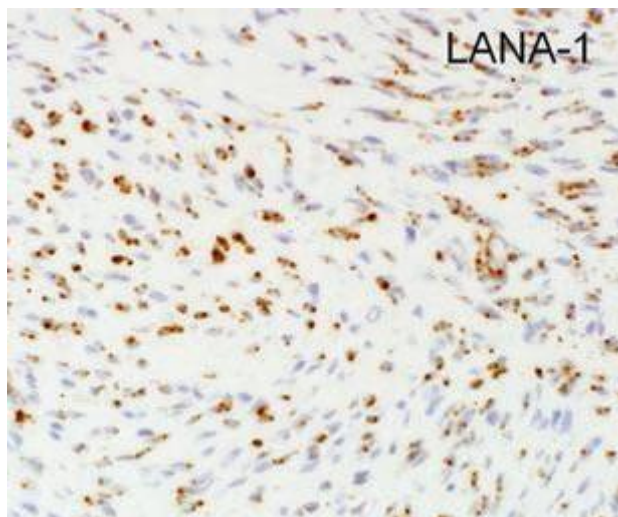


Figura 11. Imunohistoquímica de LANA-1. A microscopia evidencia sinais positivos para o LANA-1 de HHV-8 no núcleo de células tumorais de SK (laranja). Fonte: (Katano, 2018).

O ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) é um ensaio sorológico que realiza a detecção de anticorpos contra antígenos latentes (IFA-LANA) ou líticos (IFA-líticos) do HHV-8. Para essa detecção são utilizadas células de linfoma de efusão primário infectadas latentemente pelo HHV-8 (também chamado linfoma de células-B de cavidades do corpo/BCBL-1), com ou sem indução da replicação lítica viral (com acetato de éster de forbol tetradecanoil/TPA por exemplo) (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016). O IFA-LANA apresenta alta especificidade para detecção de infecção por HHV-8, e juntamente com IFA-lítico, são os testes sorológicos mais comumente usados (Nascimento *et al.*, 2007; Cahú *et al.*, 2016). Contudo, a técnica é laboriosa (Cahú *et al.*, 2016). Na figura 12 pode-se observar os IFA-LANA e IFA-líticos em amostras de soro positivas para anticorpos específicos do HHV-8.

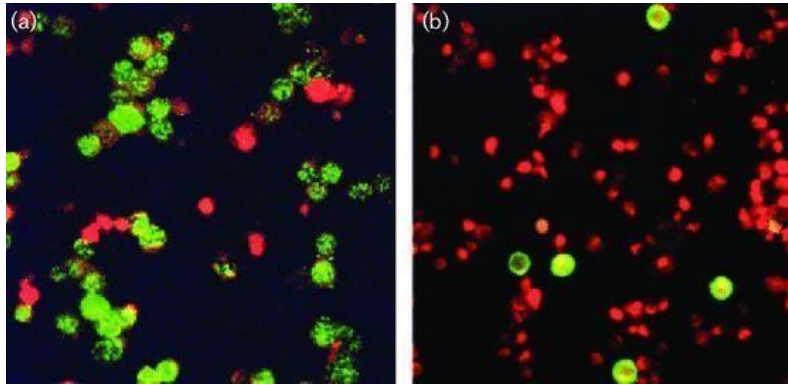


Figura 12. Imunofluorescência indireta (IFA). Padrão obtido com soros positivos para anticorpos específicos para HHV-8 em ensaios IFA-LANA e IFA-lítico. Em (a) lâmina positiva para IFA-LANA com uma fluorescência verde nuclear pontilhada típica, indicando reatividade de anticorpos a antígenos latentes; em (b) lâmina IFA-lítico-positiva com um padrão citoplasmático de fluorescência verde observado durante a fase lítica da replicação do vírus. Ampliação original: 400x. Adaptado de fonte: (Cunha *et al.*, 2005)

Outro teste sorológico, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utiliza diferentes estratégias de detecção da infecção causada por HHV-8, como detecção a partir de proteínas sintéticas, partícula viral intacta/lisada, anticorpos contra o antígeno latente LANA-1 ou contra produtos líticos do HHV-8. Estes testes apresentam diferentes desempenhos e, normalmente, menor especificidade que a IFA (Nascimento *et al.*, 2007).

Já as reações em cadeia da polimerase (PCR), como *nested* PCR ou PCR em tempo real (qPCR), são muito utilizadas por apresentarem vantagens adicionais no diagnóstico laboratorial, principalmente por serem capazes de detectar pequenas quantidades de genoma viral (altamente sensível) e por apresentarem alta especificidade e rapidez nesta detecção que, nos casos graves e sistêmicos da infecção tornam-se vitais (Penello *et al.*, 2010). Além disso, a qPCR permite a quantificação de ácidos nucleicos nas amostras, que é importante para o acompanhamento clínico do paciente (Bustin e Mueller, 2005).

Existem diferentes alvos para a detecção de HHV-8 por PCR (Levi *et al.*, 2011), sendo a ORF 26 (gene que codifica a menor proteína do capsídeo) um alvo amplamente utilizado por ser uma região altamente conservada do genoma deste vírus (Chang *et al.*, 1994). Estes testes moleculares também são utilizados em conjunto com os testes anteriores para confirmação da infecção causada por HHV-8 (Katano, 2018).

No que se refere ao tratamento anti-HHV-8, as terapias disponíveis contra os outros herpesvírus que infectam humanos foram avaliadas para o controle da infecção lítica causada por HHV-8, como aciclovir, ganciclovir, foscarnet e cidofovir. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios em sua atividade anti-HHV-8, sendo que a maioria destes apresentam alta toxicidade (Andrei e Snoeck, 2015).

No que se refere a prevenção da infecção causada por HHV-8, está intimamente relacionada às rotas específicas de transmissão deste vírus. Entretanto, algumas destas rotas ainda não são bem compreendidas. Assim, não há intervenções rigorosamente examinadas para a prevenção dessa infecção. No geral, o aconselhamento sobre a possível disseminação do HHV-8 por diferentes vias específicas de transmissão já conhecidas deve ser realizada através de uma mensagem educacional para populações em risco, como pacientes com HIV, gestantes e HSH, para evitar comportamentos que apresentem risco de contaminação pelo HHV-8 (Cesarman *et al.*, 2019).

Além disso, vacinas contra o HHV-8 estão em desenvolvimento, mas acredita-se ser improvável que uma vacina para uso em humanos esteja disponível em breve (Cesarman *et al.*, 2019). Este desenvolvimento tem sido dificultado por características biológicas específicas do HHV-8, como a latência e sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro (Cesarman *et al.*, 2019). Algumas destas vacinas, por exemplo, utilizam partículas semelhantes a vírus contendo glicoproteínas de HHV-8 (gpK8.1, gB e gH-gL) que estão envolvidos na entrada do vírus nas células hospedeiras, e estão na fase pré-clínica em teste em camundongos (Barasa *et al.*, 2017).

1.7. Indivíduos coinfectados com HHV-8 e HIV

O desenvolvimento de neoplasias associadas ao HHV-8 é raro em indivíduos imunocompetentes (Kaspersen e Höllsberg, 2013). Entretanto, indivíduos imunocomprometidos, como pacientes infectados pelo HIV, apresentam maior risco de infecção causada por este herpesvírus (Rohner *et al.*, 2016). Estes indivíduos, quando coinfectados com HHV-8, apresentam maior risco de reativação e de desenvolvimento de neoplasias malignas associadas, como SK (Aneja e Yuan, 2017), ocorrendo de forma mais agressiva, com rápido

curso e ocasionando alta mortalidade(Hengge *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2015).

Isso ocorre provavelmente devido ao deficiente controle da replicação do HHV-8 pelo organismo imunocomprometido (Aneja e Yuan, 2017), ocasionando aumento de células infectadas, onde poderão desenvolver neoplasias, que, por sua vez, não serão devidamente reconhecidas e eliminadas pelo sistema imunológico que está deficiente(Ensoli, Stürzl e Monini, 2001; Paludan *et al.*,2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012; Perse da Silva *et al.*, 2015).

Além disso, somado a este imunocomprometimento, estudos *in vitro* indicam que durante a coinfeção, mecanismos de promoção da cooperação entre HIV-1 e o HHV-8 pode culminar na replicação e aumento da carga viral de ambos os vírus no organismo do hospedeiro, favorecendo a progressão da AIDS e o surgimento de malignidades causadas por HHV-8 (Aneja e Yuan, 2017; Qin e Lu, 2017).

Nas gestantes infectadas com HIV, além do imunocomprometimento causado pela infecção do HIV, a gravidez também pode torná-las mais suscetíveis às doenças infecciosas e ao agravamento destas, devido às mudanças na imunidade que ocorrem durante a gestação. As evidências indicam que o sistema imune materno pode tolerar antígenos fetais por suprimir a imunidade celular, mantendo a imunidade humoral normal. Estas modificações são conhecidas por ocorrer localmente na interface materno-fetal, mas podem também afetar as respostas imunitárias sistêmicas à infecção (Jamieson, Theiler e Rasmussen, 2006; Lathrop, Jamieson e Danel, 2014). Por isso, é concebível que a ocorrência dessas alterações em gestantes imunocomprometidas com o HIV pode diminuir a vigilância imunológica contra agentes patogênicos intracelulares e infecções virais (Piccinni *et al.*, 2000; Veenstra van Nieuwenhoven *et al.*, 2002; Lisco *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, alguns estudos já verificaram a ocorrência de infecção produtiva de HHV-8 em PBMC (célula mononuclear de sangue periférico) (Lisco *et al.*,2006) e em plasma de gestantes portadoras do HIV (Ilboudo *et al.*, 2009). Casos de gestantes com coinfeção por HIV/HHV-8 desenvolvendo distúrbios neoplásicos causados por este herpesvírus também foram identificados (Bryant *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005; Adeyemo, Wood e Govind, 2012; Mian *et al.*, 2015).

Além desses riscos sobre a saúde das gestantes portadoras de HIV, o

HHV-8 possivelmente pode ser transmitido para o feto, e apesar de não estar bem esclarecido e estar sendo descrito como um evento raro durante a gravidez, a transmissão vertical já foi relatada em alguns estudos (Mantina *et al.*, 2001; Brayfield *et al.*, 2003; Brunet- Possenti *et al.*, 2013). A contaminação intrauterina de HHV-8 já foi observada através da detecção da infecção causada por HHV-8 em células da placenta em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Di Stefano *et al.*, 2008; Brunet-Possenti *et al.*, 2013). Além disso, casos raros de SK em recém-nascidos sugerem que a infecção vertical pelo HHV-8 pode levar ao SK precoce, especialmente em crianças infectadas pelo HIV (McCarty e Bungu, 1995).

Também já foi relatado que a transmissão vertical de HIV é maior nas gestantes coinfetadas com HHV-8 em comparação com as gestantes sem coinfecção HIV/HHV-8, sugerindo que a infecção por este herpesvírus pode ser um fator de risco para a transmissão vertical do HIV-1 (Calabrò *et al.*, 2000).

1.8. Justificativa

O HHV-8 representa um importante problema de saúde pública mundial, sendo associado a diferentes neoplasias, que podem acometer pacientes infectados com HIV, inclusive em gestantes coinfetadas com HIV/HHV-8. Estima-se que 17,4 milhões de mulheres adultas estejam infectadas com o HIV em todo o mundo (WHO, 2020). O sarcoma de Kaposi, neoplasia associada ao HHV-8, apresenta incidência de 172,18 por 100.000 pessoas-ano em mulheres HIV-positivas (Liu *et al.*, 2018).

No Brasil, a soroprevalência da coinfecção HIV/HHV-8 varia de 13,9% a 30% (Pierrotti *et al.*, 2005; de Souza *et al.*, 2007; Ishak *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2009; Magri *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2015; Cahú *et al.*, 2016) e segundo dados do último Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, desde 2000 até junho de 2020, foram notificadas no país 134.328 gestantes infectadas com o HIV (Ministério Da Saúde, 2020). Contudo, apesar do risco de desenvolvimento de neoplasias associadas ao HHV-8 durante a gestação, são poucos os estudos investigando essa coinfecção em gestantes no mundo, sendo que no Brasil não existem dados publicados.

Além disso, a investigação da circulação dos genótipos do HHV-8 (A-F) baseados na região codificadora da ORF K1 mostram que existe penetrância variável em diferentes populações humanas de grupos étnicos e geográficos

distintos, possivelmente devido a antigas migrações humanas. No entanto, as informações sobre a diversidade genética do HHV-8 e sua distribuição geográfica no mundo, e até mesmo no Brasil são antigas e apresentam informações desatualizadas, e com poucas amostras realizadas, não retratando o cenário de distribuição mundial e da diversidade étnica.

Dentro deste cenário, estimar a soroprevalência de HHV-8 em gestantes com HIV e uma análise detalhada dos genótipos do HHV-8 podem fornecer uma perspectiva mais atualizada e completa sobre a distribuição e circulação desses genótipos no Brasil e no mundo, além de contribuir com informações relevantes sobre a epidemiologia e evolução molecular.

2. OBJETIVOS

Durante o doutorado foram publicados/submetidos sete artigos, sendo que nesta tese serão abordados apenas os artigos de HHV-8. Os objetivos específicos serão apresentados de acordo com os artigos publicados.

2.1. Objetivo Geral

Investigar a epidemiologia do HHV-8 em gestantes com HIV, analisar a diversidade genética do HHV-8 em portadores de HIV no Brasil e determinar a distribuição dos genótipos no mundo.

2.2. Objetivos Específicos

Artigo 1:

Estimar a prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes portadoras de HIV no Rio de Janeiro, Brasil;

Artigo 2:

- Caracterizar isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1;
- Analisar as origens putativas dos isolados de HHV-8 circulando no Brasil;

Artigo 3:

Determinar a distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados na forma de artigos publicados, ou submetidos à publicação em revistas indexadas. Baseando-se nos objetivos do presente estudo, as seções apresentadas a seguir estão divididas em três seções: (i) Investigação da prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes infectadas com HIV no Rio de Janeiro, Brasil; (ii) Caracterização de isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 e análise das origens putativas desses isolados de HHV-8 no país; e (iii) Determinação da distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1.

3.1. Investigação da prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes infectadas com HIV no Rio de Janeiro - Brasil.

3.1.1. Artigo 1

Título: *Low prevalence of Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil.*

Autores: Amanda de O. Lopes, Lyana R. P. Lima, Tania R. Tozetto-Mendoza, Katrini G. Martinelli, Mariza G. Morgado, José H. Pilotto & Vanessa S. de Paula.

Publicado no periódico *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*.

Objetivo específico: Estimar a prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes portadoras de HIV no Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo: Mulheres grávidas coinfectadas com o *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) e o *Gammaherpesvírus humano 8* (HHV-8) possuem maior risco de desenvolvimento do sarcoma de Kaposi, aumento da carga viral e transmissão vertical desses vírus. Um total de 131 mulheres grávidas infectadas com HIV foram examinadas para anticorpos contra o antígeno nuclear associado à latência (LANA) e antígenos líticos do HHV-8 usando ensaios de imunofluorescência. A presença de DNA de HHV-8 foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e *nested* PCR. No geral, 0,8% (1/131)

dos pacientes continham anticorpos para antígenos LANA e líticos de HHV-8, e nenhum DNA deste herpesvírus foi detectado.

Este estudo, incluindo uma pequena população de gestantes infectadas pelo HIV no Brasil, indica uma baixa prevalência de soropositividade para HHV-8 e ausência de infecção ativa neste grupo. No entanto, sugere-se um potencial papel do HHV-8 no aumento da transmissão e atividade patogênica do HIV em mulheres grávidas. Atenção deve ser dada ao surgimento da infecção pelo HHV-8 nesse grupo populacional, a fim de evitar comorbidades e transmissão do HIV.



The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine

ISSN: 1476-7058 (Print) 1476-4954 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ijmf20>

Low prevalence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil

Amanda de O. Lopes, Lyana R. P. Lima, Tania R. Tozetto-Mendoza, Katrini G. Martinelli, Mariza G. Morgado, José H. Pilotto & Vanessa S. de Paula

To cite this article: Amanda de O. Lopes, Lyana R. P. Lima, Tania R. Tozetto-Mendoza, Katrini G. Martinelli, Mariza G. Morgado, José H. Pilotto & Vanessa S. de Paula (2019): Low prevalence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil, The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, DOI: [10.1080/14767058.2019.1685967](https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1685967)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1685967>



Published online: 21 Nov 2019.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ijmf20>

Low prevalence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil

Amanda de O. Lopes^a, Lyana R. P. Lima^a, Tania R. Tozetto-Mendoza^b, Katrini G. Martinelli^c, Mariza G. Morgado^d, José H. Pilotto^{d,e} and Vanessa S. de Paula^a

^aLaboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro, Brazil; ^bLaboratório de Virologia, LIM52, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDepartamento de Medicina Social, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil; ^dLaboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ^eHospital Geral de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Pregnant women coinfecting with the human immunodeficiency virus (HIV) and human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) are at higher risk of Kaposi's sarcoma development, increased viral load, and vertical transmission of these viruses. A total of 131 pregnant women infected with HIV were examined for antibodies against HHV-8 latency-associated nuclear antigen (LANA) and lytic antigens using immunofluorescence assays. The presence of HHV-8 DNA was confirmed using real-time polymerase chain reaction (qPCR) and nested PCR. Overall, 0.8% (1/131) of the patients contained antibodies to HHV-8 LANA and lytic antigens, and no HHV-8 DNA was detected. This study, including a small population of HIV-infected pregnant women in Brazil, indicates a low prevalence of HHV-8 seropositivity and absence of active infection in this group. However, a potential role of HHV-8 in the increased transmission and pathogenic activity of HIV in pregnant women is suggested. Attention should be given to the emergence of HHV-8 infection in this population group in order to avoid comorbidities and transmission of HIV.

ARTICLE HISTORY

Received 21 July 2019
Revised 8 October 2019
Accepted 24 October 2019

KEYWORDS

Coinfection; human gamma herpesvirus 8; human immunodeficiency virus; pregnant women; prevalence

Introduction

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) is the etiologic agent of Kaposi's sarcoma (KS), one of the most common cancers in individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV). The overall KS incidence in HIV-infected people is 481.54 per 100,000 person-years worldwide. The KS incidence of HIV-positive women is reported as 172.18 per 100,000 person-years [1]. An estimated 17.4 million adult women are infected with HIV worldwide [2].

KS may develop during pregnancy [3], as changes in the immune system during this period may contribute to increased herpesvirus viremia and subsequent tumorigenesis. In addition, immune changes in HIV-coinfecting pregnant women may further impair immunosurveillance for HHV-8 infection [3,4].


Vertical transmission of HHV-8 may occur during pregnancy [5] and high viral load of this herpesvirus in cervicovaginal secretions influences intrapartum transmission [4]. Rare cases of KS in newborns suggest that HHV-8 vertical infection could lead to early KS, especially in children infected with HIV [6]. HHV-8

infection in pregnancy is additionally proposed to present a risk factor for HIV-1 vertical transmission [7].

Mechanisms promoting cooperation between HIV-1 and HHV-8 may culminate in the spread of these viruses within the host organism, AIDS progression, and KS development [8]. The HHV-8 seroprevalence rates range from 1.7 to 80.7% in HIV-infected pregnant women worldwide [9]. To address the lack of data of HHV-8 infection in this population group in Brazil, we have investigated the prevalence of HHV-8 infection in pregnant women with HIV in this study.

Materials and methods

This study was retrospective in design, and all 131 HIV-infected pregnant women were recruited between April 2005 and August 2008 at the Nova Iguaçu General Hospital, Rio De Janeiro State, Brazil. This is a referral center for the care and treatment of HIV-infected pregnant women located on the outskirts of Rio de Janeiro. Sociodemographic, clinical and

CONTACT Vanessa S. de Paula vdepaula@ioc.fiocruz.br  Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 4365, Brazil Av, Manguinhos, Rio De Janeiro, Brazil

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

laboratory information were abstracted from medical records.

Inclusion criteria were as follows: samples collected during the second and third trimesters of pregnancy, HIV infection confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay, any ethnicity/color, age, marital status, maternal education level, and family income.

The sociodemographic variables used were: ethnicity/color (white, black, brown/mulatto, indigenous), marital status (living with a partner or not), degree of schooling (illiterate, incomplete elementary school, complete elementary school, high school, and higher education), family income (no income, up to one salary, two or three salaries, four or five salaries, and > five salaries), maternal age at the time of HIV diagnosis (up to 15 years, 16–20 years, 21–30 years, 31–40 years, and ≥41 years); and HIV diagnosis during current gestation (yes or no).

With regard to clinical and laboratory variables, all HIV-infected pregnant women received combined antiretroviral therapy, with 91.6% (120/131) patients displaying cluster of differentiation CD4⁺ T lymphocyte counts of >200 cells/mm³ of blood.

Serum samples were collected and stored at –20 °C until testing for HHV-8 infection. Immunofluorescence assays (IFA) were used for detection of antibodies against HHV-8 latency-associated nuclear antigen (LANA) and lytic antigens, as reported previously [10]. Samples were considered seropositive for HHV-8-specific antibodies in cases where at least one of the assays (IFA–LANA or IFA–lytic) was positive.

Serum samples with HHV-8 anti-LANA and antilytic antibodies from individuals with KS were used as positive controls and those without HHV-8 anti-LANA and antilytic antibodies from blood donors as negative controls.

Viral DNA was extracted from homogenized samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at –70 °C until sample analysis. Viral DNA was analyzed in triplicate via real-time polymerase chain reaction (qPCR) as described previously [11], which amplified HHV-8 minor capsid protein gene/open reading frame (ORF) 26 (66 bp). In addition, a synthetic standard curve (5'-TTCGTGCCCCATAAATGACACATTGGCGTATATATGGCGGAACCTTGATCTATGCGTTACATCATCCGGGGCCCTGATA-3') with an initial titer of 10⁷ copies/mL in a dilution series (10¹–10⁷) was designed for qPCR.

Viral DNA was analyzed via nested PCR that amplified a 233-bp fragment from HHV-8 ORF 26, as described previously [12]. Each PCR reaction contained

500-nM primer (forward/reverse). Amplification products were visualized on 1.5% agarose with ethidium bromide staining.

In both PCR assays, serum samples positive for HHV-8 DNA from individuals with KS were used as positive controls and serum samples without HHV-8 DNA from blood donors as negative controls.

The study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number 895.159/CAEE:28183314.7.0000.5248) and all participants signed an informed consent form.

Descriptive statistical analyses were performed for variables related to sociodemographic information on HIV-positive pregnant women, with absolute and relative frequency calculations. As the prevalence of HHV-8/HIV coinfection was extremely low, inferential statistics, initially planned for analysis of risk factors, could not be performed.

Results

HIV-positive pregnant women were 16 years or older with an average age of 26.3 ± 6.3 years. All sociodemographic data are presented in Table 1.

Antibodies against HHV-8 LANA and lytic antigens (Figure 1) were detected in one pregnant woman (0.8%; 1/131) aged 29 years who had a CD4⁺

Table 1. Sociodemographic characteristics of HIV-infected pregnant women in this study.

Variables	N participants (%)
Ethnicity/color	
White	38 (29)
Black	39 (29.8)
Brown/mulatto	53 (40.5)
Indigenous	01 (0.8)
Marital status	
Living together with a partner	100 (76.3)
Not living with a partner	31 (23.7)
Degree of schooling	
Illiterate	03 (2.3)
Incomplete elementary school	76 (58)
Complete elementary school	36 (27.5)
High school	15 (11.5)
Higher education	01 (0.8)
Family income ^a	
No income	17 (13.3)
Up to one salary	54 (42.2)
Two or three salaries	47 (36.7)
Four or five salaries	05 (3.9)
>5 salaries	05 (3.9)
Maternal age at the time of HIV diagnosis (years) ^b	
Up to 15	01 (0.8)
16–20	33 (25.4)
21–30	69 (53.1)
31–40	23 (17.7)
≥41	04 (3.1)
HIV diagnosis in current gestation	
Yes	90 (68.7)
No	41 (31.3)

N: number of participants.

^aMissing variables.

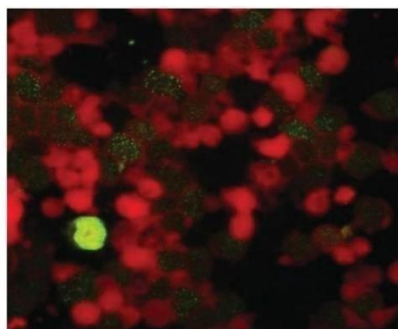


Figure 1. HHV-8-specific antibody-positive serum in IFA-LANA and IFA-Lytic assays (100 \times). IFA-LANA-positive pattern with typical speckled fluorescence in the nucleus, indicating reactivity of antibodies to latent antigens. IFA-lytic-positive pattern with cytoplasmic fluorescence observed during the lytic phase of virus replication.

T lymphocyte count of 540 cells/mm³ blood and 50 copies/mL HIV viral load. HHV-8 DNA was undetectable in all HIV-positive pregnant women.

Discussion

The low HHV-8 seroprevalence (0.8%; 1/131) detected in HIV-infected pregnant women from our Brazilian area corroborates with earlier data obtained by other groups from nonendemic regions. In the USA, a country with low HHV-8 seroprevalence [13], Goedert et al. [14] reported the presence of HHV-8 antibodies in only 2/118 (1.7%) pregnant women with HIV infection. In contrast, in endemic regions, such as Africa (Ethiopia, Gambia, Uganda, Zambia, Cameroon, and Burkina Faso), HHV-8 seroprevalence rates in HIV-positive pregnant women were significantly higher, ranging from 12 to 80.7% [9].

Although epidemiological data of HHV-8 infection are still scarce in Brazil, our country is considered non-endemic for this infection [15]. To our knowledge, this is the first study to investigate the prevalence of HHV-8 in pregnant women with HIV from Brazil.

We employed IFA evaluation of anti-LANA antibodies, generally considered a reference assay for detecting HHV-8 infection, along with IFA-lytic, which are the most commonly used serological tests [16]. In view of a previous report that 5.2% serum samples from HIV-infected individuals negative for HHV-8 antibodies were HHV-8 DNA-positive, we additionally examined for the presence of HHV-8 DNA [17]. Real-time and nested PCR disclosed no detectable HHV-8

DNA in HIV-positive pregnant women, consistent with IFA-based negative serological tests.

In conclusion, HHV-8 prevalence and risk of infection are low in HIV-positive pregnant women from Rio de Janeiro, Brazil. Nevertheless, attention should be given to the emergence of HHV-8 infection in pregnant women infected with HIV and their impact on health in non-endemic countries, since HHV-8 can reactivate during pregnancy and contribute to KS development, increased viral load and vertical transmission of both viruses.

Acknowledgments

The authors thank CAPES and FAPERJ for funding.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors regarding the publication of this paper.

Funding

This work was supported by CAPES (Coordination of Superior Level Staff Improvement) [grant No. 1632788]; and FAPERJ (State of Rio de Janeiro Research Support Foundation) [grant No. E-26/203.0928/2016].

