

Carla Nicolly da Silva Passos

**Biotecnologia de Aptâmeros no  
Diagnóstico de Vírus  
Oncogênicos: uma Breve  
Revisão da Literatura e Análises  
Preliminares em Herpes Vírus  
Humano Tipo 8**

CARLA NICOLLY DA SILVA PASSOS

BIOTECNOLOGIA DE APTÂMEROS NO DIAGNÓSTICO DE VÍRUS  
ONCOGÊNICOS: UMA BREVE REVISÃO DA LITERATURA E  
ANÁLISES PRELIMINARES EM HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 8

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia.

Orientadoras: Dr<sup>a</sup> Elen Mello de Souza (Externa  
- Fiocruz) e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Leandro Rama  
Gomes (Interna - IFRJ).

Rio de Janeiro

2023

CARLA NICOLLY DA SILVA PASSOS

**BIOTECNOLOGIA DE APTÂMEROS NO DIAGNÓSTICO DE VÍRUS  
ONCOGÊNICOS: UMA BREVE REVISÃO DA LITERATURA E ANÁLISES  
PRELIMINARES EM HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 8**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 12/07/2023.

Banca Examinadora:

*Elen Mello de Souza*

---

**Dr<sup>a</sup> Elen Mello de Souza**  
(Orientadora Externa – Fiocruz)

*Débora Leandro Rama Gomes*

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Leandro Rama Gomes**  
(Orientadora Interna – IFRJ)

*Amanda de Oliveira Lopes*

---

**Dr<sup>a</sup> Amanda de Oliveira Lopes**  
(Membro Externo da Banca – Fiocruz)

*Luiza Silveira Garcia*

---

**M. Sc. Luiza Silveira Garcia**  
(Membro Externo da Banca – Fiocruz)

Rio de Janeiro  
2023

CIP - Catalogação na Publicação  
Alane Elias Souza – CRB7 6321

P289b Passos, Carla Nicolly

Biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos: uma breve revisão da literatura e análises preliminares em herpesvírus humano tipo 8 / Carla Nicolly Passos - Rio de Janeiro, 2023.

51 f.

Orientação: Débora Leandro Gomes Rama.

Coorientação: Elen Mello de Souza.

Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2023.

1. Aptâmeros. 2. Diagnóstico. 3. Herpesvírus Humano tipo 8. 4. Vírus Oncogênicos. I. Rama, Débora Leandro Gomes , **orient.** II Souza, Elen Mello de , **coorient.** III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. IV. Título

CDU 615

Dedico à minha mãe, que é meu exemplo de força, minha principal apoiadora e a pessoa que mais acreditou em mim durante toda minha vida. A minha maior conquista é dar esse orgulho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Carla e Mário, que sempre fizeram de tudo para que eu tivesse a base para construir meu futuro e nunca deixaram de acreditar em mim. Essa graduação hoje é um sonho meu, mas foi sonhado por eles muito antes de eu pensar no meu futuro. À minha irmã, Myllena, que sempre esteve comigo do jeito que é só nosso. À minha sobrinha e afilhada, Anna Júlia, por me ensinar o que é amor e ser meu orgulho.

Aos meus padrinhos, Gracinha e Waltinho, que junto dos meus pais fizeram parte da minha educação e me ajudaram a me entender como pessoa.

Ao meu noivo e futuro esposo, Henrique, que é meu maior apoiador em tudo o que eu faço. Obrigada por tudo e por estar ao meu lado sempre. Sou nós.

À minha avó Célia, por estar aqui sempre por mim, além de todo o carinho e amor. À minha avó Iracema, por todo o amor e por me ensinar sobre resiliência.

Às minhas famílias, Passos e Silva, por me ensinarem tudo o que eu sei sobre alegria, respeito, fé e união. Sou grata a todos, mas não poderia deixar de citar, em especial: minhas tias Cláudia, Fabíola, Jurema (*in memoriam*), Lene e Marilda; meus tios Adolfo e Junior; minhas primas Emily, Gabriela, Hanna, Ivi, Lorena, Nathália, Polliana; meu primo e irmão Gabriel; minhas irmãs Maryllin, Karen e Aline. Todos eles sempre vibraram por mim e sem eles eu não estaria aqui.

À Carolina Honório, agora colega de profissão, por todo auxílio durante esses anos e por ser meu exemplo de Farmacêutica.

À minha sogra, Jandira, que me tem como filha, por todo o cuidado, carinho e apoio.

Aos meus cachorros, Benji e Yugi, por trazerem cor aos dias nublados, me dando forças para seguir mesmo nos tropeços.

Ao meu amigo Breno, que está comigo em todos os momentos da minha vida.

Às amigas que o IF me proporcionou: Ellen, Isabella, Letícia e Vitória, que estiveram comigo por todos esses anos, nas alegrias e tristezas... Não há como

pensar na minha jornada na graduação sem falar delas. Sou grata por tudo que vivemos e iremos viver; Ao meu amigo Hoffgan, pela amizade linda que construímos além da graduação; À minha amiga Carolina, minha parceira e grata surpresa, por todos os nossos momentos dentro e fora do laboratório.

Ao IFRJ, que através do ensino público e de qualidade, me proporcionou diferentes experiências na minha trajetória: Diretório Acadêmico de Farmácia; Ligas Acadêmicas de Bioquímica e de Saúde Mental; Monitoria Acadêmica; PET-Saúde Interprofissionalidade e até mesmo o time de handebol da Atlética. Aproveitei todas as oportunidades que consegui abraçar, me desenvolvendo tanto no âmbito acadêmico, quanto no pessoal, mas principalmente no profissional. A universidade pública transforma vidas!

À minha orientadora acadêmica, Débora Rama, por ter aceitado me orientar e por todo o auxílio nesse trabalho. Sou muito grata também por ter me apresentado o mundo da Microbiologia, pelo qual me apaixonei desde o primeiro contato.

Aos meus professores, destacando Ana Barbosa, Camila Falcão, Eduardo Rodrigues, Leda Glicério, Murilo Marinho, Paula Maciel e Paulo Galdino, por todos os ensinamentos e principalmente Itallo Collopy Jr., que me apresentou a Bioquímica que, junto da Microbiologia, tem todo o meu carinho.

Às minhas orientadoras da Fiocruz, Elen Mello e Mariana Waghbi, que me deram a oportunidade de vivenciar a Iniciação Científica. Sou grata por toda confiança que sempre depositaram em mim, por me ajudarem a descobrir minhas paixões e meus talentos e por me auxiliarem a trilhar meu futuro.

PASSOS, C. N. S. Biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos: uma breve revisão da literatura e análises preliminares em herpesvírus humano tipo 8. 51p. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

## RESUMO

Vírus oncogênicos são vírus capazes de infectar e se integrar às células e induzir a oncogênese, sendo responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de todos os tipos de câncer em países de baixa e média renda. O câncer é uma das principais causas de óbitos no mundo sendo estimado cerca de 10 milhões de óbitos apenas no ano de 2020, sendo o diagnóstico precoce essencial para o tratamento e diminuição de taxa de mortalidade. Aptâmeros são oligonucleotídeos de fita simples capazes de se dobrar em formas tridimensionais e se complexar a uma grande diversidade de alvos, apresentando vantagens frente a métodos já utilizados em diagnóstico e tratamento de doenças. O presente estudo visa realizar uma revisão bibliográfica acerca da utilização da biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos e analisar a replicação viral de HHV-8 através do cultivo *in vitro* de linfócitos B. Sobre a revisão bibliográfica, foi buscado nas bases de dados CAPS, *Pubmed*, *Scielo* e *Science Direct* estudos utilizando aptâmeros no diagnóstico de oncovírus conduzidos nos últimos 10 anos. A partir do levantamento realizado, foram identificados 76 artigos relevantes e após análise criteriosa dos textos, foram incluídos 13 artigos, sendo 5 sobre o vírus da hepatite B, 5 relacionados ao vírus da hepatite C e 3 abordando o vírus do papiloma humano. Os estudos selecionados apresentaram resultados promissores e mais vantajosos em comparação aos métodos de diagnóstico já utilizados na prática clínica. Em relação aos experimentos conduzidos em laboratório, foi realizada a avaliação da replicação viral de HHV-8 através do cultivo *in vitro* de linfócitos B (BCBL-1) que apresenta o genoma viral do HHV-8 inserido de forma latente. Para isso, a replicação viral foi estimulada pelo tratamento com o fármaco Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) em diferentes concentrações e as amostras foram coletadas em diferentes tempos pós-infecção, a fim de determinar qual apresenta maior carga viral. O DNA viral foi quantificado no equipamento *QuantStudio™ Real-Time PCR System*, pela Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz. Como resultado, observou-se que a concentração de 30 ng/mL do PMA em 96 horas coletando o sobrenadante celular se apresenta como a melhor opção para seguir com os experimentos de seleção de aptâmeros. Diante desses resultados, é possível observar que a biotecnologia de aptâmeros é uma alternativa viável para o diagnóstico de doenças, destacando nesse trabalho, cânceres causados por vírus. Com isso, espera-se que se apresente como uma candidata em potencial para ser utilizada como alternativa de método de identificação e diferenciação de células infectadas por HHV-8 e, conseqüentemente, auxiliar no diagnóstico de doenças associadas ao vírus.

**Palavras-chave:** Aptâmeros. Vírus Oncogênicos. Diagnóstico. Herpesvírus Humano tipo 8.



PASSOS, C. N. S. Aptamer biotechnology in the diagnosis of oncogenic viruses: a brief literature review and preliminary analysis on human herpesvirus type 8. 51p. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

## ABSTRACT

Oncogenic viruses are viruses capable of infecting and integrating into cells and inducing oncogenesis, accounting for approximately 30% of cases of all types of cancer in low-and middle-income countries. Cancer is one of the main causes of death in the world, with an estimated 10 million deaths just in 2020's year, that way early diagnosis being essential for treatment and a reduction in the mortality rate. Aptamers are single-stranded oligonucleotides capable of folding into three-dimensional shapes and complexing to a wide range of targets, presenting advantages over methods already used in the diagnosis and treatment of diseases. The purpose of this study is to execute a bibliographic review about the use of aptamer biotechnology in the diagnosis of oncogenic viruses and analyze the viral replication of HHV-8 through in vitro cultivation of B lymphocytes. About the bibliographic review, it was searched in the CAPS databases, Pubmed, Scielo and Science Direct studies using aptamers in the diagnosis of oncoviruses conducted in the last 10 years. From the data survey, 76 relevant articles were identified and after careful analysis of the texts, 13 articles were included, 5 of the hepatitis B virus, 5 related to the hepatitis C virus and 3 about the human papilloma virus. The selected studies showed promising and more advantageous results compared to diagnostic methods already used in clinical practice. Concerning the experiments in the laboratory, the evaluation of viral replication of HHV-8 was carried out through the in vitro cultivation of B lymphocytes (BCBL-1) that present the viral genome of HHV-8 latently inserted. For this, viral replication was stimulated by treatment with the drug Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) at different concentrations and samples were collected at different times post-infection, to determine which one has the highest viral charge. The viral DNA was quantified in the QuantStudio™ Real-Time PCR System equipment, by the Fiocruz Technological Platforms Network. As a result, it was observed that the concentration of 30 ng/mL of PMA in 96 hours collecting the cell supernatant showed as the best option to continue with the aptamer selection experiments. In view of these results, it is possible to observe that the biotechnology of aptamers is a viable alternative for the diagnosis of diseases, in case of this work, cancers caused by viruses. With this, it is expected that aptamers present as a potential candidate to be used as an alternative method of identification and differentiation of cells infected by HHV-8 and, consequently, to aid in the diagnosis of diseases associated with the virus.

**Keywords:** Aptamers. Oncogenic Viruses. Diagnostic. Human Herpesvirus 8.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da interação de fatores virais e celulares que podem contribuir para a carcinogênese. ....	13
Figura 2 – Ilustração da partícula viral do HHV-8.....	15
Figura 3 – Ilustração do genoma viral do HHV-8.....	16
Figura 4 – Esquema representativo do funcionamento de um aptâmero. ....	18
Figura 5 – Esquema representativo do método de SELEX. ....	19
Figura 6 – Esquema do processo de coleta das amostras em placas de 24 poços. .	23
Figura 7 – Esquema do preparo das amostras em microplaca de 96 poços para a quantificação da carga viral.....	26
Figura 8 – Fluxograma do processo de seleção e inclusão de artigos.....	27
Figura 9 Ilustração da partícula viral do HBV. ....	28
Figura 10 – Ilustração do genoma do HBV.....	29
Figura 11 – Ilustração da partícula viral do HCV. ....	33
Figura 12 – Ilustração do genoma do HCV. ....	33
Figura 13 – Ilustração da partícula viral do HPV. ....	37
Figura 14 – Ilustração do genoma viral do HPV.....	37
Figura 15 – Cultura de células BCBL-1 em crescimento.....	40
Figura 16 – Quantificação da carga viral de HHV-8 por qPCR (QuantStudio™ Design & Analysis) em células BCBL-1 após indução de reativação viral por PMA.....	41
Figura 17 – Quantificação da carga viral de HHV-8 por qPCR (QuantStudio™ Design & Analysis) em células controle (BCBL-1).....	42
Figura 18 – Reativação viral de HHV-8 em células BCBL-1.....	43

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Vírus oncogênicos e tipos de câncer causados.....	14
Quadro 2 – Comparação entre aptâmeros e anticorpos.....	20
Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação viral do HHV-8 por qPCR.....	25
Quadro 4 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HBV .....	31
Quadro 5 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HCV.....	35
Quadro 6 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HPV.....	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCBL-1	Célula de linhagem do linfócito B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAccc	DNA circular de fita dupla covalentemente fechado
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ELASA	<i>Enzyme-Linked Aptosorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HHV-8	Herpesvírus Humano tipo 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HTLV	Vírus Linfotrópico para células T de humanos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
LANA	<i>latency-associated nuclear antigen</i>
LVPM	Laboratório de Virologia e Parasitologia Molecular
MCPyV	Poliomavírus de células de Merkel
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTC	<i>no template control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Fármaco Acetato Miristato de Forbol
PUBMED	plataforma de busca da <i>National Library of Medicine</i> (NLM)
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	meio de cultura para crescimento celular
SCIELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SIB	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>
SK	Sarcoma de Kaposi

