



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**ASSOCIAÇÃO DAS CITOCINAS (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ)
EM COINFECTADOS COM HIV/HHV-8 E MONOINFECTADOS COM
HIV**

Dayvson Maurício da Silva

Recife - PE

2018

DAYVSON MAURÍCIO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DAS CITOCINAS (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ)
EM COINFECTADOS COM HIV/HHV-8 E MONOINFECTADOS COM
HIV**

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

Orientadora

**Profa.: Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte
Coêlho**

Professora Titular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do CB/UFPE

Recife - PE

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Kyria de Albuquerque Macedo, CRB4: 1693

S586a Silva, Dayvson Maurício da.
Associação das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) em
coinfecções com HIV/HHV-8 e monoinfecções com HIV/ Dayvson Maurício
da Silva. – Recife: o autor, 2018.
78 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Medicina tropical. 2. Citocinas. 3. Coinfecção. 4. Herpesvirus Humano
8. 5. HIV. I. Coelho, Maria Rosângela Cunha Duarte (orientadora). II. Título.

616.9883 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018- 068)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DAYVSON MAURÍCIO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DAS CITOCINAS (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ)
EM COINFECTADOS COM HIV/HHV-8 E MONOINFECTADOS COM
HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 20/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Viviane Martha Santos de Moraes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Clarice Neuenschawander Lins de Moraes Fonseca (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ)



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

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lucia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

À Deus, minha família,

Ao meu avô, Antônio Luiz de Mendonça (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Pós-Graduação em Medicina Tropical, a os funcionários e aos demais colegas que estiveram comigo na pós-graduação, à CAPES pelo apoio financeiro, a UFPE e ao LIKA .

À minha orientadora profa. Dra. Rosângela Coêlho por me apoiar em mais um projeto, por compartilhar sua experiência comigo e sua dedicação a me ajudar a fazer o melhor. Quero agradecer a Deus por tudo o que ele tem feito por mim, inclusive nesta etapa da minha vida.

Quero agradecer também à minha família que tem se esforçado muito para me ajudar a conseguir alcançar todos os meus objetivos na vida.

Aos colaboradores da minha pesquisa, a MSc Juliana Prado pela contribuição em todas as etapas do projeto e a Dra. Virgínia Lorena por além de contribuir, nos acolher em seu laboratório para obtermos os resultados da pesquisa.

Quero dar uma atenção especial também aos pacientes por aceitarem participar do trabalho e contribuir conosco no trabalho e aos funcionários do Hospital das Clínicas da UFPE pelo apoio na pesquisa.

Aos demais componentes do Setor de Virologia do LIKA que estiveram comigo nesse período (Viviane, Evônio, Joanne, Luan, Thaísa, Regina, Alessandra, Marcella, Melayne, Yan, Nadilene) sendo não só colaboradores mas grandes amigos.

Aos meus amigos que conheci na Universidade, que moram comigo, aos irmãos da igreja e aos demais amigos da vida inteira, agradeço a vocês pelo apoio e carinho. Sozinho nós não conseguimos alcançar nada, muito menos sermos felizes, que Deus abençoe a todos e lhes dê muitas alegrias e realizações!

“E, de mais disso, filho meu, atenta: não há limite para fazer livros, e o muito estudar enfado é da carne”.

Eclesiastes 12.12.

RESUMO

Em pessoas com doenças associadas ao herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), como o sarcoma de Kaposi (SK), a doença de Castleman multicêntrica (MCD) e o linfoma de efusão primária (PEL) em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA), relatou-se um aumento nos níveis de algumas citocinas, e entre elas destacam-se as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ por estarem associadas a estas doenças e a infecção pelo HHV-8. Considerando que o HHV-8 pode influenciar na reação imunológica do hospedeiro aumentando níveis de citocinas e da carga viral do HIV levando ao desenvolvimento de doenças, fomos motivados a realizar o presente trabalho, com o objetivo de comparar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV. Realizou-se um estudo do tipo caso-controle com 56 amostras de soro de pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e 95 de monoinfectados com HIV, provenientes do Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFPE coletadas no período de julho de 2015 a outubro de 2016. Os dados sócio demográficos foram obtidos a partir do formulário da pesquisa e os exames laboratoriais dos prontuários dos pacientes. A quantificação das citocinas foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, com kits comerciais BD (Cytometric Bead Array - CBA) e human soluble protein master buffer kit utilizando o citômetro BD FACSCalibur™. Houve associação dos níveis das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 em coinfectados HIV/HHV-8 comparados com monoinfectados com HIV. A IL-4 foi significativamente aumentada nos coinfectados com carga viral do HIV detectável e indetectável, e os níveis das IL-6 e IL-10 nos coinfectados com carga viral do HIV indetectável. Houve uma correlação inversa entre os níveis da IL-10 e a contagem de TCD4 nos monoinfectados com HIV, mas não foi encontrada associação entre as medianas das contagens de TCD4 entre coinfectados e monoinfectados. O aumento de citocinas em coinfectados pode constituir marcadores preditivos, além disso, ressalta-se a importância do acompanhamento desses pacientes que podem desenvolver doenças associadas ao HHV-8 na coinfeção com o HIV.

Palavras-chave: Citocinas. coinfeção. HIV. HHV-8.

ABSTRACT

In people with diseases associated with human herpesvirus type 8 (HHV-8), such as Kaposi's sarcoma (KS), multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL) in people living with HIV/AIDS, the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ were reported to be associated with the HHV-8 infection. Considering that HHV-8 may influence the immune response of the host by increasing cytokine levels, increasing HIV viral load and developing diseases, we were motivated to carry out the present study with the objective of comparing IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in HIV/HHV-8 coinfecting and monoinfecting with HIV. The knowledge that there is an increase in the levels of cytokines in coinfecting without diseases associated with coinfection could be predictive markers and inspire to investigate more factors that can develop these clinical manifestations. A case-control study was carried out with 56 serum samples from people co-infected with HIV / HHV-8 and 95 from monoinfecting with HIV, from the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of UFPE collected in the period of July from 2015 to October 2016. The socio-demographic data were obtained from the research form and the laboratory exams of the patients' medical records. Cytokine quantification was performed by flow cytometry using commercial BD (Cytometric Bead Array (CBA) and Human Soluble Protein Master Buffer Kit using the BD FACSCalibur™ Cytometer. There was an association of IL-4, IL-6 and IL-10 cytokines in HIV / HHV-8 coinfecting compared to HIV monoinfecting. IL-4 was significantly increased in those co-infected with detectable and undetectable HIV viral load and IL-6 and IL-10 in those co-infected with undetectable HIV viral load. There was an inverse correlation between IL-10 levels and TCD4 counts in HIV monoinfecting, but no association was found between the median of CD4 counts between coinfecting and monoinfecting. The increase in cytokines in coinfecting underscores the importance of monitoring these patients, since it may be a predictive marker for HHV-8 associated diseases in HIV / HHV-8 coinfection.

Key-words: Coinfection. HIV. HHV-8. cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da estrutura do HHV-8..... 20
- Figura 2.** Imagem ilustrativa do genoma do HHV-8..... 20
- Figura 1.** Correlação de Spearman entre as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e a contagem de TCD4 entre coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV com a carga viral indetectável..... 42
- Figura 2.** Correlação de Spearman entre as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e o tempo de uso da TARV entre coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV com a carga viral indetectável..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis sócio demográficas dos pacientes coinfectados com HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV.....	40
Tabela 2: Medianas das dosagens das IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV.....	40
Tabela 3: Medianas das dosagens das IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ quanto à carga viral detectável e indetectável do HIV pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
CBA	Ensaio de beads na citometria, do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HEK 293	Células renais embrionárias 293, do inglês <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IL-4	Interleucina 4
IL- 6	Interleucina 6
IL- 8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IFA	Imunofluorescência indireta
IFN- α	Interferon- alfa
IFN-γ	Interferon-gama
IP	Inibidor da protease
IRF-7	Fator regulador do interferon tipo 7
KSHV	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi
LANA	Antígeno nuclear associado à latência, do inglês <i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i>
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MCD	Doença de Castleman multicêntrica, do inglês <i>multicentric Castleman disease</i>
NF-AT	Fator nuclear de células T ativadas
NHL	linfoma não-Hodgkin
NF-κB	Fator Nuclear <i>Kappa B</i>
ORF	Quadros abertos de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i>

PBMC	Células mononucleares de sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PEL	Linfoma de efusão primária, do inglês <i>primary effusion lymphoma</i>
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/aids
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SK	Sarcoma de Kaposi
SK-aids	Sarcoma de Kaposi associado à aids
SKC	Sarcoma de Kaposi clássico
SKE	Sarcoma de Kaposi endêmico
SKI	Sarcoma de Kaposi iatrogênico
STAT6	Proteína de transcrição ativada pela tirosina quinase 6, do inglês <i>signal transducers and activators of transcription 6</i>
TARV	Terapia antirretroviral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade Internacional
vGPCR	Receptor viral acoplado à proteína G
vIL-6	Interleucina 6 viral
vIRF-4	Fator regulador do interferon viral tipo 4
VP16	Proteína do tegumento do herpesvírus humano 8

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Histórico do SK e do HHV-8.....	19
2.2 Características genéticas do HHV-8.....	19
2.3 Ciclo replicativo do HHV-8.....	21
2.4 Manifestações clínicas do HHV-8.....	22
2.5 Epidemiologia do HHV-8.....	23
2.6 Transmissão do HHV-8.....	24
2.7 Diagnóstico da infecção pelo HHV-8.....	24
2.8 Tratamento do HHV-8.....	25
2.9 Coinfecção HIV/HHV-8.....	26
2.10 Interleucina 2.....	27
2.11 Interleucina 4.....	27
2.12 Interleucina 6.....	28
2.13 Interleucina 10.....	29
2.14 Fator de Necrose Tumoral- α	29
2.15 Interferon- γ	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Desenho do estudo.....	33
4.2 População e local de estudo.....	33
4.3 Critérios de inclusão.....	33
4.4 Critérios de exclusão.....	34
4.5 Definição e categorização das variáveis de coleta de dados.....	34
4.5.1 Variável dependente.....	34
4.5.2 Variáveis independentes.....	34
4.6 Coleta e processamento dos dados.....	35
4.7 Coleta e armazenamento das amostras.....	36
4.8 Citometria de fluxo para quantificar as citocinas.....	36
4.9 Análise estatística.....	37

4.10 Aspectos éticos.....	37
5. RESULTADOS.....	38
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICES.....	63
APÊNDICE A – Formulário de pesquisa.....	63
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	65
APÊNDICE C – Artigo Científico.....	67
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	76

1. INTRODUÇÃO

Em pessoas com doenças associadas ao herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), como o sarcoma de Kaposi (SK), a doença de Castleman multicêntrica (MCD) e o linfoma de efusão primária (PEL) em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA), relatou-se um aumento nos níveis de citocinas, entre elas o TNF- α , IL-6, a IL-8 e a IL-10 (QIN et al., 2010; URSINI, et al. 2010; SATHISH & YUAN, 2011; POLLIZZOTO et al., 2013; KNOWLTON et al., 2014; MACHADO et al., 2014). Além disso, o IFN- γ pode estar associado ao desenvolvimento do SK (FIORELLI et al., 1998; GUEDES et al., 2008). O HHV-8 ainda pode influenciar no aumento nos níveis de outras citocinas como a IL-2 e a IL-4 (PATI, et al. 2003; PELLET, et al. 2006; ZENG et al. 2007).