Data availability

The datasets used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

- [1] Liu Z, Fang Q, Zuo J, et al. The world-wide incidence of Kaposi's sarcoma in the HIV/AIDS era. *HIV Med.* 2018;19(5):355–364.
- [2] WHO. Number of women living with HIV. World Health Organization; 2019. Available from: https://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_adults_women_children_text/en/.
- [3] Brunet-Possenti F, Pages C, Rouzier R, et al. Kaposi's sarcoma and pregnancy: case report and literature review. *Dermatology.* 2013;226(4):311–314.
- [4] Lisco A, Barbierato M, Fiore JR, et al. Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):3863–3871.
- [5] Mantina H, Kankasa C, Klaskala W, et al. Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Int J Cancer.* 2001;94(5):749–752.
- [6] McCarty KA, Bungu Z. Kaposi's sarcoma in a two week old infant born to a mother with Kaposi's sarcoma/AIDS. *Cent Afr J Med.* 1995;41(10):330–331.
- [7] Calabrò ML, Gasperini P, Barbierato M, et al. A search for human herpesvirus 8 (HHV-8) in HIV-1 infected

- mothers and their infants does not suggest vertical transmission of HHV-8. *Int J Cancer*. 2000;85(2): 296–297.
- [8] da Silva SR, de Oliveira DE. HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. *Cancer Lett*. 2011;305(2):175–185.
- [9] Rohner E, Wyss N, Heg Z, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;138(1): 45–54.
- [10] Borges JD, Souza VA, Giambartolomei C, et al. Transmission of human herpesvirus type 8 infection within families in American indigenous populations from the Brazilian Amazon. *J Infect Dis*. 2012;205(12): 1869–1876.
- [11] Levi JE, Nascimento MC, Sumita LM, et al. Non-detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-seropositive blood donors from three Brazilian regions. *PLoS One*. 2011;6(8):e23546.
- [12] de Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis*. 2007;196(6): 844–852.
- [13] Rohner E, Wyss N, Trelle S, et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. *Syst Rev*. 2014;3:11.
- [14] Goedert JJ, Kedes DH, Ganem D. Antibodies to human herpesvirus 8 in women and infants born in Haiti and the USA. *Lancet*. 1997;349(9062):1368.
- [15] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(10):707–719.
- [16] Nascimento MC, de Souza VA, Sumita LM, et al. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):715–720.
- [17] Szalai E, Gerlei Z, Szlávik J, et al. Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43(2):265–268.

3.2. Caracterização de isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 e análise das origens putativas desses isolados de HHV-8 no país.

3.2.1. *Artigo 2*

Título: *Introduction of Human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions.*

Autores: Amanda de Oliveira Lopes, Natália Spitz, Katrini Guidolini Martinelli, Anderson Vicente de Paula, Ana Luiza de Castro Conde Toscano, Paulo Henrique Braz-Silva, Juliana dos Santos Barbosa Netto, Tania Regina Tozetto-Mendoza, Vanessa Salete de Paula.

Publicado no periódico *Virus Research*.

Objetivo específico: Caracterizar isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1; e analisar as origens putativas dos isolados de HHV-8 circulando no Brasil.

Resumo: Variações na sequência do gene de fase de leitura aberta (ORF) K1 do *Gammaherpesvírus humano 8* (HHV-8) levaram à identificação de 6 clados genotípicos principais (A, B, C, D, E e F) em espécimes isolados ao redor o mundo. Esses clados exibem um claro agrupamento entre indivíduos de diferentes grupos étnicos e de diferentes regiões geográficas. A população humana do Brasil varia muitona etnia devido a vários eventos de imigração da África, Europa, Ásia e comunidades indígenas. No entanto, há poucas informações sobre os genótipos do HHV-8 que circulam atualmente no Brasil. Neste estudo foi descrito a diversidade genotípica do HHV-8 em isolados de pacientes brasileiros infectados pelo HIV que vivem com sarcoma de Kaposi (SK) por análise da região codificadora da ORF K1. Também foram identificadas as origens geográficas mais prováveis desses diferentes genótipos brasileiros. O DNA do HHV-8 foi extraído de 24 amostras positivas, provenientes de indivíduos com HIV/SK dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, posteriormente o gene

ORF K1 foi amplificado por *nested* PCR (cerca de 870 pares de bases), seguido de sequenciamento e análise filogenética. Por fim, foram calculadas as distâncias genéticas médias das sequências brasileiras a partir de sequências de outras regiões do mundo (523 sequências analisadas). A análise filogenética mostrou que os genótipos C, A e B estavam presentes em 45,8%, 29,2% e 25% dos isolados do Brasil, respectivamente. Esses isolados agruparam em clados separados, em vez de um único clado monofilético. Análises de distância genética média sugeriram que esses genótipos foram introduzidos no Brasil várias vezes de diferentes regiões geográficas. Os isolados de HHV-8/A parecem ser da Ucrânia, Rússia e do grupo étnico tártaro; os isolados de HHV-8/B parecem ser do Congo e da República Democrática do Congo; e os isolados de HHV-8/C parecem ser da Austrália, Argélia, Inglaterra e Guiana Francesa. Esses resultados contribuem para um melhor entendimento da diversidade genética e da origem das cepas do HHV-8 em circulação no Brasil, e servirão de base para futuros estudos epidemiológicos e evolutivos do HHV-8.



Introduction of human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions



Amanda de Oliveira Lopes^a, Natália Spitz^a, Katrini Guidolini Martinelli^b, Anderson Vicente de Paula^c, Ana Luiza de Castro Conde Toscano^{c,d}, Paulo Henrique Braz-Silva^{c,e}, Juliana dos Santos Barbosa Netto^f, Tania Regina Tozetto-Mendoza^c, Vanessa Salette de Paula^{a,*}

^a Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil

^b Department of Social Medicine, Espírito Santo Federal University, Espírito Santo, 29075-910, Brazil

^c Department of Virology, São Paulo Tropical Medicine Institute, São Paulo University, São Paulo, 05403-000, Brazil

^d Dia Hospital, Emílio Ribas Infectology Institute, São Paulo, 01246-900, Brazil

^e General Pathology Division, Department of Stomatology, School of Dentistry, São Paulo University, São Paulo, 05508-000, Brazil

^f National Institute of Infectology Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Human gammaherpesvirus 8
Genotypic diversity
Molecular epidemiology
Genotyping
Genetic distance

ABSTRACT

Variations in the open reading frame (ORF) K1 gene sequence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) has led to the identification of 6 major genotypic clades (A, B, C, D, E, and F) in specimens isolated from around the world. These clades exhibit clear clustering among individuals in different ethnic groups and from different geographic regions. The human population of Brazil varies greatly in ethnicity because of multiple immigration events from Africa, Europe, Asia, and indigenous communities. However, there is scant information about the HHV-8 genotypes currently circulating in Brazil. Here, we describe HHV-8 genotypic diversity in isolates from Brazilian HIV-infected patients living with Kaposi's sarcoma (KS) by analysis of the complete ORF-K1 region. We also identified the most likely geographic origins of these different Brazilian genotypes. We extracted HHV-8 DNA (24 positive samples) from individuals with HIV/KS from the states of São Paulo and Rio de Janeiro, amplified the ORF-K1 gene using nested PCR (about 870 base pairs), performed sequencing and phylogenetic analysis, and then calculated the mean genetic distances of Brazilian sequences from sequences in other regions of the world (523 sequences analyzed). Phylogenetic analysis showed that genotypes C, A, and B were present in 45.8%, 29.2% and 25% of the isolates from Brazil, respectively. These isolates grouped into separate clades, rather than a single monophyletic cluster. Mean genetic distance analyses suggested that these genotypes were introduced into the Brazil multiple times from different geographical regions. HHV-8/A isolates appear to be from Ukraine, Russia, and the Tartar ethnic group; HHV-8/B isolates appear to be from Congo and Democratic Republic of the Congo; and HHV-8/C isolates appear to be from Australia, Algeria, England, and French Guiana. These results contribute to a better understanding of the genetic diversity and origins of HHV-8 strains circulating in Brazil, and will provide a foundation for further epidemiological and evolutionary studies of HHV-8.

1. Introduction

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), also called human gammaherpesvirus 8 (HHV-8), is in the Herpesviridae family, the Gammaherpesvirinae subfamily, and the Rhadinovirus genus. This virus is the etiologic agent for all forms of the vascular neoplasm known as Kaposi's sarcoma (KS), a cancer that is common in patients with HIV/AIDS (Pérez and Tous, 2017).

HHV-8 has a highly conserved double-stranded DNA genome of approximately 140 kilobases. However, both ends of the genome show significant variability, allowing categorization of HHV-8 into different genotypes (Isaacs et al., 2016; Olp et al., 2015). The 5' end has a highly variable open reading frame (ORF) of about 870 base pairs (bp) (called ORF-K1) that codes for a transmembrane protein composed of 289 amino acid (aa) residues. ORF-K1 has multiple roles in cellular signal transduction, viral reactivation, endothelial cell immortalization, and

* Corresponding author at: Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, 4365, Av., Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil.

E-mail addresses: amanda.lopes.fiocruz@gmail.com (A. de Oliveira Lopes), nataliastd@gmail.com (N. Spitz), katrigm@gmail.com (K.G. Martinelli), anddeblair@yahoo.com.br (A.V. de Paula), aluizaconde@gmail.com (A.L. de Castro Conde Toscano), pbraz@usp.br (P.H. Braz-Silva), juliananetto@gmail.com (J. dos Santos Barbosa Netto), tozetto@usp.br (T.R. Tozetto-Mendoza), vdepaula@ioc.fiocruz.br (V.S. de Paula).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197828>

Received 6 September 2019; Received in revised form 26 November 2019; Accepted 27 November 2019

Available online 30 November 2019

0168-1702/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Primers, probe, and synthetic standard used for detection and quantification of HHV-8.

HHV-8	Sequence (5'→3')
Primers	Forward – GGGCCGGGATGATGTA Reverse – GCCCATAAATGACACATTGG
Probe	FAM-AGATCAAGTTGGCGCATAT-MGB
Synthetic standard	TTCGTGCCCATAAATGACACATTGGGGTATATATGGCGGAACCTTGATCTATGCGTTACATCATCCGGGGCCCTGATA

HHV-8: Human gammaherpesvirus 8, A: adenine, T: thymine, C: cytosine, G: guanine, FAM: 5(6)-carboxyfluorescein, MGB: minor groove binder.

host immune recognition (Lee et al., 2003).

Phylogenetic studies based on the highly variable HHV-8 ORF-K1 identified six major genotypes (A, B, C, D, E, and F) whose sequences differ by up to 30% at the aa level (Isaacs et al., 2016; Olp et al., 2015). These different genotypes have variable penetrance in different human populations, and all exhibit clear clustering with different ethnic and geographic groups, possibly due to ancient human migrations (Isaacs et al., 2016). Thus, genotypes A and C occur predominantly in Europe, the United States, most parts of Asia, and the Middle East; genotype B is predominant in Africa; the rare genotype D was only reported in the Pacific islands and Taiwan; genotype E was reported in Amerindian populations of Brazil, French Guiana, and Ecuador; and genotype F, the most recently identified form, was reported in Uganda and Brazil (Tozetto-Mendoza et al., 2016).

Brazil has significant ethnic diversity because of multiple migratory flows from Africa, Europe, Asia, and indigenous communities, but there is scant information about HHV-8 genetic diversity in Brazil. The aim of this study was to characterize HHV-8 isolates from HIV/KS patients living in Brazil based on phylogenetic analysis of the complete ORF-K1 gene.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The present study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the School of Medicine from São Paulo University and Emílio Ribas Infectology Institute (number 1.560.798), and the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number 0032.0.009.000-1). This study also complied with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. All patients signed written informed consent agreements before participation. Clinical and epidemiological information were collected from medical records.

2.2. Samples

This study was retrospective, and fourteen saliva samples were collected between August 2016 and February 2018 from HIV/KS patients who were enrolled at the outpatient clinic of the HIV/AIDS Patient Care Extension Service (SEAP HIV/AIDS) of the Clinical Division of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo-School of Medicine Clinical Hospital (ICHCFMUSP), and at Dia Hospital, Emílio Ribas Infectology Institute, São Paulo City. Ten serum samples were collected between January 2017 and August 2018 from HIV/KS patients who were enrolled at the National Institute of Infectology Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro City. Both Institutes are referral centers for the care and treatment of individuals with HIV/KS in these states.

As saliva collection from HIV/KS patients is routine in these hospitals from São Paulo, we chose these samples for HHV-8 detection. However, this collection is not routine at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases from Rio de Janeiro. For this reason, we obtained serum samples from patients with HIV/KS for this detection. All HIV-infected patients received combined antiretroviral therapy.

Inclusion criteria were as follows: HIV infection confirmed using

enzyme-linked immunosorbent assay, KS confirmed by biopsy, any gender, ethnicity/color, age, CD4 + T lymphocyte count (CD4 + Count), and HIV load. The variables used were: gender (female, male), ethnicity/color (white, black/ brown/mulatto), age (20–29 years, 30–39 years, 40–49 years, and ≥ 50 years), CD4 + Count (< 200 cells/mm³ of blood, 200 e 350 cells/mm³ of blood, 351 e 500 cells/mm³ of blood), and HIV load (Mean ± SD in copies/mL).

Saliva samples were collected as described by Beyari et al. (Beyari et al., 2003) and Tozetto-Mendoza (Tozetto-Mendoza et al., 2018), and stored at –70 °C until analyses. Serum samples were collected and stored at –20 °C until analyses.

Viral DNA was extracted from homogenized samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, New Jersey, EUA) according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at –70 °C until analyses. The quantity and quality of DNA samples were assessed as previously described (Saiki et al., 1985).

All samples were suitable for viral DNA amplification. A quantitative (real-time) polymerase chain reaction (qPCR) with HHV-8 ORF26-specific primers and a probe was performed to confirm the presence of HHV-8 in all samples, as reported previously (Levi et al., 2011). In addition, a synthetic standard curve (Lopes et al., 2019), with initial titer of 10⁷ copies/mL and a dilution range of 10 to 10⁷ was used for this qPCR assay (Table 1). All samples were tested in triplicate, and all samples were successfully amplified. Results are expressed as copies per mL.

2.3. ORF-K1 amplification

The ORF-K1 sequence (about 870 bp) was amplified to identify HHV-8 genotypes. PCR reactions and cycling parameters were adapted from Lacoste et al. (Lacoste et al., 2000a) and Poole et al. (Poole et al., 1999) and were according to the protocol of Mendoza et al. (Tozetto-Mendoza et al., 2016).

Briefly, semi-nested PCR reactions were performed in a 25 µL reaction mixture containing 100–200 ng of DNA template, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer (Table 2), 1X of 10XPCR buffer minus Mg, and 1 U/µL of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

The PCR thermal conditions for the first and second rounds were as follows: initial 3 min denaturation at 95 °C; 45 cycles of 95 °C for 30 s, 61.5 °C for 50 s, and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 3 min. PCR products were visualized on 1.5% agarose gels that were stained with ethidium bromide. A UV transilluminator and the Low DNA Mass Ladder (Gibco) were used to identify PCR products.

All laboratory procedures were performed under stringent conditions to avoid contamination. Four separate rooms were used, one for extraction, another to prepare amplification mixes, another to apply DNA to the mix tubes, and a fourth room where amplicons were handled. DNAs isolated from saliva and serum samples that were HHV-8 positive and negative were used as controls.

2.4. ORF-K1 purification and sequencing

ORF-K1 PCR products were purified using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, New Jersey, EUA) according to the

Table 2
Primers used in amplification and sequencing of HHV-8 ORF-K1.

Round PCR	Primers	Sequences (5'-3')	Nucleotide positions ^a	References
First	Forward LGH2089	GTTCTGCCAGGCATAGTC	21-38	Poolle et al., 1999
First	Reverse KIAG1200AS	AGGCCATGCTGTAAGTAGCAGCGTT	1094-1118	Lacoste et al., 2000a,b
Second	Forward LGH2089	GTTCTGCCAGGCATAGTC	21-38	Poolle et al., 1999
Second	Reverse LGH2088	AATAAGTATCCGACCTCAT	1037-1055	Poolle et al., 1999

^a NCBI Reference Sequence: NC_009333.1.

Table 3
Clinical and epidemiological characteristics of HIV/KS patients living in São Paulo and Rio de Janeiro, Brazil.

Variables	Total (N = 24)		São Paulo (N = 14)		Rio de Janeiro (N = 10)		P-value [#]
	n	%	n	%	n	%	
Gender							
Female	01	4.2	00	00	01	10.0	-
Male	23	95.8	14	100	09	90.0	
Ethnicity/color							
White	07	29.2	04	28.6	03	30.0	0.939
Black/Brown/mulatto	17	70.8	10	71.4	07	70.0	
Age							
20-29 years	06	25.0	03	21.4	03	30.0	0.297
30-39 years	05	20.8	04	28.6	01	10.0	
40-49 years	08	33.3	03	21.4	05	50.0	
≥ 50 years	05	20.8	04	28.6	01	10.0	
CD4+ Count (cells/mm³)**							
< 200	14	63.6	08	57.1	06	75.0	-
200 e 350	06	27.3	04	28.6	02	25.0	
351 e 500	02	9.1	02	14.3	00	0.0	
	Mean ± SD		Mean ± SD		Mean ± SD		P-value[§]
HIV load (copies/mL)	1.65*10 ⁵ ± 1.96*10 ⁵		1.64*10 ⁵ ± 1.74*10 ⁵		1.69*10 ⁵ ± 2.43*10 ⁵		0.962
HHV-8 load (copies/mL)	5.29*10 ⁸ ± 1.59*10 ⁹		1.59*10 ⁷ ± 3.87*10 ⁷		1.25*10 ⁹ ± 2.34*10 ⁹		0.131

Note: N, number of participants; **Missing variables; # Chi-square test, Fisher's exact test; §Student's t-test; SD, standard deviation.

manufacturer's instructions. Purification products were visualized on 1.5 % agarose gels that were stained with ethidium bromide. A UV transilluminator and the Low DNA Mass Ladder (Gibco) were used to identify purification products.

The DNA sequencing of purified PCR products (~20 ng) was performed at the Platform of Technological Development Program in Materials for Health (PDTIS) of Fiocruz (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro) using the ABI Kit BigDye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and ABI 3730xl Automated Sequencers (Applied Biosystems) for both complementary strands. Second-round semi-nested PCR primers were used during this stage (Table 1).

2.5. Phylogenetic analysis

Fifty-nine complete HHV-8 ORF-K1 sequences from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) were used as references for analysis. Reference sequences and Brazilian sequences from this study were aligned using MUSCLE software (Edgar, 2004), and manually edited with the MEGA program, version 7 (Kumar et al., 2016). A phylogenetic tree was constructed in MEGA using the maximum likelihood method (ML), with the GTR + G + I model of rate heterogeneity. Bootstrapping was performed with 500 replicates, and a bootstrap value above 70 % was used to confirm the robustness of each major branch.

2.6. Mean genetic distance

The mean genetic distances between complete ORF-K1 sequences

from Brazil and other regions of the world were examined to identify the possible geographic origins of the genotypes identified in this study. A total of 523 complete ORF-K1 sequences that corresponded to genotypes A, B, and C and were deposited in GenBank were collected for these analyzes. The mean genetic distances between groups were estimated using MEGA, version 7 (Kumar et al., 2016), with the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980).

2.7. Statistical analysis

Descriptive statistics of the qualitative variables was determined by frequency distribution. Afterwards, the Chi-square test was used for categorical variables at 95 % confidence intervals (CIs) and p value ≤ 0.05 to compare proportions between Sao Paulo and Rio de Janeiro groups. The Student's t-test was used to compare the mean (SD) between Sao Paulo and Rio de Janeiro groups also using 95 % CI and p-value ≤ 0.05. One-Way ANOVA was used to compare the viral load of HIV and HHV8 between the three genotypes (A, B and C), followed by Tukey's test for multiple comparisons between means (SD), 95 % CI and p-value ≤ 0.05.

3. Results

The clinical and epidemiological characteristics of 24 HIV/KS patients living in São Paulo and Rio de Janeiro are presented in Table 3. We did not find any statistical difference between these groups, probably due to the small sample size.

We successfully amplified all samples for sequencing of the

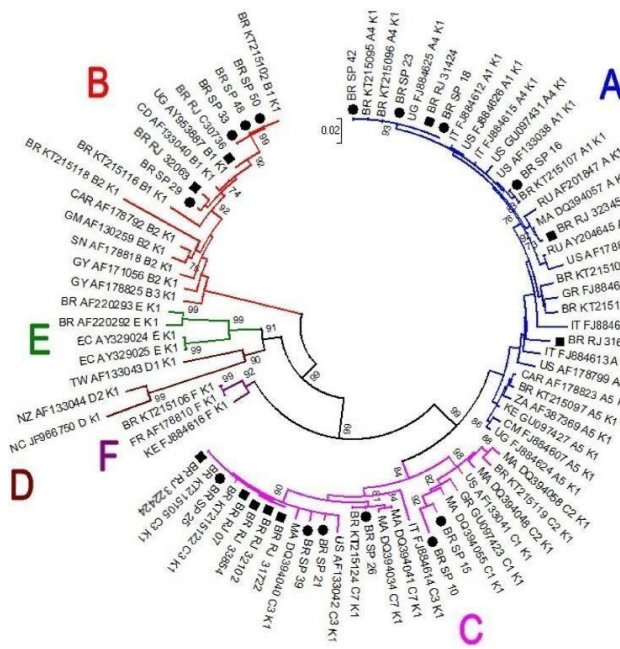


Fig. 1. Phylogenetic analysis of HHV-8 ORF-K1 sequences using the maximum-likelihood method. GenBank accession numbers for the reference sequences are: genotype A, KT215095, KT215096, FJ884625, FJ884612, FJ884626, FJ884615, GU097431, AF133038, KT215107, AF201847, DQ394057, AY204645, AF178807, KT215109, FJ884608, KT215108, FJ884611, FJ884613, AF178799, AF178823, KT215097, AF387369, GU097427, FJ884607, FJ884624; genotype B, AF178825, AF171056, AF178818, AF130259, AF178792, KT215118, KT215116, AF133040, AY953887, KT215102; genotype C, DQ394058, KT215119, DQ394048, AF133041, GU097423, DQ394055, FJ884614, DQ394041, DQ394034, KT215124, AF133042, DQ394040, KT215122, KT215105; genotype D, JF966750, AF133043, AF133044; genotype E, AY329025, AY329024, AF220293, AF220292; and genotype F, FJ884616, AF178810, KT215106. The HHV-8 genotypes are indicated in the figure. Reference sequences are indicated by the country or origin (BR, Brazil; CAR, Central African Republic; CD, Democratic Republic of the Congo; CM, Cameroon; EC, Ecuador; FR, France; GM, Gambia; GY, Guiana; GR, Greece; IT, Italy; KE, Kenya; MA, Morocco; NC, New Caledonia; NZ, New Zealand; RU, Russia; SN, Senegal; TW, Taiwan; UG, Uganda; US, United States of America; ZA, South Africa) followed by accession number, genotype, and gene sequenced (ORF-K1). New sequences from this study are denoted "BR", followed by the location and code, and a symbol indicating location within Brazil (filled circle: São Paulo, SP; filled square: Rio de Janeiro, RJ). Values at internal nodes indicate percentages of 500 bootstrap replicates that support the branch.

complete HHV-8 ORF-K1 sequence. Fig. 1 shows the phylogenetic reconstruction of new sequences from the 24 HIV/KS individuals from Brazil (including 14 from the state of São Paulo and 10 from the state of Rio de Janeiro), and 59 reference sequences from GenBank.

This phylogenetic analysis (Fig. 1) clearly distinguishes the six known genotypic clades (A, B, C, D, E, F), and all these branches have high bootstrap values. Among all of our 24 samples from Brazil, genotype C was predominant (11, 45.8%), followed by genotype A (7, 29.2%) and genotype B (6, 25%). The proportion of genotypes A, B, and C were 28.6%, 28.6% and 42.8% in the SP group, and 30%, 20% and 50% in the RJ group. By comparing the genotypic distribution of HHV-8 between the states of São Paulo and Rio de Janeiro, no statistical difference was observed (Chi-square test, Fisher's exact test, $P = 0.885$).

There was no statistical difference in the genotypic distribution of HHV-8 between clinical and epidemiological characteristics (Chi-square test, p -value > 0.05). No statistical difference was observed in the genotypic distribution of HHV-8 between viral load of HHV-8 and HIV (One-Way ANOVA, Tukey's test, $P = 0.852$ and $P = 0.531$, respectively).

Table 4 summarizes the HHV-8 data of each of the 24 samples collected from Brazil, including clinical samples, year of collection, viral load, genotype, and GenBank accession number.

We also calculated mean genetic distances between ORF-K1 sequences from different geographical regions (Supplementary Table) and Brazil using Kimura's two parameter model (Table 5). This distance ranged from 1.9 to 4.9% for clade A, 1.9–5.3% for clade B, and 2.0–5.0% for clade C.

The lowest genetic distances for Brazilian HHV-8/A isolates were in

Table 4
Characteristics of HHV-8 samples collected from HIV/KS individuals in Brazil based on phylogenetic analysis of the HHV-8 K1 gene.

Sample code	Clinical samples	Year of collection	Viral load (copies/ml)	Genotype	GenBank accession number
BR SP 10	saliva	2016	2.51×10^6	C	MN318222
BR SP 15	saliva	2016	1.13×10^5	C	MN318223
BR SP 16	saliva	2016	3.52×10^5	A	MN318207
BR SP 18	saliva	2016	6.59×10^5	A	MN318208
BR SP 21	saliva	2016	2.72×10^5	C	MN318224
BR SP 23	saliva	2016	5.56×10^6	A	MN318209
BR SP 25	saliva	2016	9.29×10^5	C	MN318225
BR SP 26	saliva	2016	9.71×10^4	C	MN318226
BR SP 29	saliva	2016	5.71×10^2	B	MN318213
BR RJ 322424	serum	2017	2.9×10^7	C	MN318220
BR RJ 30736	serum	2017	4.4×10^2	B	MN318212
BR RJ 32063	serum	2017	3.6×10^4	B	MN318211
BR RJ 31722	serum	2017	2.26×10^8	C	MN318219
BR RJ 32345	serum	2017	3.6×10^5	A	MN318206
BR RJ 07	serum	2017	3.8×10^7	C	MN318221
BR RJ 32103	serum	2017	3.55×10^7	C	MN318218
BR SP 33	saliva	2017	3.52×10^6	B	MN318214
BR SP 39	saliva	2017	8.27×10^6	C	MN318227
BR SP 42	saliva	2017	1.22×10^5	A	MN318210
BR SP 48	saliva	2017	5.81×10^7	B	MN318215
BR RJ 31424	serum	2018	7.09×10^9	A	MN318205
BR RJ 31617	serum	2018	9.92×10^7	A	MN318204
BR RJ 33854	serum	2018	1.46×10^9	C	MN318217
BR SP 50	saliva	2018	1.40×10^6	B	MN318216

Table 5
Mean genetic distances between HHV-8 (ORF-K1) isolates from Brazil and other geographic regions.