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	VÍRUS ONCOGÊNICOS	13
1.1.1	<b>Herpes vírus Humano Tipo 8</b>	<b>15</b>
1.2	APTÂMEROS	18
1.3	OBJETIVOS	21
1.3.1	<b>Objetivo geral</b>	<b>21</b>
1.3.2	<b>Objetivos específicos</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	<b>22</b>
2.1	METODOLOGIA	22
2.1.1	<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>22</b>
2.1.2	<b>Avaliação da replicação viral de HHV-8 em células BCBL-1</b>	<b>22</b>
2.1.2.1	<i>Propagação e manutenção do cultivo celular de BCBL-1 in vitro</i>	22
2.1.2.2	<i>Indução da produção do ciclo lítico do HHV-8 pelo fármaco PMA</i>	23
2.1.2.3	<i>Extração do DNA viral</i>	24
2.1.2.4	<i>Quantificação da carga viral por qPCR</i>	24
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.2.1	<b>Revisão bibliográfica: Utilização da biotecnologia de aptâmeros para o diagnóstico de vírus oncogênicos</b>	<b>25</b>
2.2.1.1	<i>Aptâmeros e HBV</i>	28
2.2.1.2	<i>Aptâmeros e HCV</i>	32
2.2.1.3	<i>Aptâmeros e HPV</i>	36
2.2.2	<b>Estudo experimental: Avaliação da replicação viral do HHV- 8 em células BCBL-1</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>46</b>
	REFERÊNCIAS	47

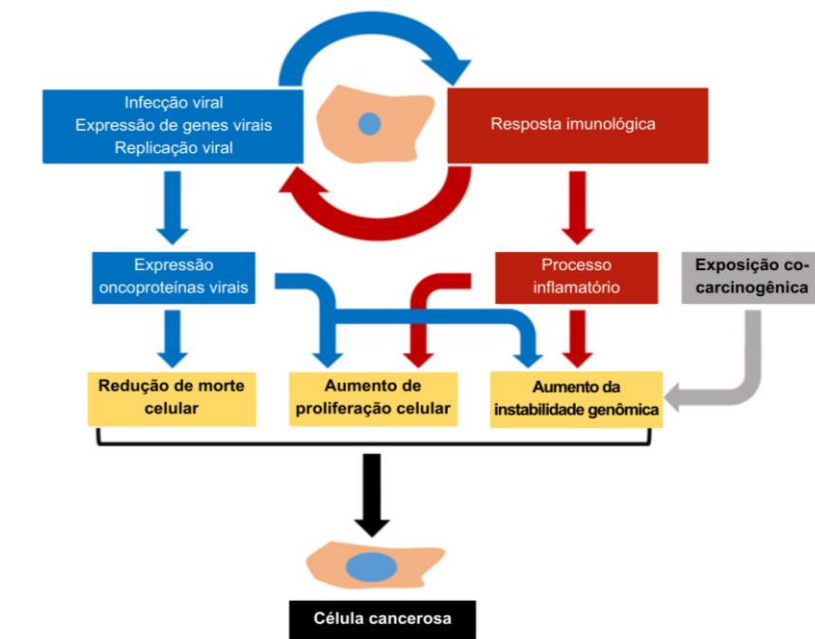
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VÍRUS ONCOGÊNICOS

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2020), o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela perda do controle da divisão celular e crescimento desordenado de células que tendem a invadir outras estruturas orgânicas. O processo de formação do câncer – oncogênese – é iniciado a partir de uma mutação genética no DNA celular e ocorre lentamente, podendo ter inúmeras causas, sendo uma delas a infecção viral.

Vírus oncogênicos são vírus capazes de se associar, infectar, integrar células sem destruí-las e induzir a oncogênese. A atividade carcinogênica desses vírus se dá a partir de inúmeros mecanismos de ação, como expressão de proteínas virais específicas (oncogenes), indução de proliferação celular e ativação de resposta inflamatória (SANTOS, 2015; SCHILLER; LOWY, 2021). Estes fatores virais, junto da ação das células do hospedeiro, contribuem para a carcinogênese (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática da interação de fatores virais e celulares que podem contribuir para a carcinogênese.



Legenda: Fatores virais (azul); Fatores celulares (vermelho); Consequência das ações dos fatores (amarelo); Fator de risco (cinza). Fonte: Adaptado de GAGLIA; MUNGER (2018).

Atualmente já foram identificados sete vírus capazes de induzir oncogênese em humanos (Quadro 1), a saber: Vírus da Hepatite B (do inglês, *Hepatitis B Virus - HBV*); Vírus da Hepatite C (do inglês, *Hepatitis C Virus - HCV*); Vírus do Papiloma Humano (do inglês, *Human Papillomavirus - HPV*); Vírus Linfotrópico para células T de humanos (do inglês, *Human T-lymphotropic virus - HTLV*); Vírus Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr Virus - EBV*); Herpesvírus Humano tipo 8 (do inglês, *Human Herpesvirus-8 - HHV-8*); e Poliomavírus de células de Merkel (do inglês, *Merkel Cell Polyomavirus - MCPyV*) (BOGOLYUBOVA, 2019; SANTOS, 2015).

Quadro 1 – Vírus oncogênicos e tipos de câncer causados.

<b>Família</b>	<b>Vírus</b>	<b>Tipos de Câncer</b>
<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatite B (HBV)	Hepatocarcinoma
<i>Flaviviridae</i>	Hepatite C (HCV)	
<i>Papillomaviridae</i>	Papiloma Humano (HPV)	Carcinoma do trato anogenital, carcinoma de orofaringe, câncer de pele
<i>Retroviridae</i>	Linfotrópico para células T de humanos tipo 1 e 2 (HTLV 1 e 2)	Leucemia de células T de adulto e pilosas
<i>Herpesviridae</i>	Epstein-Barr (EBV)	Carcinoma de nasofaringe, linfoma de Burkitt
	Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8)	Sarcoma de Kaposi, linfoma de efusão primário, doença multicêntrica de Castleman
<i>Polyomaviridae</i>	Poliomavírus de células de Merkel (MCPyV)	Carcinoma de células de Merkel

Fonte: Adaptado de *International Agency for Research on Cancer - IARC* (2023).

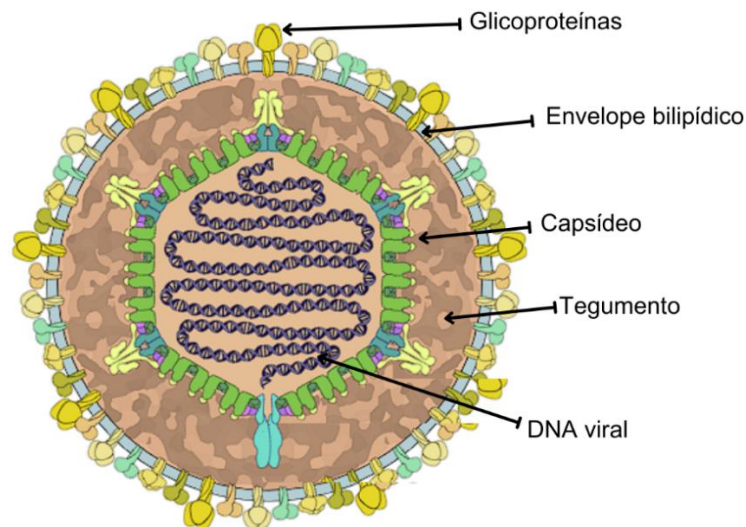
O câncer é uma das maiores causas de óbitos no mundo, sendo estimado cerca de 10 milhões de óbitos apenas no ano de 2020 (DE MARTEL *et al.*, 2020). Em países de baixa e média renda, as infecções carcinogênicas, como as causadas por vírus oncogênicos, são responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de todos os tipos de câncer. Para diminuir a taxa de mortalidade é necessário que ocorra o diagnóstico precoce, afim de iniciar o tratamento antes da evolução da doença (OMS, 2022).



### 1.1.1 Herpes vírus Humano Tipo 8

O herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8) é um oncovírus que está associado ao desenvolvimento de três tipos de tumores em pacientes imunocomprometidos: Sarcoma de Kaposi (SK) (SEMANGO *et al.*, 2018), linfomas de efusão primária e doença de Castleman (WU; LIM; JAFFE, 2018). O vírus é detectado em 80% a 100% dos casos de SK e por isso é conhecido como “herpes vírus do Sarcoma de Kaposi”. Membro da subfamília *Gammaherpesviridae* e pertencente ao gênero *Rhadinovirus*, apresenta-se como partículas de 100 a 150 nm, com envelope bilipídico e núcleo central com DNA de fita dupla; capsídeo icosaédrico; e tegumento (CESARMAN *et al.*, 2019). Sua partícula viral está representada na Figura 2.

Figura 2 – Ilustração da partícula viral do HHV-8.



Fonte: Adaptado de *Swiss Institute of Bioinformatics - SIB, ViralZone* (2023).

O genoma do HHV-8 possui cerca de 170 kb de tamanho, podendo se apresentar na forma linear ou epissomal, após entrada na célula. São codificados cerca de 80 genes líticos e latentes, sendo classificados como genes imediatos precoces, precoces e tardios (Figura 3). O gene ORF50 (RTA) inicia o ciclo lítico, seguido da expressão de genes imunomoduladores (K2, K4, K5, K6 e vIRF-2) e do gene K7, que inibe apoptose, oferecendo vantagem ao vírus frente à célula



caracterizando o estado ativo do vírus, em que ocorre a replicação viral e liberação dos vírus da célula por brotamento. Já no estado latente, o genoma adquire conformação episomal, havendo alta expressão de, principalmente, ORF73 (LANA) e com isso, o vírus permanece inativo, com seu material genético sem atividade e replicação, podendo ser ativado por diversos fatores relacionados ao sistema imunológico, como imunodepressão, imunossupressão, estresse ou até mesmo radiação ultravioleta (BRASIL, 2013; CESARMAN *et al.*, 2019).

A maior probabilidade de via de infecção é através da saliva, mas pode ser transmitido pelo sangue, secreções genitais, ou através de transplante de órgãos (BRASIL, 2013; LOPES, 2021). Sendo a principal doença associada à infecção por HHV-8, o SK se apresenta como a neoplasia mais frequente em pessoas com AIDS, além de possuir algumas variações epidemiológicas: i) clássico, mais frequente em idosos do leste europeu; ii) associado a AIDS (epidêmico), em que as lesões podem atingir mucosas, linfonodos e trato gastrointestinal, predominante em homens homossexuais; iii) endêmico, observado na África, em crianças, com alta mortalidade; e iv) iatrogênico, relacionado a terapia imunossupressora após transplante de órgão (CAMPOS *et al.*, 2017; SEMANGO *et al.*, 2018).

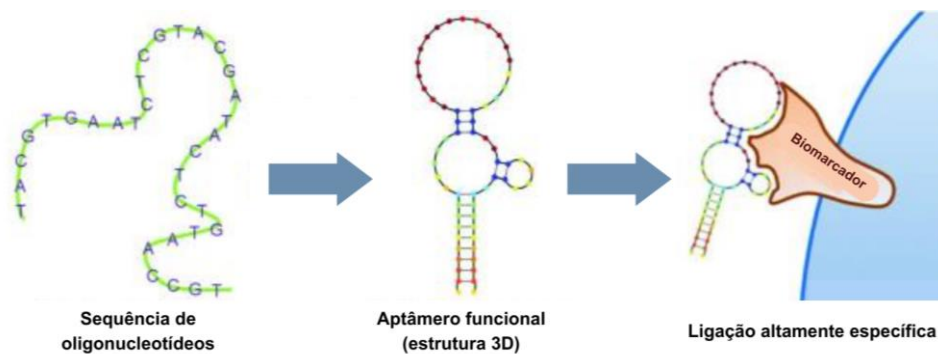
De acordo com a IARC (2023), foi estimado que no ano de 2020 cerca de 34.270 novos casos de SK foram registrados no mundo, tendo somado aproximadamente 15.086 óbitos. Dos casos novos, estima-se que 25.010 (73%) são originados apenas do continente Africano e destes, cerca 86% foram fatais. No mesmo ano, no Brasil, foram registrados cerca de 779 novos casos de SK, detendo a maior porcentagem de incidência na América do Sul. Porém, projeções mostram que há tendência no aumento do número de casos de SK no Brasil, com previsão de maior aumento até 2030 (DOS SANTOS, 2021).

O diagnóstico é muito importante para impedir a evolução da infecção pelo vírus e, conseqüentemente, sua progressão para o SK. Existem diferentes métodos para detecção de HHV-8 utilizando materiais biológicos, como biópsias ou fluidos corporais para a utilização de técnicas como PCR; imuno-histoquímica; hibridação *in situ*; e imunofluorescência (anticorpos anti-LANA). Porém nenhum destes testes atualmente apresentam sensibilidade e/ou especificidade ou são limitados principalmente pelo alto custo (BRASIL, 2013; CESARMAN *et al.*, 2019).

## 1.2 APTÂMEROS

Aptâmeros são oligonucleotídeos de fita simples, de DNA ou RNA, que apresentam de 20 a 100 nucleotídeos na sua região central. Devido sua estrutura, são capazes de se dobrar em uma diversidade de formas tridimensionais, podendo assim, se complexar a uma grande diversidade de alvos, como aminoácidos, antibióticos, ácidos nucleicos, proteínas ou até mesmo vírus, bactérias e células (LEE; KIM; HEO, 2015; LI *et al.*, 2020) (Figura 4).