No entanto, a maioria das pesquisas são com indivíduos já com apresentações clínicas associadas à coinfeção, não tendo comparação entre os níveis dessas citocinas em pessoas coinfectadas sem essas doenças. Uma associação de citocinas em coinfectados HIV/HHV-8 sem doenças associadas à coinfeção poderia demonstrar que não só níveis alterados de citocinas contribuiriam para a manifestação dessas doenças. Pugliese et al. (2002) fizeram uma comparação entre as citocinas IL-4, IL-10, IL-18 e IFN- γ com apenas 24 pessoas coinfectadas com o HIV/HHV-8 e 20 infectadas com o HIV, onde foi encontrado um nível menor da IL-18 entre os coinfectados.

Sabe-se que o aumento dos níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias e inflamatórias contribuem para replicação viral e muitas manifestações de imunodeficiência (MUNOZ-FERNANDEZ, et al. 1997; TASCA et al. 2012). Por outro lado, não se sabe exatamente se um aumento significativo de citocinas inflamatórias influenciaria na infecção pelo HIV em pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8. Para Caselli et al., (2005) os produtos virais homólogos a quimiocinas humanas, produzidas pelo HHV-8, podem induzir a produção de citocinas inflamatórias em células, sugerindo que isso poderia causar um aumento na replicação do HIV, embora não se conheçam quais delas estariam aumentadas.

Demonstrando uma possibilidade de que o HHV-8 pode influenciar na carga viral do HIV, Cahú et al. (2016) mostraram que a sorologia reagente para o HHV-8 foi mais frequente entre os indivíduos que tiveram uma carga viral do HIV detectável quando comparada com a carga viral do HIV indetectável. Sendo assim, a coinfeção pelo HHV-8 em PVHA poderia trazer um pior prognóstico, visto que um aumento significativo de citocinas inflamatórias poderia aumentar a produção e recrutamento de células imunológicas, contribuindo para a replicação do HIV.

Considerando que o HHV-8 pode influenciar na reação imunológica do hospedeiro com o aumento dos níveis de citocinas e elevação da carga viral do HIV, além de levar ao desenvolvimento de diversas doenças como o SK, fomos motivados a realizar o presente trabalho, com o objetivo de comparar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em coinfectados HIV/HHV-8 e mono infectados com HIV. O aumento dos níveis de citocinas em coinfectados HIV/HHV-8 sem manifestações clínicas, além de outros fatores poderiam constituir marcadores preditivos ao desenvolvimento de doenças associadas à coinfeção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Abaixo serão apresentados os principais aspectos da infecção pelo HHV-8, da coinfeção HIV/HHV-8 e das citocinas.

2.1 Histórico do SK e do HHV-8

Em 1872, o dermatologista Moriz Kaposi descreveu o SK e o classificou em quatro variantes clínico-epidemiológicas (KAPOSI, 1872). No entanto, apenas em 1994 Chang et al. identificaram a sequência do HHV-8 a partir de biópsias cutâneas de pacientes com SK e vivendo com HIV/aids. O SK foi a primeira doença oportunista relacionada à infecção pelo HIV, sendo a neoplasia mais frequente em PVHA (BERAL et al., 1990; FELLER e LEMER, 2008; CAHÚ, 2015).

Além do SK, o HHV-8 está associado à doença de Castleman multicêntrica (MCD) e linfoma de efusão primária (PEL) em PVHA. Ainda não foi confirmada sua associação com outras doenças, entre elas o mieloma múltiplo, sarcoidose, hipertensão pulmonar primária, angiossarcoma, linfoma de células T e carcinomas de pele (SANTOS, et al., 2015).

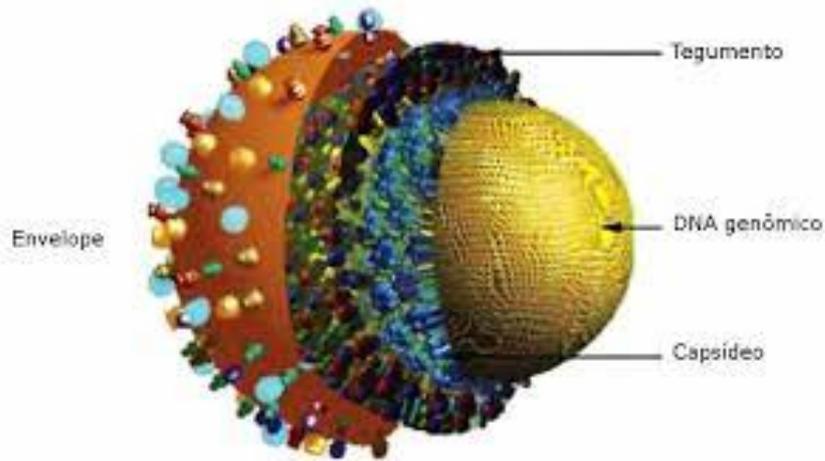
Em 2010, o HHV-8 foi classificado pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer como agente carcinogênico do grupo 1, destacando a importância do vírus na saúde pública (IARC, 2012).

2.2 Características genéticas do HHV-8

O HHV-8 é membro da Ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, da subfamília *Gammaherpesvirinae* e do gênero *Rhadinovirus* (ICTV, 2016). Possui vírion com 120-150 nm de diâmetro e também envelope, nucleocapsídeo de forma icosaédrica, uma molécula de DNA linear de fita dupla e no espaço entre o envelope e o capsídeo existe uma camada denominada de tegumento (JENNER et al., 2002; SATISH et al., 2012), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema da estrutura do HHV-8.

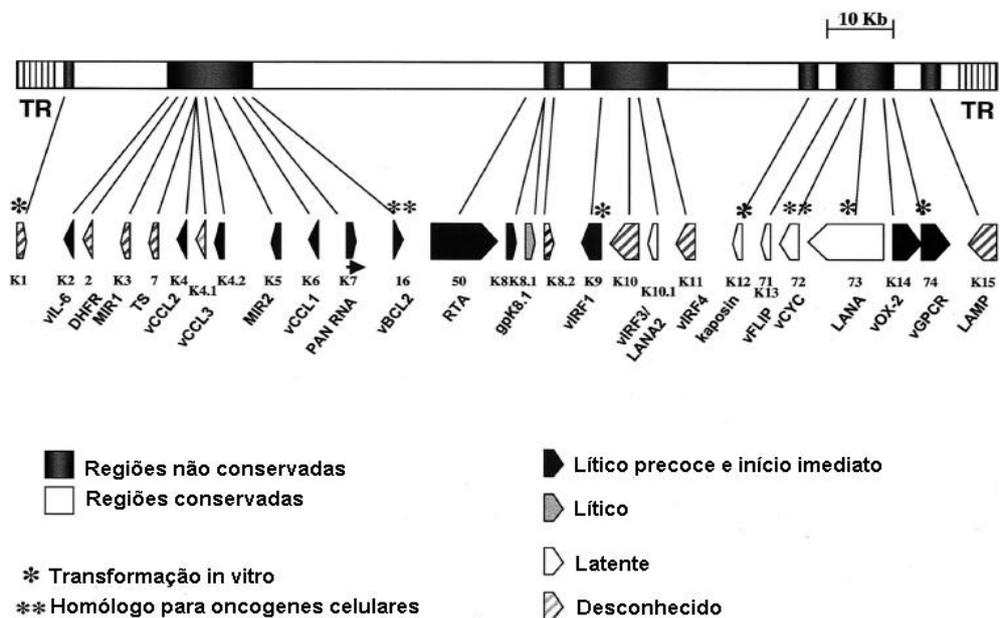
Fonte: www.prn.org.ilustration-John/Henderson-2002 - modificado



O genoma do HHV-8, representado na figura 2, possui aproximadamente 170 a 270 kb com pelo menos 85 a 95 quadros abertos de leitura (ORF) (CHAKRABORTY et al., 2012). O HHV-8 possui ORFs homólogos a outros herpesvírus e ainda apresenta mais de 20 genes únicos, designados pelo prefixo K (CHAKRABORTY et al., 2012).

Figura 2. Imagem ilustrativa do genoma do HHV-8.

Fonte: ABLASHI et al., 2002 (adaptado).



Foi verificado através de estudos epidemiológicos que a ORF-K1 é altamente variável, tornando-a então um bom marcador para genotipagem. Foram descritos cinco subtipos moleculares principais do gene K1, identificados como A, B, C, D e E, sendo a distribuição dos subtipos variada de acordo com a localização geográfica e a composição étnica da população (PAOLI, 2004; MOHANNA et al., 2005).

O HHV-8 também pode apresentar genes semelhantes aos genes codificadores de proteínas de células humanas (CARBONE, 2002) denominados de genes pirateados e por não apresentarem introns, foram provavelmente adquiridos de DNA complementar (cDNA) de células humanas. Devido a este fato, a aquisição dos genes do hospedeiro pode capacitar o vírus a modular a resposta imunológica do hospedeiro (RUSSO, et al., 1996; BORGES, 2009).

Alguns estudos têm identificado muitos desses genes homólogos como sendo proteínas biologicamente ativas, modulando o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células do hospedeiro (CARBONE, 2002). No SK, como exemplo, essas proteínas podem agir tanto na estimulação autócrina/parácrina das células tumorais quanto na transformação celular (CARBONE, 2002).

De uma forma geral, alguns genes do HHV-8 podem ser responsáveis por induzir a angiogênese, o crescimento celular, inibir a apoptose e a resposta inflamatória do hospedeiro, tornando a resposta imune antitumoral deficiente e contribuindo para o surgimento e progressão das neoplasias associadas pela infecção do HHV-8 (CUNHA, 2005). De fato, o HHV-8 especifica um certo número de proteínas que não tinham sido previamente identificadas em gama herpesvírus, herpesvírus ou mesmo vírus em geral, e acredita-se que estas proteínas desempenhem funções vitais na biologia do vírus e sejam centralmente envolvidas na patogênese viral (COUSINS & NICHOLAS, 2014).