Country	sequences n	Genotypes					
		A		B		C	
		n	Mean genetic distance	n	Mean genetic distance	n	Mean genetic distance
Algeria	1	0	–	0	–	1	2.1
Argentina	22	3	2.8	4	2.2	15	3.4
Australia	12	9	2.3	0	–	3	2
Botswana	1	1	3.9	0	–	0	–
Cameroon	6	6	3.4	0	–	0	–
Central African Republic	12	5	3.6	5	2.8	2	3.3
Congo	1	0	–	1	1.7	0	–
Cuba	20	14	4.9	5	3.9	1	3.9
Democratic Republic of the Congo	1	0	–	1	1.9	0	–
England	10	5	2.4	1	2	4	2.1
France	14	1	2.8	0	–	13	2.2
French Guiana	11	4	3.2	6	3.4	1	2.1
Gambia	9	0	–	9	4.1	0	–
Greece	8	4	2.9	0	–	4	4.4
Iceland	2	1	2.7	0	–	1	5
Iran	4	0	–	0	–	4	3.4
Italy	30	18	3.1	0	–	12	3.7
Japan	12	5	2.3	0	–	7	2.9
Kenya	13	12	2.9	0	–	1	4.4
Mauritania	1	1	2.7	0	–	0	–
Morocco	35	5	4.4	0	–	30	2.3
Russia	32	26	2.2	0	–	6	3.2
Saudi Arabia	13	10	4.7	0	–	3	3.5
Senegal	2	0	–	1	3.7	1	2.2
South Africa	102	58	3.1	44	3.9	0	–
Spain	2	2	3.1	0	–	0	–
Tartar (Russia)	2	2	1.9	0	–	0	–
Togo	1	0	–	1	5.3	0	–
Tunisia	2	0	–	0	–	2	2.3
Turkey	1	1	2.6	0	–	0	–
Uganda	67	36	3.3	27	3.5	4	4.5
Ukraine	3	2	2.2	0	–	1	3.8
United States	18	12	2.5	0	–	6	3.5
Brazil	53 (24 ^a)	14 (7 ^a)	–	20 (6 ^a)	–	19 (11 ^a)	–
Total	523	257	–	125	–	141	–

^a Brazilian HHV-8 sequences generated in this study.

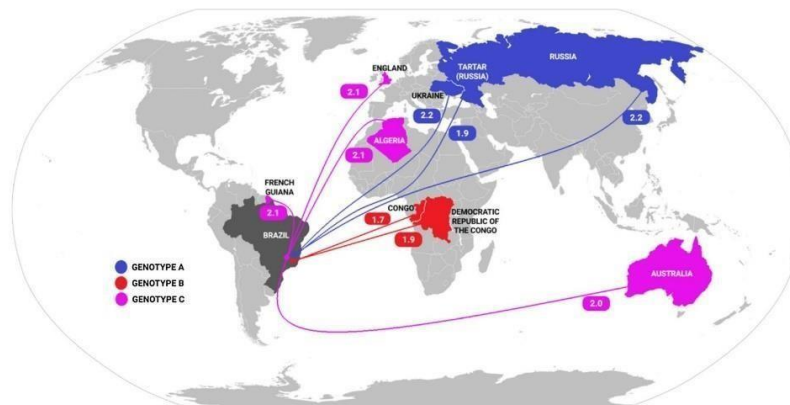


Fig. 2. Possible geographic origins of HHV-8 genotypic clades A, B, and C in Brazil based on calculation of genetic distances from previously described HHV-8 isolates. The lowest mean genetic distance between ORF-K1 sequences from Brazil and other regions are indicated in rectangles. Genotype A: blue; genotype B: red; genotype C: pink.

Ukraine, Russia, and the Tartar ethnic group. The lowest distances for Brazilian HHV-8/B isolates were in Congo and Democratic Republic of the Congo. The lowest distances for Brazilian HHV-8/C isolates were in Australia, Algeria, England, and French Guiana (Table 5). These genetic distance data led to our hypotheses about the possible geographic origins of these different genotypic clades in Brazil (Fig. 2).

4. Discussion

In this study, we characterized isolates of HHV-8 from HIV/KS patients living in Brazil in an effort to better understand the molecular epidemiological characteristics of HHV-8 in this country. The initial molecular classification of HHV-8 strains was based on ORF26 and ORF75 genes. However, analyses using these sequences were limited because of the very low variation of these genes (Fouchard et al., 2000; Pérez and Tous, 2017), which are highly conserved structural genes (Cook et al., 1999). On the other hand, the use of more variable genomic regions, such as ORF-K1, is now widely accepted in molecular studies of the epidemiology of HHV-8 for determination of the origin, genetic evolution, transmissibility, and disease associations of this virus (Fouchard et al., 2000; Pérez and Tous, 2017).

The ORF-K1 gene has very high variability. These variations are concentrated in the central region which has two hypervariable regions (VR1 and VR2) (Lacoste et al., 2000a), and with up to 85 % of nucleotide changes in these regions producing amino acid changes (Isaacs et al., 2016; Zong et al., 2007, 1999). Therefore, epidemiologists regard ORF-K1 as a marker of strain diversity and use it to investigate HHV-8 epidemiological spread. This virus is now grouped into six main genotypic clades (A to F) that have distinct distributions among different geographic and ethnic groups, and appear to migrate with the human populations (Hayward, 1999; Isaacs et al., 2016; Liu et al., 2017; Zong et al., 1999).

Evolutionary analysis indicated that genotype B appeared about 100,000 years ago in Africa; genotypes D and E arose about 60,000 years ago on the Pacific Islands and in Amerindian populations, respectively; and genotypes A and C appeared about 35,000 years ago in Eurasia (Marashi et al., 2018; Zong et al., 2002). In agreement with this scenario, genotypes A and C are currently predominant in Europe, the United States, most parts of Asia, and the Middle East, and genotype B is predominant in Africa. The more rare genotypes D, E, and F have only been reported in the Pacific Islands and Taiwan, Amerindian populations of Latin America, and Uganda and Brazil, respectively (Tozetto-Mendoza et al., 2016).

Our phylogenetic analysis of the K1 gene in 24 isolates from Brazil indicated that genomes clustered with genotype A (29.2 %), genotype B (25 %), and genotype C (45.8 %), rather than as a single monophyletic cluster. This suggests that these genotypes were introduced into Brazil at multiple times and from multiple locations (Fig. 1).

Our analysis of the putative origins of HHV-8 genotypes in this study was based on calculations of mean genetic distance. Thus, the putative origins of HHV-8/A isolates were the Tartar ethnic group, Russia, and Ukraine (1.9, 2.2, and 2.2, respectively; Table 5 and Fig. 2). Notably, during the late nineteenth and early twentieth centuries, Brazil received a large influx of immigrants from different countries, including these regions (Spitz et al., 2017), where genotype A is common (Kadyrova et al., 2003; Lacoste et al., 2000b).

The putative origins of HHV-8/B isolates were Congo and Democratic Republic of the Congo (1.7 and 1.9, respectively) (Table 5 and Fig. 2). It is possible that these HHV-8 B strains were brought by African slaves during the colonial period of Brazil (16th century), and that their circulation has increased since then.

Genotype C is common in European countries (England and France) (Cook et al., 1999; Lacoste et al., 2000a) and regions subsequently occupied or colonized by these countries (Australia, Algeria, French Guiana) (Augustyn et al., 2019; Democracy, 2019; Lacoste et al., 2000a; Meng et al., 1999; Sutton et al., 2019). The Brazilian C sequences had

the lowest genetic distances for C sequences from Australia, Algeria, England, and French Guiana (2.0, 2.1, 2.1, and 2.1, respectively) (Table 5 and Fig. 2). Therefore, it is likely that the Brazilian C strains were brought into Brazil by immigrants of these countries.

Our findings are thus consistent with the early history of Portuguese colonization in Brazil during the early 16th century, when most residents were African slaves, and the subsequent history when there were waves of migration mainly from Europe, Asia, and the Middle East. Overall, immigrants from more than 60 countries arrived in Brazil before 1930 (Wejsa and Lesser, 2019). Nevertheless, as the samples were obtained from HIV infected individuals the route of transmission could have been more recent through sexual contact on a trip or sex with tourist visiting the country. Further studies including phylogeography analysis could clarify the route of transmission of HHV-8 in Brazil.

Previous HHV-8 genotyping using the K1 gene has employed different strategies, such as analysis of the complete ORF-K1 region (approximately 870 bp) including both hypervariable regions (VR1 and VR2); separate analysis of the two hypervariable regions to produce two phylogenetic trees; and analysis of the VR1 region only (Pérez and Tous, 2017; Tozetto-Mendoza et al., 2016). Previous molecular epidemiological studies in Brazil have exploited the genetic diversity of HHV-8 ORF-K1 (partial and/or complete K1 gene) and showed a wide spectrum of genotypes circulating in the Brazil, including genotypes A, B, C, E, and F (Biggar et al., 2000; Nascimento et al., 2005; Ramos da Silva et al., 2011; Tozetto-Mendoza et al., 2016).

However, mismatches within the sites of the primers for VR1 and VR2 were observed after analysis of the alignment containing reference sequences of HHV-8. This may have led to biased genotyping if certain primers preferentially amplified one genotype over another. For example, the VR2 assay can lead to underestimation of HHV-8 genotype B (Tozetto-Mendoza et al., 2016). Therefore, phylogenetic analysis based on the whole ORF-K1 sequence is more reliable (Ramos da Silva et al., 2011), because the sites of the primers used for amplification are more conserved (located at both ends of the K1 gene) (Lacoste et al., 2000a; Poole et al., 1999). Thus, we analyzed the complete K1 gene and identified 7 new Brazilian sequences for genotype A, 6 new Brazilian sequences for genotype B, and 11 new Brazilian sequences for genotype C. These new sequences provide new information for future studies of the epidemiology and evolution of HHV-8 in Brazil and elsewhere.

Previous studies proposed that different HHV-8 genotypes may have different pathogenic and tumorigenic potential (Hayward, 1999; Schwartz, 1996). Although we did not study this topic, other studies have confirmed this relationship (Boralevi et al., 1998; Cordiali-Fei et al., 2015; Isaacs et al., 2016; Mancuso et al., 2008; Marshall et al., 2010; Tozetto-Mendoza et al., 2016). However, there are conflicting data in the literature, and the nature of these relationships is still unclear (Kourí et al., 2012; Nascimento et al., 2005; Tornesello et al., 2010). Future studies of the genotypic diversity of HHV-8 may help to clarify this issue.

In this study, we used different samples (serum from patients from Rio de Janeiro, and saliva from patients from São Paulo) for HHV-8 detection. It is well known that HHV-8 can be detected in different body fluids, especially in saliva. Although this detection is reported to be less common in serum (de França et al., 2011), we identified high HHV-8 load average in this fluid (1.25×10^9 copies/mL) (Table 3). This can be explained mainly because these patients were immunocompromised. We found that 75 % of these patients from Rio de Janeiro had CD4 + T lymphocyte count < 200 cells/mm³ blood and HIV load average of 1.69×10^5 copies/mL (Table 3). In addition, cooperation mechanisms between HIV-1 and HHV-8 may culminate in this HHV-8 spread in the host organism (Lopes et al., 2019).

5. Conclusion

In conclusion, this study allowed us to identify the possible origins

of HHV-8 genotypes A, B, and C in Brazil, and provides new insights about the geographic circulation of HHV-8 genotypes in the world. The HHV-8 ORF-K1 sequences reported here will provide a basis for future studies of the molecular epidemiology and genetic evolution of HHV-8.

Funding statement

This work was supported by CAPES (Coordination of Superior Level Staff Improvement; grant number 1632788), CNPq (National Council of Scientific and Technological Development; grant number 423401/2018-1 and 202.562/2019) and FAPERJ (State of Rio de Janeiro Research Support Foundation; grant number 218410).

Data availability

The datasets used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

CRedit authorship contribution statement

Amanda de Oliveira Lopes: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Writing - original draft. **Natália Spitz:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Katrin Guidolini Martinelli:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Anderson Vicente de Paula:** Methodology, Resources. **Ana Luiza de Castro Conde Toscano:** Methodology, Resources. **Paulo Henrique Braz-Silva:** Resources, Writing - review & editing. **Juliana dos Santos Barbosa Netto:** Resources, Writing - review & editing. **Tania Regina Tozetto-Mendoza:** Methodology, Resources, Writing - review & editing. **Vanessa Salete de Paula:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there exist no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

We thank Andreza S. Lemos from LVM/IOC/FIOCRUZ for assistance with sending the sequences generated in this study to Genbank, the Platform of Technological Development Program in Materials for Health/PDTIS of Fiocruz (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil) (RPT01A) for technical support, and the CAPES, CNPq, and FAPERJ for funding.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197828>.

References

- Augustyn, A., Bauer, P., Duignan, B., Eldridge, A., Gregersen, E., McKenna, A., Petruzzello, M., Rafferty, J., Ray, M., Rogers, K., Tikkanen, A., Wallenfeldt, J., Zeidan, A., Zelazko, A., 2019. French Guiana: Territorial Collectivity, France Vol. 2019 Encyclopedia Britannica, United States.
- Beyari, M.M., Hodgson, T.A., Cook, R.D., Kondowe, W., Molyneux, E.M., Scully, C.M., Tso, C.G., Porter, S.R., 2003. Multiple human herpesvirus-8 infection. *J. Infect. Dis.* 188 (5), 678–689.
- Biggar, R.J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A.C., Black, F., 2000. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J. Infect. Dis.* 181 (5), 1562–1568.
- Boralevi, F., Masquelier, B., Denayrolles, M., Dupon, M., Pellegrin, J.L., Ragnaud, J.M., Fleury, H.J., 1998. Study of human herpesvirus 8 (HHV-8) variants from Kaposi's

- sarcoma in France: is HHV-8 subtype A responsible for more aggressive tumors? *J. Infect. Dis.* 178 (5), 1546–1547.
- Cook, P.M., Whitby, D., Calabro, M.L., Luppi, M., Kakoola, D.N., Hjalgrim, H., Ariyoshi, K., Enslin, B., Davison, A.J., Schulz, T.F., 1999. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group. *AIDS* 13 (10), 1165–1176.
- Cordiali-Fei, P., Trento, E., Giovanetti, M., Lo Presti, A., Latini, A., Giuliani, M., D'Agosto, G., Bordignon, V., Cella, E., Farchi, F., Ferraro, C., Lesnoni La Parola, I., Cota, C., Sperduti, I., Vento, A., Cristaudo, A., Ciccozzi, M., Enslin, F., 2015. Analysis of the ORF1 hypervariable regions reveal distinct HHV-8 clustering in Kaposi's sarcoma and non-Kaposi's cases. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34, 1.
- de França, T.R., de Araújo, R.A., Ribeiro, C.M., Leao, J.C., 2011. Salivary shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. *J. Oral Pathol. Med.* 40 (1), 97–102.
- Democracy, M.o.A., 2019. Australia's Story: Timeline 60,000 BC–1836 Vol. 2019 Australia's National Council, Australia.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32 (5), 1792–1797.
- Fouchar, N., Lacoste, V., Guipple, P., Develoux, M., Mauciere, P., Michel, P., Herve, V., Pradinaud, R., Bestetti, G., Huerre, M., Tekala, F., de Thé, G., Gessain, A., 2000. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. *Int. J. Cancer* 85 (2), 166–170.
- Hayward, G.S., 1999. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin. Cancer Biol.* 9 (3), 187–199.
- Isaacs, T., Abera, A.B., Muloiwa, R., Katz, A.A., Todd, G., 2016. Genetic diversity of HHV8 subtypes in South Africa: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS. *J. Med. Virol.* 88 (2), 292–303.
- Kadyrova, E., Lacoste, V., Duprez, R., Pozharitsky, K., Molochkov, V., Huerre, M., Gurtsevitch, V., Gessain, A., 2003. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 71 (4), 548–556.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 (2), 111–120.
- Kourfi, V., Martinez, P.A., Capó, V., Blanco, O., Rodríguez, M.E., Jiménez, N., Fleites, G., Caballero, I., Dovigny, M.C., Alemán, Y., Correa, C., Pérez, L., Soto, Y., Gardellá, L., Álvarez, A., Nambiar, S., Hengge, U., 2012. Kaposi's Sarcoma and Human Herpesvirus 8 in Cuba: evidence of subtype B expansion. *Virology* 432 (2), 361–369.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7), 1870–1874.
- Lacoste, V., Judde, J.G., Brière, J., Tulliez, M., Garin, B., Kassa-Kelembho, E., Morvan, J., Couppié, P., Clyti, E., Forteza Vila, J., Rio, B., Delmer, A., Mauciere, P., Gessain, A., 2000a. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K1.4.1/K1.5 loci, are frequent and widespread. *Virology* 278 (1), 60–74.
- Lacoste, V., Kadyrova, E., Chistiakova, I., Gurtsevitch, V., Judde, J.G., Gessain, A., 2000b. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 5), 1217–1222.
- Lee, B.S., Connole, M., Tang, Z., Harris, N.L., Jung, J.U., 2003. Structural analysis of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 protein. *J. Virol.* 77 (14), 8072–8086.
- Levi, J.E., Nascimento, M.C., Sumita, L.M., de Souza, V.A., Freire, W.S., Mayaud, P., Pannuti, C.S., 2011. Non-detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8 seropositive blood donors from three Brazilian regions. *PLoS One* 6 (8), e23546.
- Liu, Z., Fang, Q., Zuo, J., Minhas, V., Wood, C., He, N., Zhang, T., 2017. Was Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus introduced into China via the ancient Silk Road? An evolutionary perspective. *Arch. Virol.* 162 (10), 3061–3068.
- Lopes, A.O., Lima, L.R.P., Tozetto-Mendoza, T.R., Martinelli, K.G., Morgado, M.G., Pilotto, J.H., de Paula, V.S., 2019. Low prevalence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 1–4.
- Mancuso, R., Biffi, R., Valli, M., Belliniva, M., Tourlaki, A., Athanasiu, T., Ferrucci, S., Brambilla, L., DelBus, S., Ferrante, P., Tinelli, C., Clerici, M., 2008. HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 80 (12), 2153–2160.
- Marashi, S.M., Mostafa, A., Shoja, Z., Nejati, A., Shahmohammadi, S., Mollaei-Kandelous, Y., Sahraian, M.A., Jalilvand, S., 2018. Human herpesvirus 8 DNA detection and variant analysis in patients with multiple sclerosis. *Virusdisease* 29 (4), 540–543.
- Marshall, V., Martró, E., Labo, N., Ray, A., Wang, D., Mbisa, G., Bagni, R.K., Volfovsky, N., Casabona, J., Whitby, D., Group, E.-S.S., 2010. Kaposi sarcoma (KS)-associated herpesvirus microRNA sequence analysis and KS risk in a European AIDS-KS case control study. *J. Infect. Dis.* 202 (7), 1126–1135.
- Meng, Y.X., Spira, T.J., Bhat, G.J., Birch, C.J., Druot, J.D., Edlin, B.R., Edwards, R., Gunthel, C., Newton, R., Stamey, F.R., Wood, C., Pelletti, P.E., 1999. Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology* 261 (1), 106–119.
- Nascimento, M.C., Wilder, N., Pannuti, C.S., Weiss, H.A., Mayaud, P., 2005. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Sao Paulo, Brazil. *J. Clin. Virol.* 33 (1), 52–59.
- Olp, L.N., Jeanniard, A., Marimo, C., West, J.T., Wood, C., 2015. Whole-genome sequencing of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from Zambian Kaposi's sarcoma biopsy specimens reveals unique viral diversity. *J. Virol.* 89 (24), 12299–12308.
- Poole, L.J., Zong, J.C., Cluff, D.M., Alencor, D.J., Cannon, J.S., Ambinder, R., Orenstein, J.M., Reitz, M.S., Hayward, G.S., 1999. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated

- herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J. Virol.* 73 (8), 6646–6660.
- Pérez, C.L., Tous, M.I., 2017. Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina. *J. Med. Virol.* 89 (11), 2020–2028.
- Ramos da Silva, S., Ferraz da Silva, A.P., Bocchi, M.M., Bacchi, C.E., Elgui de Oliveira, D., 2011. KSHV genotypes A and C are more frequent in Kaposi sarcoma lesions from Brazilian patients with and without HIV infection, respectively. *Cancer Lett.* 301 (1), 85–94.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732), 1350–1354.
- Schwartz, R.A., 1996. Kaposi's sarcoma: advances and perspectives. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34 (5 Pt 1), 804–814.
- Spitz, N., Moreira, A.S., Mello, F.C.A., Franz, H.C.F., Gomes, S.A., Araujo, N.M., 2017. Complete genome sequence of a hepatitis B virus isolate of genotype D2, subtype adrq+, from Brazil. *Arch. Virol.* 162 (6), 1695–1700.
- Sutton, K., Chanderli, A., Zaimche, S., Brown, L., 2019. Algeria Vol. 2019 Encyclopedia Britannica, United States.
- Tornesello, M.L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Rocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M., 2010. Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology* 398 (2), 280–289.
- Tozetto-Mendoza, T.R., Ibrahim, K.Y., Tateno, A.F., Oliveira, C.M., Sumita, L.M., Sanchez, M.C., Luna, E.J., Pierrotti, L.C., Drexler, J.F., Braz-Silva, P.H., Pannuti, C.S., Romano, C.M., 2016. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS? *Medicine (Baltimore)* 95 (48), e5291.
- Tozetto-Mendoza, T.R., Sumita, L.M., Palmieri, M., Ormaghi, M., do Canto, A.M., Braz-Silva, P.H., 2018. No detectable human herpesvirus-8 oral shedding in seronegative-healthy, immunocompetent individuals from non-endemic regions for Kaposi's sarcoma: a pilot study. *J. Investig. Clin. Dent.* 9 (1).
- Wejsa, S., Lesser, J., 2019. Migration in Brazil: The Making of a Multicultural Society Vol. 2019 Migration Policy Institute, Washington, DC.
- Zong, J., Clufo, D.M., Viscidi, R., Alagiozoglou, L., Tyring, S., Rady, P., Orenstein, J., Boto, W., Kalumbuja, H., Romano, N., Melbye, M., Kang, G.H., Boshoff, C., Hayward, G.S., 2002. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J. Clin. Virol.* 23 (3), 119–148.
- Zong, J.C., Arav-Boger, R., Alcendor, D.J., Hayward, G.S., 2007. Reflections on the interpretation of heterogeneity and strain differences based on very limited PCR sequence data from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genomes. *J. Clin. Virol.* 40 (1), 1–8.
- Zong, J.C., Clufo, D.M., Alcendor, D.J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P.J., Rady, P.L., Tyring, S.K., Orenstein, J.M., Rabkin, C.S., Su, L.J., Powell, K.F., Croxson, M., Foreman, K.E., Nickoloff, B.J., Alkan, S., Hayward, G.S., 1999. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol.* 73 (5), 4156–4170.

Material Supplementar

Supplementary table. GenBank accession numbers and references of the 499 ORFK1/HHV8 sequences used in the Bayesian phylogeographic analyses.

GenBank accession number	Genotype	Country	Reference*
KU950273	A	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950281	A	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950284	A	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
AF278824	A	Australia	(Meng et al., 1999)
AF278825	A	Australia	(Meng et al., 1999)
JN613419	A	Australia	(Speicher et al., 2013)
JN613420	A	Australia	(Speicher et al., 2013)
JN800483	A	Australia	Unpublished
JN800485	A	Australia	Unpublished
JN800488	A	Australia	Unpublished
JN800490	A	Australia	Unpublished
JN800491	A	Australia	Unpublished
AY329023	A	Botswana	(Whitby et al., 2004)
KT215095	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215096	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215097	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215107	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215108	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215109	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215123	A	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
AF171058	A	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)
AF178784	A	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)
AF178797	A	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)
FJ884607	A	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
GU097429	A	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
GU097432	A	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
AF171059	A	CAR	(Fouchard et al., 2000)
AF178779	A	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178790	A	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178798	A	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178823	A	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AY623768	A	Cuba	Unpublished
AY623769	A	Cuba	Unpublished
AY623771	A	Cuba	Unpublished
AY623772	A	Cuba	Unpublished

AY623773	A	Cuba	Unpublished
AY623774	A	Cuba	Unpublished
AY623776	A	Cuba	Unpublished
AY623778	A	Cuba	Unpublished
AY623779	A	Cuba	Unpublished
AY623780	A	Cuba	Unpublished
AY623782	A	Cuba	Unpublished
AY623785	A	Cuba	Unpublished
AY623787	A	Cuba	Unpublished
AY623790	A	Cuba	Unpublished
AF130295	A	England	(Cook et al., 1999)
AF130296	A	England	(Cook et al., 1999)
AF130297	A	England	(Cook et al., 1999)
AF130299	A	England	(Cook et al., 1999)
AF130303	A	England	(Cook et al., 1999)
AF178775	A	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178778	A	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178785	A	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178819	A	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF171057	A	French Guiana	(Fouchard et al., 2000)
FJ884608	A	Greece	(Tornesello et al., 2010)
FJ884610	A	Greece	(Tornesello et al., 2010)
GU097419	A	Greece	(Tornesello et al., 2010)
GU097420	A	Greece	(Tornesello et al., 2010)
AF130272	A	Iceland	(Cook et al., 1999)
AF130269	A	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130282	A	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130283	A	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130284	A	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130285	A	Italy	(Cook et al., 1999)
FJ884611	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
FJ884612	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
FJ884613	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
FJ884615	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
GU097421	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
GU097430	A	Italy	(Tornesello et al., 2010)
HQ391919	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391920	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391923	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391924	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391934	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391935	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391950	A	Italy	(Mancuso et al., 2011)

AF178786	A	Japan	(Lacoste et al., 2000a)
AF278838	A	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278839	A	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278851	A	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278852	A	Japan	(Meng et al., 2001)
GU097427	A	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
GU097433	A	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
GU097435	A	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
JN800492	A	Kenya	Unpublished
JN800493	A	Kenya	Unpublished
JN800494	A	Kenya	Unpublished
JN800495	A	Kenya	Unpublished
JN800496	A	Kenya	Unpublished
JN800497	A	Kenya	Unpublished
JN800498	A	Kenya	Unpublished
JN800499	A	Kenya	Unpublished
JN800500	A	Kenya	Unpublished
AF178812	A	Mauritania	(Lacoste et al., 2000a)
DQ394037	A	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394038	A	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394057	A	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394064	A	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394068	A	Marocco	(Duprez et al., 2006)
AF201847	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AF201848	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AF201849	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AF201850	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AF201852	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AF201853	A	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AY204643	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204644	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204645	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204647	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204648	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204650	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204652	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204653	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204654	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204655	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204660	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204662	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204663	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204664	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)

AY204665	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204667	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204668	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204670	A	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
KJ130029	A	Russia	(Shirokov et al., 2007)
KJ583230	A	Russia	Unpublished
AM423127	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423128	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423129	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423131	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423132	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423133	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423134	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423137	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423138	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423139	A	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AF387369	A	South Africa	(Treurnicht et al., 2002)
KP997035	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997040	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997041	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997044	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997046	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997048	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997049	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997051	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997052	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997053	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997054	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997057	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997058	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997059	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997061	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997063	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997065	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997070	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997073	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997075	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997078	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997083	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997085	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997086	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997087	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997088	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)