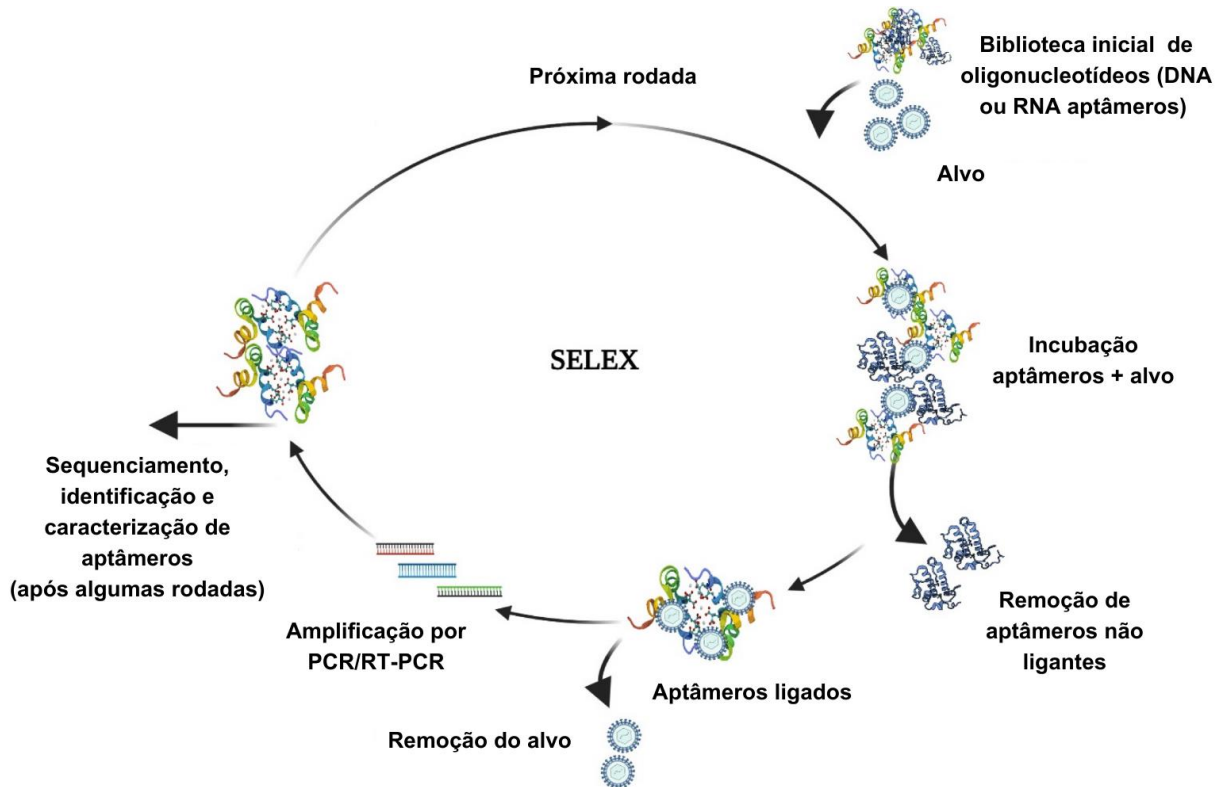
Figura 4 – Esquema representativo do funcionamento de um aptâmero.



Fonte: Adaptado de SUN *et al.* (2014).

A seleção de aptâmeros é realizada a partir do método de SELEX (do inglês *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), que consiste em ciclos repetitivos de seleção e amplificação de oligonucleotídeos com alta afinidade por um alvo pretendido. O processo se inicia a partir de uma biblioteca inicial de oligonucleotídeos (DNA ou RNA aptâmeros), que é incubada com a molécula alvo em condições otimizadas, como temperatura, pH e concentração de sal. Com isso, algumas sequências de oligonucleotídeos interagem com a molécula alvo, sendo então isolados, eluidos e amplificados para o próximo ciclo. Já as sequências que não interagiram são removidas. Este ciclo é repetido de 8 a 15 vezes até que seja obtido o melhor conjunto de sequências-alvo específicas, que posteriormente são sequenciadas e identificadas (KIM; LEE, 2021; KRÜGER *et al.*, 2021) (Figura 5).

Figura 5 – Esquema representativo do método de SELEX.



Fonte: Adaptado de KRÜGER *et al.* (2021).

Devido às suas propriedades únicas, os aptâmeros apresentam uma grande variedade de aplicações, como desenvolvimento de fármacos, rastreamento de células neoplásicas, detecção viral e bacteriana. Dessa forma, são investigados como possíveis alternativas à tecnologia baseada em anticorpos, visto que ambos são altamente comparáveis, pois ligam-se aos seus alvos com alta afinidade e seletividade. Apesar de atualmente anticorpos serem amplamente mais utilizados, os aptâmeros se apresentam como uma melhor alternativa, quando comparados pois apresentam: menor custo e menor tempo de produção, uma vez que podem ser sintetizados e alterados facilmente por síntese química; tamanho menor, fazendo com que a possibilidade de interações moleculares e penetração celular sejam maiores; alta especificidade em moléculas e células-alvo, tendo conformação definida pelo sítio de ligação; apresentam maior resistência em alteração de temperatura; além de, entre outras vantagens, possuir baixa toxicidade e imunogenicidade (ABALO, 2019; RUSCITO; DEROSA, 2016) (Quadro 2).

Quadro 2 – Comparação entre aptâmeros e anticorpos.

	<b>Aptâmeros</b>	<b>Anticorpos</b>
<b>Material</b>	Ácidos Nucleicos (DNA e RNA)	Proteínas
<b>Alvo</b>	Grande variedade, incluindo proteínas	Alvos limitados, compostos por aminoácidos
<b>Tamanho</b>	~20 kDa	~150 kDa
<b>Ligação</b>	Reconhecimento de estrutura 3D	Reconhecimento de sequência de peptídeo
<b>Imunogenicidade</b>	Poucos relatos	Muitos relatos
<b>Período de desenvolvimento</b>	6 – 8 semanas	Meses
<b>Produção</b>	Síntese química	Biológica
<b>Armazenamento</b>	Temperatura ambiente	Temperatura baixa

Fonte: Adaptado de KIM; LEE (2021).

A biotecnologia de aptâmeros vem sendo crescentemente estudada na pesquisa para desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento, desde a sua invenção por Ellington e Szostak (1990) e desenvolvimento por Tuerk e Gold (1990), destacando-se, atualmente, as pesquisas em oncologia e virologia, principalmente na área terapêutica. Nos últimos 3 anos, por exemplo, foram conduzidas pesquisas utilizando aptâmeros para: (i) tratamento de câncer de mama (ZHANG *et al.*, 2021), câncer de fígado (YIN *et al.*, 2022), câncer de próstata (MIRANDA *et al.*, 2021), HIV (ZARANDI; BEHBAHANI; MOHABAKTAR, 2020), SARS-COV-2 (SUN *et al.*, 2021); (ii) diagnóstico de dengue (KHORIS *et al.*, 2021), ZIKA (ALMEIDA *et al.*, 2021) e influenza (MADDOCKS *et al.*, 2022).

Dessa forma, o presente estudo visa demonstrar como a biotecnologia de aptâmeros vem se tornando um potencial método de inovação no diagnóstico de cânceres causados por vírus oncogênicos, bem como apresentar análises preliminares de pesquisa pioneira utilizando HHV-8 como alvo, conduzida no Laboratório de Virologia e Parasitologia Molecular (LVPM), na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

Realizar breve revisão bibliográfica acerca da utilização da biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos e analisar a replicação viral de HHV-8 através do cultivo *in vitro* de linfócitos B.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico de artigos científicos sobre o uso da biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos;
- Reativar a replicação viral do HHV-8 em células BCBL-1, através do estímulo do ciclo lítico pelo fármaco acetato miristato de forbol (PMA, do inglês, *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*);
- Quantificar a carga viral do HHV-8 intracelular e extracelular através do método de qPCR para futuras identificações de DNA aptâmeros específicos para o HHV-8.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 METODOLOGIA

#### 2.1.1 Revisão bibliográfica

Trata-se de uma revisão da literatura com abordagem descritiva e de caráter exploratório que visa realizar levantamento de artigos relacionados ao uso da biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos.

A pesquisa bibliográfica baseou-se no levantamento de dados da literatura científica publicados do período de 2013 a 2023. Este levantamento foi realizado utilizando os bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* (PubMed – NCBI), Periódicos CAPES, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *Science Direct*. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave, com ou sem combinações entre si: *aptamer*, HBV, HCV, EBV, HHV-8, MCPyV, HTLV, HPV, *diagnostic* e *oncoviruses*. Além dos artigos encontrados nos bancos de dados, também foram consultados livros, teses, revistas e *sites*.

Como critérios de exclusão, foram desconsiderados artigos que se repetiam nas diferentes bases de dados e artigos que não se aplicavam ao tema.

#### 2.1.2 Avaliação da replicação viral de HHV-8 em células BCBL-1

Trata-se de uma pesquisa qualitativa experimental, apoiada em experimentos realizados em bancada no Laboratório de Virologia e Parasitologia Molecular (LVPM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), localizado no Rio de Janeiro.

##### 2.1.2.1 Propagação e manutenção do cultivo celular de BCBL-1 *in vitro*

As células tumorais (Linfócitos B de linhagem BCBL-1) foram cultivadas em suspensão na concentração de  $1 \times 10^6$  ou  $3 \times 10^6$  células/mL em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> de área, respectivamente, utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de L-glutamina, 2% de piruvato e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O procedimento de renovação do meio, propagação e manutenção das células foi realizado a cada 3-4 dias, através de sua centrifugação em 1200 rpm por 5 minutos a 4°C e utilizando tubos de 15 mL. Em seguida, as células

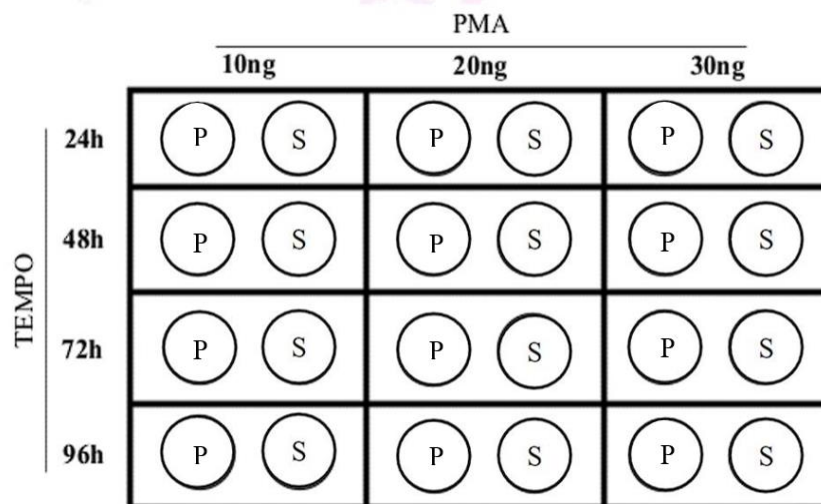


foram quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio óptico, com o uso do corante Azul de Tripán para avaliação da viabilidade celular e posterior plaqueamento para realização dos ensaios.

### 2.1.2.2 Indução da produção do ciclo lítico do HHV-8 pelo fármaco PMA

Uma vez que o HHV-8 se encontra em sua forma latente no genoma das células BCBL-1, seu ciclo lítico foi estimulado em culturas de células BCBL-1 da 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> passagem, denominadas P10 e P15. Foram utilizadas placas de 24 poços, na densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, onde as células foram tratadas com diferentes concentrações do fármaco PMA (10, 20 e 30 ng/mL), sendo mantida a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram coletadas amostras de *pellet* celular (P - intracelular) e sobrenadante (S - extracelular) em diferentes tempos de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas), a fim de avaliar a melhor condição experimental para a reativação viral, isto é, ativação do ciclo lítico (Figura 6). As amostras foram devidamente identificadas de acordo com suas passagens, concentração de fármaco e tempo de coleta, em microtubos e armazenadas a -70°C até o momento do ensaio experimental.

Figura 6 – Esquema do processo de coleta das amostras em placas de 24 poços.



Legenda: P: coleta do *pellet* da amostra; S: coleta do sobrenadante da amostra.  
Fonte: A autora (2023).

### 2.1.2.3 Extração do DNA viral

Para a avaliação da carga viral intracelular e extracelular do HHV-8 nas culturas tratadas com o PMA (estado lítico) e não tratadas (estado latente) foi realizada, primeiramente, a extração do DNA viral nas duas amostras de culturas (P10 e P15), utilizando o *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (QIAGEN®). Para preparação, as amostras de *pellet* foram ressuspensas em 200 µL de PBS, sendo adicionados 20 µL de proteinase K e 200 µL do Buffer AL para a lise celular e misturou-se utilizando o vórtex. A partir desta etapa as amostras de *pellet* e sobrenadante foram submetidas ao mesmo procedimento. A fim de promover o isolamento do DNA adicionou-se 200 µL de etanol (96%) e misturou-se pelo vórtex. A mistura foi pipetada para uma mini coluna acoplada e um tubo coletor de 2 mL, centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto e então, foi descartado o tubo contendo o eluido e a coluna foi acoplada a outro tubo coletor. A primeira lavagem foi realizada com a adição do tampão Buffer AW1, seguida da centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto, descartando o eluido e acoplando a coluna a outro tubo coletor. A segunda lavagem foi realizada com a adição do tampão Buffer AW2, sendo levada a centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos e então descartou-se o eluido junto ao tubo coletor. A fim de transferir a amostra para ser quantificada, acoplou-se a coluna em um microtubo e eluiu-se o DNA viral através da adição do tampão Buffer AE, seguido de incubação por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. As amostras foram devidamente identificadas de acordo com suas passagens, concentração de fármaco e tempo de coleta em microtubos e armazenadas a -70°C até o momento do ensaio experimental.