2.3 Ciclo replicativo do HHV-8

O ciclo replicativo do HHV-8 inicia-se com a interação entre as glicoproteínas do envelope viral e a matriz extracelular. Em seguida, há uma segunda interação das glicoproteínas com receptores da membrana celular promovendo a fusão e conseqüentemente a liberação do capsídeo viral para o citoplasma da célula hospedeira (ROIZMAN, 1996; CHAKRABORTY et al., 2012). O deslocamento do nucleocapsídeo para a superfície celular acontece através de microtúbulos e o DNA viral é liberado para o núcleo da célula, passando

de uma forma linear para circular (epissomal), não integrada. Durante a fase lítica da infecção pelo HHV-8 ocorre a expressão de genes virais de fase imediata, intermediária e tardia. Ainda nesta fase com a expressão dessas proteínas, ocorre a produção de substâncias pró angiogênicas e pró inflamatórias, levando ao favorecimento de um ambiente para a proliferação do vírus na célula hospedeira e da persistência viral, induzindo então respostas inflamatórias relacionadas à patogênese do SK (GRUNDHOFF & GANEM, 2004).

Assim como os demais herpesvírus, o HHV-8 pode atuar de forma latente por toda a vida do hospedeiro. A VP16 (proteína do tegumento) interage com o material celular promovendo a transcrição de proteínas virais denominadas antígenos latentes ou LANA (do inglês *Latency-Associated nuclear antigen*). O vírus na fase latente pode reativar-se e iniciar seu ciclo lítico, durante esse ciclo, proteínas estruturais são produzidas no citoplasma celular (ROIZMAN, 1996; JENNER, R. G. & BOSHOFF, 2002).

2.4 Manifestações clínicas do HHV-8

Existem quatro variantes do SK, as quais são o SK clássico (SKC), o SK endêmico (SKE), o SK iatrogênico (SKI) relacionado à imunossupressão em pacientes transplantados e o SK associado à aids (SK-aids) (ANTMAN & CHANG, 2000; MOHANNA et al., 2005).

O SK-aids é a manifestação clínica mais comum na coinfeção HIV/HHV-8 progredindo mais rapidamente e sendo mais grave, podendo apresentar múltiplas lesões disseminadas acometendo principalmente pele, linfonodos e trato gastrointestinal (HENGGE, et al., 2002; SIMONETI, et al., 2016).

A MCD é uma doença linfoproliferativa rara na qual a maioria dos indivíduos com a doença apresenta linfadenopatia difusa, febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia (STEBBING, 2008; KAPLAN, 2013). O SK está presente em até 70% dos indivíduos com MCD no momento do diagnóstico (SCHULZ, 2006; STEBBING, 2008; KAPLAN, 2013).

O PEL é um raro linfoma não-Hodgkin (NHL) incurável associado ao HHV-8, que inicia-se em pessoas imunocomprometidas, como por exemplo, em pessoas vivendo com HIV/aids (CHEN, et al., 2007; BONSIGNORE, et al., 2016). Pode ocorrer em consequência da infecção latente de células B infectadas com o HHV-8, correspondendo a aproximadamente 4% de todos os NHL nestes pacientes (CHEN, et al., 2007; BONSIGNORE, et al., 2016). O PEL tem uma apresentação clínica única com predileção para cavidades corporais, tais como o espaço pleural, pericárdio e peritônio (CHEN, et al., 2007).

Células do PEL são morfológicamente variáveis com uma imunofenotipagem de linfócitos nula e evidência de infecção pelo HHV-8 (CHEN, et al., 2007). Os mecanismos oncogênicos exatos do HHV-8 não foram claramente definidos (CHEN, et al., 2007). O tratamento é geralmente com a combinação de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona e caso o paciente seja HIV positivo adiciona-se a terapia antirretroviral (CHEN, et al., 2007; BONSIGNORE, et al., 2016; OSAWA, et al., 2016). O prognóstico para PEL é ruim, com um tempo médio de sobrevivência de cerca de seis meses (CHEN, et al., 2007, OSAWA, et al., 2016).

2.5 Epidemiologia do HHV-8

A infecção pelo HHV-8 pode ser encontrada em todo o mundo com diferentes taxas de prevalência, onde os testes sorológicos são usados geralmente para estimar a prevalência mundial do HHV-8 (MINHAS & WOOD, 2014).

Nas populações adultas das regiões da África e do Mediterrâneo, a soroprevalência do HHV-8 varia de 20% a 80%, enquanto que nos Estados Unidos e Norte da Europa geralmente baixa (<10%) (MINHAS & WOOD, 2014). Na América do Sul, os índios também foram identificados como uma população hiperendêmica para infecção, sendo a prevalência em não-índios significativamente inferior (BIGGAR, et al., 2000; MINHAS & WOOD, 2014). Em relação aos países Asiáticos, a incidência do SK é incomum e a prevalência do HHV-8 é baixa na população (DE SANJOSE, et al., 2009). No entanto, na China a prevalência do HHV-8 varia consideravelmente entre as diferentes regiões do país, sendo de 7,3% a 16,1% em adultos em diferentes províncias (MINHAS & WOOD, 2014). As razões para tais variações geográficas e populacionais do SK e distribuição do HHV-8 continuam a serem estudadas. (DEDICAT & NEWTON, 2003; MINHAS & WOOD, 2014).

No Brasil, a prevalência do HHV-8 na população geral está abaixo de 10%, no entanto, tem sido relatada uma prevalência em torno de 30%, em tribos ameríndias da Amazônia, sendo considerada uma região hiperendêmica para a infecção pelo HHV-8 (ISHAK et al., 2007; SOUZA et al., 2010; BORGES et al., 2012) Em PVHA, a prevalência do HHV-8 varia de 15-38% (PIERROTTI et al., 2000; ZAGO et al., 2000; SOUZA et al., 2004; CAHÚ, 2015).

2.6 Transmissão do HHV-8

Ainda não há um esclarecimento completo da via exata de transmissão do HHV-8 (ROHNER et al., 2014). Os modos de transmissão do HHV-8 podem variar em diferentes partes do mundo, dependendo da endemicidade daquela região (MINHAS & WOOD, 2014).

A transmissão do HHV-8 frequentemente se dá através da saliva (associada ao compartilhamento de utensílios domésticos ou contato íntimo), sangue, mucosa orofaríngea, sêmen, secreções cervico-vaginais e glândulas da próstata (MINHAS & WOOD, 2014; SANTOS, et al., 2015). Todas essas formas de transmissão representam uma fonte tanto de transmissão vertical quanto horizontal (MINHAS & WOOD, 2014; SANTOS, et al., 2015). Há relatos de transmissão vertical e através de transplante de órgãos a partir de doadores de órgãos (LUPPI et al., 2000; BAROZZI et al., 2003). Uma elevada soroprevalência do HHV-8 ocorre entre usuários de drogas injetáveis e pessoas que receberam transfusão de sangue e/ou derivados nas áreas endêmicas para o vírus (LEVI, et al., 2011).

Nos países endêmicos, há uma proporção parecida de homens e mulheres infectados pelo HHV-8, e a transmissão durante a infância torna-se a principal via de infecção, podendo ser causada principalmente pelo contato de saliva e leite materno entre as mulheres desses locais (SANTOS, et al., 2015).

Em relação à transmissão sexual, há uma elevada prevalência do HHV-8 entre homens que fazem sexo com homens (HSH), tornando esta via um importante fator de transmissão entre este grupo (CAHÚ, et al., 2016). Em países da América do Norte, a prevalência do HHV-8 é maior entre HSH do que em pessoas que usam drogas endovenosas, hemofílicos e mulheres (LEÃO, et al., 1999; ROHNER, et al., 2014). Segundo Rohner et al. (2014), a transmissão sexual por contato heterossexual, ainda é controversa.

2.7 Diagnóstico da infecção pelo HHV-8

Não há um padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo HHV-8, sendo este ainda um desafio, no qual mesmo com os ensaios atuais sendo confiáveis para a detecção de anticorpos, não são usados rotineiramente para diagnosticar pessoas infectadas pelo HHV-8 (MOHANNA, et al., 2005; CAHÚ, 2015; LOGAN, et al. 2016).

Quanto aos testes sorológicos disponíveis, há o ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), que foi o primeiro teste aplicado em inquéritos epidemiológicos e o ensaio

imunoenzimático (ELISA), que utiliza proteínas recombinantes, anticorpos contra antígenos estruturais e não estruturais e a partícula viral intacta ou lisada (SPIRA, et al., 2000; MOHANNA, et al., 2005; LOGAN, et al. 2016).

O HHV-8 pode ser isolado a partir de lesões de pele de pacientes com SK, por cultura de células de rim embrionário humano, a *Human Embryonic Kidney 293 cells* (HEK293), entretanto, o isolamento de HHV-8 em cultura não é utilizado com fins de diagnóstico (FOREMAN et al., 1997; CAHÚ, 2015).

A detecção do DNA do HHV-8 é realizada, a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pela técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) (EDELMAN, 2005; CAHÚ, 2015; LOGAN, et al. 2016). Também é possível quantificar a carga viral do HHV-8 utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que apresenta uma detecção de no mínimo 1-6 cópias (QU et al., 2010).

2.8 Tratamento do HHV-8

Na prática clínica não há tratamento para o HHV-8, embora existam antivirais que inibem *in vivo* a replicação do HHV-8, como o ganciclovir e sua pró-droga, o valganciclovir (CASPER et al., 2004; CASPER, et al., 2008). *In vitro*, foi observada a inibição do HHV-8 utilizando ganciclovir, foscarnet e cidofovir em baixa dose (KEDES et al., 1997; LEÃO et al., 2000; RADU & PANTANOWITZ, 2013).

Os inibidores da protease (IP) utilizados na terapia antirretroviral (TARV) para o HIV podem auxiliar na remissão do SK e inibem a replicação do HHV-8 (SGADARI et al., 2002; GANTT et al., 2011)

A TARV tem sido utilizada para reverter a imunossupressão associada ao HIV, levando a regressão da epidemia do SK nos países desenvolvidos e reduziu o risco de desenvolver o SK para até 90% para aqueles que receberam o tratamento (GALLAFENT, et al., 2005; SEEMERE, et al., 2012; OHNER, et al., 2014). Com a TARV e o monitoramento do tratamento, muitas vezes é o suficiente para tratar a SK-aids, tendo por objetivo reconstituir o sistema imunológico e reprimir a replicação do HIV, seja no contexto de doentes não tratados, onde as lesões do SK podem ser as primeiras indicações de infecção pelo HIV, ou no contexto da aids, onde as lesões do SK indicam a falha da TARV (SCHNEIDER & DITTMER, 2017).

2.9 Coinfecção HIV/HHV8

Estudos demonstram o aumento na prevalência do HHV-8 em PVHA, devido aos vírus apresentarem vias de transmissão comuns (PALELLA et al., 1998; SEABERG et al., 2010; REINHEIMER et al., 2011).

No Brasil, a prevalência do HHV-8 em PVHA varia de 15-38% (PIERROTTI et al., 2000; ZAGO et al., 2000; SOUZA et al., 2004; CAHÚ, 2016). Em Pernambuco, a prevalência da coinfecção HIV/ HHV-8 foi de 28,6% e em HSH 38,6% (CAHÚ, et al. 2016).