KP997089	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997090	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997091	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997092	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997093	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997097	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997098	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997099	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997101	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997103	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997105	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997106	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997107	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997109	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997110	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997111	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997112	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997113	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997117	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997118	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997120	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997121	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997123	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997124	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997125	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997126	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997127	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997131	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997132	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997133	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997135	A	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
AF130305	A	spain	(Cook et al., 1999)
AF178794	A	spain	(Lacoste et al., 2000a)
AY204646	A	Tartar	(Kadyrova et al., 2003)
AY204651	A	Tartar	(Kadyrova et al., 2003)
AF178829	A	Turkey	(Lacoste et al., 2000a)
AF130288	A	Uganda	(Cook et al., 1999)
AF130289	A	Uganda	(Cook et al., 1999)
AF151690	A	Uganda	(Meng et al., 1999)
AF278831	A	Uganda	(Meng et al., 1999)
AY042950	A	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042951	A	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042952	A	Uganda	(Kakoola et al., 2001)

AY042953	A	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042955	A	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
FJ884623	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
FJ884624	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
FJ884625	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
GU097426	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
GU097428	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
GU097434	A	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
MH632204	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632205	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632207	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632209	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632210	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632212	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632214	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632217	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632218	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632223	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632225	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632228	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632229	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632231	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632232	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632234	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632235	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632237	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632238	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632239	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632240	A	Uganda	(Zong et al., 1999)
AY204641	A	Ukraine	(Kadyrova et al., 2003)
AY204657	A	Ukraine	(Kadyrova et al., 2003)
AF133038	A	United States	(Nicholas et al., 1998)
AF133039	A	United States	(Nicholas et al., 1998)
AF151688	A	United States	(Meng et al., 1999)
AF178799	A	United States	(Lacoste et al., 2000a)
AF178807	A	United States	(Lacoste et al., 2000a)
AF278827	A	United States	(Meng et al., 1999)
AF278828	A	United States	(Meng et al., 1999)
AF278829	A	United States	(Meng et al., 1999)
AF278830	A	United States	(Meng et al., 1999)
FJ884626	A	United States	(Tornesello et al., 2010)
GU097431	A	United States	(Tornesello et al., 2010)
U86667	A	United States	(Lagunoff and Ganem, 1997)

KU950275	B	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950276	B	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950286	B	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950295	B	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KT215098	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215099	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215100	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215101	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215102	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215110	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215111	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215112	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215113	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215114	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215115	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215116	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215117	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215118	B	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
AF178791	B	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178792	B	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178796	B	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178801	B	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178824	B	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178783	B	Congo	(Lacoste et al., 2000a)
AY623770	B	Cuba	Unpublished
AY623775	B	Cuba	Unpublished
AY623781	B	Cuba	Unpublished
AY623784	B	Cuba	Unpublished
AY623789	B	Cuba	Unpublished
AF133040	B	Democratic Republic of the Congo	(Nicholas et al., 1998)
AF130301	B	England	(Cook et al., 1999)
AF178782	B	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178788	B	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178821	B	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178822	B	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF178825	B	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF171056	B	French Guiana	(Fouchard et al., 2000)
AF130259	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130260	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130261	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130262	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130263	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130264	B	Gambia	(Cook et al., 1999)

AF130265	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130266	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF130306	B	Gambia	(Cook et al., 1999)
AF178818	B	Senegal	(Lacoste et al., 2000a)
KP997034	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997036	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997037	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997038	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997039	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997042	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997043	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997045	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997047	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997050	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997055	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997056	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997060	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997062	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997064	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997066	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997067	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997068	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997069	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997071	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997072	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997074	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997077	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997079	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997080	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997081	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997082	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997084	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997094	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997095	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997096	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997100	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997102	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997104	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997108	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997114	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997115	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997116	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997119	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)

KP997122	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997128	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997129	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
KP997130	B	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
MH632203	B	South Africa	(Zong et al., 1999)
AF178804	B	Togo	(Lacoste et al., 2000a)
AF130290	B	Uganda	(Cook et al., 1999)
AF130292	B	Uganda	(Cook et al., 1999)
AF130293	B	Uganda	(Cook et al., 1999)
AF151689	B	Uganda	(Meng et al., 1999)
AY042940	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042941	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042942	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042944	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042945	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042946	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042947	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042948	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
AY042949	B	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
FJ884618	B	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
MH632206	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632208	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632211	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632213	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632215	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632219	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632220	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632221	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632222	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632226	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632227	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632230	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632236	B	Uganda	(Zong et al., 1999)
AF178805	C	Algeria	(Lacoste et al., 2000a)
KU950272	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950274	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950277	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950278	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950279	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950280	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950285	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950287	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950288	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)

KU950290	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950291	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950292	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950293	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950294	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
KU950296	C	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
AF278823	C	Australia	(Meng et al., 1999)
JN800484	C	Australia	Unpublished
JN800489	C	Australia	Unpublished
KT215103	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215104	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215105	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215119	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215120	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215121	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215122	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
KT215124	C	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
AF178780	C	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AF178789	C	CAR	(Lacoste et al., 2000a)
AY623777	C	Cuba	Unpublished
AF130298	C	England	(Cook et al., 1999)
AF130300	C	England	(Cook et al., 1999)
AF130302	C	England	(Cook et al., 1999)
AF130304	C	England	(Cook et al., 1999)
AF042370	C	France	(Morand et al., 1999)
AF178773	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178774	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178777	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178781	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178787	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178793	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178795	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178800	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178803	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178806	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178808	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178828	C	France	(Lacoste et al., 2000a)
AF178776	C	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
AF130267	C	Greece	(Cook et al., 1999)
AF130268	C	Greece	(Cook et al., 1999)
GU097417	C	Greece	(Tornesello et al., 2010)
GU097423	C	Greece	(Tornesello et al., 2010)
AF130273	C	Iceland	(Cook et al., 1999)

JN242286	C	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
JN242287	C	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
JN242288	C	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
JN242289	C	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
AF130270	C	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130271	C	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130274	C	Italy	(Cook et al., 1999)
AF130286	C	Italy	(Cook et al., 1999)
FJ884614	C	Italy	(Tornesello et al., 2010)
GU097425	C	Italy	(Tornesello et al., 2010)
HQ391937	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391939	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391942	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391943	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391945	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
HQ391946	C	Italy	(Mancuso et al., 2011)
AF278840	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278841	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278843	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278847	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278848	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278849	C	Japan	(Meng et al., 2001)
AF278850	C	Japan	(Meng et al., 2001)
GU097418	C	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
DQ394034	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394035	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394036	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394039	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394040	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394041	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394042	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394043	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394044	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394045	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394046	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394047	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394048	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394049	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394050	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394051	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394052	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394053	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394054	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)

DQ394055	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394056	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394058	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394059	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394060	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394061	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394062	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394063	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394065	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394066	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
DQ394067	C	Marocco	(Duprez et al., 2006)
AF201851	C	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
AY204642	C	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204649	C	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204661	C	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204666	C	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AY204669	C	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
AM423130	C	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423135	C	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AM423136	C	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
AF178820	C	Senegal	(Lacoste et al., 2000a)
AY766082	C	Tunisia	Unpublished
AY766083	C	Tunisia	Unpublished
AY042954	C	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
GU097424	C	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
MH632224	C	Uganda	(Zong et al., 1999)
MH632233	C	Uganda	(Zong et al., 1999)
AY204659	C	Ukrainia	(Kadyrova et al., 2003)
AF133041	C	United States	(Nicholas et al., 1998)
AF133042	C	United States	(Nicholas et al., 1998)
AF151686	C	United States	(Meng et al., 1999)
AF170531	C	United States	(Samaniego et al., 2001)
AF278826	C	United States	(Meng et al., 1999)
GU097422	C	United States	(Tornesello et al., 2010)

Note: CAR, Central African Republic. *Unpublished: Sequences unpublished on Pubmed. Informations collected from Genbank.

References

- 1) Al-Otaibi, L.M., Ngui, S.L., Scully, C.M., Porter, S.R., Teo, C.G., 2007. Salivary human herpesvirus 8 shedding in renal allograft recipients with Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 79(9), 1357-1365.
- 2) Cook, P.M., Whitby, D., Calabro, M.L., Luppi, M., Kakoola, D.N., Hjalgrim, H., Ariyoshi, K., Ensoli, B., Davison, A.J., Schulz, T.F., 1999. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group. *AIDS* 13(10), 1165-1176.
- 3) Duprez, R., Hbid, O., Afonso, P., Quach, H., Belloul, L., Fajali, N., Ismaili, N., Benomar, H., Hassane Tahri, E., Huerre, M., Quintana-Murci, L., Gessain, A., 2006. Molecular epidemiology of the HHV-8 K1 gene from Moroccan patients with Kaposi's sarcoma. *Virology* 353(1), 121-132.
- 4) Fouchard, N., Lacoste, V., Couppie, P., Develoux, M., Maclere, P., Michel, P., Herve, V., Pradinaud, R., Bestetti, G., Huerre, M., Tekai, F., de Thé, G., Gessain, A., 2000. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. *Int J Cancer* 85(2), 166-170.
- 5) Isaacs, T., Abera, A.B., Muloiwa, R., Katz, A.A., Todd, G., 2016. Genetic diversity of HHV8 subtypes in South Africa: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS. *J Med Virol* 88(2), 292-303.
- 6) Jalilvand, S., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., Buonaguro, L., Naraghi, Z.S., Shoja, Z., Ziaee, A.A., Hamkar, R., Shahmahmoodi, S., Nategh, R., Mokhtari-Azad, T., 2012. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 variants in Kaposi's sarcoma from Iranian patients. *Virus Res* 163(2), 644-649.
- 7) Kadyrova, E., Lacoste, V., Duprez, R., Pozharissky, K., Molochkov, V., Huerre, M., Gurtsevitch, V., Gessain, A., 2003. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 71(4), 548-556.
- 8) Kakoola, D.N., Sheldon, J., Byabazaire, N., Bowden, R.J., Katongole-Mbidde, E., Schulz, T.F., Davison, A.J., 2001. Recombination in human herpesvirus-8 strains from Uganda and evolution of the K15 gene. *J Gen Virol* 82(Pt 10), 2393-2404.
- 9) Lacoste, V., Judde, J.G., Brière, J., Tulliez, M., Garin, B., Kassa-Kelembho, E., Morvan, J., Couppié, P., Clyti, E., Forteza Vila, J., Rio, B., Delmer, A., Maclère, P., Gessain, A., 2000a. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology* 278(1), 60-74.
- 10) Lacoste, V., Kadyrova, E., Chistiakova, I., Gurtsevitch, V., Judde, J.G., Gessain, A., 2000b. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia. *J Gen Virol* 81(Pt 5), 1217-1222.

- 11) Lagunoff, M., Ganem, D., 1997. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* 236(1), 147-154.
- 12) Mancuso, R., Brambilla, L., Agostini, S., Biffi, R., Hernis, A., Guerini, F.R., Agliardi, C., Tourlaki, A., Bellinva, M., Clerici, M., 2011. Intrafamilial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and seronegative infection in family members of classic Kaposi's sarcoma patients. *J Gen Virol* 92(Pt 4), 744-751.
- 13) Meng, Y.X., Sata, T., Stamey, F.R., Voevodin, A., Katano, H., Koizumi, H., Deleon, M., De Cristofano, M.A., Galimberti, R., Pellett, P.E., 2001. Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait. *J Gen Virol* 82(Pt 3), 499-506.
- 14) Meng, Y.X., Spira, T.J., Bhat, G.J., Birch, C.J., Druce, J.D., Edlin, B.R., Edwards, R., Gunthel, C., Newton, R., Stamey, F.R., Wood, C., Pellett, P.E., 1999. Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology* 261(1), 106-119.
- 15) Morand, P., Buisson, M., Collandre, H., Chanzy, B., Genoulaz, O., Bourgeat, M.J., Pinel, N., Leclercq, P., Leroux, D., Marechal, V., Fritsch, L., Ruigrok, R., Seigneurin, J.M., 1999. Human herpesvirus 8 and Epstein Barr-virus in a cutaneous B-cell lymphoma and a malignant cell line established from the blood of an AIDS patient. *Leuk Lymphoma* 35(3-4), 379-387.
- 16) Nicholas, J., Zong, J.C., Alcendor, D.J., Ciuffo, D.M., Poole, L.J., Sarisky, R.T., Chiou, C.J., Zhang, X., Wan, X., Guo, H.G., Reitz, M.S., Hayward, G.S., 1998. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr*(23), 79-88.
- 17) Pérez, C.L., Tous, M.I., 2017. Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina. *J Med Virol* 89(11), 2020-2028.
- 18) Samaniego, F., Pati, S., Karp, J.E., Prakash, O., Bose, D., 2001. Human herpesvirus 8 K1-associated nuclear factor-kappa B-dependent promoter activity: role in Kaposi's sarcoma inflammation? *J Natl Cancer Inst Monogr*(28), 15-23.
- 19) Shirokov, D., Kadyrova, E., Anokhina, M., Kondratyeva, T., Gourtsevich, V., Tupitsyn, N., 2007. A case of HHV-8-associated HIV-negative primary effusion lymphoma in Moscow. *J Med Virol* 79(3), 270-277.
- 20) Speicher, D.J., Sehu, M.M., Johnson, N.W., Shaw, D.R., 2013. Successful treatment of an HIV-positive patient with unmasking Kaposi's sarcoma immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Clin Virol* 57(3), 282-285.
- 21) Tornesello, M.L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M., 2010. Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology* 398(2), 280-289.

- 22) Tozetto-Mendoza, T.R., Ibrahim, K.Y., Tateno, A.F., Oliveira, C.M., Sumita, L.M., Sanchez, M.C., Luna, E.J., Pierrotti, L.C., Drexler, J.F., Braz-Silva, P.H., Pannuti, C.S., Romano, C.M., 2016. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS? *Medicine (Baltimore)* 95(48), e5291.
- 23) Treurnicht, F.K., Engelbrecht, S., Taylor, M.B., Schneider, J.W., van Rensburg, E.J., 2002. HHV-8 subtypes in South Africa: identification of a case suggesting a novel B variant. *J Med Virol* 66(2), 235-240.
- 24) Whitby, D., Marshall, V.A., Bagni, R.K., Wang, C.D., Gamache, C.J., Guzman, J.R., Kron, M., Ebbesen, P., Biggar, R.J., 2004. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol* 85(Pt 1), 155-163.
- 25) Zong, J.C., Ciuffo, D.M., Alcendor, D.J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P.J., Rady, P.L., Tying, S.K., Orenstein, J.M., Rabkin, C.S., Su, I.J., Powell, K.F., Croxson, M., Foreman, K.E., Nickoloff, B.J., Alkan, S., Hayward, G.S., 1999. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* 73(5), 4156-4170.

3.3. Determinação da distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1.

3.3.1. Artigo 3

Título: *Update of the global distribution of human gammaherpesvirus 8 genotypes.*

Autores: Amanda de Oliveira Lopes, Natália Spitz, Christian Robson de Souza Reis, Vanessa Salete de Paula.

Publicado no periódico *Scientific Reports*.

Objetivo específico: Determinar a distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1.

Resumo: O *Gammaherpesvírus humano 8* (HHV-8) consiste em seis clados principais (A-F) com base na sequência genética da fase de leitura aberta (ORF) K1. Existem alguns relatórios conflitantes sobre a distribuição global dos diferentes genótipos HHV-8. Este estudo objetivou determinar a distribuição global dos diferentes genótipos HHV-8 com base na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 usando sequências publicadas no *GenBank* durante 1997-2020 e construída uma árvore filogenética usando o algoritmo de máxima verossimilhança com o modelo de substituição de nucleotídeo GTR + I + G. Um total de 550 sequências de 38 países/origens foram analisadas neste estudo. Os genótipos A e C apresentaram distribuições globais semelhantes e foram prevalentes na África e na Europa. O genótipo B foi prevalente na África. Dos genótipos raros, o genótipo D foi relatado no Leste Asiático e na Oceania e o genótipo E na América do Sul, enquanto o genótipo F foi prevalente na África. A maior diversidade genotípica foi relatada no continente americano, com o Brasil abrigando cinco genótipos do HHV-8 (A, B, C, E e F). Neste estudo apresentamos a distribuição global dos genótipos do HHV-8 fornecendo uma base para futuros estudos epidemiológicos e evolutivos do HHV-8.



OPEN

Update of the global distribution of human gammaherpesvirus 8 genotypes

Amanda de Oliveira Lopes¹, Natália Spitz¹, Christian Robson de Souza Reis² & Vanessa Salete de Paula^{1✉}

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) consists of six major clades (A–F) based on the genetic sequence of the open reading frame (ORF)-K1. There are a few conflicting reports regarding the global distribution of the different HHV-8 genotypes. This study aimed to determine the global distribution of the different HHV-8 genotypes based on phylogenetic analysis of the ORF-K1 coding region using sequences published in the GenBank during 1997–2020 and construct a phylogenetic tree using the maximum likelihood algorithm with the GTR + I + G nucleotide substitution model. A total of 550 sequences from 38 countries/origins were analysed in this study. Genotypes A and C had similar global distributions and were prevalent in Africa and Europe. Genotype B was prevalent in Africa. Of the rare genotypes, genotype D was reported in East Asia and Oceania and genotype E in South America, while genotype F was prevalent in Africa. The highest genotypic diversity was reported in the American continent, with Brazil housing five HHV-8 genotypes (A, B, C, E, and F). In this study, we present update of the global distribution of HHV-8 genotypes, providing a basis for future epidemiological and evolutionary studies of HHV-8.

Human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) is known to cause Kaposi's sarcoma, which is one of the most common cancers in human immunodeficiency virus-infected patients¹, and the most common form of neoplasia in children from endemic regions, such as the Central, Eastern, and Southern Africa². Kaposi's sarcoma is responsible for significant morbidity and mortality, with 41,799 new cases and 19,902 deaths reported worldwide in 2018³. HHV-8 infection is also associated with other malignancies, including primary effusion lymphoma, multicentric Castleman disease, HHV-8 positive diffuse large B-cell lymphoma, and germinotropic lymphoproliferative disorder. These cancers usually occur in immunodeficient patients, but may also affect immunocompetent individuals⁴.

HHV-8 has a highly conserved double-stranded DNA genome of approximately 140 kilobases; however, both ends of the genome show significant variability. Phylogenetic studies based on the highly variable open reading frame (ORF)-K1 from the 5' end to the 3' end led to the identification of six main clades, namely A, B, C, D, E, and F. The ORF-K1 coding region is composed of approximately 870 base pairs (bp) whose sequences differ by up to 30% at the amino acid level^{5–7}. This region encodes a transmembrane protein of approximately 289 amino acid residues, which has multiple roles in cellular signal transduction, viral reactivation, endothelial cell immortalisation, and host immune recognition^{7,8}.

Studies have reported that the different genotypes have variable penetrance in different human populations of distinct ethnic and geographic groups^{5,9}. However, there are only a few studies that have reported the geographic distribution of the different HHV-8 genotypes, these studies are old with outdated information, and phylogenetic analyses were performed with a smaller number of sequences. In this study, we aimed to determine the worldwide distribution of different HHV-8 genotypes based on phylogenetic analysis of the ORF-K1 coding region using a greater number of sequences published in GenBank. This study is an update and expansion of previous efforts to generate a global distribution of HHV-8 genotypes based on the ORF-K1 coding region.

Methods

Previous publications that have reported different HHV-8 genotypes based on the sequence of the ORF-K1 coding region and sequences of the ORF-K1 coding region deposited in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) were used to obtain a database of sequences of the different HHV-8 genotypes (A to F). A literature search was performed using the search terms: HHV-8 genotype ORF-K1, HHV-8 genotyping ORF-K1, HHV-8 molecular

¹Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 4365, Brasil Av., Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil. ²Microbiology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco 50670-420, Brazil. ✉email: vdepaula@ioc.fiocruz.br

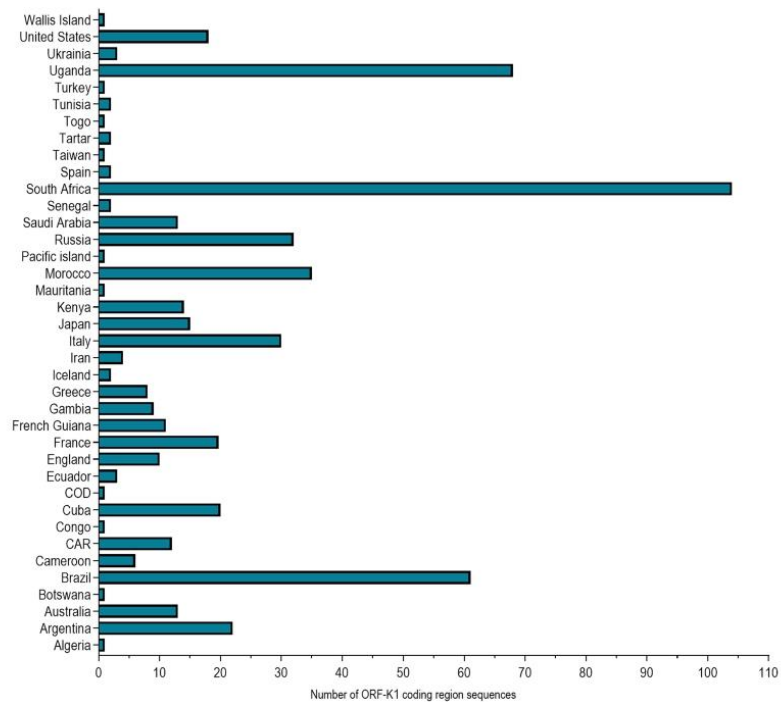


Figure 1. Number of HHV-8 ORF-K1 coding region sequences published per country/origin. Sequences were collected from GenBank. (CAR, Central African Republic; COD, Democratic Republic of the Congo).

epidemiology, and HHV-8 genetic diversity. The sequences were found in the GenBank using the search words: HHV-8, ORF-K1, K1, and gene. All sequences published from 1997 to August 2020 were included to build the database. ORF-K1 sequences smaller than 730 bp and sequences without information about country or origin were excluded from the analysis.

All sequences from this study were aligned using MUSCLE software¹⁰ included in the MEGA program (version 7)¹¹. The origin of each sequence was designated according to the locality from where the sample was collected. HHV-8 genotypes reported in a previous study or submitted to GenBank were taken as is.

A phylogenetic tree was inferred using the online version of the PhyML program¹² using the maximum likelihood method under the GTR + I + G nucleotide substitution model selected by the Smart Model Selection in PhyML¹³. A heuristic tree search was performed using the subtree pruning-re-grafting branch-swapping algorithm, and the reliability of the phylogenies was estimated with aLRT¹⁴ based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure (SH-aLRT). We used iTOL to view phylogenetic tree and GraphPad Prism 8 to compute and graph the diversity of HHV-8 genotypes present in each country/origin.

Results

Based on a literature review using PubMed, we identified 30 studies from 1997 to 2020 that had published sequences of the ORF-K1 coding region. These sequences deposited in GenBank from these studies were combined with other sequences from this database, resulting in a total of 550 sequences from 38 countries/origins (Supplementary material 1). Figure 1 shows the number of sequences of the HHV-8 ORF-K1 coding region published per country/origin.

We performed a phylogenetic reconstruction using the 550 sequences to confirm the presence of the six known HHV-8 genotypes and estimate the evolutionary relationships between them. Figure 2 (and Supplementary material 2) shows the HHV-8 phylogenetic tree constructed using the ORF-K1 coding region sequences. The phylogenetic analysis clearly distinguished the six known clades (A, B, C, D, E, and F), and all the branches had high approximate likelihood-ratio test (aLRT) values.

As shown in Table 1, among the 550 sequences, genotype A showed the highest prevalence (262, 47.6%), followed by genotype C (141, 25.6%), genotype B (125, 22.7%), genotype F (10, 1.8%), genotype D (7, 1.3%), and genotype E (5, 0.9%). Most of the sequences had originated in Africa (258; 46.9%), followed by America (135; 12.4%), Europe (108; 19.6%), Asia (34; 6.2%), and Oceania (15; 2.7%). In the Table 1, the data in bold indicates the distribution of HHV-8 genotypes by continent and globe.

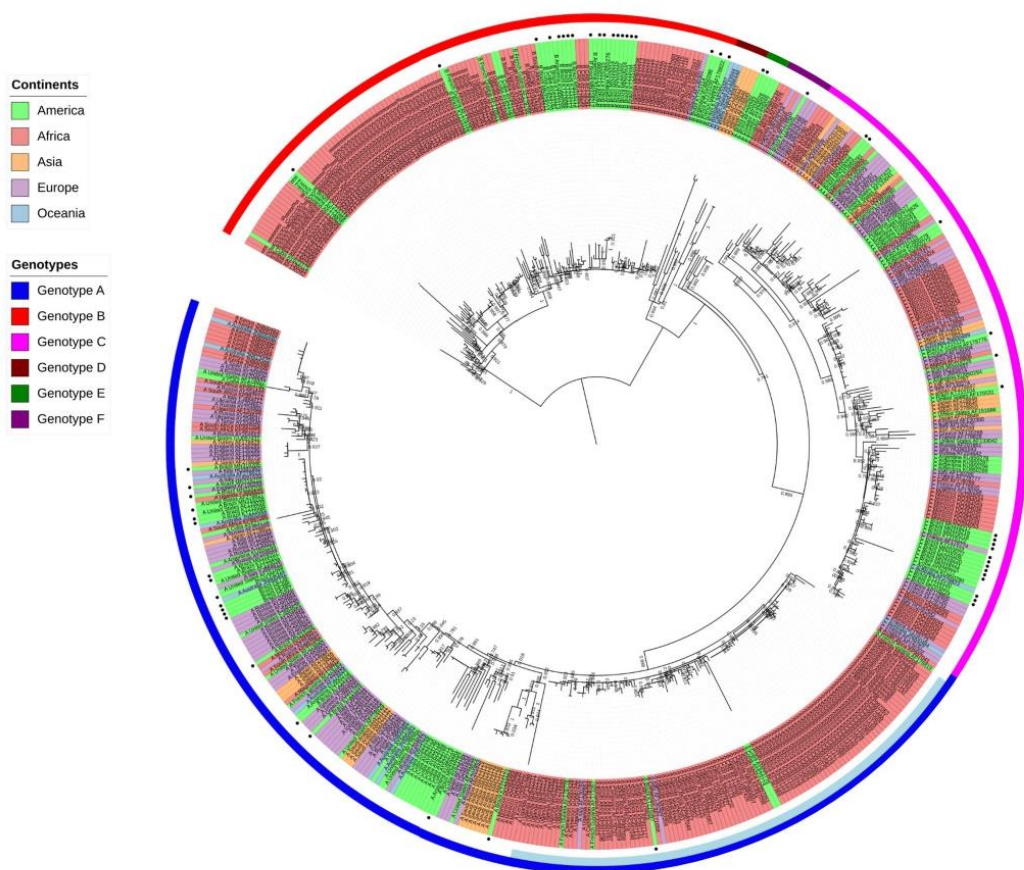


Figure 2. Phylogenetic analysis of multiple HHV-8 sequences based on the sequence of ORF-K1 coding region using the maximum-likelihood method. GenBank accession numbers for all sequences are presented in the supplementary material 1. The colours indicating the different genotypes and continents are shown in the key for the figure. The colour light blue refers to the subgenotype A5. The sequences are indicated by the genotype followed by country or origin (CAR, Central African Republic; COD, Democratic Republic of the Congo), and accession number. The filled circle symbol indicates location of all Brazilian sequences. In this phylogenetic tree are indicated all the values at internal nodes likelihood-ratio test value for the branch. The tree is rooted in the midpoint and was viewed using iTOL.