### 2.1.2.4 Quantificação da carga viral por qPCR

A detecção e quantificação da carga viral de HHV-8 foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) (*TaqMan technology, Life Technologies, Carlsbad, USA*) através da amplificação da ORF26 deste vírus (66 pares de bases), que codifica a menor proteína do capsídeo viral. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e foram adicionados os reagentes do kit para PCR AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies®) contendo: 38,5 µL de 25x RT-PCR Enzyme Mix; 96,25 µL de HHV-8 sense e anti-sense; 77 µL de HHV-8 Sonda; 462 µL de 2x RT-PCR Buffer; e 3 µL de DNA. O protocolo foi realizado de acordo com Levi *et al.* (2011), utilizando os oligonucleotídeos e sonda específicos como descrito (Quadro 3).

Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação viral do HHV-8 por qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
HHV-8 sense	5'- GGGCCCCGGATGATGTA -3'
HHV-8 anti-sense	5'- GCCCCATAAATGACACATTGG -3'
HHV-8 sonda	FAM 5'- AGATCAAGTTCCGCCATAT -3'MGB

Fonte: LEVI *et al.* (2011).

As condições de ciclagem consistiram em duas etapas iniciais de ativação de 50°C/2 minutos (UNG) e 95°C/10 minutos (Taq polymerase), seguido de 45 ciclos de 15 segundos de 95°C e 1 minuto de 55°C, no equipamento *QuantStudio™ Real-Time PCR System*. Ao final dos ciclos os resultados da quantificação foram analisados e expressos em números de cópias do DNA viral por mililitros (cópias/mL). Para controle positivo, foi incluído o DNA do HHV-8 isolado e para controle negativo foram utilizados controles sem amostra (NTC, do inglês *no template control*). A disposição das amostras para quantificação de carga viral é representada na Figura 7.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Revisão bibliográfica: Utilização da biotecnologia de aptâmeros para o diagnóstico de vírus oncogênicos

Durante a busca inicial nas bases de dados, foi observado que o Pubmed é a plataforma onde todas as publicações se concentram. Na base do *Science Direct* foi possível encontrar poucos artigos e estes também eram encontrados no Pubmed, enquanto nas plataformas Periódicos CAPES e Scielo não foram encontrados artigos dentro da temática. Dessa forma, para a pesquisa, só foram consideradas as publicações encontradas no Pubmed.

Figura 7 – Esquema do preparo das amostras em microplaca de 96 poços para a quantificação da carga viral.

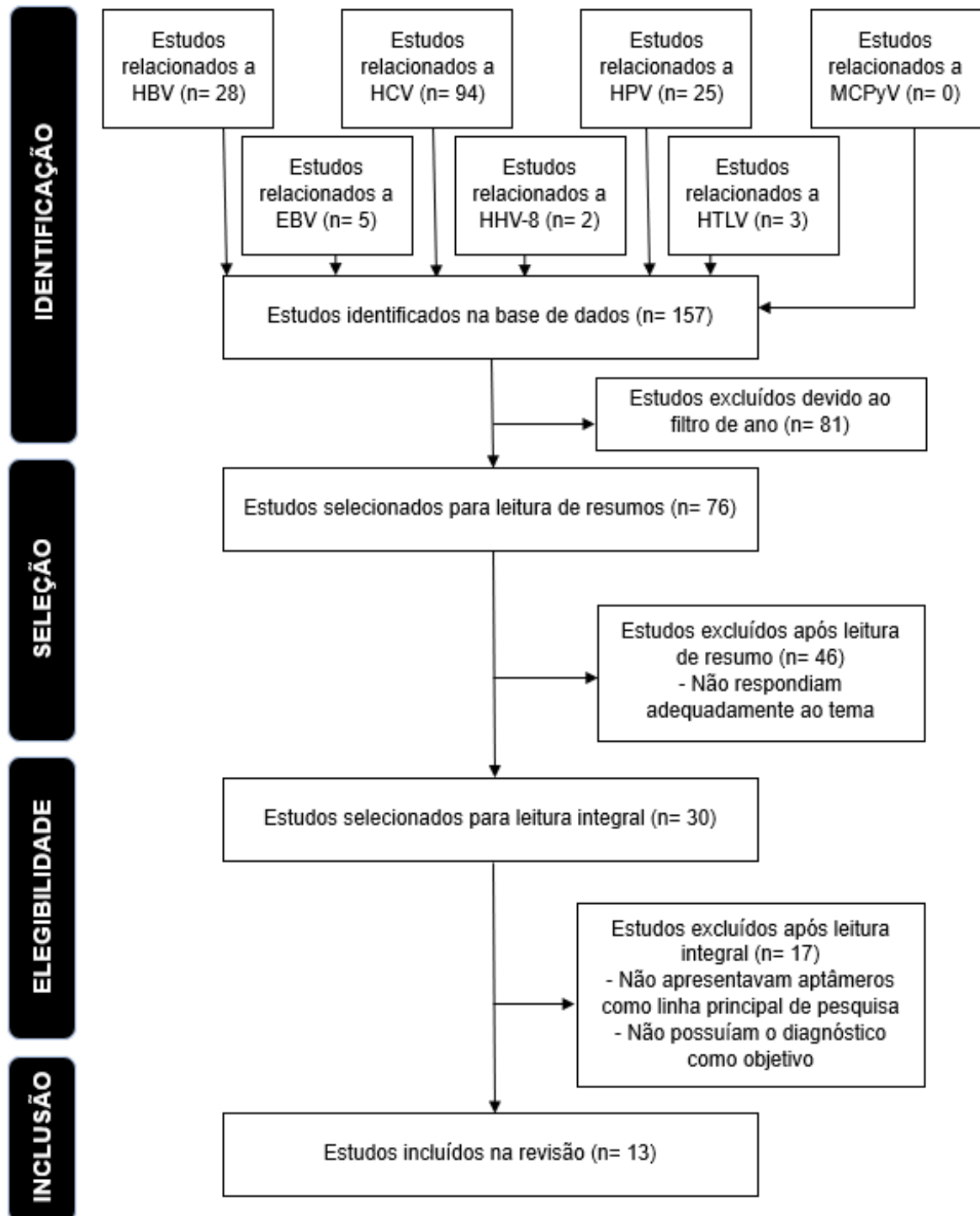
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SOBP10 24h 10 ug	SOBP10 24h 20 ug	SOBP10 24h 30 ug	SOBP10 48h 10 ug	SOBP10 48h 20 ug	SOBP10 48h 30 ug	SOBP10 72h 10 ug	SOBP10 72h 20 ug	SOBP10 72h 30 ug	SOBP10 96h 10 ug	SOBP10 96h 20 ug	SOBP10 96h 30 ug
B	PELP10 24h 10 ug	PELP10 24h 20 ug	PELP10 24h 30 ug	PELP10 48h 10 ug	PELP10 48h 20 ug	PELP10 48h 30 ug	PELP10 72h 10 ug	PELP10 72h 20 ug	PELP10 72h 30 ug	PELP10 96h 10 ug	PELP10 96h 20 ug	PELP10 96h 30 ug
C	NTC	SOBP15 24h 10 ug	SOBP15 24h 20 ug	SOBP15 24h 30 ug	SOBP15 48h 10 ug	SOBP15 48h 20 ug	SOBP15 48h 30 ug	SOBP15 72h 20 ug	SOBP15 72h 10 ug	SOBP15 72h 30 ug	SOBP15 96h 10 ug	SOBP15 96h 20 ug
D	SOBP15 96h 30 ug	PELP15 24h 20 ug	PELP15 24h 10 ug	PELP15 24h 30 ug	PELP15 48h 10 ug	PELP15 48h 20 ug	PELP15 48h 30 ug	PELP10 72h 10 ug	PELP10 72h 20 ug	PELP10 72h 30 ug	PELP10 96h 10 ug	PELP10 96h 20 ug
E	PELP15 96h 30 ug	NTC	CONTROL SOBP10 24h	CONTROL SOBP10 48h	CONTROL SOBP10 72h	CONTROL SOBP10 96h	CONTROL PELP10 24h	CONTROL PELP10 48h	CONTROL PELP10 72h	CONTROL PELP10 96h	NTC	NTC
F	CONTROL SOBP15 24h	CONTROL SOBP15 48h	CONTROL SOBP15 72h	CONTROL SOBP15 96h	CONTROL PELP15 24h	CONTROL PELP15 48h	CONTROL PELP15 72h	CONTROL PELP15 96h	NTC	CONTROL+ HSV-8		
G												
H												

Legenda: SOBP10: sobrenadante passagem 10; PELP10: *pellet* passagem 10; SOBP15: sobrenadante passagem 15; PELP15: *pellet* passagem 15; CONTROL: controle negativo, sem adição de PMA; NTC controle negativo; CONTROL + HSV-8: controle positivo. Fonte: A autora (2023).

Com a utilização dos descritores e recorte temporal (de 2013 a 2023), foram identificados 76 artigos relevantes. Estes foram submetidos à leitura de resumos, a fim de selecionar os estudos que se relacionavam adequadamente ao tema proposto. Com isso, foram excluídos 46 artigos e eleitos 30 para a leitura integral do texto. Após análise criteriosa dos textos na íntegra, foram incluídos 13 artigos que apresentavam a utilização de aptâmeros no diagnóstico de vírus oncogênicos como linha principal de pesquisa (Figura 8).

A fase de seleção dos artigos foi um ponto crítico durante a busca na base de dados, pois a partir desta fase não foram encontrados mais estudos tendo EBV, HHV-8, HTLV e MCPyV como alvos de diagnóstico, o que demonstra a falta de pesquisas conduzidas para esses vírus. Portanto, para fins de levantamento bibliográfico, foram considerados apenas os vírus HBV, HCV e HPV. Além disso, foi observado que o volume maior de publicações é referente à utilização de aptâmeros no tratamento do câncer, visando principalmente à inibição viral, o que corrobora também com o número de artigos selecionados e a limitação de pesquisas conduzidas para o diagnóstico.

Figura 8 – Fluxograma do processo de seleção e inclusão de artigos.

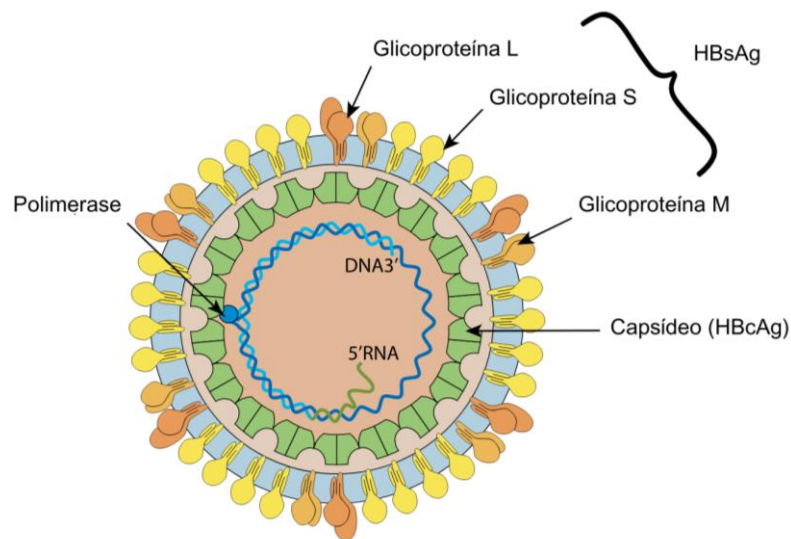


Fonte: A autora (2023).

### 2.2.1.1 Aptâmeros e HBV

O vírus da hepatite B é um dos principais agentes etiológicos causadores de hepatites virais. Pertence à família *Hepadnaviridae*, sendo do gênero *Orthohepadnavirus* e capaz de infectar mamíferos, o que inclui seres humanos (MCNAUGHTON *et al.*, 2019). Suas partículas virais infecciosas são esféricas, apresentando aproximadamente 42 nm de diâmetro, com genoma composto por DNA de dupla fita parcial, além do capsídeo icosaédrico constituído pela proteína do core HBcAg e um envelope lipoproteico composto pelas glicoproteínas S (*small*), M (*middle*) e L (*large*), que constituem o antígeno viral HBsAg (MAGNIUS *et al.*, 2020; SANTOS, 2015). Sua estrutura é representada na Figura 9.

Figura 9 Ilustração da partícula viral do HBV.

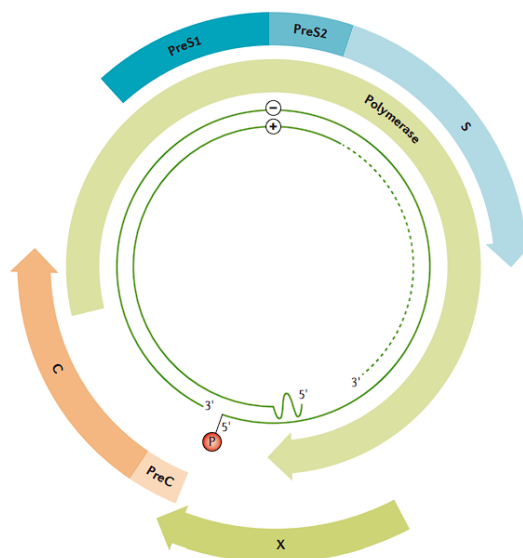


Fonte: Adaptado de *Swiss Institute of Bioinformatics – SIB, ViralZone* (2023).

O genoma do HBV (Figura 10) possui aproximadamente 3,2 kb de tamanho e codifica 4 genes caracterizados como quadros de leitura abertos (do inglês, *open reading frames - ORFs*), que por meio da atividade do RNA, traduzem proteínas virais: gene S (S, pré-S1 e pré-S2), que codifica o antígeno de superfície (HBsAg); gene X, que codifica uma proteína transativadora capaz de potencializar a replicação viral (HBxAg); gene C, que codifica a proteína do core (HBcAg) e o antígeno e (HBeAg); e polimerase, que codifica a DNA polimerase que, por sua vez, realiza a transcriptase

reversa, sintetizando novos DNAs virais. O DNA viral junto do HBsAg, HBcAg e HBeAg possuem extrema importância para o diagnóstico da infecção por HBV, sendo utilizados como marcadores biológicos para indicar a presença do vírus (BRASIL, 2019; MAGNIUS *et al.*, 2020; MCNAUGHTON *et al.*, 2019).