Desde a introdução da terapia antirretroviral, a incidência do SK-aids diminuiu drasticamente, mas ela continua sendo a neoplasia maligna mais comum em PVHA (KAPLAN, 2013; SIMONETI, et al., 2016). No entanto, o SK continua a ser um problema significativo na África Subsaariana, e em locais sem acesso à TARV (KAPLAN, 2013; SIMONETI, et al., 2016).

A incidência do SK é de cerca de 1 em 100.000 na população em geral, e aproximadamente 1 em cada 20 em indivíduos infectados pelo HIV (LI, et al. 2017). Cerca de 50% dos HSH coinfectados, mesmo nos países onde o SK é baixo, desenvolvem SK-aids, entre 5 a 10 anos da aquisição da coinfecção, sendo esse alto nível de expressão da doença nessas pessoas, mesmo com o quadro mudando com a aquisição da nova terapia antirretroviral, representado pela importância da coinfecção HIV/HHV-8 no desenvolvimento do SK (SANTOS. et al., 2015; SIMONETI, et al., 2016).

Embora a MCD apareça em pessoas soronegativas para o HIV e o HHV-8, uma associação da coinfecção HIV/HHV-8 com a MCD tem sido relatada. Uldrick et al. (2010) relataram que seis pacientes coinfectados com HIV/HHV-8, sem evidência patológica da MCD, apresentaram uma síndrome inflamatória semelhante à observada na MCD. Esses pacientes tinham padrões virais de atividade de citocinas líticas do HHV-8, incluindo a elevação acentuada da vIL-6 (interleucina 6 viral), que é uma interleucina de função basicamente autócrina produzida pelo HHV-8 e IL-6 humana, que se assemelhava aos observados em doentes com MCD (POLIZZOTTO, et al. 2013; GIFFIN, et al. 2014).

Sendo assim, considerando que o HHV-8 influencia na reação imunológica do hospedeiro, com um possível aumento na produção de diferentes tipos de citocinas, destaca-se a importância do conhecimento de como a infecção pelo HHV-8 interfere na produção de citocinas em PVHA, e entre elas se destacariam as IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ por serem importantes nas doenças causadas pela coinfecção HIV/HHV-8, no aumento da carga

viral do HIV e na contagem de TCD4 (CASELLI, et al. 2005; POLIZZOTTO, et al., 2013; MACHADO, et al., 2014).

2.10 Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é secretada principalmente por linfócitos T, sendo as células Th1 as que mais produzem IL-2 após estímulo antigênico e tem como função promover proliferação de linfócitos T e citotoxicidade mediada por células NK (HENNEY, et al. 1981).

Pellet et al. (2006) observaram um aumento significativo da produção de IL-2 e IFN- γ por células T CD4 e um aumento da produção de IFN- γ por células T CD8 em pacientes com SK sem infecção pelo HIV em comparação com pacientes controle sem SK e sem infecção pelo HHV-8.

De alguma forma, a IL-2 pode aumentar a replicação do HHV-8, sendo sua administração em tratamentos junto com a TARV temporariamente associada a aumentos transitórios na viremia do HHV-8 (SMITH, 2001; TAMBUSSI, et al. 2001; MALNATI et al. 2002). Embora a replicação do HHV-8 seja necessária para o desenvolvimento de lesões do SK, Mallery et. al. (2002) asseguraram que o tratamento com a IL-2 pode ser implementado, onde na sua pesquisa o SK ocorreu apenas em pacientes em que a replicação do HHV-8 já era detectável antes do início do tratamento com a IL-2.

2.11 Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é uma citocina produzida por linfócitos T CD4+, mastócitos e basófilos ativados e é a principal citocina responsável pela produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T auxiliares CD4+ (DA SILVA, 2007). A IL-4 também possui efeitos anti-inflamatórios, reduzindo os efeitos das IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, e, além disso, inibe a produção de radicais livres de oxigênio (DE OLIVEIRA, et al. 2011).

O HHV-8 codifica um receptor viral acoplado à proteína G (vGPCR) que tem sido implicado na patogênese do SK e que ativa o fator nuclear de células T ativadas (NF-AT), fator de transcrição importante na regulação da expressão de citocinas tais como a IL-4 (PATI, et al., 2003).

A IL-4 também pode ser induzida pela proteína Tat do HIV (ZENG, et al., 2007). Por sua vez, a IL-4 ativaria a proteína de transcrição ativada pela tirosina quinase 6 (STAT6) que pode contribuir para a replicação do HHV-8 (ZENG, et al., 2007). Todavia, não se sabe exatamente se o HHV-8 poderia interferir na produção ou inibição desta citocina, embora Publiese et al. (2002) não tenham encontrado diferenças significativamente estatísticas entre os níveis da IL-4 em monoinfectados pelo HIV e coinfectados pelo HIV/HHV-8.

2.12 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também por estimulação de outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SOUZA, et al., 2008) e atua na resposta imune inata e adaptativa. Ela é importante nas respostas inflamatórias agudas que apresenta efeitos locais e sistêmicos, incluindo a indução da síntese hepática de diversos outros mediadores inflamatórios, a estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea e a diferenciação de linfócitos T auxiliares (helper) produtores de interleucina 17 (IL-17) (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012). O receptor de IL-6 é composto por uma cadeia polipeptídica capaz de interagir com a citocina e uma subunidade capaz de transduzir sinal (chamada gp 130), que é também um componente de sinalização de receptores de outras citocinas e também participa da via de sinalização que ativa o fator de transcrição STAT 3 (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Os pacientes com alguns tipos de câncer apresentam elevação dos níveis de IL-6 devido à sua produção pelo tecido tumoral (FERREIRA, 2008). A IL-6 é superexpressa em lesões do SK, sendo considerada importante na angiogênese e como fator de crescimento autócrino para as células do SK, além disso, é também aumentada na MCD e na PEL (XIE, et al., 2005). Análises através de “microarrays” demonstraram que a infecção pelo HHV-8 induzia a expressão da IL-6, todavia, o mecanismo de indução permaneceu desconhecido (CARROL, et al., 2004; NARANATT, et al., 2004).

2.13 Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é sintetizada principalmente por células TCD8 ativadas e também por células Th0, Th1, Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por LPS (BENJAMIN et al. 1992). Esse é um exemplo de circuito de feedback negativo em resposta às células T (POLIZZOTTO, et al., 2013). A IL-10 também pode atuar como um facilitador da evasão imune viral (POLIZZOTTO, et al., 2013).

A IL-10 também vem servindo como um fator de crescimento da aids relacionando-a com o linfoma de células B e por linhas celulares PEL HHV-8 infectadas (OKSENHENDLER, et al., 2000). Em relação a macrófagos, a IL-10 decresce a produção de TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF e, conseqüentemente, inibe a sua função de ativadores de células T (WEISS, et al., 2004).

No Brasil, Machado et al. (2014) observaram que a IL-10 foi maior em pacientes com SK-aids, quando comparadas com aqueles com o SK clássico ou apenas infecção pelo HIV. Houve também um alto nível de IL-10 entre os pacientes com SK de forma disseminada comparado com aqueles com apenas lesões cutâneas, ou cutânea e digestiva e/ou lesões do trato respiratório. Os resultados apresentados foram os primeiros a demonstrar que existe uma estratificação de pacientes com SK-aids de acordo com a lesão topográfica, quando níveis de IL-10 são mais elevados em indivíduos com doença disseminada.

2.14 Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

O TNF- α é uma proteína de 17 Kd, com muitas atividades biológicas, produzido principalmente por macrófagos ou monócitos ativados e também por outros tipos de células como células NK, mastócitos, células endoteliais, queratinócitos e células da musculatura lisa (RUBIN, et al., 1986; VITALE & RIBEIRO, 2007).

Embora se conheça que o TNF- α exiba atividades antitumorais, esta citocina tem sido implicada na patogênese do SK (URSINI, et al. 2010). O TNF- α funciona como um mitógeno para células de SK em cultura e os níveis séricos de TNF- α são aumentados na infecção inflamatória após a infecção por HIV (LÄHDEVIRTA. et al. 1998; NAKAMURA, et al. 1998). Além disso, as lesões de SK contêm níveis aumentados de TNF- α e a exacerbação do SK foi observada após a administração de TNF- α para pacientes com SK (ABOULAFIA, et al. 1989; OXHOLM. et al. 1989).

O HHV-8 contém um quadro de leitura aberto, K14, que tem homologia significativa com a glicoproteína celular OX2, designada OX2 viral (vOX2) (CHUNG, et al. 2002). Purificada, a proteína vOX2 glicosilada estimulou monócitos primários, macrófagos e células dendríticas para produzir citocinas inflamatórias, as quais foram a interleucina 1- β (IL-1 β), IL-6, proteína 1 quimiotratante de monócitos (MCP-1) e TNF- α (CHUNG, et al. 2002). Segundo Chung et al. (2002), essas citocinas ativam células endoteliais para favorecer a angiogênese e atuar no recrutamento de células T, sugerindo que a vOX2 ativa a infiltração de células de linhagem mieloide para produzir citocinas inflamatórias, que potencialmente facilitam a proliferação angiogênica de lesões de SK.

Embora a seja sugerido que pessoas SK-aids possuem origem multifatorial, essas possuem níveis séricos aumentados de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (MILES, 1994; JACOBSON & ARMENIAN, 1995). Segundo Mallery et al. (1998), *in vivo*, níveis elevados de TNF- α do soro juntamente com uma maior capacidade de resposta ao TNF- α promoveria o desenvolvimento da SK-aids.

Embora as pesquisas apontem um aumento do TNF- α na coinfeção HIV/HHV-8, Machado et al. (2014) não encontraram diferenças significativas do TNF- α entre pessoas com diferentes tipos de SK e o grupo controle de pessoas infectadas apenas pelo HIV.

2.15 Interferon - γ (IFN- γ)

O IFN- γ é a principal citocina de ativação de macrófagos e tem funções fundamentais na imunidade contra os microrganismos intracelulares (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012). Embora tenha alguma atividade antiviral, ele não é uma citocina antiviral potente, e funciona principalmente como um ativador de células efetor do sistema imunológico (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

O IFN- γ além de ativar macrófagos, promove a diferenciação de células T CD4+ para o subgrupo Th1 e inibe a diferenciação de células Th2 e Th17 (servindo para ampliar Th17) (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Fiorelli et al. (1998) demonstraram que o início do SK está associado a uma alteração no sistema imunológico levando a uma ativação *in situ* de células TCD8+ com aumento da expressão de IFN- γ . Em contrapartida, Pugliese et al. (2002), encontraram níveis mais baixos da interleucina 18 (IL-18), que é uma citocina capaz de induzir a produção de IFN- γ em pacientes coinfectados com o HIV/HHV-8 comparados com pacientes infectados apenas com

HIV. Machado et al. (2014) não encontraram associação nos níveis do IFN- γ em indivíduos com diversas formas de SK. Isto então sugere que o IFN- γ estaria aumentado apenas no início do SK.