HHV-8 sequences were found in all continents except Antarctica (Table 1). Genotypes A and C were identified in all continents and showed a similar global distribution. Both genotypes were prevalent in Africa and Europe, followed by America, Asia, and Oceania (Fig. 3A,C). The subgenotype A5 was responsible by the greater prevalence of genotype A in the African continent, and was also found in Europe and America. Genotypes B and F were prevalent in Africa, but were also identified in America and Europe (Fig. 3B,F). Genotype D was only reported in East Asia and Oceania, while genotype E was reported only in America (Fig. 3D,E).

The American continent exhibited the highest genotypic diversity with five genotypes (A, B, C, E, and F) (Fig. 4), wherein the majority of the American countries, including Argentina, Brazil, Cuba, and French Guiana, had at least three genotypes. Such a high degree of diversity was not observed in the other continents (Fig. 4).

In the American continent, the highest HHV-8 genotypic diversity was found in Brazil, wherein five of the six major genotypes were identified (Fig. 4). Our phylogenetic analysis contained 61 sequences that originated from Brazil, which is the third country with the largest number of published ORF-K1 coding region sequences, behind only Uganda (68 sequences) and South Africa (104 sequences), both of which are African countries.

Origin	Sequences		Genotypes												
			A		B		C		D		E		F		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Africa	258	46.9	124	48.1	89	34.5	41	15.9	0	0	0	0	0	4	1.6
Algeria	1	0.2	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0
Botswana	1	0.2	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cameroon	6	1.1	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Central African Republic	12	2.2	5	41.7	5	41.7	2	16.7	0	0	0	0	0	0	0
Congo	1	0.2	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Democratic Republic of the Congo	1	0.2	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gambia	9	1.6	0	0	9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kenya	14	2.5	12	85.7	0	0	1	7.1	0	0	0	0	1	7.1	
Mauritania	1	0.2	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morocco	35	6.4	5	14.3	0	0	30	85.7	0	0	0	0	0	0	0
Senegal	2	0.4	0	0	1	50	1	50	0	0	0	0	0	0	0
South Africa	104	18.9	58	55.8	44	42.3	0	0	0	0	0	0	2	1.9	
Togo	1	0.2	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tunisia	2	0.4	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0	0
Uganda	68	12.4	36	52.9	27	39.7	4	5.9	0	0	0	0	1	1.5	
America	135	12.4	52	38.5	35	25.9	42	31.1	0	0	5	3.7	1	0.7	
Argentina	22	4.0	3	13.6	4	18.2	15	68.2	0	0	0	0	0	0	0
Brazil	61	11.1	19	31.1	20	32.8	19	31.1	0	0	2	3.3	1	1.6	
Cuba	20	3.6	14	70	5	25.0	1	5.0	0	0	0	0	0	0	0
Ecuador	3	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0	
French Guiana	11	2.0	4	36.4	6	54.5	1	9.1	0	0	0	0	0	0	0
United States	18	3.3	12	66.7	0	0	6	33.3	0	0	0	0	0	0	0
Asia	34	6.2	16	47.1	0	0	14	41.2	4	11.8	0	0	0	0	
Iran	4	0.7	0	0	0	0	4	100	0	0	0	0	0	0	0
Japan	15	2.7	5	33.3	0	0	7	46.7	3	20	0	0	0	0	0
Saudi Arabia	13	2.4	10	76.9	0	0	3	23.1	0	0	0	0	0	0	0
Taiwan	1	0.2	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0
Turkey	1	0.2	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Europe	108	19.6	61	56.5	1	0.9	41	38.0	0	0	0	0	5	4.6	
England	10	1.8	5	50	1	10	4	40	0	0	0	0	0	0	0
France	19	3.5	1	5.3	0	0	13	68.4	0	0	0	0	5	26.3	
Greece	8	1.5	4	50	0	0	4	50	0	0	0	0	0	0	0
Iceland	2	0.4	1	50	0	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
Italy	30	5.5	18	60	0	0	12	40	0	0	0	0	0	0	0
Russia	32	5.8	26	81.3	0	0	6	18.8	0	0	0	0	0	0	0
Spain	2	0.4	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tartar	2	0.4	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukraine	3	0.5	2	66.7	0	0	1	33.3	0	0	0	0	0	0	0
Oceania	15	2.7	9	60	0	0	3	20	3	20	0	0	0	0	
Australia	13	2.4	9	69.2	0	0	3	23.1	1	7.7	0	0	0	0	0
Pacific island	1	0.2	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0
Wallis Island	1	0.2	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0
Global	550	100	262	47.6	125	22.7	141	25.6	7	1.3	5	0.9	10	1.8	

Table 1. Genotypic distribution of HHV-8 by geographic regions.

Discussion

Till date, this is the largest study to determine the global distribution of HHV-8 genotypes. A phylogenetic analysis was performed on a total of 550 distinct sequences from 38 countries/origins, indicating the large global coverage of our study.

From our phylogenetic reconstruction (Fig. 2), we obtained new insights on the global distribution of HHV-8 genotypes. First, genotypes A and C showed similar global distributions and were highly prevalent in Europe and Africa. Genotype B was found to be prevalent in Africa and was also identified in Central and South America and Europe. Of the rarer genotypes, genotype D was reported in East Asia and Oceania and genotype E was reported

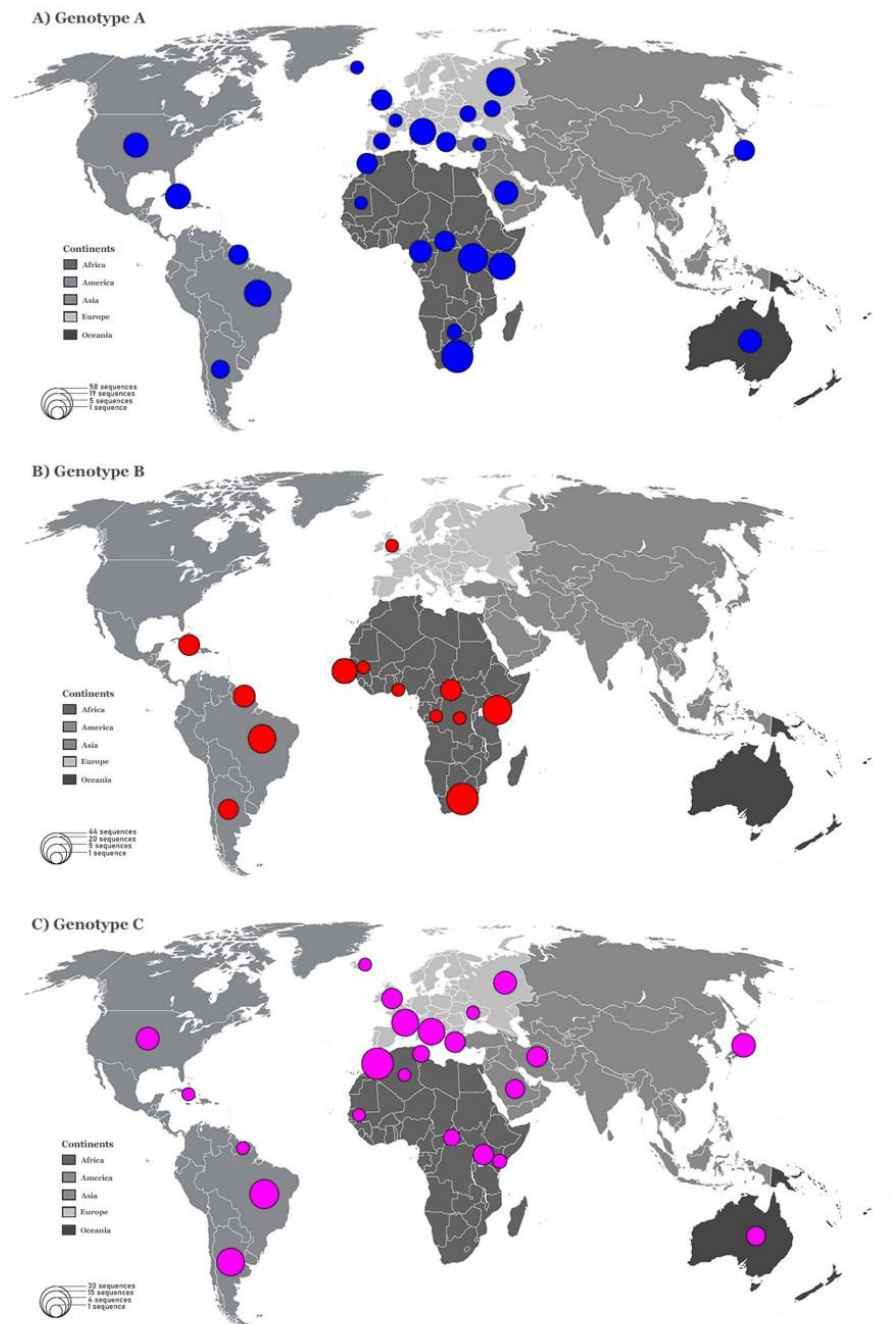


Figure 3. Global distribution of HHV-8 genotypes. The six world maps demonstrate the distribution of each HHV-8 genotypes (A - F). The genotypes and continents are indicated in the figure. Countries forming a continent are shaded in the same colour. The size of the circles is proportional to the number of HHV-8 ORF-K1 coding region sequences belonging to a particular origin analysed in this study. All sequences collected from GenBank.

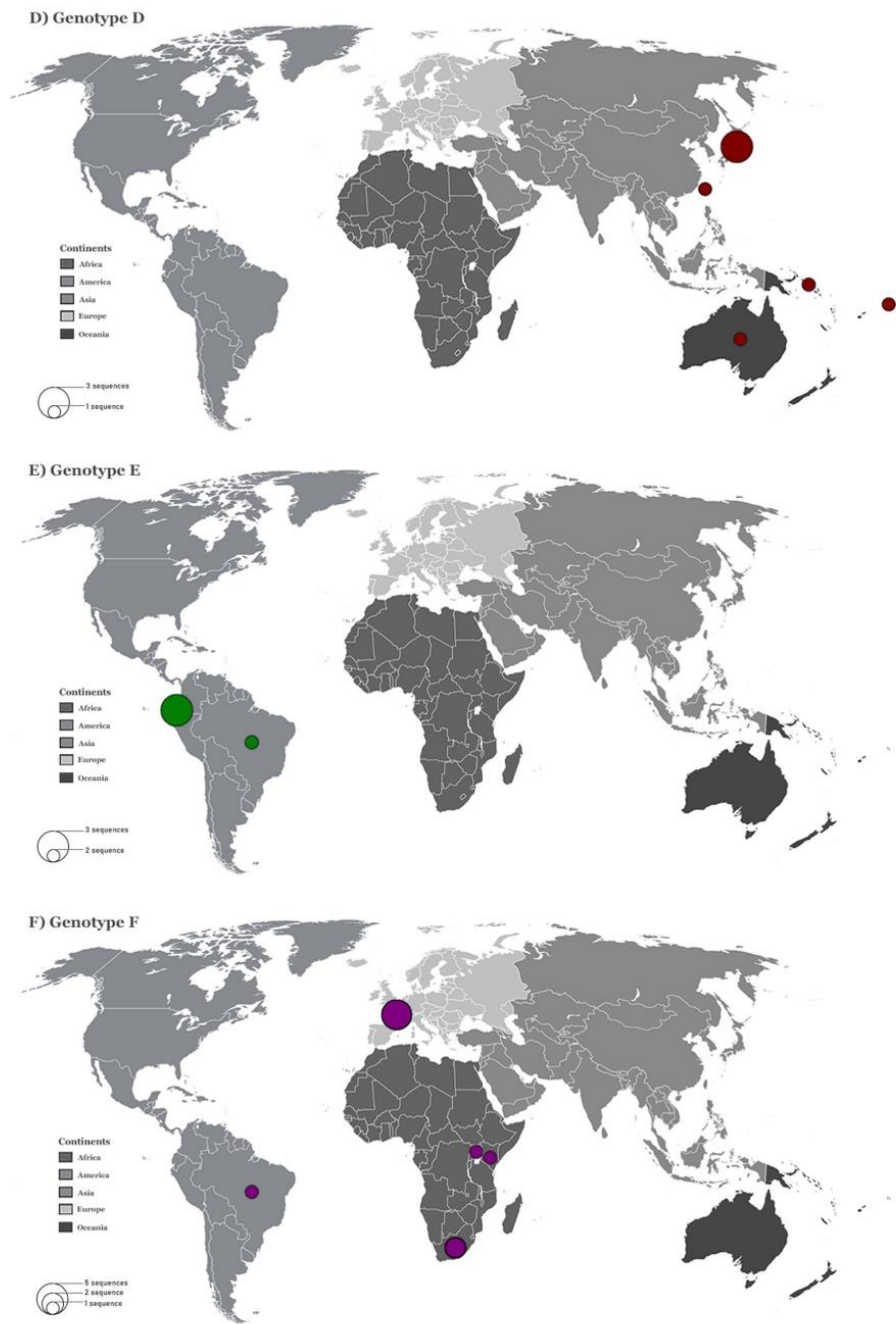


Figure 3. (continued)

in Amerindian populations of South America. Moreover, the highly uncommon genotype F was identified in Africa, America, and Europe (Fig. 3).

Previous studies have shown that the distribution of different HHV-8 ORF-K1 genotypes between geographic and ethnic backgrounds appears to depend on the global spread of modern human populations^{15,16}. Based on recent studies of contemporary human migrations^{17–19}, and the HHV-8 phylogenetic reconstruction shown in Fig. 2, we found that genotype B is the most ancient genotype with four major branches diverging from it (Fig. 2). Previous reports have stated that genotype B may have originated with the first migration of modern humans in Africa^{15,16}. We hypothesize that HHV-8 started to spread and evolve together with their human hosts as they migrated towards Northeast and Southwest Africa approximately 130–110 thousand years (kilo annum, ka) ago due to regional climate changes¹⁷. Subsequently, the several migrations that have occurred in Africa over thousands of years¹⁷ may also explain the predominance of genotype B in this continent (Fig. 3B). The slave trade, which occurred between the sixteenth and nineteenth century, due to colonisation of the American continent by Europeans²⁰ supports the identification of this genotype in America (Fig. 3B).

After human expansion out of Africa, genotype D, which is evolutionarily the closest to genotype B (Fig. 2), probably evolved in isolated populations of the first human migrants in East Asia approximately 40 ka ago, in Australasia approximately 40 ka ago^{17–19}, and in Melanesia Islands approximately 3.4 ka ago²¹, explaining the dispersion of this genotype in the globe (Fig. 3d). Genotype E is evolutionarily closest to genotype D (Fig. 2) and was identified only in specific groups of South American Amerindians isolated from East Ecuador and Northern Brazil (Fig. 3E)^{22,23}. Thus, genotype E possibly originated in human populations that had migrated across the Bering Strait from Asia approximately 20–15 ka ago¹⁸. Furthermore, the evolutionarily ancient genotype F, which may have diverged after genotype D (Fig. 2), was localised in the Bantu Gisu tribe in eastern Uganda, as shown in a previous study²⁴. Therefore, genotype F may also have had an African genesis after the dispersal of modern humans, which occurred more than 40 ka ago in this continent^{17,19}. In this study, we did not find a large global distribution of genotypes D, E, and F; these genotypes probably remained in isolated populations of different ethnic groups (Fig. 3F)^{22–24}.

Genotypes A and C have a common ancestor with genotype F and may have diverged after genotype E (Fig. 2). Some older sequences of genotypes A and C were found to have localised in Africa (Fig. 2) and, thus the genotypes may have diverged more recently in this continent after a greater spread of contemporary human populations¹⁷ approximately 20 to 15 ka ago¹⁸, and this is different from what is indicated by previous studies^{15,16,24,25}. This novel finding is based on a high number of HHV-8 genotypic sequences analysed in this study (Fig. 1) in association with recent studies of modern human migrations^{17–19}. In addition, the dispersion of genotypes A and C possibly occurred in Africa for thousands of years due to several migrations that had occurred in this continent¹⁷, arriving in the Middle East (Western Asia) and Europe in waves of migration 8 ka ago²⁶. This may explain why these genotypes are prevalent in African and European countries, and identified in regions subsequently occupied or colonised by these countries, such as American countries (in the late 1400 s)²⁷ and Australia (in the late 1700s)²⁰. The waves of human migration due to the European colonisation of the world also justify the distribution of these genotypes on five continents (Fig. 3A,C)²⁷.

Furthermore, in this study, a high HHV-8 genotypic diversity was observed in the American countries/origin, wherein Brazil with five HHV-8 genotypes (A, B, C, E, and F) had the highest genotypic diversity of the 38 countries/origins analysed in this study (Fig. 4). This high diversity is possibly a result of human migrations started at least 15 ka ago, with genotype E probably arriving first in this continent¹⁸. Thereafter, extensive migrations since the colonial era due to slave trade after the late 1400s and in the last two centuries may have contributed to the spread of genotypes A, B, C, and F in America. In fact, 5 million people from more than 60 countries moved to Brazil at the end of the 1800s and in the beginning of the 1900s²⁷. These conclusions are in agreement with a previous study that analysed genetic distances and showed that genotypes A, B, and C were possibly brought into Brazil by immigrants from several countries, including Africa, Europe, Asia, and Oceania⁷. Nevertheless, as many HHV-8 sequences were obtained from HIV infected individuals, some routes of HHV-8 transmission and spread globally may have been more recent through sexual contact on a trip or sex with visiting tourists⁷. This high HHV-8 diversity found in Brazil may also be a result of high number of published ORF-K1 coding region sequences from this country (total of 61 sequences) (Fig. 1 and Table 1). Further studies with additional HHV-8 sequences from other regions and countries, including phylogeographic analysis, can prove to be very informative to understand the HHV-8 route of transmission and diversity in the globe.

The subgenotype A5 was also analysed in this study once this subgenotype was described to be common in Africa. We confirmed this information with our phylogenetic analysis (Fig. 2), where subgenotype A5 was responsible by the greater prevalence of genotype A in the African continent¹. The clade A5 was the most ancient genotype A (Fig. 2) and may have diverged in other subgenotypes after greater spread of contemporary human populations¹⁷ to the Middle East (Western Asia) and Europe in 8 ka ago²⁶.

The World Health Organisation has reported new cancers that are associated with HHV-8 infections⁴. Unfortunately, in our study, we were unable to perform a correlation analysis between genotypes and tumorigenic potential, due to presence of only a few studies with conflicting data⁷. However, we believe that this interaction should be investigated in future studies, as the transmembrane K1 glycoprotein encoded by the viral ORF-K1 gene can contribute to the pathogenesis of HHV-8-associated human cancers²⁸.

In conclusion, we analysed 550 ORF-K1 sequences and revealed the current global distribution of different HHV-8 genotypes. The new insights about the circulation and molecular evolution of HHV-8 genotypes are: the genotypes A and C were prevalent in Africa and Europe, had probably originated in Africa, and may have diverged more recently in this continent; while the rare genotype F was prevalent in Africa which may have diverged after genotype D; and the Brazil was found to be the country with the highest HHV-8 genotypic diversity in the world. Our study provides a basis for future studies investigating the molecular epidemiology and genetic evolution of HHV-8.

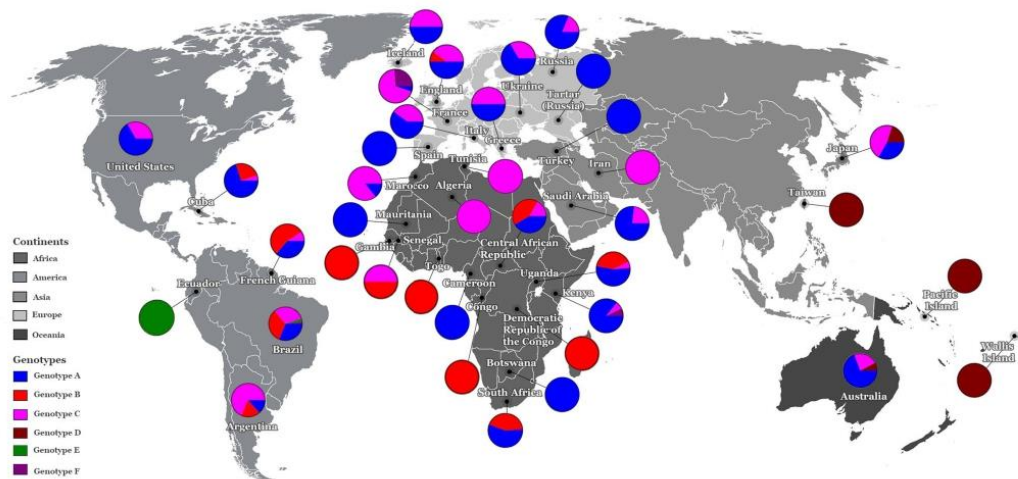


Figure 4. The HHV-8 genotypic diversity per country/origin. The pie charts indicate the proportion of occurrence of the different HHV-8 genotypes in the respective countries/origins. The genotypes and continents are indicated in the figure. Countries from the same region are shaded in the same colour on the world map. These distributions of HHV-8 genotypes were based on sequences analysed in this study.

Data availability

The datasets used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Received: 5 January 2021; Accepted: 22 March 2021

Published online: 07 April 2021

References

- Lopes, A. O. *et al.* Low prevalence of human gammaherpesvirus 8 (HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1685967> (2019).
- DallaPria, A., Pinato, D. J., Bracchi, M. & Bower, M. Recent advances in HIV-associated Kaposi sarcoma. *F1000Res* <https://doi.org/10.12688/f1000research.17401.1> (2019).
- Global Cancer Observatory, WHO. *Cancer Today* gco.iarc.fr/today/home (2018).
- Vega, F., Miranda, R. N. & Medeiros, L. J. KSHV/HHV8-positive large B-cell lymphomas and associated diseases: a heterogeneous group of lymphoproliferative processes with significant clinicopathological overlap. *Mod. Pathol.* **33**, 18–28. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0365-y> (2019).
- Isaacs, T., Abera, A. B., Muloiswa, R., Katz, A. A. & Todd, G. Genetic diversity of HHV8 subtypes in South Africa: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS. *J. Med. Virol.* **88**, 292–303. <https://doi.org/10.1002/jmv.24328> (2016).
- Olp, L. N., Jeanniard, A., Marimo, C., West, J. T. & Wood, C. Whole-genome sequencing of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from Zambian Kaposi's sarcoma biopsy specimens reveals unique viral diversity. *J. Virol.* **89**, 12299–12308. <https://doi.org/10.1128/JVI.01712-15> (2015).
- Lopes, A. O. *et al.* Introduction of human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions. *Virus Res.* **276**, 197828. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197828> (2020).
- Lee, B. S., Connole, M., Tang, Z., Harris, N. L. & Jung, J. U. Structural analysis of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 protein. *J. Virol.* **77**, 8072–8086. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.14.8072-8086.2003> (2003).
- Tozetto-Mendoza, T. R. *et al.* Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS? *Medicine (Baltimore)* **95**, e5291. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005291> (2016).
- Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340> (2004).
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> (2016).
- Guindon, S. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010> (2010).
- Lefort, V., Longueville, J. E. & Gascuel, O. SMS: smart model selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149> (2017).
- Anisimova, M. & Gascuel, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* **55**, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453> (2006).
- Zong, J. C. *et al.* High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol.* **73**, 4156–4170. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4156-4170.1999> (1999).
- Hayward, G. S. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 187–199. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0116> (1999).

17. Chan, E. K. F. *et al.* Human origins in a southern African palaeo-wetland and first migrations. *Nature* **575**, 185–189. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1714-1> (2019).
18. Bae, C. J., Douka, K. & Petraglia, M. D. On the origin of modern humans: Asian perspectives. *Science* **358**, eaa19067. <https://doi.org/10.1126/science.aai9067> (2017).
19. Rito, T. *et al.* A dispersal of Homo sapiens from southern to eastern Africa immediately preceded the out-of-Africa migration. *Sci. Rep.* **9**, 4728. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41176-3> (2019).
20. Drumm, P. Australian fantasy revisited. *Hist. Psychol.* **21**, 295–296. <https://doi.org/10.1037/hop0000099> (2018).
21. Kayser, M. The human genetic history of Oceania: near and remote views of dispersal. *Curr. Biol.* **20**, R194–201. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.004> (2010).
22. Biggar, R. J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A. C. & Black, F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J. Infect. Dis.* **181**, 1562–1568. <https://doi.org/10.1086/315456> (2000).
23. Whitby, D. *et al.* Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J. Gen. Virol.* **85**, 155–163. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19465-0> (2004).
24. Kajumbula, H. *et al.* Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology* **49**, 133–143. <https://doi.org/10.1159/000089374> (2006).
25. Zong, J. *et al.* Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J. Clin. Virol.* **23**, 119–148. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(01\)00205-0](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(01)00205-0) (2002).
26. Lazaridis, I. *et al.* Paleolithic DNA from the Caucasus reveals core of West Eurasian ancestry. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/423079> (2018).
27. Ongaro, L. *et al.* The genomic impact of European colonization of the Americas. *Curr. Biol.* **29**, 3974–3986.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.076> (2019).
28. Sousa-Squiavinato, A. C., Silvestre, R. N. & De Oliveira, D. E. Biology and oncogenicity of the Kaposi sarcoma herpesvirus K1 protein. *Rev. Med. Virol.* **25**, 273–285. <https://doi.org/10.1002/rmv.1843> (2015).

Acknowledgements

We thank Flavio Telles for assisting us with the maps generated in this study.

Author contributions

A.O.L.: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Writing—original draft. N.S.: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing—review & editing. C.R.S.R.: Formal analysis, Supervision, Writing—review & editing. V.S.P.: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Writing—review & editing. All authors reviewed the manuscript.

Funding

This work was supported by CAPES (Coordination of Superior Level Staff Improvement; grant number 1632788), CNPq (National Council of Scientific and Technological Development), and FAPERJ (State of Rio de Janeiro Research Support Foundation).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87038-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to V.d.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Material Supplementar 1

Update of the global distribution of Human gammaherpesvirus 8 genotypes

Amanda de Oliveira Lopes, Natália Spitz, Christian Robson de Souza Reis, Vanessa Salete de Paula

Supplementary material 1. GenBank accession numbers and references from 550 ORF-K1 coding region sequences regarding HHV-8 genotypes (A to F) and country/origin.