Figura 10 – Ilustração do genoma do HBV.



Fonte: YUEN *et al.* (2018).

Os hepatócitos são as células-alvo do HBV e este, ao reconhecer os receptores na membrana externa das células hepáticas, se ligam através do antígeno de superfície HBsAg. Com isso, ocorre o processo de endocitose, em que o vírus é internalizado na célula, seguido da fusão do envelope viral com o endossomo, que resulta na liberação do capsídeo. Ainda no capsídeo, o DNA de dupla fita parcial é convertido em DNA circular de fita dupla covalentemente fechado (DNAccc) e a partir deste, são transcritos RNAs mensageiros virais, que codificam as proteínas estruturais e não estruturais. Dessa forma, há síntese de novos capsídeos e do DNA viral, podendo seguir 2 destinos: a incorporação do capsídeo em novas partículas virais, que serão liberadas da célula por brotamento ou a reinserção do capsídeo no núcleo, a fim de gerar novos DNAccc, que é o responsável pela cronicidade da infecção do HBV, visto que serve de molde transcricional para síntese de novas partículas virais (COSTA, 2023; MAGNIUS *et al.*, 2020; YUEN *et al.*, 2018).

A infecção pelo vírus HBV pode ocorrer através de transmissão sexual (esperma e secreção vaginal) e sanguínea (parenteral e percutânea), sendo a transmissão vertical – que ocorre no momento do parto – um grande risco em gestantes que apresentem replicação viral. O vírus acomete o fígado, levando ao desenvolvimento de hepatite aguda sintomática ou assintomática, o que pode evoluir para hepatite crônica se ainda houver detecção do vírus após 6 meses. A cronicidade da doença aumenta o risco de desenvolvimento de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (BRASIL, 2019; COSTA, 2023; OMS, 2022).

A OMS (2022) estima que ocorram cerca de 1,5 milhões de infecções por ano no mundo todo, sendo registrados somente em 2019 cerca de 820.000 óbitos em decorrência da hepatite. No Brasil, a hepatite B é a segunda maior causa de óbito entre as hepatites virais, correspondendo a 53,4% dos 17.540 óbitos registrados entre 2000 e 2020. Apesar disso, no mesmo período foram notificados 264.640 casos e vem apresentando redução na taxa de detecção ao longo do tempo, ao ponto de que em 2021 obteve-se a menor taxa desde o início do registro – 3,4 casos a cada 100 mil habitantes. Além disso, a infecção crônica por HBV é a principal causa de carcinoma hepatocelular, correspondendo de 44% a 55% de casos em todo mundo e responsável por 33% dos óbitos por este tipo de câncer (BRASIL, 2022; COSTA, 2023).

Para impedir a evolução da hepatite B, evitando o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular e diminuir a taxa de transmissão é essencial que ocorra o diagnóstico precoce. Atualmente, são utilizados testes sorológicos que detectam antígenos (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe) no soro do indivíduo, além da quantificação viral por técnicas de biologia molecular. (BRASIL, 2019).

Durante a revisão bibliográfica, foram encontrados 28 artigos utilizando os descritores “*aptamer*” e “HBV” na base de dados. Destes, 20 eram dos últimos 10 anos e a partir da leitura dos resumos, foram excluídos 13 estudos, pois não apresentavam correlação direta com o tema. Então, foram selecionados 5 artigos que abordavam o desenvolvimento de aptâmeros para o diagnóstico de HBV.

Foi possível observar que a maioria (n = 4) utilizou como alvo para a detecção do HBV o antígeno de superfície HBsAg, que é um dos primeiros marcadores de infecção, sendo possível detectar desde os primeiros 30 - 45 dias de infecção até à sua cronicidade (BRASIL, 2019), enquanto apenas um utilizou o HBeAg, antígeno que só pode ser detectado no início da infecção (YUEN *et al.*, 2021). Além disso, a maioria



(n = 4) utilizou DNA aptâmeros para a pesquisa, pois apresenta maior estabilidade que o do tipo RNA (RUSCITO; DEROSA, 2016). Os artigos selecionados estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HBV.

Referência	Alvo	Nome do aptâmero	Tipo
Suh <i>et al.</i> (2014)	HBsAg	Anti-HBsAg	RNA
Xi <i>et al.</i> (2015, 2018)	HBsAg	HO1, HO2 e HO3	DNA
Huang <i>et al.</i> (2016)	HBeAg	2-19	DNA
Mirian <i>et al.</i> (2021)	HBsAg	Cm-1-4	DNA

Fonte: A autora (2023).

Suh *et al.* (2014) apresentaram um ensaio de quantificação capaz de detectar o antígeno HBsAg combinando aptâmeros com o ensaio de ligação FRET (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Nesse sistema criado pelos autores, o doador FRET é conjugado ao aptâmero enquanto o receptor FRET é ligado ao HBsAg. Dessa forma, assim que o aptâmero anti-HBsAg reconhece e se liga ao HBsAg, há transferência e emissão de fótons. Como resultado, demonstraram que este método era aproximadamente 40 vezes melhor do que os ensaios de detecção convencionais mais amplamente utilizados.

Utilizando separação magnética e imunoensaio, Xi *et al.* (2015) desenvolveram DNA aptâmeros específicos para HBsAg ligados a nanopartículas magnéticas carboxiladas (MNPs), afim de criar um aptasensor de quimiluminescência para detectar HBsAg. Mesmo na presença de substâncias interferentes nas amostras de soro e o aptasensor foi altamente específico na detecção de HBsAg. Em 2018, com o objetivo de aumentar a sensibilidade desse método, os autores adicionaram nanopartículas de ouro duplamente funcionalizadas (AuNPs) para amplificar o sinal de detecção do HBsAg. Além de sensível e específico para HBsAg, apresentou um limite de detecção cinco vezes melhor do que o ensaio imunoenzimático convencional (ELISA) usado em hospitais.

Também utilizando AuNPs, Huang *et al.* (2016) desenvolveram um método de detecção, porém apresentando HBeAg como alvo. Com isso, foram selecionados DNA aptâmeros específicos para HBeAg, que foram incorporados com AuNPs e marcados com fluorescência, a fim de possibilitar a detecção do antígeno. O aptasensor mostrou seletividade em relação ao alvo, além de sensibilidade e especificidade para HBeAg no soro sanguíneo.

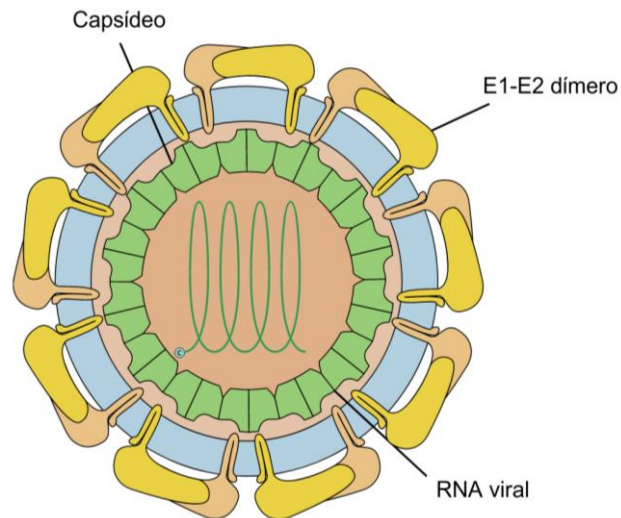
No estudo mais recente encontrado, Mirian *et al.* (2021) utilizaram o método SELEX em células inteiras (cell-SELEX), tendo como base uma célula hepática infectada com HBV, a fim de detectar o antígeno HBsAg. Para a pesquisa, foi introduzido ao método, na fase de seleção de aptâmeros, a DNase I (desoxirribonuclease I), que é capaz de remover sequências de oligonucleotídeos não ligadas ou fracamente ligadas, potencializando o processo de seleção dos aptâmeros. Com isso, foram selecionados 4 aptâmeros capazes de detectar o HBsAg, demonstrando potencial não somente para diagnóstico como também para tratamento de doenças causadas pelo HBV.

### 2.2.1.2 Aptâmeros e HCV

O vírus da hepatite C, semelhante ao HBV, é um agente etiológico causador de hepatite viral. Porém, devido às suas características morfológicas, pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus*, sendo a espécie *hominis* capaz de infectar humanos. Sua partícula viral (Figura 11) possui cerca de 50 nm de diâmetro e forma esférica com envelope bilipídico composto pelas glicoproteínas E1 e E2, responsáveis por reconhecer e se ligar aos receptores celulares, além do capsídeo que envolve o RNA de fita simples de polaridade positiva (SANTOS, 2015; SIMMONDS *et al.*, 2017).

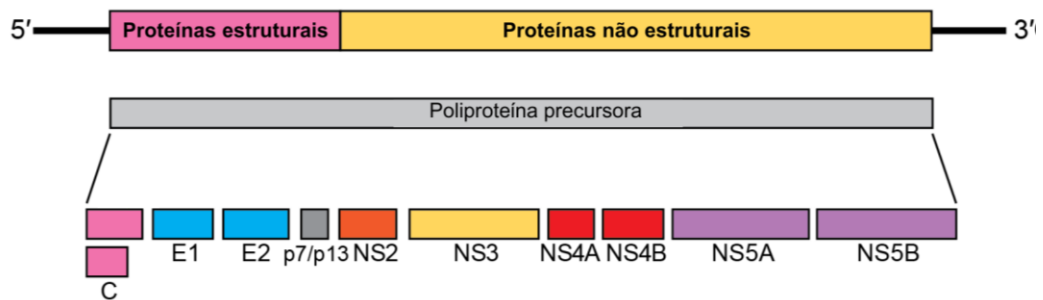
Seu genoma apresenta aproximadamente 9,6 kb com uma única ORF, que codifica uma poliproteína precursora, que posteriormente é clivada em 10 proteínas virais, que podem ser divididas em: proteínas estruturais, localizadas na região amino-terminal da ORF, tendo a proteína C (core), que é capaz de alterar funções da célula hospedeira, além das proteínas E1 e E2, que são essenciais para a entrada do vírus na célula e são os principais alvos dos anticorpos; e proteínas não estruturais (p7/p13, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) situadas na porção restante, que atuam na replicação viral e no processamento da poliproteína viral (MANNNS *et al.*, 2017; SANTOS, 2015). O genoma é apresentado na Figura 12.

Figura 11 – Ilustração da partícula viral do HCV.



Fonte: Adaptado de *Swiss Institute of Bioinformatics - SIB, ViralZone* (2023).

Figura 12 – Ilustração do genoma do HCV.



Fonte: Adaptado de *SIMMONDS et al.* (2017).

Assim como o HBV, o HCV possui tropismo por hepatócitos e, possivelmente, é capaz de se replicar também em linfócitos, apesar dessa hipótese ainda não ser confirmada *in vitro* (MAGNIUS *et al.*, 2020; SIMMONDS *et al.*, 2017). A entrada do vírus na célula é realizada através do reconhecimento e ligação das proteínas E1 e E2 aos receptores celulares. Com a ligação, o vírus é endocitado na célula e ocorre a fusão da partícula viral com o endossoma celular e, a partir disso, o genoma viral é liberado no citoplasma da célula. Então, o genoma é traduzido em proteínas, responsáveis pela replicação viral, que em conjunto realizam a síntese de novas fitas de RNA de polaridade positiva (MANNNS *et al.*, 2017). Essa ação ativa a resposta imunológica para o meio intra-hepático, sendo as células de defesa acionadas –

TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, linfócitos B e células NK – as responsáveis por causar o dano hepático propriamente dito (SANTOS, 2015).

Sua transmissão ocorre principalmente através do sangue, pelo compartilhamento de materiais perfurocortantes e transfusão de sangue não rastreada, sendo possível também a transmissão sexual e vertical, porém estes com menos frequência (BRASIL, 2017; OMS, 2022). A infecção acomete o fígado, podendo ocasionar hepatite aguda, onde 75% dos casos se tornam crônicos e destes cerca de 30% evolui para cirrose, aumentando cerca de 5% de risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular a cada ano (SIMMONDS *et al.*, 2017).

De acordo com dados da OMS (2022), no mundo é estimado que ocorram cerca de 1,5 milhões de novas infecções todo ano, além da estimativa de que atualmente 58 milhões de pessoas apresentam hepatite crônica causada pelo HCV. Ademais, em 2019 cerca de 290.000 pessoas tiveram hepatite C como causa de óbito registrada. No Brasil (2022), o Ministério da Saúde apresentou o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, que indica que de 2000 a 2021 cerca de 279.872 novos casos de hepatite C foram registrados, destacando que a partir de 2015 houve um aumento de registros por inclusão de novos métodos de diagnóstico. Quando diferenciada a detecção por marcadores biológicos sob o mesmo corte temporal, o número de casos registrados aumenta para 414.892. Em relação à mortalidade, o HCV é o responsável pela maior causa de óbitos entre as hepatites virais, sendo registrados 62.611 óbitos no período de 2000 a 2020.

Ainda não há vacina contra o HCV e, com isso, o método de prevenção é baseado na diminuição do risco de exposição ao vírus (BRASIL, 2017). Dessa forma, é imprescindível que haja métodos diagnósticos eficazes e confiáveis a fim de rastrear indivíduos infectados e auxiliar na diminuição da disseminação do vírus. Atualmente, o diagnóstico laboratorial é realizado através de 2 métodos: sorológicos, em que se detectam anticorpos contra HCV (anti-HCV), porém não faz distinção de fase da doença e/ou cura; e moleculares, que rastreiam a presença do RNA viral, sendo utilizado como diagnóstico complementar, visto que indica melhor a carga viral (BRASIL, 2019; SANTOS, 2015).

A partir da busca nas bases de dados utilizando os descritores “*aptamers*” e “HCV” foram encontrados 94 artigos, sendo apenas 33 datados nos últimos 10 anos. Destes, 15 não apresentavam correlação direta com o tema, sendo assim excluídos.