Portanto, elevados níveis das citocinas em coinfectados HIV/HHV-8 podem constituir marcadores preditivos ao desenvolvimento de diversas doenças associadas ao HHV-8, como o SK, entre outras.

3. OBJETIVOS

Abaixo estão descritos os objetivos gerais e específicos avaliados nesta pesquisa.

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ na coinfeção HIV/HHV-8 e comparar com monoinfectados com HIV.

3.2 Objetivos específicos:

Nos coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV

- ✓ Quantificar e associar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ ;
- ✓ Verificar a associação dos níveis das citocinas com a carga viral detectável e indetectável do HIV;
- ✓ Verificar a associação da contagem de TCD4;
- ✓ Correlacionar os níveis das citocinas com a contagem de TCD4 e o tempo de uso da TARV.

4. METODOLOGIA

Abaixo estão descritos todos os procedimentos metodológicos executados neste trabalho.

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo analítico do tipo caso-controle.

Definição de caso: PVHA com o diagnóstico sorológico da infecção pelo HHV-8 detectada pelo ELISA, o qual identifica anticorpos contra proteínas estruturais e não estruturais do HHV-8, sendo caracterizados como coinfectados HIV/HHV-8, conforme Cahú et al. (2016).

Definição de controle: indivíduos com diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV, estabelecido de acordo com a portaria nº 151, de 14 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009), sendo caracterizados como monoinfectados pelo HIV.

4.2 População e local de estudo

A população foi constituída por amostras de soro de pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), coletadas entre os períodos de julho de 2015 a outubro de 2016.

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas na pesquisa pessoas de ambos os sexos e com diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV, estabelecido de acordo com a portaria nº 151, de 14 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009).

4.4 Critérios de exclusão

- ✓ Pessoas menores de 18 anos
- ✓ Mulheres grávidas
- ✓ Pessoas com diagnóstico de linfomas ou SK
- ✓ Pessoas em tratamento para tuberculose
- ✓ Pessoas com diagnóstico das hepatites virais B e C
- ✓ Pacientes internados ou que fazem uso de drogas moduladoras das citocinas.

4.5 Definição e categorização das variáveis de coleta de dados

4.5.1 Variável dependente

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	CATEGORIZAÇÃO
Pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8	Pessoas com sorologia positiva para o HIV e HHV-8	1-SIM 2-NÃO

4.5.2 Variáveis independentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	CATEGORIZAÇÃO
Sexo	Sexo biológico do paciente. Variável nominal dicotômica.	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea. Variável quantitativa.	Número absoluto
Estado civil	Situação de uma pessoa em relação ao matrimônio ou à sociedade conjugal relatada pelo paciente. Variável nominal.	1. Solteiro 2. Casado 3. Divorciado 4. Viúvo 5. União estável
Formação	Grau de escolaridade referida pelo paciente. Variável nominal.	1. Analfabeto 2. Fundamental 3. Médio 4. Superior
Etnia	Auto referida pelo paciente durante a entrevista. Variável nominal.	1. Branca 2. Preta 3. Amarela 4. Parda 5. Indígena
Carga viral do HIV	Quantificada no plasma do paciente e referida no prontuário tendo sido realizada no período máximo de três meses antes da coleta do sangue. Expressa em	1. Detectável 2. Indetectável

	número de cópias/mL do HIV-RNA. Variável nominal	
Tempo de diagnóstico do HIV	Período de tempo do diagnóstico do HIV até a data da coleta de sangue. Expressa em meses. Variável quantitativa.	Número absoluto
Tempo de uso da TARV	Período de tempo em que a pessoa vem sendo tratada para o HIV até a data da coleta de sangue. Expressa em meses. Variável quantitativa.	Número absoluto
Contagem de TCD4	Marcador de superfície celular CD3 associado a CD4, referido no prontuário do paciente e realizado no máximo de três meses antes da coleta do sangue, Expresso em células/mm ³ . Variável quantitativa.	Número absoluto
IL-2	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto
IL-4	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto
IL-6	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto
IL-10	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto
TNF- α	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto
IFN- γ	Molécula sinalizadora do sistema imune. Quantificada no soro do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa.	Número absoluto

4.6 Coleta e processamento dos dados

Cada paciente que aceitou participar da pesquisa assinou juntamente com duas testemunhas, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) da pesquisa (apêndice B), em duas vias de igual teor (sendo uma para o paciente e outra para o pesquisador). Após a assinatura do TCLE, os dados de cada paciente foram coletados por meio de um formulário especialmente elaborado para a pesquisa, (apêndice A) a fim de obter dados referentes às variáveis sócio demográficas. O prontuário de cada paciente foi consultado para os dados referentes a contagem de TCD4 e carga viral do HIV, que foram realizados em serviço de referência em HIV/aids de Pernambuco.

4.7 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras sanguíneas encontravam-se armazenadas em microtubos de 2 mL, à temperatura de 20°C, no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), provenientes do projeto maior “Associação entre os polimorfismos de base única dos genes NFκB1/NFκB2 e genótipos do HHV-8 com os níveis séricos do NFκB, carga viral e a infecção latente/lítica pelo HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids”, cujo diagnóstico do HHV-8 foi realizado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (USP).

4.8 Citometria de Fluxo para quantificar as citocinas

As dosagens das citocinas foram realizadas pela citometria de fluxo utilizando kits comerciais (Cytometric Bead Array (CBA) e Human Soluble Protein Master Buffer Becton Dickinson), no Setor de Imunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em Recife-PE. O ensaio CBA é um método de captura de um analito ou conjunto de analitos com “beads” de captura de tamanho e fluorescência conhecidos. Cada “bead” de captura do kit tem uma fluorescência distinta e é revestida com um anticorpo de captura específico para cada citocina. O reagente de detecção é uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE), que fornece um sinal fluorescente na proporção da quantidade de analito ligado. Quando as “beads” de captura e o reagente são incubados com padrões ou amostras desconhecidas há a formação de “complexos de sanduíche” (“bead” de captura + citocina + reagente de detecção). O sistema do kit comercial emprega partículas com intensidades de fluorescência discretas para detectar analitos solúveis em concentrações muito baixas. O limite de detecção para a maioria dos analitos neste sistema é 10 a 2500 pg / mL.

Na análise foram utilizadas amostras de soros dos pacientes e a adicionadas “beads” específicas (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-TNF- α e anti-IFN- γ), em seguida foi adicionado o conjugado com ficoeritrina e incubadas durante 3 horas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Os tubos foram centrifugados a 200G durante 5 minutos e o sobrenadante aspirado e descartado de forma cuidadosa. Em seguida as “beads” foram ressuspensas e realizada a leitura da concentração de cada uma delas no citômetro BD FACSCalibur™.

4.9 Análise estatística

Foi aplicado inicialmente o teste de D'Agostino & Pearson omnibus para verificar a normalidade dos dados obtidos. Posteriormente empregou-se o teste de Fisher e o teste do qui-quadrado para a análise das variáveis sócias demográficas. A análise da associação dos níveis das citocinas, carga viral do HIV e contagem de TCD4 foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e para a correlação o teste de Spearman. O programa utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism (versão 6.0-San Diego/CA/USA).

4.10 Aspectos éticos

A pesquisa faz parte do projeto intitulado “Associação entre os polimorfismos de base única dos genes NFκB1/NFκB2 e genótipos do HHV-8 com os níveis séricos do NFκB, carga viral e a infecção latente/lítica pelo HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE , CAAE-45156215.5.0000.5208, (Anexo A).

5. RESULTADOS

Artigo submetido à revista: Archives of Virology: ASSOCIAÇÃO DAS CITOCINAS (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ) EM COINFECTADOS COM HIV/HHV-8 COMPARADO COM MONOINFECTADOS COM HIV

Introdução

Em pessoas vivendo com HIV/aids com doenças associadas ao herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), como o sarcoma de Kaposi (SK), a doença de Castleman multicêntrica (MCD) e o linfoma de efusão primária (PEL), relatou-se um aumento de citocinas, entre elas o TNF- α , IL-6, a IL-8 e a IL-10 e o IFN- γ [1-8]. O HHV-8 também pode influenciar no aumento nos níveis das citocinas IL-2 e a IL-4 (PATI, et al. 2003; PELLET, et al. 2006; ZENG et al. 2007). Além disso, o aumento dos níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias e inflamatórias contribuem para replicação viral e manifestações associadas ao HHV-8 [9,10].

Para Caselli et al. [11], os produtos virais homólogos a quimiocinas humanas, produzidas pelo HHV-8, podem induzir a produção de citocinas inflamatórias em células, sugerindo que isso poderia causar um aumento na replicação do HIV, embora não se conheçam quais delas estariam aumentadas. Cahú et al. [12] mostraram que a presença de anticorpos para o HHV-8 foi mais frequente em indivíduos com carga viral do HIV detectável, quando comparados com aqueles com carga viral indetectável. Sendo assim, a coinfeção do HIV/HHV-8 poderia trazer um pior prognóstico, visto que o aumento significativo de citocinas inflamatórias levaria a uma maior produção e recrutamento de células imunológicas, contribuindo para a replicação do HIV.

Considerando então que o HHV-8 pode influenciar na reação imunológica do hospedeiro aumentando níveis de citocinas, a carga viral do HIV e desenvolver doenças associadas à coinfeção foi realizado o presente trabalho, com o objetivo de comparar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV. O conhecimento de que há um aumento nos níveis de citocinas em coinfectados sem doenças associadas à coinfeção poderiam constituir marcadores preditivos ao desenvolvimento destas e inspirar novas pesquisas a explorarem mais fatores que podem desenvolver essas manifestações clínicas.

Materiais e métodos

Desenho, população e local do estudo

Foi realizado um estudo analítico do tipo caso-controle, com pessoas acompanhadas no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), PE, Brasil, de ambos os sexos e maiores de 18 anos, coinfectadas com HIV/HHV-8 e os controles mono infectados com HIV.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo para a quantificação das IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , foi realizada no Setor de Imunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em Recife-PE, com kits comerciais (Becton Dickinson Cytometric Bead Array CBA e Human Soluble Protein Master Buffer Kit) e utilizando o citômetro BD FACSCalibur™.

Análise estatística

Foi aplicado o teste de Fisher e o teste do qui-quadrado para a análise das variáveis sócio demográficas, teste de Mann-Whitney para a análise da associação dos níveis das citocinas, carga viral do HIV e contagem de TCD4 e o teste de Spearman para correlação entre o tempo de uso de TARV e contagem de TCD4 com níveis das citocinas, utilizando o GraphPad Prism (versão 6.0-San Diego/CA/USA).