Genotype	GenBank accession number	Country	Reference*
A	KU950273	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
A	KU950281	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
A	KU950284	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
A	AF278824	Australia	(Meng et al., 1999)
A	AF278825	Australia	(Meng et al., 1999)
A	JN613419	Australia	(Speicher et al., 2013)
A	JN613420	Australia	(Speicher et al., 2013)
A	JN800483	Australia	Unpublished
A	JN800485	Australia	Unpublished
A	JN800488	Australia	Unpublished
A	JN800490	Australia	Unpublished
A	JN800491	Australia	Unpublished
A	AY329023	Botswana	(Whitby et al., 2004)
A	KT215095	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215096	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215097	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215107	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215108	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215109	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	KT215123	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
A	MN318207	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318208	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318209	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318206	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318210	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318205	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MN318204	Brazil	(Lopes et al., 2020)
A	MT597155	Brazil	(in preparation)
A	MT597156	Brazil	(in preparation)
A	MT597157	Brazil	(in preparation)
A	MT597158	Brazil	(in preparation)
A	MT597159	Brazil	(in preparation)
A	AF171058	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)
A	AF178784	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)

A	AF178797	Cameroon	(Fouchard et al., 2000)
A	FJ884607	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097429	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097432	Cameroon	(Tornesello et al., 2010)
A	AF171059	Central African Republic	(Fouchard et al., 2000)
A	AF178779	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178790	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178798	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178823	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
A	AY623768	Cuba	Unpublished
A	AY623769	Cuba	Unpublished
A	AY623771	Cuba	Unpublished
A	AY623772	Cuba	Unpublished
A	AY623773	Cuba	Unpublished
A	AY623774	Cuba	Unpublished
A	AY623776	Cuba	Unpublished
A	AY623778	Cuba	Unpublished
A	AY623779	Cuba	Unpublished
A	AY623780	Cuba	Unpublished
A	AY623782	Cuba	Unpublished
A	AY623785	Cuba	Unpublished
A	AY623787	Cuba	Unpublished
A	AY623790	Cuba	Unpublished
A	AF130295	England	(Cook et al., 1999)
A	AF130296	England	(Cook et al., 1999)
A	AF130297	England	(Cook et al., 1999)
A	AF130299	England	(Cook et al., 1999)
A	AF130303	England	(Cook et al., 1999)
A	AF178775	France	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178778	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178785	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178819	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF171057	French Guiana	(Fouchard et al., 2000)
A	FJ884608	Greece	(Tornesello et al., 2010)
A	FJ884610	Greece	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097419	Greece	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097420	Greece	(Tornesello et al., 2010)
A	AF130272	Iceland	(Cook et al., 1999)
A	AF130269	Italy	(Cook et al., 1999)
A	AF130282	Italy	(Cook et al., 1999)
A	AF130283	Italy	(Cook et al., 1999)
A	AF130284	Italy	(Cook et al., 1999)
A	AF130285	Italy	(Cook et al., 1999)
A	FJ884611	Italy	(Tornesello et al., 2010)

A	FJ884612	Italy	(Tornesello et al., 2010)
A	FJ884613	Italy	(Tornesello et al., 2010)
A	FJ884615	Italy	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097421	Italy	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097430	Italy	(Tornesello et al., 2010)
A	HQ391919	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391920	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391923	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391924	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391934	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391935	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	HQ391950	Italy	(Mancuso et al., 2011)
A	AF178786	Japan	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF278838	Japan	(Meng et al., 2001)
A	AF278839	Japan	(Meng et al., 2001)
A	AF278851	Japan	(Meng et al., 2001)
A	AF278852	Japan	(Meng et al., 2001)
A	GU097427	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097433	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097435	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
A	JN800492	Kenya	Unpublished
A	JN800493	Kenya	Unpublished
A	JN800494	Kenya	Unpublished
A	JN800495	Kenya	Unpublished
A	JN800496	Kenya	Unpublished
A	JN800497	Kenya	Unpublished
A	JN800498	Kenya	Unpublished
A	JN800499	Kenya	Unpublished
A	JN800500	Kenya	Unpublished
A	AF178812	Mauritania	(Lacoste et al., 2000a)
A	DQ394037	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
A	DQ394038	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
A	DQ394057	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
A	DQ394064	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
A	DQ394068	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
A	AF201847	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AF201848	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AF201849	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AF201850	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AF201852	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AF201853	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
A	AY204643	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204644	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204645	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204647	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204648	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204650	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204652	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204653	Russia	(Kadyrova et al., 2003)

A	AY204654	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204655	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204660	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204662	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204663	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204664	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204665	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204667	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204668	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204670	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
A	KJ130029	Russia	(Shirokov et al., 2007)
A	KJ583230	Russia	Unpublished
A	AM423127	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423128	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423129	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423131	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423132	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423133	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423134	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423137	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423138	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AM423139	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
A	AF387369	South Africa	(Treurnicht et al., 2002)
A	KP997035	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997040	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997041	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997044	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997046	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997048	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997049	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997051	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997052	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997053	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997054	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997057	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997058	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997059	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997061	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997063	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997065	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997070	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997073	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997075	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997078	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997083	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997085	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997086	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997087	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997088	South Africa	(Isaacs et al., 2016)

A	KP997089	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997090	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997091	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997092	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997093	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997097	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997098	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997099	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997101	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997103	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997105	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997106	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997107	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997109	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997110	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997111	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997112	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997113	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997117	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997118	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997120	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997121	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997123	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997124	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997125	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997126	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997127	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997131	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997132	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997133	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	KP997135	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
A	AF130305	spain	(Cook et al., 1999)
A	AF178794	spain	(Lacoste et al., 2000a)
A	AY204646	Tartar	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204651	Tartar	(Kadyrova et al., 2003)
A	AF178829	Turkey	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF130288	Uganda	(Cook et al., 1999)
A	AF130289	Uganda	(Cook et al., 1999)
A	AF151690	Uganda	(Meng et al., 1999)
A	AF278831	Uganda	(Meng et al., 1999)
A	AY042950	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
A	AY042951	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
A	AY042952	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
A	AY042953	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
A	AY042955	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
A	FJ884623	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
A	FJ884624	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
A	FJ884625	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097426	Uganda	(Tornesello et al., 2010)

A	GU097428	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097434	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
A	MH632204	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632205	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632207	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632209	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632210	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632212	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632214	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632217	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632218	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632223	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632225	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632228	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632229	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632231	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632232	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632234	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632235	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632237	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632238	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632239	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	MH632240	Uganda	(Zong et al., 1999)
A	AY204641	Ukraine	(Kadyrova et al., 2003)
A	AY204657	Ukraine	(Kadyrova et al., 2003)
A	AF133038	United States	(Nicholas et al., 1998)
A	AF133039	United States	(Nicholas et al., 1998)
A	AF151688	United States	(Meng et al., 1999)
A	AF178799	United States	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF178807	United States	(Lacoste et al., 2000a)
A	AF278827	United States	(Meng et al., 1999)
A	AF278828	United States	(Meng et al., 1999)
A	AF278829	United States	(Meng et al., 1999)
A	AF278830	United States	(Meng et al., 1999)
A	FJ884626	United States	(Tornesello et al., 2010)
A	GU097431	United States	(Tornesello et al., 2010)
A	U86667	United States	(Lagunoff and Ganem, 1997)
B	KU950275	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
B	KU950276	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
B	KU950286	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
B	KU950295	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
B	KT215098	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215099	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215100	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215101	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215102	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215110	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215111	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215112	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)

B	KT215113	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215114	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215115	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215116	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215117	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	KT215118	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
B	MN318213	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	MN318212	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	MN318211	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	MN318214	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	MN318215	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	MN318216	Brazil	(Lopes et al., 2020)
B	AF178791	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178792	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178796	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178801	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178824	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178783	Congo	(Lacoste et al., 2000a)
B	AY623770	Cuba	Unpublished
B	AY623775	Cuba	Unpublished
B	AY623781	Cuba	Unpublished
B	AY623784	Cuba	Unpublished
B	AY623789	Cuba	Unpublished
B	AF133040	Democratic Republic of the Congo	(Nicholas et al., 1998)
B	AF130301	England	(Cook et al., 1999)
B	AF178782	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178788	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178821	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178822	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF178825	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF171056	French Guiana	(Fouchard et al., 2000)
B	AF130259	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130260	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130261	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130262	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130263	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130264	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130265	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130266	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF130306	Gambia	(Cook et al., 1999)
B	AF178818	Senegal	(Lacoste et al., 2000a)
B	KP997034	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997036	South Africa	(Isaacs et al., 2016)

B	KP997037	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997038	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997039	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997042	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997043	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997045	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997047	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997050	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997055	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997056	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997060	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997062	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997064	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997066	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997067	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997068	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997069	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997071	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997072	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997074	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997077	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997079	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997080	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997081	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997082	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997084	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997094	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997095	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997096	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997100	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997102	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997104	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997108	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997114	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997115	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997116	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997119	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997122	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997128	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997129	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	KP997130	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
B	MH632203	South Africa	(Zong et al., 1999)
B	AF178804	Togo	(Lacoste et al., 2000a)
B	AF130290	Uganda	(Cook et al., 1999)
B	AF130292	Uganda	(Cook et al., 1999)
B	AF130293	Uganda	(Cook et al., 1999)
B	AF151689	Uganda	(Meng et al., 1999)
B	AY042940	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042941	Uganda	(Kakoola et al., 2001)

B	AY042942	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042944	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042945	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042946	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042947	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042948	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	AY042949	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
B	FJ884618	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
B	MH632206	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632208	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632211	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632213	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632215	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632219	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632220	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632221	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632222	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632226	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632227	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632230	Uganda	(Zong et al., 1999)
B	MH632236	Uganda	(Zong et al., 1999)
C	AF178805	Algeria	(Lacoste et al., 2000a)
C	KU950272	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950274	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950277	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950278	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950279	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950280	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950285	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950287	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950288	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950290	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950291	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950292	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950293	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950294	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	KU950296	Argentina	(Pérez and Tous, 2017)
C	AF278823	Australia	(Meng et al., 1999)
C	JN800484	Australia	Unpublished
C	JN800489	Australia	Unpublished
C	KT215103	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215104	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215105	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215119	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215120	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215121	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215122	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	KT215124	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
C	MN318222	Brazil	(Lopes et al., 2020)

C	MN318223	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318224	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318225	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318226	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318220	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318219	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318221	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318218	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318227	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	MN318217	Brazil	(Lopes et al., 2020)
C	AF178780	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178789	Central African Republic	(Lacoste et al., 2000a)
C	AY623777	Cuba	Unpublished
C	AF130298	England	(Cook et al., 1999)
C	AF130300	England	(Cook et al., 1999)
C	AF130302	England	(Cook et al., 1999)
C	AF130304	England	(Cook et al., 1999)
C	AF042370	France	(Morand et al., 1999)
C	AF178773	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178774	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178777	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178781	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178787	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178793	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178795	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178800	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178803	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178806	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178808	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178828	France	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF178776	French Guiana	(Lacoste et al., 2000a)
C	AF130267	Greece	(Cook et al., 1999)
C	AF130268	Greece	(Cook et al., 1999)
C	GU097417	Greece	(Tornesello et al., 2010)
C	GU097423	Greece	(Tornesello et al., 2010)
C	AF130273	Iceland	(Cook et al., 1999)
C	JN242286	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
C	JN242287	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
C	JN242288	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
C	JN242289	Iran	(Jalilvand et al., 2012)
C	AF130270	Italy	(Cook et al., 1999)
C	AF130271	Italy	(Cook et al., 1999)
C	AF130274	Italy	(Cook et al., 1999)
C	AF130286	Italy	(Cook et al., 1999)
C	FJ884614	Italy	(Tornesello et al., 2010)
C	GU097425	Italy	(Tornesello et al., 2010)
C	HQ391937	Italy	(Mancuso et al., 2011)

C	HQ391939	Italy	(Mancuso et al., 2011)
C	HQ391942	Italy	(Mancuso et al., 2011)
C	HQ391943	Italy	(Mancuso et al., 2011)
C	HQ391945	Italy	(Mancuso et al., 2011)
C	HQ391946	Italy	(Mancuso et al., 2011)
C	AF278840	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278841	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278843	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278847	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278848	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278849	Japan	(Meng et al., 2001)
C	AF278850	Japan	(Meng et al., 2001)
C	GU097418	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
C	DQ394034	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394035	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394036	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394039	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394040	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394041	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394042	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394043	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394044	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394045	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394046	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394047	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394048	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394049	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394050	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394051	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394052	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394053	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394054	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394055	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394056	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394058	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394059	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394060	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394061	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394062	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394063	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394065	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394066	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	DQ394067	Marocco	(Duprez et al., 2006b)
C	AF201851	Russia	(Lacoste et al., 2000b)
C	AY204642	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
C	AY204649	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
C	AY204661	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
C	AY204666	Russia	(Kadyrova et al., 2003)
C	AY204669	Russia	(Kadyrova et al., 2003)

C	AM423130	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
C	AM423135	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
C	AM423136	Saudi Arabia	(Al-Otaibi et al., 2007)
C	AF178820	Senegal	(Lacoste et al., 2000a)
C	AY766082	Tunisia	Unpublished
C	AY766083	Tunisia	Unpublished
C	AY042954	Uganda	(Kakoola et al., 2001)
C	GU097424	Uganda	(Tornesello et al., 2010)
C	MH632224	Uganda	(Zong et al., 1999)
C	MH632233	Uganda	(Zong et al., 1999)
C	AY204659	Ukraine	(Kadyrova et al., 2003)
C	AF133041	United States	(Nicholas et al., 1998)
C	AF133042	United States	(Nicholas et al., 1998)
C	AF151686	United States	(Meng et al., 1999)
C	AF170531	United States	(Samaniego et al., 2001)
C	AF278826	United States	(Meng et al., 1999)
C	GU097422	United States	(Tornesello et al., 2010)
D	AF151687	Australia	(Meng et al., 1999)
D	AF278844	Japan	(Meng et al., 2001)
D	AF278845	Japan	(Meng et al., 2001)
D	AF278846	Japan	(Meng et al., 2001)
D	AF133044	Pacific island	(Zong et al., 1999)
D	AF133043	Taiwan	(Zong et al., 1999)
D	DQ386448	Wallis Island	(Duprez et al., 2006a)
E	AF220292	Brazil	(Biggar et al., 2000)
E	AF220293	Brazil	(Biggar et al., 2000)
E	AY329026	Ecuador	(Whitby et al., 2004)
E	AY329027	Ecuador	(Whitby et al., 2004)
E	AY329028	Ecuador	(Whitby et al., 2004)
F	KT215106	Brazil	(Tozetto-Mendoza et al., 2016)
F	AF178810	France	(Lacoste et al., 2000a)
F	MK876732	France	(Jary et al., 2020)
F	MK876734	France	(Jary et al., 2020)
F	MK876735	France	(Jary et al., 2020)
F	MK876736	France	(Jary et al., 2020)
F	FJ884616	Kenya	(Tornesello et al., 2010)
F	KP997076	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
F	KP997134	South Africa	(Isaacs et al., 2016)
F	MH632216	Uganda	(Kajumbula, et al., 2006)

Note: *Unpublished or in preparation: Sequences unpublished on PubMed. Information collected from GenBank.

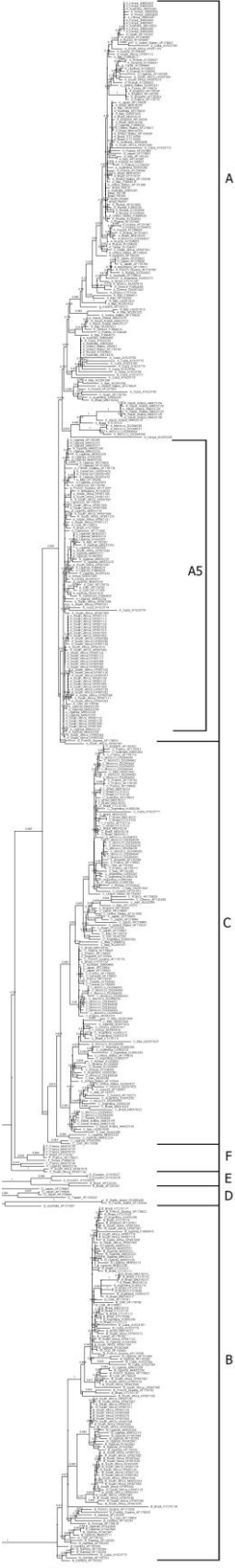
References

1. Al-Otaibi, L.M., Ngui, S.L., Scully, C.M., Porter, S.R., Teo, C.G., 2007. Salivary human herpesvirus 8 shedding in renal allograft recipients with Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 79(9), 1357-1365.
2. Biggar, R.J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A.C., Black, F., 2000. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 181(5), 1562-1568.
3. Cook, P.M., Whitby, D., Calabro, M.L., Luppi, M., Kakoola, D.N., Hjalgrim, H., Ariyoshi, K., Ensoli, B., Davison, A.J., Schulz, T.F., 1999. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group. *AIDS* 13(10), 1165-1176.
4. Lopes, A.O., Spitz, N., Martinelli, K.G., de Paula, A.V., de Castro Conde Toscano, A.L., Braz-Silva, P.H., Dos Santos Barbosa Netto, J., Tozetto-Mendoza, T.R., de Paula, V.S., 2020. Introduction of human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions. *Virus Res* 276, 197828.
5. Duprez, R., Cassar, O., Hbid, O., Rougier, Y., Morisse, L., Bassot, S., Huerre, M., Gessain, A., 2006a. Cutaneous disseminated endemic Kaposi's sarcoma in a Polynesian man infected with a new divergent human herpesvirus 8 subtype D. *J Clin Virol* 37(3), 222-226.
6. Duprez, R., Hbid, O., Afonso, P., Quach, H., Belloul, L., Fajali, N., Ismaili, N., Benomar, H., Hassane Tahri, E., Huerre, M., Quintana-Murci, L., Gessain, A., 2006b. Molecular epidemiology of the HHV-8 K1 gene from Moroccan patients with Kaposi's sarcoma. *Virology* 353(1), 121-132.
7. Fouchard, N., Lacoste, V., Couppie, P., Develoux, M., Mauclere, P., Michel, P., Herve, V., Pradinaud, R., Bestetti, G., Huerre, M., Tekai, F., de Thé, G., Gessain, A., 2000. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. *Int J Cancer* 85(2), 166-170.
8. Isaacs, T., Abera, A.B., Muloiwa, R., Katz, A.A., Todd, G., 2016. Genetic diversity of HHV8 subtypes in South Africa: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS. *J Med Virol* 88(2), 292-303.
9. Jalilvand, S., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., Buonaguro, L., Naraghi, Z.S., Shoja, Z., Ziaee, A.A., Hamkar, R., Shahm Mahmoodi, S., Nategh, R., Mokhtari-Azad, T., 2012. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 variants in Kaposi's sarcoma from Iranian patients. *Virus Res* 163(2), 644-649.
10. Kadyrova, E., Lacoste, V., Duprez, R., Pozharissky, K., Molochkov, V., Huerre, M., Gurtsevitch, V., Gessain, A., 2003. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 71(4), 548-556.
11. Kajumbula, H., Wallace, R.G., Zong, J.C., Hokello, J., Sussman, N., Simms, S., Rockwell, R.F., Pozos, R., Hayward, G.S., Boto, W. 2006. Ugandan Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Phylogeny: Evidence for Cross-Ethnic Transmission of Viral Subtypes. *Intervirology* 49,133-143.
12. Kakoola, D.N., Sheldon, J., Byabazaire, N., Bowden, R.J., Katongole-Mbidde, E., Schulz, T.F., Davison, A.J., 2001. Recombination in human herpesvirus-8 strains from Uganda and evolution of the K15 gene. *J Gen Virol* 82(Pt 10), 2393-2404.
13. Lacoste, V., Judde, J.G., Brière, J., Tulliez, M., Garin, B., Kassa-Kelembho, E., Morvan, J., Couppié, P., Clyti, E., Forteza Vila, J., Rio, B., Delmer, A., Mauclère, P.,

- Gessain, A., 2000a. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology* 278(1), 60-74.
14. Lacoste, V., Kadyrova, E., Chistiakova, I., Gurtsevitch, V., Judde, J.G., Gessain, A., 2000b. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia. *J Gen Virol* 81(Pt 5), 1217-1222.
 15. Lagunoff, M., Ganem, D., 1997. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* 236(1), 147-154.
 16. Mancuso, R., Brambilla, L., Agostini, S., Biffi, R., Hernis, A., Guerini, F.R., Agliardi, C., Turlaki, A., Bellinva, M., Clerici, M., 2011. Intrafamilial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and seronegative infection in family members of classic Kaposi's sarcoma patients. *J Gen Virol* 92(Pt 4), 744-751.
 17. Meng, Y.X., Sata, T., Stamey, F.R., Voevodin, A., Katano, H., Koizumi, H., Deleon, M., De Cristofano, M.A., Galimberti, R., Pellett, P.E., 2001. Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait. *J Gen Virol* 82(Pt 3), 499-506.
 18. Meng, Y.X., Spira, T.J., Bhat, G.J., Birch, C.J., Druce, J.D., Edlin, B.R., Edwards, R., Gunthel, C., Newton, R., Stamey, F.R., Wood, C., Pellett, P.E., 1999. Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology* 261(1), 106-119.
 19. Morand, P., Buisson, M., Collandre, H., Chanzy, B., Genoulaz, O., Bourgeat, M.J., Pinel, N., Leclercq, P., Leroux, D., Marechal, V., Fritsch, L., Ruigrok, R., Seigneurin, J.M., 1999. Human herpesvirus 8 and Epstein Barr-virus in a cutaneous B-cell lymphoma and a malignant cell line established from the blood of an AIDS patient. *Leuk Lymphoma* 35(3-4), 379-387.
 20. Nicholas, J., Zong, J.C., Alcendor, D.J., Ciufu, D.M., Poole, L.J., Sarisky, R.T., Chiou, C.J., Zhang, X., Wan, X., Guo, H.G., Reitz, M.S., Hayward, G.S., 1998. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr*(23), 79-88.
 21. Pérez, C.L., Tous, M.I., 2017. Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina. *J Med Virol* 89(11), 2020-2028.
 22. Samaniego, F., Pati, S., Karp, J.E., Prakash, O., Bose, D., 2001. Human herpesvirus 8 K1-associated nuclear factor-kappa B-dependent promoter activity: role in Kaposi's sarcoma inflammation? *J Natl Cancer Inst Monogr*(28), 15-23.
 23. Shirokov, D., Kadyrova, E., Anokhina, M., Kondratyeva, T., Gourtsevich, V., Tupitsyn, N., 2007. A case of HHV-8-associated HIV-negative primary effusion lymphoma in Moscow. *J Med Virol* 79(3), 270-277.
 24. Speicher, D.J., Sehu, M.M., Johnson, N.W., Shaw, D.R., 2013. Successful treatment of an HIV-positive patient with unmasking Kaposi's sarcoma immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Clin Virol* 57(3), 282-285.
 25. Tomesello, M.L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M., 2010. Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology* 398(2), 280-289.
 26. Tozetto-Mendoza, T.R., Ibrahim, K.Y., Tateno, A.F., Oliveira, C.M., Sumita, L.M., Sanchez, M.C., Luna, E.J., Pierrotti, L.C., Drexler, J.F., Braz-Silva, P.H., Pannuti,

- C.S., Romano, C.M., 2016. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS? *Medicine (Baltimore)* 95(48), e5291.
27. Treumicht, F.K., Engelbrecht, S., Taylor, M.B., Schneider, J.W., van Rensburg, E.J., 2002. HHV-8 subtypes in South Africa: identification of a case suggesting a novel B variant. *J Med Virol* 66(2), 235-240.
28. Whitby, D., Marshall, V.A., Bagni, R.K., Wang, C.D., Gamache, C.J., Guzman, J.R., Kron, M., Ebbesen, P., Biggar, R.J., 2004. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol* 85(Pt 1), 155-163.
29. Zong, J.C., Ciufu, D.M., Alcendor, D.J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P.J., Rady, P.L., Tying, S.K., Orenstein, J.M., Rabkin, C.S., Su, I.J., Powell, K.F., Croxson, M., Foreman, K.E., Nickoloff, B.J., Alkan, S., Hayward, G.S., 1999. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* 73(5), 4156-4170.
30. Jary, A., Leducq, V., Desire, N., Petit, H., Palich, R., Joly, V., Canestri, A., Gothland, A., Lambert-Niclot, S., Surgers, L., Amiel, C., Descamps, D., Spano, J.P., Katlama, C., Calvez, V., Marcelin, A.G., 2020. New Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus variant in men who have sex with men associated with severe pathologies. *J Infect Dis* 222, 1320-1328.

Material Suplementar 2



4. DISCUSSÃO

A discussão desta tese será apresentada se baseando nos três artigos descritos previamente.

O HHV-8 é um grande problema de saúde pública mundial uma vez que está associado a diferentes neoplasias malignas, como o sarcoma de Kaposi (SK), (Katano, 2018; Vega, Miranda e Medeiros, 2020). Além destas, outras doenças estão sendo relacionadas ao HHV-8 e, como são doenças recentemente descobertas e não são de notificação compulsória, as taxas de incidência permanecem desconhecidas (Vega, Miranda e Medeiros, 2020). De acordo com dados atuais, o SK, neoplasia associada ao HHV-8 mais bem estudada, continua a ser a neoplasia mais comum observada em indivíduos que vivem com HIV de ambos os sexos (Dittmer e Damania, 2019), apresentando uma incidência mundial de 481,54 por 100.000 pessoas/ano. Sendo que em mulheres infectadas com HIV essa taxa é de 172,18 por 100.000 pessoas/ano (Liu *et al.*, 2018). Estima-se que 17,4 milhões de mulheres adultas estão infectadas com o HIV em todo o mundo (WHO, 2020).

Essas neoplasias podem ser desenvolvidas durante a gestação, aumentando o risco de transmissão vertical destes vírus em gestantes coinfectadas com HIV/HHV-8 (Lopes *et al.*, 2019). Diante disso, esta tese investigou a epidemiologia do HHV-8 em gestantes infectadas com HIV residindo no Rio de Janeiro, analisou a diversidade genética do HHV-8 em portadores de HIV no Brasil e determinou a distribuição dos genótipos de HHV-8 no mundo, a fim de fornecer dados mais atualizados sobre a distribuição e a circulação de HHV-8 no Brasil e mundo, e contribuir com informações relevantes sobre a epidemiologia e evolução molecular deste herpesvírus.

O artigo 1 visou a investigação da prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes infectadas com HIV no Rio de Janeiro, Brasil. Neste estudo foram incluídas 131 amostras que foram avaliadas utilizando-se os testes IFA-LANA juntamente com IFA-lítico. Estes são os testes sorológicos mais comumente usados para a detecção da infecção por HHV-8 (Nascimento *et al.*, 2007). Além disso, foi verificado adicionalmente a presença de DNA do HHV-8, uma vez que um estudo anterior demonstrou que 5,2% das amostras de soro de indivíduos infectados pelo HIV que eram negativos para anticorpos HHV-8 eram HHV-8 DNA positivas (Szalai *et al.*, 2005). Entretanto, após os testes de PCR em

tempo real e *nested* PCR, o DNA do HHV-8 não foi detectável em mulheres grávidas infectadas pelo HIV, o que foi consistente com testes sorológicos negativos baseados em IFA.

A baixa soroprevalência do HHV-8 (0,8%; 1/131) detectada nas gestantes infectadas pelo HIV do Rio de Janeiro-Brasil corrobora com dados anteriores obtidos por outros grupos de regiões não endêmicas. Nos EUA, um país com baixa soroprevalência de HHV-8 (Rohner *et al.*, 2014), Goedert e colaboradores (Goedert, Kedes e Ganem, 1997) relataram a presença de anticorpos anti-HHV-8 em apenas 2/118 (1,7%) gestantes com infecção pelo HIV. Em contraste, em regiões endêmicas, como alguns países africanos (Etiópia, Gâmbia, Uganda, Zâmbia, Camarões e Burkina Faso), as taxas de soroprevalência do HHV-8 em mulheres grávidas HIV positivas foram mais altas, variando de 12% a 80,7% (Rohner *et al.*, 2016).