Por fim, foram selecionados 5 artigos que abordavam o desenvolvimento de aptâmeros para o diagnóstico de HCV.

Em todos os estudos foram utilizados DNA aptâmeros e a maioria (n = 4) apresentou como alvo a proteína *core*, que é uma das principais proteínas estruturais (MANNIS *et al.*, 2017). Por outro lado, apenas um utilizou a proteína E2, que é o principal alvo de anticorpos para o diagnóstico (BRASIL, 2019). Os artigos selecionados estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HCV.

Referência	Alvo	Nome do aptâmero	Tipo
Park <i>et al.</i> (2013)	E2	E2-B e E2-D	DNA
Wang <i>et al.</i> (2013)	Core	9-15	DNA
Ghanbari <i>et al.</i> (2017)	Core	C4, 7, 42, 97, 103 e 104	DNA
Pleshakova <i>et al.</i> (2018, 2019)	Core	A12, A14 e A15	DNA

Fonte: A autora (2023).

Com o intuito de quantificar partículas infecciosas de HCV, Park *et al.* (2013) desenvolveram um sistema denominado *Enzyme-Linked Aptosorbent Assay* (ELASA), que consiste num teste de ELISA que utiliza apenas aptâmeros, tendo a proteína E2 como alvo de detecção. Como resultado, o ELASA pôde detectar E2 de diferentes genótipos de HCV e, além disso, apresentou valor de leitura bem correlacionado com a dose das amostras.

No mesmo ano foi desenvolvido por Wang *et al.* (2013) um sistema baseado em *chip* utilizando tiras de fluxo lateral compostas por aptâmeros contra o core – antígeno central do HCV. Foi demonstrado que as tiras mostraram resultados satisfatórios quando comparados com ELISA e PCR. Sendo assim, se apresenta como uma ótima alternativa para diagnosticar o HCV, principalmente por ser um método mais rápido, econômico e sem exigência de habilidades especializadas.

Também apresentando o core como alvo, Ghanbari *et al.* (2017) desenvolveram um sensor ultrasensível baseado em um aptâmero funcionalizado com o nanocomposto GQD (do inglês *graphene quantum dots*). Através da

espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) foi demonstrada a detecção rápida, seletiva e sensível do antígeno central do HCV no soro humano.

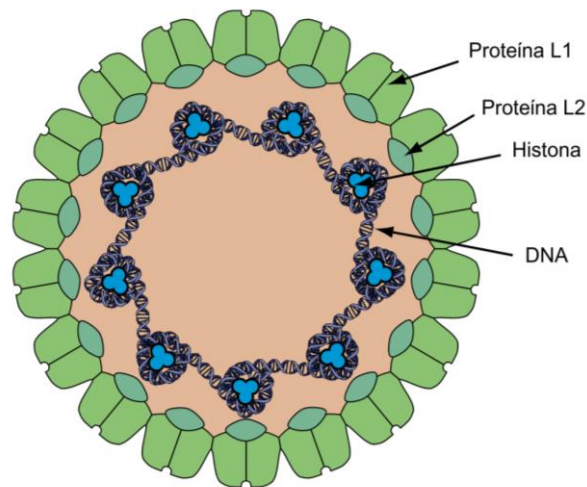
Em estudos mais recentes, Pleshakova *et al.* (2018) desenvolveram um sistema de detecção molecular do antígeno central do HCV baseada em microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*) utilizando um chip funcionalizado com DNA aptâmeros. Através desse método, foi possível realizar a detecção do antígeno com sucesso, até mesmo quando os aptâmeros foram utilizados em soro humano (PLESHAKOVA *et al.*, 2019).

### 2.2.1.3 Aptâmeros e HPV

O vírus do papiloma humano (HPV) é o principal agente etiológico causador do câncer de colo de útero, além de outras patologias. Pertence à família *Papillomaviridae*, sendo os gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* capazes de infectar humanos (DOORSLAER *et al.*, 2018). Já foram descritos mais de 200 tipos de HPV, onde 40 afetam o trato genital e, destes, cerca de 15 estão associados à carcinogênese. Destacam-se os tipos HPV-16 e HPV-18, que apresentam o maior risco de infecção e desenvolvimento do carcinoma, visto que se integram ao DNA humano (CARDIAL *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2021). Estruturalmente, o HPV possui partícula viral não envelopada, com capsídeo icosaédrico - composto pelas proteínas L1 e L2 - e apresenta cerca de 55 nm de tamanho, sendo seu genoma composto por DNA de fita dupla circular associado a histonas (SANTOS, 2015; SIMÕES, ZANUSSO, 2019) (Figura 13).

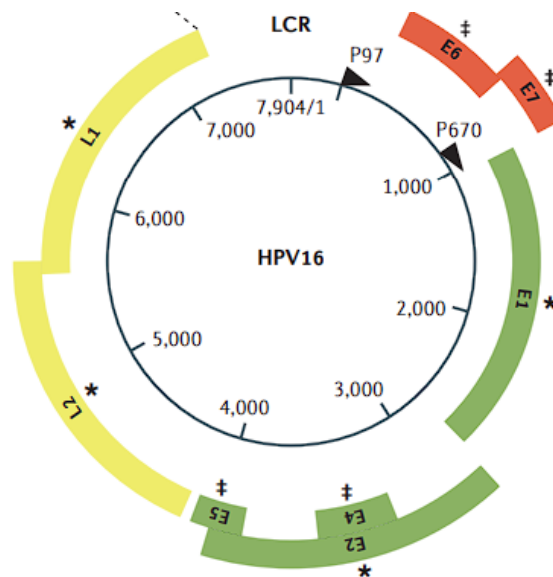
O genoma do HPV possui aproximadamente 8.000 pb e codifica de seis a nove proteínas virais, a destacar as proteínas centrais (E1, E2, L1 e L2) e proteínas acessórias (E4, E5, E6 e E7) (Figura 14). As proteínas E1 e E2 estão envolvidas na replicação do genoma viral, enquanto as proteínas L1 e L2 participam da montagem do vírus. Em relação às acessórias, estas são responsáveis por facilitar a replicação do vírus, além de aumentar a aptidão viral, conduzindo a reentrada do ciclo celular e à amplificação do genoma (DOORSLAER *et al.*, 2018). O aumento da expressão e atividade das proteínas E6 e E7 é capaz de ocasionar o aumento da divisão celular e

Figura 13 – Ilustração da partícula viral do HPV.



Fonte: Adaptado de *Swiss Institute of Bioinformatics - SIB, ViralZone* (2023).

Figura 14 – Ilustração do genoma viral do HPV.



Fonte: SCHIFFMAN *et al.* (2016).

inibir a atividade das vias regulatórias da célula, apresentando potencial carcinogênico (SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

O HPV possui tropismo por células epiteliais escamosas da pele e mucosas e é capaz de acessá-las através de fissuras no epitélio. A partir disto, o vírus se liga à célula pela interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular, porém ainda não é esclarecido como ocorre a entrada do vírus na

célula (SANTOS, 2015). Doorslaer *et al.* (2018) indicaram que há clivagem da superfície celular, resultando na entrada do vírus na região do endossomo e revestimento do capsídeo. Acredita-se que o DNA viral permaneça ligado às proteínas centrais e, no processo de mitose da célula, movem-se em direção ao núcleo e dessa forma se associa aos cromossomos do hospedeiro. A replicação viral é realizada principalmente pelas proteínas E6 e E7, que induzem a proliferação de células infectadas.

A principal via de transmissão do HPV é a sexual, sendo a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) de maior transmissibilidade. Por possuir tropismo por células epiteliais, são capazes de infectar a pele desenvolvendo verrugas, além de infectar mucosas, podendo atingir boca, garganta, trato respiratório e região ano-genital (SIMÕES, ZANUSSO JUNIOR, 2019). As infecções, na maioria das vezes, são assintomáticas, porém estima-se que 1 a 2% da população infectada pode desenvolver verrugas ano-genitais, enquanto cerca de 5% poderá evoluir para oncogênese (CARVALHO *et al.*, 2021), sendo o câncer de útero o mais comum, em que o DNA viral é encontrado em 99,7% dos casos, sendo o quarto tipo de câncer que mais atinge mulheres mundialmente (CARDIAL *et al.*, 2019).

Estima-se que, em todo o mundo, tenham ocorrido 604.000 novos casos e 342.000 óbitos causados pelo câncer cervical somente no ano de 2020. Diante desse problema de saúde pública, foi implementada uma estratégia global para diminuir a incidência de casos de câncer de colo uterino até 2030, através de: ações preventivas, com a vacinação contra o HPV de meninas até 15 anos de idade; rastreamento em mulheres de 35 e 45 anos de idade; e tratamento das mulheres identificadas com o câncer (OMS, 2020). Segundo o INCA (2023), no Brasil são identificados cerca de 18.000 novos casos de câncer de colo de útero anualmente, sendo registrados cerca de 4.000 óbitos.

O método de diagnóstico utilizado atualmente no Brasil é o rastreamento através do exame citopatológico (Papanicolau) em mulheres de 25 a 64 anos a cada três anos, que é a faixa etária mais atingida pela carcinogênese causada pela infecção do HPV, sendo esse rastreamento realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) através das Unidades de Atenção Básica (INCA, 2021). Além disso, também é utilizada a biologia molecular, através da técnica de PCR (OMS, 2020).

Durante a busca nas bases de dados com os descritores “*aptamer*” e “HPV” foram encontrados 25 artigos, sendo 18 dos últimos 10 anos. Com a leitura dos



resumos foram excluídos 13 estudos, pois não apresentavam correlação direta com o tema. Por fim, 3 artigos que abordavam o desenvolvimento de aptâmeros para o diagnóstico de HPV foram selecionados, sendo estes apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 – Artigos que abordavam a biotecnologia de aptâmeros no diagnóstico de HPV.

Referência	Alvo	Nome do Aptâmero	Tipo
Leija-Montoya <i>et al.</i> (2014)	VLP-L1	Sc5-c3	RNA
Trausch <i>et al.</i> (2017)	VLP-L1	HPV-07	DNA
Aspermair <i>et al.</i> (2020)	E7	Sc5-c3	RNA

Fonte: A autora (2023).

O primeiro estudo que caracterizou um aptâmero de RNA contra a proteína L1 do HPV foi realizado por Leija-Montoya *et al.* (2014). Além da automontagem viral, a L1 é capaz de se auto-organizar em partículas semelhantes a vírus (VLPs, do inglês *virus-like particles*), apresentando similaridade com partículas infecciosas. Através do método de SELEX e ensaios de ligação foi identificado o aptâmero Sc5-c3, que apresentou alta especificidade e afinidade, mesmo em misturas de proteínas de biofluidos, sugerindo potencial para diagnóstico.

Trausch *et al.* (2017) visaram o mesmo alvo e através do mesmo método isolaram um aptâmero, porém do tipo DNA, nomeado HPV-07, em que sua especificidade foi avaliada por testes de ressonância. Ao ser utilizado em ELISA, o aptâmero mostrou especificidade muito alta. Com isso, os autores demonstraram que a utilização do HPV-07 em testes de ELISA apresentou mais eficácia e menos exigência de recursos que o tradicional, que utiliza anticorpos.

Com uma abordagem diferente, Aspermair *et al.* (2020) utilizaram transistores de efeito de campo de óxido de grafeno reduzido (rGO-FET, do inglês *reduced graphene oxide based a field effect transistor*) funcionalizado com o aptâmero Sc5-c3 contra a proteína E7, que é uma das responsáveis pela carcinogênese. A partir dessa modificação, a ligação do aptâmero pôde ser monitorada em tempo real e se mostrou ser altamente sensível e com rápida detecção, apresentando cerca de 95% de nível

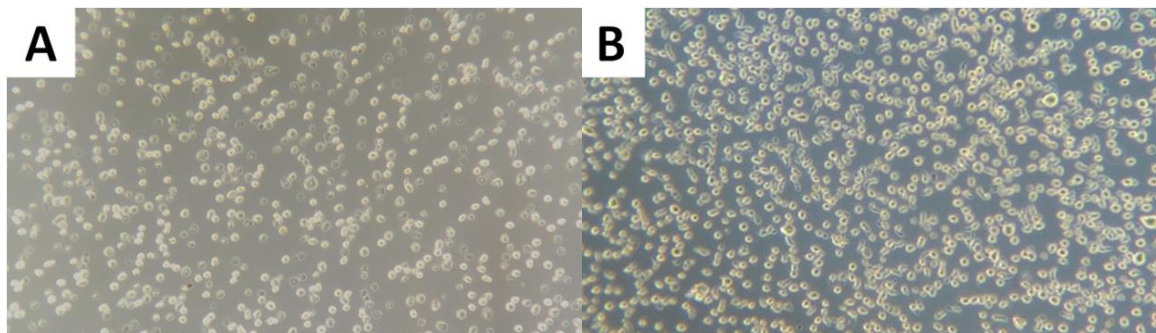
de confiança. Além de ser um potencial método de diagnóstico, também se mostra como uma possível alternativa ao PCR e RT-PCR.

### 2.2.2 Estudo experimental: Avaliação da replicação viral do HHV- 8 em células BCBL-1

No intuito de investigar o potencial uso de DNA aptâmeros como marcadores de células infectadas por HHV-8 — pesquisa pioneira elaborada pelas pesquisadoras Dr<sup>a</sup> Elen Mello e Dr<sup>a</sup> Mariana Waghbi do IOC/Fiocruz — foram realizados estudos preliminares baseados na reativação do ciclo lítico em cultura de células BCBL-1 *in vitro*. Dessa forma, a fase de seleção de aptâmeros se torna mais confiável em relação ao reconhecimento específico de células infectadas com diferenciação entre estado latente e lítico.