Resultados

Participaram da pesquisa 56 pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e 95 mono infectados com HIV, ambos com média de idade de 43 anos. As demais variáveis sócio demográficas estão expostas na tabela 1. Nos coinfectados, 12,5% (7/56) tinham carga viral do HIV detectável e 26,3% (25/95) dos mono infectados. O tempo médio do diagnóstico de HIV e tempo de uso da TARV nos coinfectados foi de 91,6 e 74,9 meses respectivamente, e nos mono infectados de 90,7 e 79,3 meses. A mediana das contagens de TCD4, entre os coinfectados e mono infectados foi de 572 células/mm³ e 479 células/mm³ respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre a contagem de TCD4 entre os grupos.

Tabela 1: Variáveis sócio demográficas dos pacientes coinfectados com HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV.

	HIV/HHV-8 %(n)	HIV %(n)	<i>P</i>
Sexo			0,1654*
Masculino	71,4% (40/56)	60% (57/95)	
Feminino	28,6% (16/56)	40% (38/95)	
Estado civil			0,1336**
Solteiro	60,7% (34/56)	47,5% (45/95)	
Casado	19,7% (11/56)	33,9% (34/95)	
Divorciado	1,8% (1/56)	4,2% (4/95)	
Viúvo	5,3% (3/56)	1% (1/95)	
União estável	12,5% (7/56)	12,6% (12/95)	
Etnia			0,4305**
Pardo	57,1% (32/56)	63,1% (60/95)	
Branco	23,2% (13/56)	13,7% (13/95)	
Negro	19,7% (11/56)	22,1% (21/95)	
Indígena	0% (0)	1% (1/95)	
Formação			0,6232**
Analfabeto	5,3% (3/56)	7,4% (7/95)	
Fundamental	42,8% (24/56)	49,5% (47/95)	
Médio	46,4% (26/56)	35,7% (34/95)	
Superior	5,3% (3/56)	7,4% (7/95)	

* *p* obtido pelo teste de Fisher. ** *p* obtido pelo teste do qui-quadrado.

A tabela 2 apresenta as medianas das concentrações das citocinas em coinfectados com HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV.

Tabela 2: Medianas das concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV.

Citocinas	HIV/HHV-8	HIV	<i>p</i> *
	Mediana em pg/mL	Mediana em pg/mL	
IL-2	5,365 (4,53 - 48,23)	5,47 (4,41 - 7,07)	0,2126
IL-4	6,12 (5,42-33)	5,93 (5,32 - 6,78)	0,0030
IL-6	8,62 (6,59 - 36,37)	7,93 (5,97 - 144,76)	0,0319
IL-10	7,17 (6,44 - 42,62)	6,99 (6,22 - 16,15)	0,0042
TNF- α	5,495 (4,71 - 68,51)	5,42 (3,68-6,83)	0,2785
IFN- γ	6,195 (5,23 - 21,46)	6,09 (4,93 - 16,36)	0,0740

* *p* obtido através do teste de Mann Whitney.

As medianas das dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ quanto à carga viral do HIV entre pessoas coinfectadas e monoinfectadas estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Medianas das dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ quanto à carga viral do HIV pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 e monoinfectados com HIV.

Citocinas	CV do HIV detectável		<i>p</i> *	CV do HIV indetectável		<i>p</i> *
	Mediana em pg/mL			Mediana em pg/mL		
	HIV/HHV-8 (n=7)	HIV (n=25)		HIV/HHV8 (n=49)	HIV (n=70)	
IL-2	5,4 (4,99 – 48,23)	5,47 (4,41 – 6,51)	0,680	5,33 (4,53 – 7,15)	5,47 (4,73 – 7,07)	0,196
IL-4	6,37 (5,77 – 33)	5,88 (5,32 – 6,48)	0,022	6,09 (5,42 – 6,9)	5,93 (5,32 – 6,78)	0,023
IL-6	9,49 (7,61 -36,37)	9,12 (7,06 – 24,85)	0,338	8,42 (6,59 – 21,51)	7,51 (5,97 – 144,76)	0,004
IL-10	7,53 (6,52 – 34,46)	7,11 (6,44 – 11,2)	0,338	7,15 (6,44 – 42,62)	6,95 (6,22 – 16,15)	0,002
TNF- α	5,13 (4,89 – 68,51)	5,47 (4,71 – 6,49)	0,452	5,52 (4,71 – 6,32)	5,42 (3,68 – 6,83)	0,135
IFN- γ	6,48 (5,75 – 21,46)	6,17 (5,31 – 16,36)	0,273	6,17 (5,23 – 7,14)	6,04 (4,93 – 8,18)	0,089

* *p* obtido através do teste de Mann Whitney.

A correlação entre concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e a contagem de TCD4 nos coinfectados e monoinfectados com a carga viral do HIV indetectável está apresentada na figura 1.

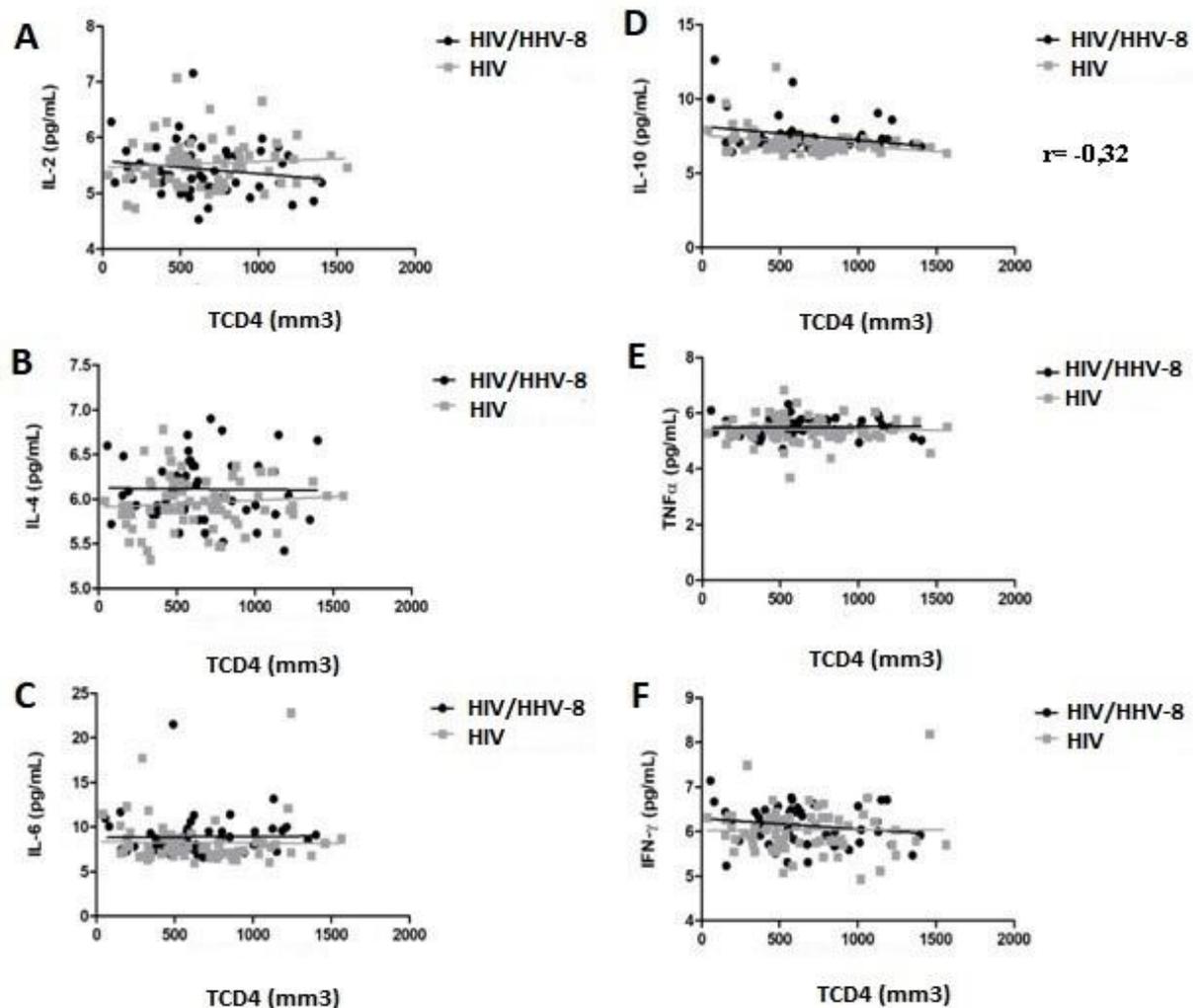


Figura 1. 1A. Correlação de Spearman entre a IL-2 e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=46$, $r = -0,1516$ e $p=0,2983$) e mono infectados ($n=70$, $r = 0,0838$ e $p=0,4935$); 1B. Correlação de Spearman entre a IL-4 e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=49$; $r=0,001$ e $p=0,9942$) e mono infectados ($n=70$; $r = 0,1052$ e $p=0,3896$). 1C. Correlação de Spearman entre a IL-6 e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=49$, $r = -0,1176$ e $p=0,4209$) e mono infectados ($n=70$, $r = -0,1176$ e $p=0,4209$); 1D. Correlação de Spearman entre a IL-10 e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=49$, $r = -0,1209$ e $p=0,4079$) e mono infectados (**$n=70$, $r = -0,3257$ e $p=0,0063$**); 1E. Correlação de Spearman entre o TNF- α e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=49$, $r=0,01712$ e $p=0,9071$) e mono infectados ($n=70$, $r=0,0234$ e $p=0,8484$); 1F. Correlação de Spearman entre o IFN- γ e a contagem de TCD4 entre coinfectados ($n=49$; $r = -0,1728$ e $p=0,2350$) e mono infectados ($n=70$; $r=-0,1054$ e $p=0,3888$).

A correlação entre os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e o tempo de uso da TARV nos coinfectados e mono infectados com a carga viral do HIV indetectável está apresentada na figura 2.