Embora os dados epidemiológicos da infecção pelo HHV-8 ainda sejam escassos no Brasil, nosso país é considerado não endêmico para essa infecção (Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010). Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo publicado que investigou a prevalência da infecção causada por HHV-8 em gestantes com HIV no Brasil.

Assim, o artigo 1 revelou que a prevalência e o risco de infecção por HHV-8 são baixos em gestantes HIV-positivas do Rio de Janeiro-Brasil. No entanto, deve-se atentar para o surgimento da infecção pelo HHV-8 em gestantes infectadas pelo HIV e seu impacto na saúde, inclusive em países não endêmicos, uma vez que o HHV-8 pode ser reativado durante a gravidez e pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias associadas, favorecer a progressão da AIDS pelo aumento da carga viral do HIV nas gestantes e contribuir para a transmissão vertical de ambos os vírus (Calabrò *et al.*, 2000; Lisco *et al.*, 2006; Ramos da Silva *et al.*, 2011; Brunet-Possenti *et al.*, 2013).

Como não foi detectado o HHV-8 DNA em amostras de gestantes, não foi possível conduzir a caracterização molecular. Como um dos objetivos desta tese era verificar a diversidade genética do HHV-8, foi então, realizada uma colaboração com dois institutos que já realizavam estudos com o HHV-8 no Brasil: o Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz-Rio de Janeiro, através da Dra. Juliana Netto e o Instituto de Medicina Tropical/USP-São Paulo, através da Dra. Tania Regina Tozetto-Mendoza. Estas colaborações permitiram o

desenvolvimento do artigo 2 cujos objetivos foram caracterizar os isolados de HHV-8 de pacientes com HIV/SK residindo no Brasil, baseado na análise filogenética da região codificadora da ORF K1 do HHV-8 e analisar as origens putativas desses isolados de HHV-8 circulando no país em um esforço para melhor compreender as características epidemiológicas e moleculares do HHV-8 no país.

Para isto, utilizamos diferentes amostras (soro de pacientes do Rio de Janeiro e saliva de pacientes de São Paulo) para a detecção do HHV-8. É bem conhecido que o HHV-8 pode ser detectado em diferentes fluidos corporais, principalmente na saliva (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016). Embora essa detecção seja menos comum no soro (de França *et al.*, 2011), identificamos alta carga média de HHV-8 neste fluido ($1,25 \times 10^9$ cópias/mL) (Tabela 3 do artigo 2). Isso pode ser explicado principalmente porque esses pacientes eram imunocomprometidos. Neste estudo, verificamos que 75% dos pacientes do Rio de Janeiro apresentavam contagem de linfócitos T CD4+ <200 células/mm³ no sangue e carga média de HIV de $1,69 \times 10^5$ cópias/mL (Tabela 3 do artigo 2). Além disso, os mecanismos de cooperação entre o HIV-1 e o HHV-8 podem culminar na disseminação do HHV-8 no organismo hospedeiro (Ramos da Silva *et al.*, 2011).

Uma das grandes contribuições deste artigo foi fomentar a genotipagem de HHV-8, através da região codificadora da ORF K1, pois anteriormente, a classificação molecular inicial das cepas de HHV-8 era baseada nos genes ORF 26 e ORF 75. No entanto, as análises usando essas sequências foram limitadas devido à baixa variação desses genes (Fouchard *et al.*, 2000; Pérez e Tous, 2017), que são genes estruturais altamente conservados (Cook *et al.*, 1999). Por outro lado, o uso de regiões genômicas mais variáveis, como ORF K1, agora é amplamente aceito em estudos de epidemiologia molecular do HHV-8 para determinação da origem, evolução genética, transmissibilidade e associações de doenças deste vírus (Fouchard *et al.*, 2000; Pérez e Tous, 2017).

O gene ORF K1 tem alta variabilidade e essas variações estão concentradas na região central que possui duas regiões hipervariáveis (VR1 e VR2) (Lacoste *et al.*, 2000a) e as alterações nucleotídicas nessas regiões podem variar até 85% produzindo alterações de aminoácidos (Isaacs *et al.*, 2016; Zong *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2007). Portanto, os epidemiologistas consideram a ORF K1 um marcador de diversidade de cepas e o utilizam para investigar a

epidemiologia molecular do HHV-8. Este vírus é, até o momento, agrupado em seis clados genotípicos principais (A a F) que têm distribuições distintas entre diferentes grupos geográficos e étnicos, e parecem migrar com as populações humanas (Hayward, 1999; Zong et al., 1999; Isaacs et al., 2016; Liu et al., 2017).

Baseada na região codificadora do gene K1, a análise filogenética de 24 isolados do Brasil indicou que os genomas se agruparam com o genótipo A (29,2%), genótipo B (25%) e genótipo C (45,8%), ao invés de um único agrupamento monofilético (Figura 1 do artigo 2). Isso sugere que esses genótipos foram introduzidos no Brasil em épocas diferentes e a partir de vários locais.

Assim, para a análise das origens putativas dos genótipos do HHV-8 foram realizados cálculos de distância genética média. As origens putativas dos isolados de HHV-8/A foram o grupo étnico tártaro, Rússia e Ucrânia (1.9, 2.2 e 2.2, respectivamente) (Tabela 5 e Figura 2 do artigo 2). Notavelmente, durante o final do século XIX e início do século XX, o Brasil teve um grande influxo de imigrantes de diferentes países, incluindo dessas regiões (Spitz et al., 2017), onde o genótipo A é comum (Lacoste et al., 2000b; Kadyrova et al., 2003).

As origens putativas dos isolados de HHV-8/B foram o Congo e a República Democrática do Congo (1.7 e 1.9, respectivamente) (Tabela 5 e Figura 2 do artigo 2), países do continente africano, onde o genótipo B é mais prevalente (Tozetto-Mendoza et al., 2016). É possível que essas cepas de HHV-8/B tenham sido trazidas por escravos africanos durante o período colonial brasileiro (século XVI), e que sua circulação tenha aumentado desde então.

O genótipo C é encontrado em países europeus (Inglaterra e França) (Cook et al., 1999; Lacoste et al., 2000a) e regiões subsequentemente ocupadas ou colonizadas por esses países (Austrália, Argélia, Guiana francesa) (Meng et al., 1999; Lacoste et al., 2000a; Augustyn et al., 2019; Democracy, 2019; Sutton et al., 2019). As sequências HHV-8/C brasileiras apresentaram as menores distâncias genéticas para as sequências C da Austrália, Argélia, Inglaterra e Guiana Francesa (2.0, 2.1, 2.1 e 2.1, respectivamente) (Tabela 5 e Figura 2 do artigo 2). Portanto, é provável que as cepas brasileiras de HHV-8/C tenham sido trazidas para o Brasil por imigrantes desses países.

Nossas descobertas são, portanto, consistentes com a história inicial da colonização portuguesa no Brasil durante o início do século XVI, quando a maioria dos residentes eram escravos africanos, assim como com a história

subsequente quando houveram ondas de migração principalmente vindas da Europa, Ásia e Oriente Médio. No geral, imigrantes de mais de 60 países chegaram ao Brasil antes de 1930 (Wejsa e Lesser, 2019). No entanto, como as amostras foram obtidas de indivíduos infectados pelo HIV, a via de transmissão mais recente pode ter sido por meio de contato sexual. Novos estudos incluindo análises filogeográficas podem esclarecer a rota de transmissão do HHV-8 no Brasil.

Previamente, a genotipagem do HHV-8 a partir do gene K1 utilizava diferentes estratégias, como a análise da região codificadora da ORF K1 completa (aproximadamente 870 bp) incluindo ambas as regiões hipervariáveis (VR1 e VR2); análise separada das duas regiões hipervariáveis para produzir duas árvores filogenéticas; e análise da região VR1 apenas (Tozetto- Mendoza *et al.*, 2016; Pérez e Tous, 2017). Estudos anteriores de epidemiologia molecular no Brasil exploraram a diversidade genética do HHV-8 a partir da ORF K1 (gene K1 parcial e/ou completo) e mostraram um amplo espectro de genótipos circulando no Brasil, incluindo genótipos A, B, C, E e F (Biggar *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2005; Ramos da Silva *et al.*, 2011; Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016).

No entanto, incompatibilidades em nucleotídeos localizados na região de ligação dos iniciadores para a amplificação da VR1 e VR2 foram observadas após análise do alinhamento contendo sequências de referência de HHV-8. Esse achado sugere um potencial viés na genotipagem, pois iniciadores específicos podem ter amplificado preferencialmente um genótipo em relação ao outro. Por exemplo, o ensaio VR2 pode levar à subestimação do genótipo B de HHV-8 (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016). Portanto, a reconstrução filogenética com base em toda a sequência da região codificante da ORF K1 é mais confiável (Ramos da Silva *et al.*, 2011), porque as sequências onde ocorre a ligação dos iniciadores usados para amplificação são mais conservadas (localizados em ambas as extremidades do gene K1) (Poole *et al.*, 1999; Lacoste *et al.*, 2000a). Assim, analisamos a região codificadora do gene K1 completo e identificamos 7 novas sequências brasileiras para o genótipo A, 6 novas sequências brasileiras para o genótipo B e 11 novas sequências brasileiras para o genótipo C. Essas novas sequências fornecem novas informações para estudos futuros de epidemiologia e evolução de HHV-8 no Brasil e em outros lugares.

Estudos anteriores propuseram que diferentes genótipos de HHV-8 podem ter diferentes potenciais patogênicos e tumorigênicos (Schwartz, 1996;

Hayward, 1999). Embora não tenhamos estudado este tópico, outros estudos confirmaram esta relação. Estudos demonstraram uma associação entre o genótipo A do HHV-8 e a rápida progressão de SK em pacientes com SK endêmicos e SK clássicos (Boralevi *et al.*, 1998; Mancuso *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2010). Além destes, Tozetto-Mendoza e colaboradores associaram a redução da extensão da lesão ou ausência de novas lesões de SK com o genótipo B em indivíduos com SK-AIDS (Tozetto-Mendoza *et al.*, 2016). No entanto, existem dados conflitantes na literatura e a natureza dessas relações ainda não é clara (Nascimento *et al.*, 2005; Tornesello *et al.*, 2010; Kourí *et al.*, 2012). Estudos futuros sobre a diversidade genotípica do HHV-8 e a associação com a patogenicidade podem ajudar a esclarecer essa questão.

Deste modo, o artigo 2 permitiu identificar os genótipos A, B e C no Brasil e as possíveis origens destes, fornecendo novos conhecimentos sobre a circulação geográfica dos genótipos do HHV-8 no mundo.

Após a finalização deste estudo, durante o doutorado sanduíche no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-Pernambuco com a colaboração com o Dr. Christian Reis, surgiu a ideia de estudar os genótipos de HHV-8 distribuídos pelo mundo, uma vez que foi verificada a inconsistência de informações entre os artigos de genotipagem de HHV-8. Muitos deles são muito antigos e alguns dos mais recentes estudos publicados utilizaram essas informações desatualizadas, que muitas vezes se tornam contraditórias.

Diante dessa necessidade de uma análise mais atualizada e também robusta, o artigo 3 visou determinar a distribuição mundial dos diferentes genótipos do HHV-8 com base na reconstrução filogenética da região codificadora da ORF K1. Até o momento, o artigo 3 é o maior estudo para determinar a distribuição global dos genótipos do HHV-8 a partir da região codificadora da ORF K1. Uma reconstrução filogenética foi realizada em um total de 550 sequências de 38 países/origens, indicando a cobertura global de nosso estudo.

A partir de nossa reconstrução filogenética (Figura 2 do artigo 3), obtivemos novos conhecimentos sobre a distribuição global dos genótipos do HHV-8. Os genótipos A e C mostraram distribuições globais semelhantes e foram altamente prevalentes na Europa e na África. O genótipo B foi prevalente na África e foi identificado na América Central e do Sul e na Europa. Entre os genótipos mais raros, o genótipo D foi relatado no Leste Asiático e na Oceania e

o genótipo E foi relatado em populações ameríndias da América do Sul. Além disso, o genótipo F, altamente incomum, foi identificado na África, América e Europa (Figura 3 do artigo 3).

Como mencionado no artigo 2, estudos anteriores mostraram que a diferente distribuição dos genótipos de HHV-8 entre origens geográficas e étnicas parece depender da disseminação global das populações humanas modernas (Hayward, 1999; Zong *et al.*, 1999). Com base em estudos recentes de migrações humanas contemporâneas (Chan *et al.*, 2019; Bae, Douka e Petraglia, 2017; Rito *et al.*, 2019) e a reconstrução filogenética do HHV-8 mostrada na Figura 2 do artigo 3, identificamos que o genótipo B é o genótipo mais antigo com quatro ramos principais divergindo dele. Estudos anteriores afirmaram que o genótipo B pode ter se originado com a primeira migração de humanos modernos na África (Hayward, 1999; Zong *et al.*, 1999). Nossa hipótese é que o HHV-8 começou a se espalhar e evoluir junto com seus hospedeiros humanos à medida que migraram para o Nordeste e Sudoeste da África há aproximadamente 110-130 mil anos (mil anos, ka) devido às mudanças climáticas regionais (Chan *et al.*, 2019). Posteriormente, as várias migrações que ocorreram na África ao longo de milhares de anos (Chan *et al.*, 2019) também podem explicar a predominância do genótipo B neste continente (Figura 3b do artigo 3). O tráfico de escravos, ocorrido entre os séculos XVI e XIX, devido à colonização do continente americano por europeus (Drumm, 2018), corrobora na identificação desse genótipo na América (Figura 3b do artigo 3).

Após a expansão humana para fora da África, o genótipo D, que é evolutivamente o mais próximo do genótipo B (Figura 2 do artigo 3), provavelmente evoluiu nos primeiros migrantes humanos de populações isoladas do Leste Asiático e Australásia há aproximadamente 40 ka (Chan *et al.*, 2019; Bae, Douka e Petraglia, 2017; Rito *et al.*, 2019). O genótipo D possivelmente alcançou as Ilhas da Melanésia há aproximadamente 3,4 ka (Kayser, 2010), explicando a dispersão deste genótipo no globo (Figura 3d do artigo 3). O genótipo E é evolutivamente mais próximo do genótipo D (Fig. 2 do artigo 3) e foi identificado apenas em grupos específicos de ameríndios sul-americanos isolados do Leste do Equador e Norte do Brasil (Figura 3e do artigo 3) (Biggar *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2004). Assim, o genótipo E possivelmente se originou em populações humanas que migraram através do Estreito de Bering da Ásia aproximadamente 20-15 ka atrás (Bae, Douka e Petraglia, 2017). Além disso, o

genótipo F evolutivamente antigo, que pode ter divergido após o genótipo D (Figura 2 do artigo 3), foi localizado na tribo Bantu Gisu no leste de Uganda, como mostrado em um estudo anterior (Kajumbula *et al.*, 2006). Portanto, o genótipo F também pode ter tido uma gênese africana após a dispersão dos humanos modernos, que ocorreu há mais de 40 ka neste continente (Chan *et al.*, 2019; Rito *et al.*, 2019). No artigo 3, não encontramos uma grande distribuição global dos genótipos D, E e F, e esses genótipos provavelmente permaneceram em populações isoladas de diferentes grupos étnicos (Figura 3f do artigo 3) (Biggar *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2004; Kajumbula *et al.*, 2006).

Os genótipos A e C têm um ancestral comum com o genótipo F e podem ter divergido após o genótipo E em uma escala temporal (Figura 2 do artigo 3). Algumas sequências mais antigas dos genótipos A e C foram encontradas localizadas na África (Figura 2 do artigo 3) e, portanto, os genótipos podem ter divergido mais recentemente neste continente após uma maior disseminação das populações humanas contemporâneas (Chan *et al.*, 2019) há mais de 20 a 15 ka atrás (Bae, Douka e Petraglia, 2017), o que difere do indicado por estudos anteriores (Hayward, 1999; Zong *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2002; Kajumbula *et al.*, 2006). Este novo achado é baseado em um número maior de sequências genotípicas de HHV-8 analisadas no artigo 3 (Figura 1) em associação com estudos recentes de migrações humanas modernas (Bae, Douka e Petraglia, 2017; Chan *et al.*, 2019; Rito *et al.*, 2019). Além disso, a dispersão dos genótipos A e C possivelmente ocorreu na África por milhares de anos devido a diversas migrações que ocorreram neste continente (Chan *et al.*, 2019), chegando ao Oriente Médio (Ásia Ocidental) e Europa em ondas de migração há 8 ka (Lazaridis *et al.*, 2018). Isso pode explicar por que esses genótipos são prevalentes em países africanos e europeus e identificados em regiões subsequentemente ocupadas ou colonizadas por esses países, como os países americanos (no final dos anos 1400) (Ongaro *et al.*, 2019) e Austrália (no final dos anos 1700) (Drumm, 2018). As ondas de migrações humanas devido à colonização europeia no mundo também justificam a distribuição desses genótipos nos cinco continentes (Figura 3a e 3c do artigo 3) (Ongaro *et al.*, 2019).

Além disso, neste estudo, uma alta diversidade genotípica do HHV-8 foi observada nos países americanos, onde o Brasil, apresentando cinco genótipos do HHV-8 (A, B, C, E e F), teve a maior diversidade genotípica dos 38

países/origens analisados no artigo 3 (Figura 4 do artigo 3). Esta alta diversidade é possivelmente resultado de migrações humanas pelo menos 15 ka atrás, com o genótipo E provavelmente chegando primeiro neste continente (Bae, Douka e Petraglia, 2017). Posteriormente, extensas migrações desde a era colonial devido ao comércio de escravos após o final dos anos 1400 e nos últimos dois séculos podem ter contribuído para a disseminação dos genótipos A, B, C e F na América. Na verdade, cinco milhões de pessoas de mais de 60 países se mudaram para o Brasil no final dos anos 1800 e no início dos anos 1900 (Ongaro *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2020). Essas análises estão de acordo com o artigo 2 que analisou distâncias genéticas e mostrou que os genótipos A, B e C foram possivelmente trazidos para o Brasil por imigrantes de vários países, incluindo os da África, Europa, Ásia e Oceania (Lopes *et al.*, 2020). No entanto, como muitas sequências do HHV-8 foram obtidas de indivíduos infectados pelo HIV, a rota de transmissão do HHV-8 pode ter sido mais recente por meio de contato sexual. Outros estudos com sequências adicionais do HHV-8 de outras regiões e países, incluindo análise filogeográfica, podem ser muito informativos para entender a rota de transmissão do HHV-8 no globo.

A Organização Mundial da Saúde relatou novos cânceres associados a infecções por HHV-8 (Vega, Miranda e Medeiros, 2020). Neste estudo, não foi possível realizar uma análise de correlação entre genótipos e potencial tumorigênico, devido à presença de estudos com dados conflitantes (Lopes *et al.*, 2020). No entanto, acreditamos que essa interação deva ser investigada em estudos futuros, uma vez que a glicoproteína transmembrana K1 codificada pela ORF K1 pode contribuir para a patogênese de cânceres humanos associados ao HHV-8 (Sousa- Squiavinato, Silvestre e Elgui De Oliveira, 2015).

No artigo 3 analisamos 550 sequências de ORF K1 e revelamos a distribuição global de diferentes genótipos de HHV-8. Os novos achados incluem: os genótipos A e C são prevalentes também na África, além da Europa e provavelmente se originaram na África, assim como os genótipos B e F; e o Brasil foi considerado o país com a maior diversidade genotípica do HHV-8 no mundo. Assim, o artigo 3 também fornece uma base para futuras investigações acerca da epidemiologia molecular e evolução genética do HHV-8.

Por fim, através desta tese podemos concluir que apesar do HHV-8 ser de baixa prevalência em gestantes com HIV no Brasil, a investigação epidemiológica deste vírus se torna de suma importância para a identificação de

população de risco para a infecção ocasionada por HHV-8. Além disso, novas informações sobre a circulação dos genótipos de HHV-8 no país e no mundo, e suas possíveis origens foram agora fornecidas, contribuindo para dados mais atuais sobre a epidemiologia do HHV-8 que serão relevantes para futuros estudos de evolução molecular, estudos de filogeografia do HHV-8 e a rota de transmissão deste vírus, e também para a associação dos genótipos do HHV-8 como potencial tumorigênico e neoplasias associadas.

5. CONCLUSÕES

- Apesar da prevalência moderada de HHV-8 em pacientes portadores de HIV, o Brasil apresenta baixa soroprevalência do HHV-8 em gestantes portadoras do HIV;
- Os genótipos A, B e C do HHV-8 foram encontrados em isolados de pacientes brasileiros com HIV/SK corroborando com estudos anteriores que também identificaram estes genótipos do HHV-8 na região sudeste do Brasil;
- A introdução dos genótipos A, B e C no Brasil provavelmente foi em épocas diferentes através das imigrações ocorridas no país desde o período de colonização;
- Os isolados de HHV-8/A possivelmente tiveram origem na Ucrânia, Rússia e do grupo étnico tártaro; os isolados de HHV-8/B parecem ser do Congo e da República Democrática do Congo; e os isolados de HHV-8/C parecem ser da Austrália, Argélia, Inglaterra e Guiana Francesa;
- Novos dados sobre a circulação dos genótipos de HHV-8 no mundo foram identificados, uma vez que os genótipos A e C mostraram distribuições globais semelhantes e estavam presentes em todos os continentes, mas altamente prevalentes na Europa e na África; o genótipo B foi mais prevalente na África, mas também foi identificado na América Central e do Sul e na Europa; o genótipo D é raro e foi relatado no Leste Asiático e na Oceania; o incomum genótipo E foi identificado em populações ameríndias da América do Sul; e o genótipo F também é raro, mas foi identificado na África, América e Europa;
- Os países americanos apresentam alta diversidade genotípica do HHV-8 e o Brasil é o país com maior diversidade genotípica do mundo, apresentando cinco genótipos do HHV-8 (A, B, C, E e F);
- A associação dos genótipos do HHV-8 com as possíveis migrações humanas, pode ajudar a prever possíveis rotas de transmissão e grupos de riscos para a infecção pelos diferentes genótipos do HHV-8.

6. PERSPECTIVAS

- **Analisar a associação dos genótipos do HHV-8 com o potencial tumorigênico e neoplasias associadas;**
- **Realizar as análises filogeográficas para verificar a rota de distribuição dos genótipos do HHV-8 no mundo.**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeyemo, A., Wood, C. e Govind, A. (2012) 'Kaposi's sarcoma in pregnancy after initiation of highly active antiretroviral therapy: a manifestation of immune reconstitutionsyndrome', *Int J STD AIDS*, 23(12), pp. 905-6.

Altuğlu, İ., Yolcu, A., Öcek, Z. A., Yazan Sertöz, R. e Gökengin, D. (2016) '[Investigation of human herpesvirus-8 seroprevalence in blood donors and HIV-positive patients admitted to Ege University Medical School Hospital, Turkey]', *Mikrobiyol Bul*, 50(1), pp. 104-11.

Andrei, G. e Snoeck, R. (2015) 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: the role of lytic replication in targeted therapy', *Curr Opin Infect Dis*, 28(6), pp. 611-24.

Aneja, K. K. e Yuan, Y. (2017) 'Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update', *Front Microbiol*, 8, pp. 613.

Augustyn , A., Bauer , P., Duignan , B., Eldridge , A., Gregersen , E., McKenna , A., Petruzzello , M., Rafferty , J., Ray , M., Rogers , K., Tikkanen , A., Wallenfeldt , J., Zeidan , A. e Zelazko, A. (2019) *French Guiana: TERRITORIAL COLLECTIVITY, FRANCE*. United States: Encyclopedia Britannica. Available at: [https:// britannica.com/place/French-Guiana](https://britannica.com/place/French-Guiana) (Accessed: July 2019).

Bae, C. J., Douka, K. e Petraglia, M. D. (2017) 'On the origin of modern humans: Asianperspectives', *Science*, 358(6368).

Batista, M. D., Ferreira, S., Sauer, M. M., Tomiyama, H., Giret, M. T., Pannuti, C. S., Diaz, R. S., Sabino, E. C. e Kallas, E. G. (2009) 'High human herpesvirus 8 (HHV- 8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infectedsubjects in Sao Paulo, Brazil', *PLoS One*, 4(5), pp. e5613.

Biggar, R. J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A. C. e Black, F. (2000) 'Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype', *J Infect Dis*, 181(5), pp. 1562-8.

Blauvelt, A. (2001) 'Skin diseases associated with human herpesvirus 6, 7, and 8 infection', *J Investig Dermatol Symp Proc*, 6(3), pp. 197-202.

Blauvelt, A., Sei, S., Cook, P. M., Schulz, T. F. e Jeang, K. T. (1997) 'Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States', *J Infect Dis*, 176(3), pp. 771-4.

Boralevi, F., Masquelier, B., Denayrolles, M., Dupon, M., Pellegrin, J. L., Ragnaud, J.

M. e Fleury, H. J. (1998) 'Study of human herpesvirus 8 (HHV-8) variants from Kaposi's sarcoma in France: is HHV-8 subtype A responsible for more aggressive tumors?', *J Infect Dis*, 178(5), pp. 1546-7.

Brayfield, B. P., Phiri, S., Kankasa, C., Muyanga, J., Mantina, H., Kwenda, G., West, J. T., Bhat, G., Marx, D. B., Klaskala, W., Mitchell, C. D. e Wood, C. (2003) 'Postnatal human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 infection in mothers and infants from Zambia', *J Infect Dis*, 187(4), pp. 559-68.

Brunet-Possenti, F., Pages, C., Rouzier, R., Dupin, N., Bagot, M. e Lebbé, C. (2013) 'Kaposi's sarcoma and pregnancy: case report and literature review', *Dermatology*, 226(4), pp. 311-4.

Bryant, A. E., Genc, M., Hurtado, R. M. e Chen, K. T. (2004) 'Pulmonary Kaposi's sarcoma in pregnancy', *Am J Perinatol*, 21(6), pp. 355-63.

Bustin, S. A. e Mueller, R. (2005) 'Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis', *Clin Sci (Lond)*, 109(4), pp. 365-79.

Cahú, G. G., Morais, V. M., Lopes, T. R., da Silva, D. M., Tozetto-Mendoza, T. R., Pannuti, C. S. e Coêlho, M. R. (2016) 'Prevalence of Human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil', *J Med Virol*.

Calabrò, M. L., Gasperini, P., Barbierato, M., Ometto, L., Zanchetta, M., De Rossi, A. e Chieco-Bianchi, L. (2000) 'A search for human herpesvirus 8 (HHV-8) in HIV-1 infected mothers and their infants does not suggest vertical transmission of HHV-8', *Int J Cancer*, 85(2), pp. 296-7.

Cesarman, E., Damania, B., Krown, S. E., Martin, J., Bower, M. e Whitby, D. (2019) 'Kaposi sarcoma', *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), pp. 9.

Chan, E. K. F., Timmermann, A., Baldi, B. F., Moore, A. E., Lyons, R. J., Lee, S. S., Kalsbeek, A. M. F., Petersen, D. C., Rautenbach, H., Förtsch, H. E. A., Bornman, M.

S. R. e Hayes, V. M. (2019) 'Human origins in a southern African palaeo-wetland and first migrations', *Nature*, 575(7781), pp. 185-189.

Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M. e Moore, P. S. (1994) 'Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma', *Science*, 266(5192), pp. 1865-9.