O protocolo descrito para manutenção e propagação de células foi bem sucedido, apresentando curva de crescimento celular ao longo de uma cinética temporal (Figura 15). Após descongelamento, as células apresentaram cerca de 80 a 90% de viabilidade e após 24 horas de cultivo exibiram um crescimento de  $1 \times 10^6$  para  $3 \times 10^6$  células/mL (Figura 15A). Pode-se observar que a BCBL-1 apresentou ótimo crescimento quando se mantinha o intervalo de 72 horas para sua manutenção, se multiplicando quase 8 vezes mais ( $8 \times 10^6$  células/mL) (Figura 15B). Foi observado que após esse tempo era necessário realizar a passagem para novas garrafas de cultura, a fim de manter a viabilidade e permitir o crescimento celular.

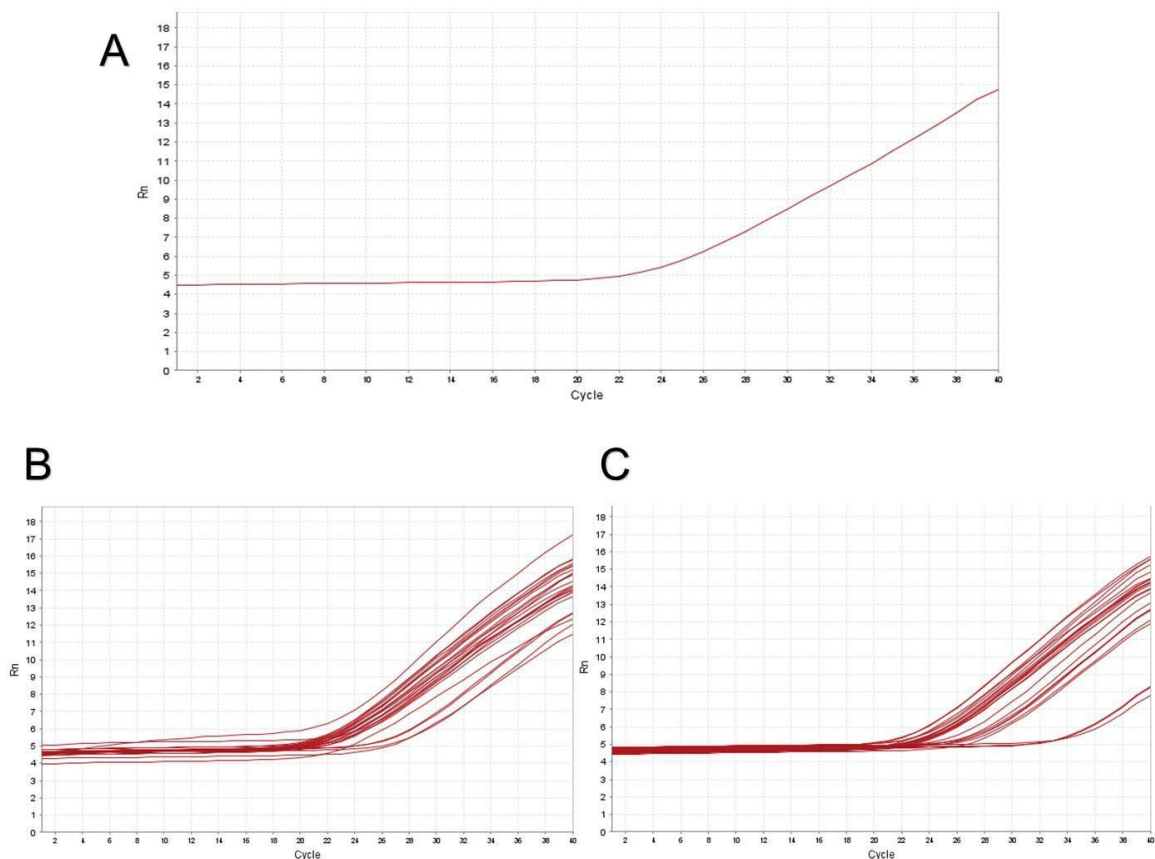
Figura 15 – Cultura de células BCBL-1 em crescimento.



Legenda: (A) BCBL-1 após 24 horas de cultivo, com  $3 \times 10^6$  células/mL; (B) BCBL-1 após 72 horas de cultivo, com  $8 \times 10^6$  células/mL. Aumento de 10x. Fonte: A autora (2023).

Conforme descrito na metodologia, as células BCBL-1 tiveram seu ciclo lítico induzido pela ação do PMA em diferentes concentrações, sendo as amostras coletadas em diferentes intervalos de tempo, a fim de avaliar qual apresentaria melhor reativação viral. Para isso, o DNA viral foi extraído e então foi realizada a quantificação da carga viral de cada amostra coletada por qPCR. Os resultados foram visualizados através do *software* *QuantStudio™ Design & Analysis* (Figura 16). Foi possível observar que o DNA do controle positivo começou a ser amplificado por volta 22º ciclo do qPCR (Figura 16A), servindo então como parâmetro para comparação com a amplificação das amostras. Pode-se analisar que a maior parte das curvas geradas apresentou comportamento similar ao controle positivo, tanto da amostra P10 (Figura 16B) quanto da P15 (Figura 16C), demonstrando o sucesso do protocolo de reativação viral, bem como o de quantificação.

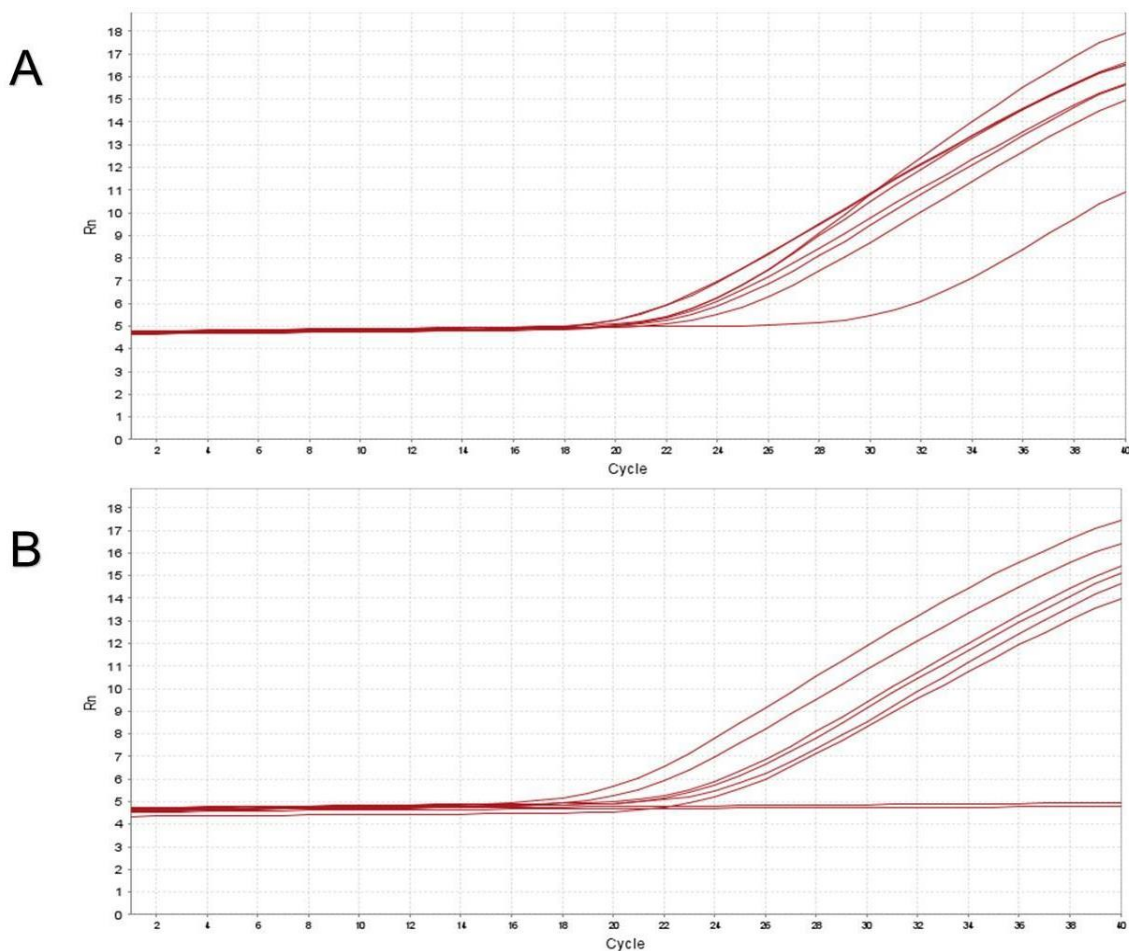
Figura 16 – Quantificação da carga viral de HHV-8 por qPCR (*QuantStudio™ Design & Analysis*) em células BCBL-1 após indução de reativação viral por PMA.



Legenda: Comparação entre curvas de amplificação geradas por (A) controle positivo: HSV-8; (B) amostras P10; e (C) amostras P15. Fonte: A autora (2023).

Por outro lado, surpreendentemente, a quantificação viral das células controle – que teoricamente não sofreram o processo de reativação viral, ou seja, apresentam latência – também apresentaram curvas similares ao controle positivo (Figura 17), tanto a amostra P10 (Figura 17A) quanto a amostra P15 (Figura 17B). Acredita-se que esse fenômeno ocorreu devido à contaminação cruzada durante a manipulação do protocolo de extração viral ou através da transferência das amostras para posterior quantificação. Porém, é válido ressaltar que tal resultado não interfere no sucesso do relatado anteriormente.

Figura 17 – Quantificação da carga viral de HHV-8 por qPCR (QuantStudio™ Design & Analysis) em células controle (BCBL-1).

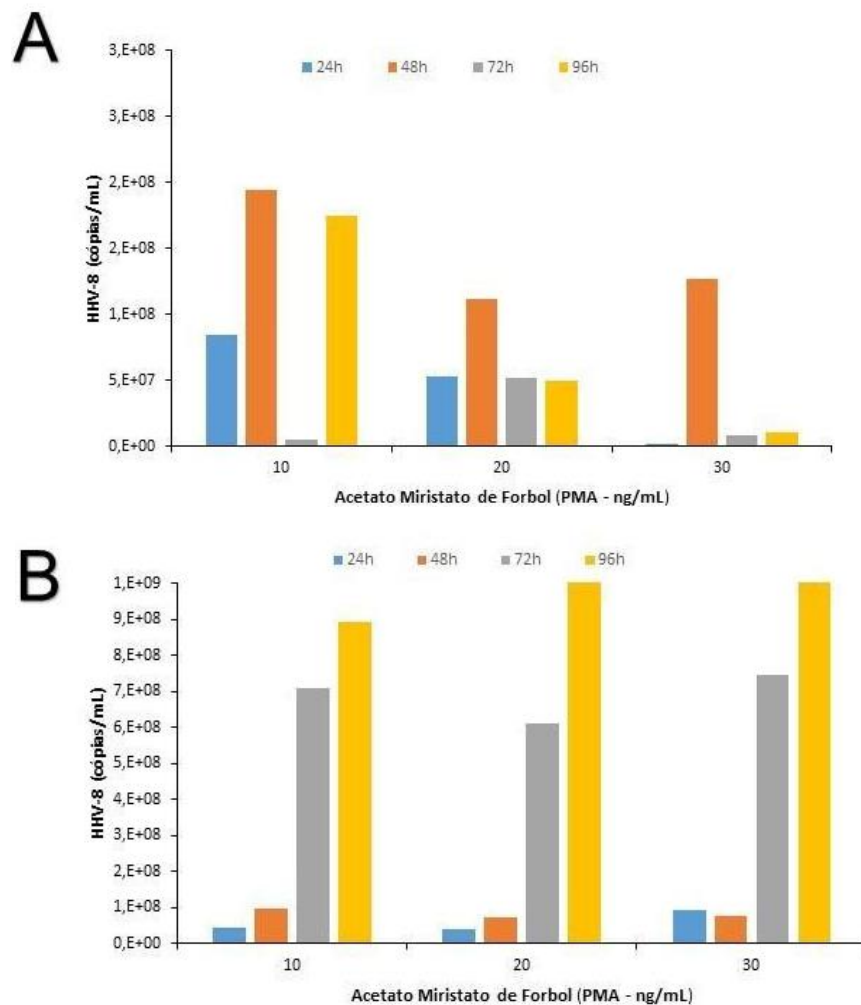


Legenda: Curvas de amplificação geradas por (A) controle da amostra P10 e (B) controle da amostra P15. Fonte: A autora (2023).

A partir da quantificação viral, realizou-se um levantamento dos dados em que foi construído um gráfico relacionando o número de cópias/mL de HHV-8 com as diferentes concentrações de PMA em ng/mL, para observar em qual tempo houve melhor reativação viral (Figura 18) tanto na amostra onde coletou-se o *pellet* (Figura 18A) quanto a que o sobrenadante foi coletado (Figura 18B). Os dados referem-se à média da quantificação viral da amostra P10 e P15.

Como resultado, observou-se que a amplificação do genoma viral foi melhor sucedida no sobrenadante das células em todas as concentrações, quando coletados em 72 horas apresentando em média  $7 \times 10^8$  cópias/mL e principalmente em 96 horas, em que foi possível encontrar até  $1 \times 10^9$  cópias/mL do DNA viral.

Figura 18 – Reativação viral de HHV-8 em células BCBL-1.



Legenda: Número de cópias/mL de HHV-8 por concentração de PMA e tempo. (A) média das coletas dos *pellets* das amostras P10 e P15 (B) média das coletas dos sobrenadantes das amostras P10 e P15. Fonte: A autora (2023).

Como citado anteriormente, as primeiras horas após a infecção são caracterizadas pela endocitose do vírus na célula e expressão dos primeiros genes virais (imediatos precoces), a destacar a ORF50, importantes para a replicação do DNA viral. Em seguida, são expressos genes precoces, onde a proteína utilizada como alvo (ORF26) se encontra, sendo importante para a montagem do capsídeo de novos vírus, pois codifica sua menor proteína e se apresenta como uma região altamente conservada do genoma (LOPES, 2021). Sabendo disso, entende-se que foram detectadas poucas cópias do DNA viral nas primeiras 48 horas com o PMA pois o alvo utilizado ainda se encontrava no meio intracelular ou não havia sido expresso o suficiente. Além disso, provavelmente, ainda não havia ocorrido o brotamento de vírus das células, que possibilitaria a sua detecção no sobrenadante.