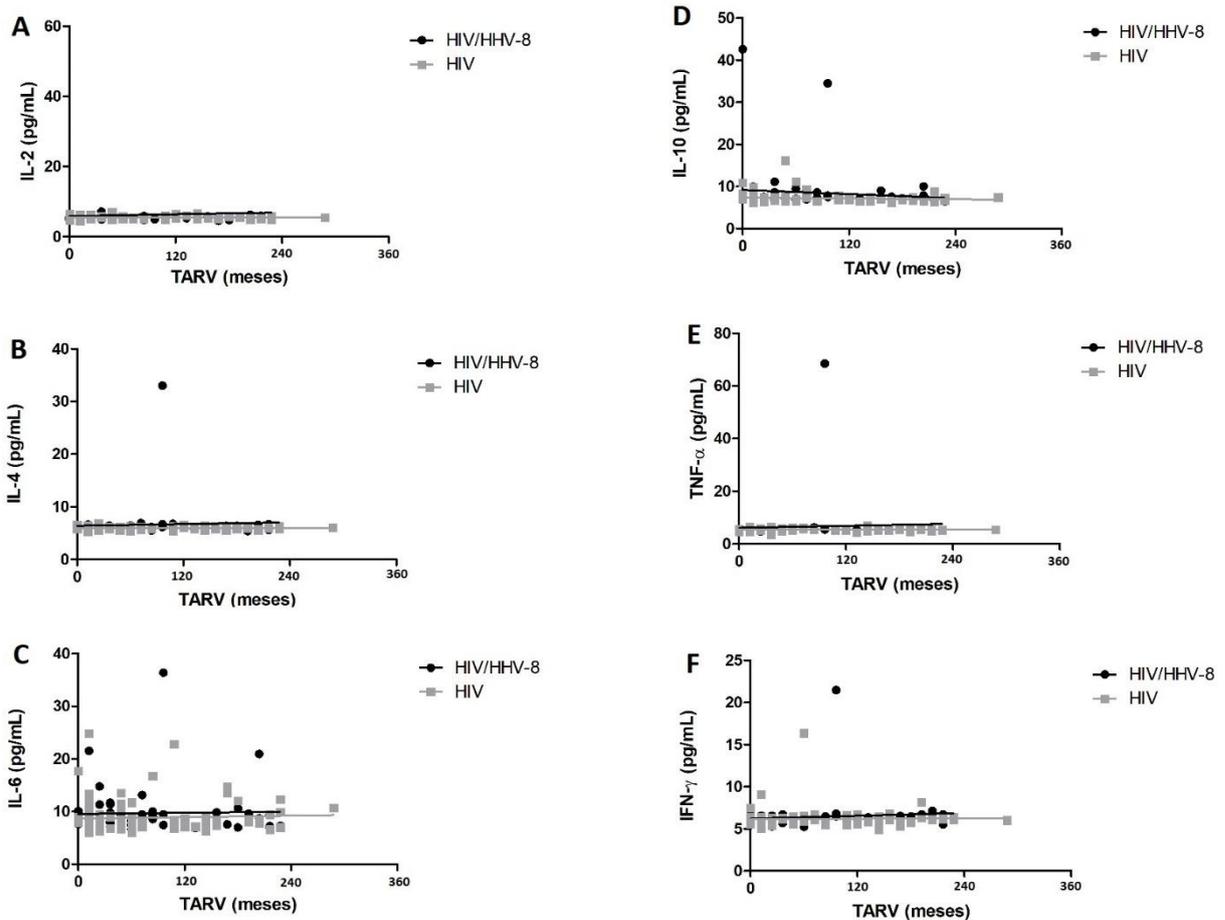


Figura 2. 2A. Correlação de Spearman entre a IL-2 e o tempo de uso da TARV entre coinfectados ($n=46$, $r=0,2234$ e $p=0,0979$) e mono infectados ($n=70$, $r=-0,0260$ e $p=0,8024$); 2B. Correlação de Spearman entre a IL-4 e o tempo de uso da TARV ($n=49$; $r=0,1435$ e $p=0,2915$) e mono infectados ($n=70$; $r=-0,004$ e $p=0,9677$). 2C. Correlação de Spearman entre a IL-6 e o tempo de uso da TARV entre coinfectados ($n=49$, $r=-0,1050$ e $p=0,4414$) e mono infectados ($n=70$, $r=0,0370$ e $p=0,7218$); 2D. Correlação de Spearman entre a IL-10 e o tempo de uso da TARV entre coinfectados ($n=49$, $r=-0,0050$ e $p=0,9708$) e mono infectados ($n=70$, $r=-0,0343$ e $p=0,7414$); 2E. Correlação de Spearman entre o TNF- α e o tempo de uso da TARV entre coinfectados ($n=49$, $r=0,2209$ e $p=0,1272$) e mono infectados ($n=70$, $r=0,0084$ e $p=0,9356$); 2F. Correlação de Spearman entre o IFN- γ e o tempo de uso da TARV entre coinfectados ($n=49$; $r=0,2150$ e $p=0,2350$) e mono infectados ($n=70$; $r=-0,1695$ e $p=0,1005$).

Discussão

Em relação às variáveis sócio demográficas, nossos dados corroboram com estudos mundiais [12,15,16] que mostram uma maior frequência de infecção tanto de coinfectados quanto de mono infectados entre indivíduos do sexo masculino, idade média de 43 anos, etnia

parada e baixa escolaridade. A mediana das contagem de TCD4 não mostrou associação entre coinfectados e monoinfectados, embora tenha sido maior nos coinfectados, corroborando com Altuğlu et al. [17] que também não encontraram associação.

Os níveis aumentados da IL-4 em coinfectados corroboram com os dados encontrados por Zeng, et al. [18] sugerindo que esse aumento pode ocorrer pela indução da proteína Tat do HIV e ativação da tirosina quinase 6 (STAT6), proteína de transcrição do HHV-8, contribuindo para a replicação deste vírus. Além disso, o HHV-8 codifica um receptor viral acoplado à proteína G (vGPCR) que tem sido implicado na patogênese do SK e que ativa um fator de transcrição nuclear de células T ativadas (NF-AT), importante na regulação da expressão da IL-4 [19]. Ademais Valentin et al. [20] a IL-4 sugerem que o aumento da IL-4 poderia ser responsável por aumentar a carga viral do HIV em coinfectados HIV/HHV-8. Contrariamente, Publiese et al. [21] não encontraram associação dos níveis da IL-4 entre coinfectados e monoinfectados pelo HIV. Ressaltamos que a referida pesquisa estudou um pequeno número de participantes, sendo 24 pacientes coinfectados e 20 monoinfectados.

A pesquisa mostrou um aumento dos níveis das IL-6 e IL10 em coinfectados, sugerindo que esses pacientes tem um risco maior de desenvolverem doenças associadas ao HHV-8. Pollizzotto et al. [6] mostraram que altos níveis da IL-6 foram correlacionados com os sintomas da MCD e que o bloqueio da IL-6 seria suficiente para tratar a doença. A IL-6 é superexpressa em lesões do SK sendo considerada importante na angiogênese e como fator de crescimento autócrino para as células deste sarcoma [22]. Além, disso Machado et al. [8] observaram que os níveis da IL-10 foram maiores em pacientes com SK-aids, quando comparados com pessoas com SK clássico ou apenas infectadas com HIV. Segundo Oksenhendler, et al. [23], a IL-10 está relacionada com o linfoma de células B e por linhas celulares do PEL infectadas pelo HHV-8.

Entretanto, a constatação de que o aumento das IL-6 e IL-10 estaria relacionado ao desenvolvimento de doenças associadas ao HHV-8, não pode ser verificada porque todos os pacientes da pesquisa não apresentavam sintomas dessas doenças, no entanto, chama atenção para um acompanhamento futuro.

Em pessoas com SK e sem infecção pelo HIV foi encontrado aumento significativo da produção de IL-2, sugerindo que o HHV-8 estimula a produção da IL-2 pelas células TCD4 [24]. No entanto, a não associação da IL-2 entre os coinfectados e monoinfectados na pesquisa pode ser explicada pelo aumento nos coinfectados da IL-10, que é uma citocina inibidora da síntese de IL-2 [25].

Não ter encontrado associação dos níveis do TNF- α entre os coinfectados e monoinfectados, sugere que os elevados níveis das IL-4 e IL-10, podem ter exercido efeito inibidor da produção do TNF- α [4,26,27].

Assim como Pugliese et al. e Machado et al. não foi encontrado aumento dos níveis do IFN- γ entre coinfectados e monoinfectados. No entanto, Fiorelli et al. [1] relacionaram o aumento do IFN- γ ao início do SK e não às fases anteriores ou mais tardias da doença, ressaltando que os pacientes estudados não tinham o SK.

Em relação à concentração da IL-4 ter sido significativamente maior nos coinfectados, independente da carga viral do HIV ser detectável ou indetectável, apontando que os dois vírus induzem a produção dessa citocina. As concentrações da IL-6 e IL10 foram maiores nos coinfectados com carga viral indetectável, porém o mesmo não foi observado nos indivíduos com carga viral detectável, sugerindo que na presença de carga viral do HIV detectável a coinfeção não influenciaria a produção de IL-6 e IL-10.

Em relação aos níveis de citocinas houve apenas uma correlação inversa entre a IL-10 e contagem do TCD4 nos monoinfectados, porém não podemos verificar qual dessas variáveis está influenciando essa correlação. Por outro lado, no estudo de Akase et al [28], foi encontrada associação de maiores concentrações da IL-10 em PVHA com a baixa contagem de TCD4.

Na pesquisa não foi encontrada uma correlação entre as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e tempo de uso da TARV. No entanto, estudos sobre a interferência do uso de antirretrovirais com níveis das citocinas são conflitantes, considerando que o tratamento não restaura completamente o sistema imunológico do indivíduo e o período de início da TARV muitas vezes é tardio [10]. Portanto, ainda busca-se entender mais profundamente a relação entre a TARV e os níveis de citocinas entre coinfectados comparando-se com monoinfectados.

Em conclusão, o aumento dos níveis de citocinas em coinfectados HIV/HHV-8 sem manifestações clínicas, além de outros fatores poderiam constituir marcadores preditivos ao desenvolvimento de doenças associadas à coinfeção.

Referências

1. Fiorelli, V, Gendelman, R, Sirianni, MC et al (1998) γ -Interferon Produced by CD8+ T Cells Infiltrating Kaposi's Sarcoma Induces Spindle Cells With Angiogenic Phenotype and Synergy With Human Immunodeficiency Virus-1 Tat Protein: An Immune Response to Human Herpesvirus-8 Infection?. Blood 91(3): 956-967.

2. Guedes, F, de Andrade Jr, HF, Fernandes, ER, Tuon, F F, Brasil, RA, Pagliari, C, Duarte, MIS (2008) The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon- γ response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus- infected and uninfected individuals. *British Journal of Dermatology* 159(4):839-846.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08755.x>
3. Qin, Z, Kearney, P, Plaisance, K, Parsons, CH (2010) Pivotal Advance: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded microRNA specifically induce IL-6 and IL-10 secretion by macrophages and monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 86:1–10.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0409251>
4. Ursini, F, Naty, S, Mazzei, V, Spagnolo, F, & Grembiale, RD (2010) Kaposi's sarcoma in a psoriatic arthritis patient treated with infliximab. *International immunopharmacology* 10(7):827-828.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.04.016>
5. Sathish, N, Yuan, Y (2011) Evasion and Subversion of Interferon-Mediated Antiviral Immunity by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: an Overview. *Journal of Virology* 85:10934–10944.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00687-11>
6. Polizzotto, MN, Uldrick, TS, Wang, V, Aleman, K, Wyvill, KM, Marshall, V, Pittaluga, S, O'Mahony, D, Whitby, D, Tosato, G, et al (2013) Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castlemann disease. *Blood* 122: 4189–74198.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519959>
7. Knowlton, ER, Rappocciolo, G, Piazza, P (2014) Human Herpesvirus 8 Induces Polyfunctional B Lymphocytes That. *MBio* 5, e10277-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01277-14.Editor>
8. Machado, PRL, Farias, KJS, Genre, J, Oliveira, CJF, Guedes, PMM, da Fonseca, BAL (2014) Disseminated Kaposi's Sarcoma in Patients with HIV Infection Correlates to High Serum Levels of IL-10. *Viral Immunology* 27: 356–360.
<https://doi.org/10.1089/vim.2013.0134>
- 9, Munoz-Fernandez MA, Navarro J, Garcia A, Punzón C, Fernández-Cruz E, Fresno M (1997) Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. *J Allergy Clin Immunol* 100:838-845.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70282-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70282-3)
10. Tasca, KI, Calvi, SA, Souza, LDRD. (2012). Immunovirological parameters and cytokines in HIV infection. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(6): 663–9.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000600002>
11. Caselli, E, Galvan, M, Cassai, E, Caruso, A, Sighinolfi, L, Di Luca, D (2005) Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood* 106: 2790–2797.