Choi, U. Y., Lee, J. J., Park, A., Zhu, W., Lee, H. R., Choi, Y. J., Yoo, J. S., Yu, C., Feng, P., Gao, S. J., Chen, S., Eoh, H. e Jung, J. U. (2020) 'Oncogenic human herpesvirus hijacks proline metabolism for tumorigenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(14), pp. 8083-8093.

Coen, D. M. e Schaffer, P. A. (2003) 'Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets', *Nat Rev Drug Discov*, 2(4), pp. 278-88.

Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S. e Longnecker, R. (2011) 'Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery', *Nat Rev Microbiol*, 9(5), pp. 369-81.

Cook, P. M., Whitby, D., Calabro, M. L., Luppi, M., Kakoola, D. N., Hjalgrim, H., Ariyoshi, K., Ensoli, B., Davison, A. J. e Schulz, T. F. (1999) 'Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group', *AIDS*, 13(10), pp. 1165-76.

Cordiali-Fei, P., Trento, E., Giovanetti, M., Lo Presti, A., Latini, A., Giuliani, M., D'Agosto, G., Bordignon, V., Cella, E., Farchi, F., Ferraro, C., Lesnoni La Parola, I., Cota, C., Sperduti, I., Vento, A., Cristaudo, A., Ciccozzi, M. e Ensoli, F. (2015) 'Analysis of the ORFK1 hypervariable regions reveal distinct HHV-8 clustering in Kaposi's sarcoma and non-Kaposi's cases', *J Exp Clin Cancer Res*, 34, pp. 1.

Cunha, A. M. G., Caterino-de-Araujo, A., Costa, S. C. B., Santos-Fortuna, E., Boa-Sorte, N. C. A., Gonçalves, M. S., Costa, F. F. e Galvão-Castro, B. (2005) 'Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil', *J Gen Virol*, 86(Pt 9), pp. 2433-2437.

Damania, B. A. e Cesarman, E. (2013) 'Kaposi's Sarcoma - Associated Herpesvirus', in Knipe, D.M. e Howley, P.M. (eds.) *Fields Virology*. Sixth ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 2080-2126.

De França, T. R., de Araújo, R. A., Ribeiro, C. M. e Leao, J. C. (2011) 'Salivary

shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1', *J Oral Pathol Med*, 40(1), pp. 97-102.

De Souza, V. A., Sumita, L. M., Nascimento, M. C., Oliveira, J., Mascheretti, M., Quiroga, M., Freire, W. S., Tateno, A., Boulos, M., Mayaud, P. e Pannuti, C. S. (2007) 'Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region', *J Infect Dis*, 196(6), pp. 844-52.

Democracy, M. o. A. (2019) *Australia's Story: Timeline 60,000 BC–1836*. Australia: Australia's National Council. Available at: <https://foundingdocs.gov.au/timeline.html> (Accessed: July 2019).

Di Stefano, M., Calabrò, M. L., Di Gangi, I. M., Cantatore, S., Barbierato, M., Bergamo, E., Kfutwah, A. J., Neri, M., Chieco-Bianchi, L., Greco, P., Gesualdo, L., Ayoub, A., Menu, E. e Fiore, J. R. (2008) 'In vitro and in vivo human herpesvirus 8 infection of placenta', *PLoS One*, 3(12), pp. e4073.

Dittmer, D. P. e Damania, B. (2019) 'Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV)-Associated Disease in the AIDS Patient: An Update', *Cancer Treat Res*, 177, pp. 63-80.

Dollery, S. J. (2019) 'Towards Understanding KSHV Fusion and Entry', *Viruses*, 11(11).

Drumm, P. (2018) 'Australian fantasy revisited', *Hist Psychol*, 21(3), pp. 295-296.

Ensoli, B., Stürzl, M. e Monini, P. (2001) 'Reactivation and role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma initiation', *Adv Cancer Res*, 81, pp. 161-200.

Fouchard, N., Lacoste, V., Couppie, P., Develoux, M., Mauclore, P., Michel, P.,

Herve, V., Pradinaud, R., Bestetti, G., Huerre, M., Tekaia, F., de Thé, G. e Gessain, A. (2000) 'Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America', *IntJ Cancer*, 85(2), pp. 166-70.

GLOBOCAN, G. C. O. (2021) *Cancer today*. <https://gco.iarc.fr/today/home> (Accessed: Janeiro de 2021 2021).

Goedert, J. J., Kedes, D. H. e Ganem, D. (1997) 'Antibodies to human herpesvirus 8 in women and infants born in Haiti and the USA', *Lancet*, 349(9062), pp. 1368.

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

Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tyring, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A. e Seeber, S. (2002) 'Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy', *The Lancet Infectious Diseases*, 2(5), pp. 281-292.

Hernández, J. L., Gómez-Román, J., Ramos-Estébanez, C., Nan, D., Martín-Oviedo, J., Riancho, J. A. e González-Macías, J. (2005) 'Human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus coinfection in localized Castleman disease during pregnancy', *Haematologica*, 90 Suppl, pp. ECR35.

ICTV, I. C. o. T. o. V. (2019) *Taxonomy History for Human herpesvirus 8*. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901510 (Accessed: Janeiro de 2021 2021).

Ilboudo, D., Simpoire, J., Sanou, D. S., Karou, D., Sia, D. J., Ouermi, D., Bisseye,

C., Sagna, T., Odolini, S., Buelli, F., Pietra, V., Pignatelli, S., Gnoula, C., Nikiema, J. B. e Castelli, F. (2009) 'Mother-to-child HIV and HHV-8 transmission in neonates at Saint Camille Medical Centre in Burkina Faso', *Pak J Biol Sci*, 12(12), pp. 908-13.

Isaacs, T., Abera, A. B., Muloiwa, R., Katz, A. A. e Todd, G. (2016) 'Genetic diversity of HHV8 subtypes in South Africa: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS', *J Med Virol*, 88(2), pp. 292-303.

Ishak, M. e O., Martins, R. N., Machado, P. R., de Souza, L. L., Machado, L. F., Azevedo, V. N., Katano, H., Sata, T., Hasegawa, H., Vallinoto, A. C. e Ishak, R. (2007) 'High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: evidence of an ancient human infection', *J Med Virol*, 79(10), pp. 1537-44.

Jamieson, D. J., Theiler, R. N. e Rasmussen, S. A. (2006) 'Emerging infections and pregnancy', *Emerg Infect Dis*, 12(11), pp. 1638-43.

Johnson, D. C. e Baines, J. D. (2011) 'Herpesviruses remodel host membranes for virus egress', *Nat Rev Microbiol*, 9(5), pp. 382-94.

Kadyrova, E., Lacoste, V., Duprez, R., Pozharissky, K., Molochkov, V., Huerre, M., Gurtsevitch, V. e Gessain, A. (2003) 'Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma', *J Med Virol*, 71(4), pp. 548-56.

Kajumbula, H., Wallace, R. G., Zong, J. C., Hokello, J., Sussman, N., Simms, S., Rockwell, R. F., Pozos, R., Hayward, G. S. e Boto, W. (2006) 'Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes', *Intervirology*, 49(3), pp. 133-43.

Kaspersen, M. D. e Höllsberg, P. (2013) 'Seminal shedding of human herpesviruses', *Virology*, 10, pp. 226.

Katano, H. (2018) 'Pathological Features of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection', *Adv Exp Med Biol*, 1045, pp. 357-376.

Kayser, M. (2010) 'The human genetic history of Oceania: near and remote views of dispersal', *Curr Biol*, 20(4), pp. R194-201.

Kourí, V., Martínez, P. A., Capó, V., Blanco, O., Rodríguez, M. E., Jiménez, N., Fleites, G., Caballero, I., Dovigny, M. C., Alemán, Y., Correa, C., Pérez, L., Soto, Y., Cardellá, L., Álvarez, A., Nambiar, S. e Hengge, U. (2012) 'Kaposi's Sarcoma and Human Herpesvirus 8 in Cuba: evidence of subtype B expansion', *Virology*, 432(2), pp. 361-9.

La Ferla, L., Pinzone, M. R., Nunnari, G., Martellotta, F., Lleshi, A., Tirelli, U., De Paoli, P., Berretta, M. e Cacopardo, B. (2013) 'Kaposi's sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era', *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17(17), pp. 2354-65.

Labo, N., Miley, W., Benson, C. A., Campbell, T. B. e Whitby, D. (2015) 'Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in HIV-1-infected US persons in the era of combination antiretroviral therapy', *AIDS*, 29(10), pp. 1217-25.

Lacoste, V., Judde, J. G., Brière, J., Tulliez, M., Garin, B., Kassa-Kelembho, E., Morvan, J., Couppié, P., Clyti, E., Forteza Vila, J., Rio, B., Delmer, A., Maucière, P. e Gessain, A. (2000a) 'Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in Africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread', *Virology*, 278(1), pp. 60-74.

Lacoste, V., Kadyrova, E., Chistiakova, I., Gurtsevitch, V., Judde, J. G. e Gessain, A. (2000b) 'Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia', *J Gen Virol*, 81(Pt 5), pp. 1217-22.

Lathrop, E., Jamieson, D. J. e Danel, I. (2014) 'HIV and maternal mortality', *Int J Gynaecol Obstet*, 127(2), pp. 213-5.

Lazaridis I., A, B.-C., S, M., N, P., O, C., N, R., G, B.-O., O, B.-Y., N, J., E, K., D, L., Z, M., T, M., BJ, C., DJ, K., R, P. e D, R. (2018) 'Paleolithic DNA from the Caucasus reveals core of West Eurasian ancestry', *BioRxiv*, 423079.

Le, J., Gantt, S. e Practice, A. I. D. C. o. (2013) 'Human herpesvirus 6, 7 and 8 in solidorgan transplantation', *Am J Transplant*, 13 Suppl 4, pp. 128-37.

Levi, J. E., Nascimento, M. C., Sumita, L. M., de Souza, V. A., Freire, W. S., Mayaud, P. e Pannuti, C. S. (2011) 'Non-detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-seropositive blood donors from three Brazilian regions', *PLoS One*, 6(8), pp. e23546.

Li, S., Bai, L., Dong, J., Sun, R. e Lan, K. (2017) 'Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Epidemiology and Molecular Biology', *Adv Exp Med Biol*, 1018, pp. 91- 127.

Lisco, A., Barbierato, M., Fiore, J. R., Gasperini, P., Favia, A., Volpe, A., Chironna, M., Pastore, G., Chieco-Bianchi, L. e Calabrò, M. L. (2006) 'Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women', *J Clin Microbiol*, 44(11), pp. 3863-71.

Liu, Z., Fang, Q., Zuo, J., Minhas, V., Wood, C., He, N. e Zhang, T. (2017) 'Was Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus introduced into China via the ancient Silk Road? An evolutionary perspective', *Arch Virol*, 162(10), pp. 3061-3068.

Liu, Z., Fang, Q., Zuo, J., Minhas, V., Wood, C. e Zhang, T. (2018) 'The world-wide incidence of Kaposi's sarcoma in the HIV/AIDS era', *HIV Med*, 19(5), pp. 355-364.

Lopes, A. O., Lima, L. R. P., Tozetto-Mendoza, T. R., Martinelli, K. G., Morgado, M. G., Pilotto, J. H. e de Paula, V. S. (2019) 'Low prevalence of human gammaherpesvirus 8(HHV-8) infection among HIV-infected pregnant women in Rio De Janeiro, Brazil', *J Matern Fetal Neonatal Med*, pp. 1-4.

Lopes, A., Spitz, N., Martinelli, K. G., de Paula, A. V., de Castro Conde Toscano, A. L., Braz-Silva, P. H., Dos Santos Barbosa Netto, J., Tozetto-Mendoza, T. R. e de Paula, V. S. (2020) 'Introduction of human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions', *Virus Res*, 276, pp. 197828.

Machado, P. R., Farias, K. J., Pereira, M. G., Freitas, P. P. e Fonseca, B. A. (2015) 'Human herpesvirus 8 (HHV-8) detected by nested polymerase chain reaction (PCR) in HIV patients with or without Kaposi's sarcoma. An analytic cross-sectional study', *Sao Paulo Med J*.

Magri, M. C., Carbone, P. H., de los Santos-Fortuna, E. e Caterino-de-Araujo, A. (2009) '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), pp. 1292-7.

Mancuso, R., Biffi, R., Valli, M., Bellinvia, M., Tournalaki, A., Athanasia, T., Ferrucci, S., Brambilla, L., Delbue, S., Ferrante, P., Tinelli, C. e Clerici, M. (2008) 'HHV8 a subtypeis associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma', *J Med Virol*, 80(12), pp. 2153-60.

Mantina, H., Kankasa, C., Klaskala, W., Brayfield, B., Campbell, J., Du, Q., Bhat, G., Kasolo, F., Mitchell, C. e Wood, C. (2001) 'Vertical transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus', *Int J Cancer*, 94(5), pp. 749-52.

Marshall, V., Martró, E., Labo, N., Ray, A., Wang, D., Mbisa, G., Bagni, R. K., Volfovsky, N., Casabona, J., Whitby, D. e Group, E.-S. S. (2010) 'Kaposi sarcoma (KS)-associated herpesvirus microRNA sequence analysis and KS risk in a EuropeanAIDS-KS case control study', *J Infect Dis*, 202(7), pp. 1126-35.

Martellotta, F., Berretta, M., Vaccher, E., Schioppa, O., Zanet, E. e Tirelli, U. (2009) 'AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies', *Curr HIV Res*, 7(6), pp. 634-8.

Mayama, S., Cuevas, L. E., Sheldon, J., Omar, O. H., Smith, D. H., Okong, P., Silvel, B., Hart, C. A. e Schulz, T. F. (1998) 'Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents', *Int J Cancer*, 77(6), pp. 817-20.

Mbondji-Wonje, C., Ragupathy, V., Lee, S., Wood, O., Awazi, B. e Hewlett, I. K. (2013)'Seroprevalence of human herpesvirus-8 in HIV-1 infected and uninfected individuals in Cameroon', *Viruses*, 5(9), pp. 2253-9.

McCarty, K. A. e Bungu, Z. (1995) 'Kaposi's sarcoma in a two week old infant born

to a mother with Kaposi's sarcoma/AIDS', *Cent Afr J Med*, 41(10), pp. 330-1.

Meng, Y. X., Spira, T. J., Bhat, G. J., Birch, C. J., Druce, J. D., Edlin, B. R., Edwards, R., Gunthel, C., Newton, R., Stamey, F. R., Wood, C. e Pellett, P. E. (1999) 'Individuals from North America, Australasia, and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8', *Virology*, 261(1), pp. 106-19.

Mesri, E. A., Cesarman, E. e Boshoff, C. (2010) 'Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus', *Nat Rev Cancer*, 10(10), pp. 707-19.

Mian, D. B., Itoua, C., Angoi, V., Gbary, E., Nguessan, K. L., Iloki, H. e Boni, S. (2015) 'Late diagnosis of positive HIV serology in pregnancy incidentally discovered by the widespread appearance of Kaposi's sarcoma', *Clin Exp Obstet Gynecol*, 42(3), pp.378-80.

Miller, C. S., Berger, J. R., Mootoor, Y., Avdiushko, S. A., Zhu, H. e Kryscio, R. J. (2006) 'High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy', *J Clin Microbiol*, 44(7), pp. 2409-15.

Munawwar, A., Sharma, S. K., Gupta, S. e Singh, S. (2014) 'Seroprevalence and determinants of Kaposi sarcoma-associated human herpesvirus 8 in Indian HIV-infected males', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 30(12), pp. 1192-6.

Nascimento, M. C., de Souza, V. A., Sumita, L. M., Freire, W., Munoz, F., Kim, J., Pannuti, C. S. e Mayaud, P. (2007) 'Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis', *J Clin Microbiol*, 45(3), pp. 715-20.

Nascimento, M. C., Wilder, N., Pannuti, C. S., Weiss, H. A. e Mayaud, P. (2005)

'Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Sao Paulo, Brazil', *J Clin Virol*, 33(1), pp. 52-9.

NCBI, N. C. f. B. I. (2020) *K1 [Human gammaherpesvirus 8]*. <https://ncbi.nlm.nih.gov/gene/4961511> (Accessed: Janeiro de 2021 2021).

Ogoina, D., Onyemelukwe, G., Musa, B. O. e Babadoko, A. (2011) 'Seroprevalence and determinants of human herpes virus 8 infection in adult Nigerians with and without HIV-1 infection', *Afr Health Sci*, 11(2), pp. 158-62.

Olp, L. N., Jeanniard, A., Marimo, C., West, J. T. e Wood, C. (2015) 'Whole-Genome Sequencing of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus from Zambian Kaposi's Sarcoma Biopsy Specimens Reveals Unique Viral Diversity', *J Virol*, 89(24), pp. 12299-308.

Ongaro, L., Scliar, M. O., Flores, R., Raveane, A., Marnetto, D., Sarno, S., Gnecci-Ruscione, G. A., Alarcón-Riquelme, M. E., Patin, E., Wangkumhang, P., Hellenthal, G., Gonzalez-Santos, M., King, R. J., Kouvatsi, A., Balanovsky, O., Balanovska, E., Atramentova, L., Turdikulova, S., Mastana, S., Marjanovic, D., Mulahasanovic, L., Leskovac, A., Lima-Costa, M. F., Pereira, A. C., Barreto, M. L., Horta, B. L., Mabunda, N., May, C. A., Moreno-Estrada, A., Achilli, A., Olivieri, A., Semino, O., Tambets, K., Kivisild, T., Luiselli, D., Torroni, A., Capelli, C., Tarazona-Santos, E., Metspalu, M., Pagani, L. e Montinaro, F. (2019) 'The Genomic Impact of European Colonization of the Americas', *Curr Biol*, 29(23), pp. 3974-3986.e4.

Orenstein, J. M., Alkan, S., Blauvelt, A., Jeang, K. T., Weinstein, M. D., Ganem, D. e Herndier, B. (1997) 'Visualization of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy', *AIDS*, 11(5), pp. F35-45.

Paludan, S. R., Bowie, A. G., Horan, K. A. e Fitzgerald, K. A. (2011) 'Recognition of herpesviruses by the innate immune system', *Nat Rev Immunol*, 11(2), pp. 143-54.

Penello, A. M., Campos, B. C., Simão, M. S., Gonçalves, M. A., Souza, P. M., Salles, R. S. e Pellegrini, E. (2010) 'Herpes genital', *J bras Doenças Sex Transm*, 22(2), pp. 64-72.

Perng, G. C. e Jones, C. (2010) 'Towards an understanding of the herpes simplex virustype 1 latency-reactivation cycle', *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2010, pp. 262415.

Perse da Silva, A., Lopes, A. e O., Vieira, Y. R., de Almeida, A. J., Sion, F. S., Grinsztejn, B., Wagner, S. e de Paula, V. S. (2015) 'Genotypic Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates in Immunocompromised Patients in Rio de Janeiro, Brazil', *PLoS One*, 10(9), pp. e0136825.

Piccinni, M. P., Scaletti, C., Maggi, E. e Romagnani, S. (2000) 'Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy', *J Neuroimmunol*, 109(1), pp. 30-3.

Pierrotti, L. C., Etzel, A., Sumita, L. M., Braga, P. E., Eluf-Neto, J., de Souza, V. A. e Segurado, A. A. (2005) 'Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors', *Sex Transm Dis*, 32(1), pp. 57-63.

Poole, L. J., Zong, J. C., Ciufu, D. M., Alcendor, D. J., Cannon, J. S., Ambinder, R., Orenstein, J. M., Reitz, M. S. e Hayward, G. S. (1999) 'Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end', *J Virol*, 73(8), pp. 6646-60.

Pérez, C. L. e Tous, M. I. (2017) 'Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina', *J Med Virol*, 89(11), pp. 2020-2028.

Qin, J. e Lu, C. (2017) 'Infection of KSHV and Interaction with HIV: The Bad Romance', *Adv Exp Med Biol*, 1018, pp. 237-251.

Ramos da Silva, S., Ferraz da Silva, A. P., Bacchi, M. M., Bacchi, C. E. e Elgui de Oliveira, D. (2011) 'KSHV genotypes A and C are more frequent in Kaposi sarcoma lesions from Brazilian patients with and without HIV infection, respectively', *Cancer Lett*, 301(1), pp. 85-94.

Rito, T., Vieira, D., Silva, M., Conde-Sousa, E., Pereira, L., Mellars, P., Richards, M. B. e Soares, P. (2019) 'A dispersal of Homo sapiens from southern to eastern Africa immediately preceded the out-of-Africa migration', *Sci Rep*, 9(1), pp. 4728.

Rohner, E., Wyss, N., Heg, Z., Faralli, Z., Mbulaiteye, S. M., Novak, U., Zwahlen, M., Egger, M. e Bohlius, J. (2016) 'HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis', *Int J Cancer*, 138(1), pp. 45-54.

Rohner, E., Wyss, N., Trelle, S., Mbulaiteye, S. M., Egger, M., Novak, U., Zwahlen, M. e Bohlius, J. (2014) 'HHV-8 seroprevalence: a global view', *Syst Rev*, 3, pp. 11.

Schwartz, R. A. (1996) 'Kaposi's sarcoma: advances and perspectives', *J Am Acad Dermatol*, 34(5 Pt 1), pp. 804-14.

Sousa-Squiavinato, A. C., Silvestre, R. N. e Elgui De Oliveira, D. (2015) 'Biology and oncogenicity of the Kaposi sarcoma herpesvirus K1 protein', *Rev Med Virol*, 25(5),pp.273-85.

Speicher, D. J., Sehu, M. M., Johnson, N. W. e Shaw, D. R. (2013) 'Successful treatment of an HIV-positive patient with unmasking Kaposi's sarcoma immune reconstitution inflammatory syndrome', *J Clin Virol*, 57(3), pp. 282-5.

Spitz, N., Moreira, A. S., Mello, F. C. A., Franz, H. C. F., Gomes, S. A. e Araujo, N. M. (2017) 'Complete genome sequence of a hepatitis B virus isolate of genotype D2, subtype adrq+, from Brazil', *Arch Virol*, 162(6), pp. 1695-1700.

Sutton, K., Chanderli, A., Zaimeche, S. e Brown, L. (2019) *Algeria*. United States: Encyclopedia Britannica. Available at: <https://britannica.com/place/Algeria> (Accessed: July 2019).

Szalai, E., Gerlei, Z., Szlávik, J., Szládek, G., Patel, R., Hunyadi, J., Gergely, L. e Juhász, A. (2005) 'Prevalence of human herpesvirus-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi's sarcoma in Hungary', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43(2), pp. 265-8.

Tamanaha-Nakasone, A., Uehara, K., Tanabe, Y., Ishikawa, H., Yamakawa, N., Toyoda, Z., Kurima, K., Kina, S., Tsuneki, M., Okubo, Y., Yamaguchi, S., Utsumi, D., Takahashi, K., Arakawa, H., Arasaki, A. e Kinjo, T. (2019) 'K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi's sarcoma: Correlation with clinical presentation', *Sci Rep*, 9(1), pp. 6416.

Tornesello, M. L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L. e Buonaguro, F. M. (2010) 'Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era', *Virology*, 398(2), pp. 280-9.

Tozetto-Mendoza, T. R., Ibrahim, K. Y., Tateno, A. F., Oliveira, C. M., Sumita, L. M., Sanchez, M. C., Luna, E. J., Pierrotti, L. C., Drexler, J. F., Braz-Silva, P. H., Pannuti, C. S. e Romano, C. M. (2016) 'Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS?', *Medicine (Baltimore)*, 95(48), pp. e5291.

Varella, R., Pires, I., Saraiva, C., Guimarães, A. e Guimarães, M. (2005) 'Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados', *J Bras Patol Med Lab*, 41.

Veenstra van Nieuwenhoven, A. L., Bouman, A., Moes, H., Heineman, M. J., de Leij, L. F., Santema, J. e Faas, M. M. (2002) 'Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle', *Fertil Steril*, 77(5), pp. 1032-7.

Vega, F., Miranda, R. N. e Medeiros, L. J. (2020) 'KSHV/HHV8-positive large B-cell lymphomas and associated diseases: a heterogeneous group of lymphoproliferative processes with significant clinicopathological overlap', *Mod Pathol*, 33(1), pp. 18-28.

Wejsa, S. e Lesser, J. (2019) *Migration in Brazil: The Making of a Multicultural Society*. Washington, DC: Migration Policy Institute. Available at: <https://migrationpolicy.org/article/migration-brazil-making-multicultural-society> (Accessed: July 2019).

Whitby, D., Marshall, V. A., Bagni, R. K., Wang, C. D., Gamache, C. J., Guzman, J.

R., Kron, M., Ebbesen, P. e Biggar, R. J. (2004) 'Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations', *J Gen Virol*, 85(Pt 1), pp. 155-63.

White, D. W., Suzanne Beard, R. e Barton, E. S. (2012) 'Immune modulation during latent herpesvirus infection', *Immunol Rev*, 245(1), pp. 189-208.

Yan, L., Majerciak, V., Zheng, Z. M. e Lan, K. (2019) 'Towards Better Understanding of KSHV Life Cycle: from Transcription and Posttranscriptional Regulations to Pathogenesis', *Virol Sin*, 34(2), pp. 135-161.

Zong, J., Ciufu, D. M., Viscidi, R., Alagiozoglou, L., Tyring, S., Rady, P., Orenstein, J., Boto, W., Kalumbuja, H., Romano, N., Melbye, M., Kang, G. H., Boshoff, C. e Hayward, G. S. (2002) 'Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism', *J Clin Virol*, 23(3), pp. 119-48.

Zong, J. C., Arav-Boger, R., Alcendor, D. J. e Hayward, G. S. (2007) 'Reflections on the interpretation of heterogeneity and strain differences based on very limited PCR sequence data from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genomes', *J Clin Virol*, 40(1), pp. 1-8.

Zong, J. C., Ciufu, D. M., Alcendor, D. J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P. J., Rady, P. L., Tyring, S. K., Orenstein, J. M., Rabkin, C. S., Su, I. J., Powell, K. F., Croxson, M., Foreman, K. E., Nickoloff, B. J., Alkan, S. e Hayward, G. S. (1999) 'High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations', *J Virol*, 73(5), pp. 4156-70.

8. PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

Trabalhos científicos publicados em período concomitante e que não foram relacionados ao tema central desta tese de doutorado.

8.1. *Longitudinal study on oral shedding of human betaherpesviruses 6 and 7 in renal transplant recipients reveals active replication.*

Autores: Jéssica Vasques Raposo, Dmitry José De Santana Sarmiento, Rafaela Barbosa Da Silva Pinto, Amanda de Oliveira Lopes, Marina Gallottini, Tânia Regina Tozetto-Mendoza, Paulo Henrique Braz-Silva e Vanessa Salette de Paula

Revista de publicação: *Journal of Oral Microbiology*,

2020DOI: 10.1080/20002297.2020.1785801

8.2. *Detection and quantification of hepatitis E virus in the absence of IgG and IgM anti-HEV in HIV-positive patients.*

Autores: A.L. Salvio, A.O. Lopes, A.J. Almeida,†, N.R. Gardinali, L.R.P. Lima, J.M. de Oliveira, F.S. Sion, L.C.P. Ribeiro, M.A. Pinto e V.S. de Paula

Revista de publicação: *Journal of Applied Microbiology*,

2018DOI: 10.1111/jam.14024