Sob a mesma ótica, as amostras em que foram analisados os *pellets* celulares, em média, não apresentaram grande amplificação do DNA viral após 72 horas. É provável que isso se deve ao fato de que após a replicação viral ocorrer, os vírus são liberados para fora da célula por brotamento (CESARMAN *et al.*, 2019) e dessa forma, não seria possível detectá-los no meio intracelular. Por outro lado, nas primeiras horas de infecção, foi encontrado um número considerável de cópias de DNA viral, indo de encontro ao fato de a ORF26 ser um gene precoce (LOPES, 2021), sendo mais facilmente encontrado nas primeiras horas de infecção e no meio intracelular.

Apesar de não ter sido observado um padrão na amostra em que se coletou os *pellets*, em que pode ter ocorrido por alguma contaminação cruzada durante o manuseio, é possível verificar que o sobrenadante das culturas apresentou maior e similar número de cópias de DNA viral utilizando qualquer concentração do PMA após 72 e 96 horas de infecção. No entanto, a concentração de 30 ng/mL do PMA parece ser a melhor condição experimental, à medida que se observa uma correlação inversamente proporcional ao longo da cinética entre os níveis de cópias virais obtidos intracelular e extracelular, melhor observada nos tempos de 48, 72 e 96 horas (Figura 18A e B).

O PMA é um fármaco agonista da proteína quinase C, sendo utilizado na pesquisa para, entre outras funções, induzir alterações metabólicas e produção de espécies reativas de oxigênio (NCBI, 2023). O estresse oxidativo, por sua vez, é um fator que, através de mecanismos moleculares, auxilia na transcrição de fatores epigenéticos na célula hospedeira que contribuem para a reativação viral e, conseqüentemente, replicação do vírus (NAIK *et al.*, 2020). Semelhante aos

resultados apresentados, estudos baseados na utilização do PMA como agente de reativação do EBV e HHV-8 demonstraram que o fármaco foi capaz de induzir a ativação da transcrição de genes virais e, com isso, a replicação viral (BALISTRERI *et al.*, 2016; GONNELA *et al.*, 2015, 2017).

Por fim, devido à inconsistência encontrada nos resultados, torna-se necessário a realização do experimento novamente, a fim de obter resultados mais exatos e seguir com os experimentos de seleção e identificação de DNA aptâmeros específicos para células infectadas com o HHV-8 no estado lítico e latente.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o seu desenvolvimento em 1990, a biotecnologia de aptâmeros vem sendo alvo de muitos estudos voltados ao diagnóstico e tratamento de doenças, se apresentando como uma inovação tecnológica na pesquisa clínica. No geral, os aptâmeros representam um potencial método de diagnóstico, principalmente pela sua alta especificidade aos seus alvos, sendo altamente comparado com anticorpos, apresentando vantagens, como menor custo e tamanho, além de baixa toxicidade e imunogenicidade. Com isso, se tornam uma alternativa viável para o diagnóstico de doenças, destacando nesse trabalho, cânceres causados por vírus, que necessitam de um diagnóstico precoce da infecção para melhor sucesso no tratamento.

Nessa revisão de literatura, os estudos selecionados apresentaram o desenvolvimento de aptâmeros específicos para as principais proteínas virais do HBV, HCV e HPV, conhecidas e utilizadas para os diagnósticos atuais. É importante destacar que os resultados obtidos nesses estudos foram promissores, se mostrando mais vantajosos em comparação aos já utilizados na prática clínica.

Dessa forma, espera-se que a biotecnologia de aptâmeros se apresente como uma candidata em potencial para ser utilizada como alternativa de método de identificação e diferenciação de células infectadas por HHV-8 e, conseqüentemente, auxiliar no diagnóstico de doenças associadas a este vírus.



## REFERÊNCIAS

- ABALO, A. A. Obtenção e caracterização de aptâmeros para detecção do antígeno NS5 do vírus Zika. 91p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.
- ALMEIDA *et al.* DNA aptamer selection and construction of an aptasensor based on graphene FETs for Zika virus NS1 protein detection. **Beilstein J Nanotechnol**, [s.l.], v. 2, n. 13, p. 873-881, set., 2022.
- ASPERMAIR, P.; MISHYN, V. BINTINGER, J. Reduced graphene oxide–based field effect transistors for the detection of E7 protein of human papillomavirus in saliva. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 413, p. 779–787, jan., 2021.
- AVEY, D.; BREWERS, B.; ZHU, F. Recent advances in the study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and pathogenesis. **Virology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 130-145, abr., 2015.
- BALISTRERI *et al.* Oncogenic Herpesvirus Utilizes Stress-Induced Cell Cycle Checkpoints for Efficient Lytic Replication. **PLOS Pathogens**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. e1005424, 2016.
- BING, T.; SHANGGUAN, D.; WANG, Y. Facile Discovery of Cell-Surface Protein Targets of Cancer Cell Aptamers. **Mol Cell Proteomics**, [s.l.], v. 14, n. 10, p. 2692–2700, out., 2015.
- BOGOLYUBOVA, A. V. Human Oncogenic Viruses: Old Facts and New Hypotheses. **Molecular Biology**, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 767–775, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 9: Infecções Virais, 150p., Brasília, 2013.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Brasília, 2015.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília, 2017.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] – 3ª. ed. Brasília, 2019.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2022: número especial [recurso eletrônico]. Brasília, 2022.
- CARDIAL *et al.* Papilomavírus humano (HPV). São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia; Cap. 4, p. 26-39, 2017.

CARVALHO *et al.* Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 30, n. spe1, 2020.

CAMPOS *et al.* Sarcoma de Kaposi em Paciente Jovem Imunocompetente: uma Quinta Variante Epidemiológica?. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s.l.], v. 63, n. 4, p. 277-84, out/nov/dez, 2017.

CESARMAN *et al.* Kaposi Sarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 5, n. 9, jan. 2019.

COSTA, A. P. M. Carcinoma hepatocelular em portadores crônicos do vírus da hepatite B: incidência, fatores de risco e acurácia de escores preditores. 88 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2023.

DE MARTEL *et al.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. e180-e190, fev., 2020.

DOORSLAER *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 99, p. 989–990, 2018.

DOS SANTOS *et al.* Mortalidade por Sarcoma de Kaposi no Brasil: Tendências atuais e projeções até 2030. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1-13, fev., 2022.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, [s.l.], v. 346, p. 818-822, 1990.

GAGLIA, M. M.; MUNGER, K. More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses. **Curr Opin Virol**. [s.l.], v. 32, p. 48-59, out., 2018.

GHANBARI, K.; ROUSHANI, M.; AZADBAKHT, A. Ultra-sensitive aptasensor based on a GQD nanocomposite for detection of hepatitis C virus core antigen. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 1, n. 534, p. 64–69., out., 2017.

GONNELA *et al.* PKC theta and p38 MAPK activate the EBV lytic cycle through autophagy induction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1853, n. 7, p. 1586–1595, 2015.

\_\_\_\_\_. Oxidant species are involved in T/B-mediated ERK1/2 phosphorylation that activates p53-p21 axis to promote KSHV lytic cycle in PEL cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 112, p. 327–335, 2017.

HUANG *et al.* Fluorescence based Aptasensors for the determination of hepatitis B virus e antigen. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 31103, ago., 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer – 6. ed. Rio de Janeiro, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–133, 2023.

LEE, J. W.; KIM, H. J.; HEO, K. Therapeutic aptamers: developmental potential as anticancer drugs. **BMB reports**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 234-237, abr. 2015.

LEIJA-MONTOYA *et al.* Characterization of an RNA aptamer against HPV-16 L1 virus-like particles. **Nucleic Acid Ther**, [s.l.], v. 24, n. 5, p 344-55, out., 2014.

LI *et al.* Advances in detection of infectious agents by aptamer-based Technologies. **Emerging Microbes & Infections**, [s.l.], v. 9, p. 1671-1681, fev., 2020.

LOPES, A. O. Epidemiologia e diversidade genética do Gammaherpesvírus humano 8 no Brasil e no mundo. 2021. 129 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

LOPES *et al.* Update of the global distribution of human gammaherpesvirus 8 genotypes. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 11, n. 7640, abr., 2021.

MADDOCKS *et al.* Aptasensor for Detection of Influenza-A in Human Saliva. **Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc**, [s.l.], p. 1262-1265, jul., 2022.

MAGNIUS *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 101, p. 571–572, 2020.

MANNS *et al.* Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 3, n. 17006, mar., 2017.

MARIGGIÒ, G.; KOCH, S.; SCHULZ, T. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. [s.l.], v. 372, n. 1732, p. 20160275, out., 2017.

MCNAUGHTON *et al.* Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome – Unique, Tiny, and Misunderstood. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 156, n. 2, p. 384-399, jan., 2019.

MIRANDA *et al.* Aptamer-based approaches to detect nucleolin in prostate cancer. **Talanta**, [s.l.], v. 1, n. 226, p. 122037, mai., 2021.

MIRIAN *et al.* Generation of HBsAg DNA aptamer using modified cell-based SELEX strategy. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 139–146, jan., 2021.

NAIK *et al.* Epigenetic factor siRNA screen during primary KSHV infection identifies novel host restriction factors for the lytic cycle of KSHV. **PLoS Pathog** [s.l.], v. 16, n. 1, p. e1008268, 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 27924, Phorbol 12-myristate 13-acetate.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Hepatitis B: fact sheets, 2022.

\_\_\_\_\_. Hepatitis C: fact sheets, 2022.

\_\_\_\_\_. Cancer: fact sheets, 2022.

PANG *et al.* Bioapplications of Cell-SELEX-generated aptamers in cancer diagnostics, therapeutics, theranostics and biomarker discovery: a comprehensive review. **Cancers (Basel)**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 47, fev. 2018.

PARK *et al.* Infectivity of hepatitis C virus correlates with the amount of envelope protein E2: Development of a new aptamer-based assay system suitable for measuring the infectious titer of HCV. **Virology**, [s.l.], v. 439, n. 1, p. 13–22, abr., 2013.

PLESHAKOVA *et al.* The detection of hepatitis c virus core antigen using AFM chips with immobilized aptamers. **Journal of Virological Methods**, [s.l.], v. 251, p. 99–105, jan., 2018.

\_\_\_\_\_. Detection of Hepatitis C Virus Core Protein in Serum Using Aptamer-Functionalized AFM Chips. **Micromachines**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 129, fev., 2019.

SIMMONDS *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 98, p. 2–3, 2017.

ROH, C.; JO, S. K. Quantitative and sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated RNA aptamer on chip. **J Chem Technol Biotechnol**, [s.l.], v. 86, n. 12, p.1475–1479, dez., 2011.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *Virologia humana* – 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SCHIFFMAN *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 2, p. 16086, dez., 2016.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. An Introduction to Virus Infections and Human Cancer. **Recent Results Cancer Res.**, [s.l.], v. 217, p. 1-11, 2021.

SEMANGO *et al.* Prevalence and associated risk factors for Kaposi's sarcoma among HIV-positive patients in a referral hospital in Northern Tanzania: a retrospective hospital-based study. **BMC Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1258, 2018.

SIMOES, L. P.; ZANUSSO JUNIOR, G. Vírus HPV e o desenvolvimento de câncer de colo de útero – uma revisão bibliográfica. **Revista Uningá**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 98–107, 2019.

SUH *et al.* Aptamer-based competitive binding assay for one-step quantitation of hepatitis B surface antigen. **The Analyst**, [s.l.], v. 139, n. 17, p. 4310–4314, 2014.

SUN *et al.* Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. **Mol Ther Nucleic Acids**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. e182, ago., 2014.

SUNG *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, [s.l.], v. 71, p. 209-249, 2021.

TRAUSCH, J. J., SHANK-RETZLAFF, M.; VERCH, T. Development and Characterization of an HPV Type-16 Specific Modified DNA Aptamer for the Improvement of Potency Assays. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 89, n. 6, p. 3554–3561, 2017.

UEDA, K. KSHV Genome Replication and Maintenance in Latency. **Advances in Experimental Medicine and Biology - Human Herpesviruses**, [s.l.], v. 1045, p. 299-320, 2018.

WANG, C.; ZHANG, L.; SHEN, X. Development Of A Nucleic Acid Lateral Flow Strip For Detection Of Hepatitis C Virus (Hcv) Core Antigen. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 59–68, 2013.

WU, D.; LIM, M. S.; JAFFE, E. S. Pathology of Castleman Disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 37-52, fev., 2018.

XI *et al.* Selection of HBsAg-Specific DNA Aptamers Based on Carboxylated Magnetic Nanoparticles and Their Application in the Rapid and Simple Detection of Hepatitis B Virus Infection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 7, n. 21, p. 11215–11223, jun., 2015.

XI *et al.* Highly sensitive chemiluminescent aptasensor for detecting HBV infection based on rapid magnetic separation and double-functionalized gold nanoparticles. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 9444, jun., 2018.

YANG *et al.* Identification of SARS-CoV-2-against aptamer with high neutralization activity by blocking the RBD domain of spike protein 1. **Signal Transduct Target Ther**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 227, jun., 2021.

YIN *et al.* Inhibition of Autophagy Promotes the Elimination of Liver Cancer Stem Cells by CD133 Aptamer-Targeted Delivery of Doxorubicin. **Biomolecules**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 1623, 2022.

YUEN *et al.* Hepatitis B virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 18035, jun., 2018. doi:10.1038/nrdp.2018.35. Acesso em: 08 mai. 2023.

ZARANDI, H. S.; BEHBAHANI, M.; MOHABATKAR, H. In Silico Selection of Gp120 ssDNA Aptamer to HIV-1. **SLAS Discov**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 1087-1093, out., 2020.

ZHANG *et al.* Immunotherapy for breast cancer using EpCAM aptamer tumor-targeted gene knockdown. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s.l.], v. 118, n.9, p. e2022830118, mar., 2021.