<https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1390>

12. Cahú, GGOM, Morais, VMS, Lopes, T RR, da Silva, DM, Tozetto, M., TR., Pannuti, CS, Coêlho, MRCD (2016) Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *Journal of medical virology* 88:11.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24550>
13. Brasil. Portaria N° 151, october 14 (2009) Secretary of Vigilancy in Health, Ministry of Health, Brasília, DF.
14. Nascimento, MC, de Souza, VA, Sumita, LM, Freire, W, Munoz, F, Kim, J et al (2007). Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *Journal of clinical microbiology* 45(3): 715-720.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01264-06>
15. Guadalupe, M, Pollock, BH, Westbrook, S, Redding, S., Bullock, D., Anstead, G. & Rebeles, J (2011). Risk Factors Influencing Antibody Responses to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent and Lytic Antigens in Patients Under Antiretroviral Therapy in South Texas. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999), 56(1): 83.
<https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181fdc928>
16. Magri, MC, Carbone, PHL, de los Santos-Fortuna, 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. *Journal of medical virology* 81(7): 1292-1297.
<https://doi.org/10.1002/jmv.21513>
17. Altuğlu, İ, Yolcu, A, Öcek, ZA, Yazan, SR, Gökengin, D (2016). Investigation of human herpesvirus-8 seroprevalence in blood donors and HIV-positive patients admitted to Ege University Medical School Hospital, Turkey. *Mikrobiyoloji bulteni* 50(1): 104-111.
18. Zeng, Y, Zhang, X, Huang, Z, Cheng, L, Yao, S, Qin, D et al (2007). Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. *Journal of virology* 81(5): 2401-2417.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02024-06>
19. Pati, S, Foulke, JS, Barabitskaya, O, Kim, J, Nair, BC, Hone, D et al (2003). Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Journal of virology* 77(10): 5759-5773.
<https://doi.org/10.1128/JVI.77.10.5759-5773.2003>
20. Valentin, A, Lu, W, Rosati, M, Schneider, R, Albert, J, Karlsson, A, Pavlakis, GN, (1998). Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(15): 8886-8891.
21. Pugliese A, Torre, D, Saini, A, Pagliano, G, Gallo, G, Pistono, PG, Paggi, GC (2002) Cytokine detection in HIV-1/HHV-8 co-infected subjects. *Cell Biochemistry and Function* 20: 191–194. <https://doi.org/10.1002/cbf.935>

22. Xie, J, Pan, H, Yoo, S, Gao, SJ (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Virology* 79 (24): 15027–37.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15027-15037.2005>
23. Oksenhendler, E, Carcelain, G, Aoki, Y, Boulanger, E, Maillard, A, Clauvel, JP, & Agbalika, F (2000). High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemann disease in HIV-infected patients. *Blood* 96(6): 2069-2073.
<https://doi.org/10.1056/nejm199805283382204>
24. Pellet, C, Kerob, D, Dupuy, A, Carmagnat, MV, Mourah, S, Podgorniak, MP et al. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viremia is associated with the progression of classic and endemic Kaposi's sarcoma. *Journal of Investigative Dermatology* 126(3): 621–627.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700083>
25. Weiss, E, Mamelak, AJ, La Morgia, S, Wang, B, Feliciani, C, Tulli, A, Sauder, DN (2004). The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50(5): 657-675.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.11.075>
26. De Oliveira, CMB, Sakata, RK, Issy, AM, Gerola, LR, & Salomão, R (2011). Cytokines and pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 61(2): 255–265.
[https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)
27. Chung, YH, Means, RE, Choi, JK, Lee, BS, Jung, JU (2002). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus OX2 glycoprotein activates myeloid-lineage cells to induce inflammatory cytokine production. *Journal of Virology* 76(10): 4688–4698.
<https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.4688-4698.2002>
28. Akase, IE, Musa, BO, Obiako, RO, Ahmad Elfulatiy, A, Mohammed, AA (2017). Immune Dysfunction in HIV: A Possible Role for Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in HIV Staging. *Journal of immunology research*.
<https://doi.org/10.1155/2017/4128398>

6. CONCLUSÕES

- As IL-4, IL-6 e IL-10 foram significativamente associadas em pessoas coinfectadas com HIV/HHV-8 quando comparadas com monoinfectados com HIV;
- A IL-4 foi associada com a carga viral detectável e indetectável do HIV nos coinfectados e monoinfectados e IL-6 e IL-10 com a carga viral indetectável do HIV;
- A mediana das contagem de TCD4 não se mostrou associada entre coinfectados e monoinfectados;
- Houve uma correlação inversa entre os níveis da IL-10 e a contagem de TCD4 nos monoinfectados com HIV;
- Não houve correlação entre IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e o tempo de uso da TARV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 2012; 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- ABLASHI, D. V.; CHATLYNNE, L. G.; WHITMAN, J. E, CESARMAN E. Spectrum of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, or Human Herpesvirus 8, Diseases. **Clin Microbiol Reviews**. 2002; p. 439–464.
- ABOULAFIA, D. et al. Intravenous recombinant tumor necrosis factor in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 1989; v. 2, n. 1, p. 54-58.
- ANTMAN K.; CHANG, Y. Kaposi's sarcoma. **N Engl J Med**. 2000; v. 342, n. 14, p. 1027-1038.
- BAROZZI, P. et al. Post-transplant Kaposi's sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. **Nature medicine**. 2003; v. 9, n. 5, p. 554–561.
- BENJAMIN, D. K, NOBLOCK, T. J., DAYTON, M. A. Human B cell interleukin-10 cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukine-10. **Blood**. 1992; v. 80, n. 5, p. 1289-1298.
- BERAL, V. Kaposi's Sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? **Lancet**. 1990; v.8682, n. 335, p. 123-128.
- BIGGAR, R. J. et al. Human herpesvirus 8 in brazilian amerindians: A hyperendemic population with a new subtype. **J. Infect. Dis**. 2000; v. 181, p. 1562–1568.
- BONSIGNORE, L. et al. A role for MALT1 activity in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency and growth of primary effusion lymphoma. **Leukemia**, 2016.

BORGES, J. D. et al. Transmission of Human Herpesvirus Type 8 Infection Within Families in American Indigenous Populations From the Brazilian Amazon. **The Journal of Infectious Diseases**. 2012; v. 205, p. 1869–76.

BRASIL. Portaria Nº 151, de 14 de outubro de 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF. 2009.

CAHÚ, G. G. O. M. Prevalência e Fatores de Risco da Infecção Pelo HHV-8 em Pessoas Vivendo com HIV/AIDS Acompanhadas em Serviço de Referência no Recife/PE. Dissertação de mestrado em Medicina tropical, UFPE, 2015.

CAHÚ, G. G. O. M. et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **Journal of medical virology**. 2016.

CAI, Q. et al. Molecular biology of Kaposi's sarcoma herpesvirus and related oncogenesis. **Advances in virus research**. 2010, v. 78, p. 87.

CARBONE, P. H. L. Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo. Tese de Doutorado, USP, 2002.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nature immunology**. 2004; v. 5, n. 10, p. 981-986.

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

CESARMAN, E. et al. In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. **Blood**. 1995; v. 86, p. 2708–14.

CHAKRABORTY, S.; VEETIL, M. V.; CHANDRAN, B. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus entry into target cells. **Frontiers in Microbiology**. 2012; v. 20, p. 3-6.

CHANG, Y. et al. Identification of herpesviruslike DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**. 1994; v. 266, p. 1865–1869.

CHEN, Y. B.; RAHEMTULLAH, A.; HOCHBERG, E. Primary effusion lymphoma. **Oncologist**. 2007; v. 12, p. 569-576.

CHUNG, Young-Hwa et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus OX2 glycoprotein activates myeloid-lineage cells to induce inflammatory cytokine production. **Journal of virology**. 2002 v. 76, n. 10, p. 4688-4698.

COUSINS, E. NICHOLAS, J. Molecular Biology of Human Herpesvirus 8: Novel Functions and Virus–Host Interactions Implicated in Viral Pathogenesis and Replication. **Viruses and Human Cancer**. 2014. p. 227-268.

CUNHA, Andréa Mendonça Gusmão. Soroprevalência e epidemiologia molecular do herpesvírus humano 8 (HHV-8) em populações brasileiras. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, 2005.

DA SILVA, T. M.. Perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- γ analisadas por RT-PCR em tecido de mucosa nasal de pacientes portadores de rinite alérgica. Dissertação de Mestrado em Medicina, UFMG, 2007.

DEDICOAT, M.; NEWTON, R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. **British journal of cancer**. 2003; v. 88, n. 1, p. 1-3.

DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. Cytokines and pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**. 2011; v. 61, n. 2, p. 255-265.

DE SANJOSE, S. et al. Geographic variation in the prevalence of kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. **J. Infect. Dis**. 2009; v. 199, p. 1449–1456.

- EDELMAN, D.C. Human herpesvirus 8—a novel human pathogen. **Virology Journal**. 2005 v. 2, p. 78.
- FELLER, J.; LEMMER, J. Insight into pathogenic events of HIV-associated Kaposi Sarcoma and immune reconstitution syndrome related Kaposi Sarcoma. **Infect Agent Cancer**. 2008; n. 21, v. 3, p. 1.
- FERREIRA, K. A. S. L. Dor e qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer: influência das citocinas pró-inflamatórias TNF – alfa, IL-6, IL-8, e IL-1beta. Tese de doutorado em enfermagem, USP, 2008.
- FIORELLI, V. et al. Gamma-interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? **Blood**. 1998; v. 91, p. 956–967.
- FOREMAN, L. W. et al. Identification of LTR-specific small non-coding RNA in FeLV infected cells. **FEBS letters**. 1997; v. 583, n. 8, p. 1386-1390.
- FREDRICKS, D.N. et al. Human herpesvirus 8 and sarcoidosis. **Clinical Infectious Diseases**. 2002; v.34, n. 4, p.559-560.
- GALLAFENT, J. H. et al. Profile of patients with Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. **J Clin Oncol**. 2005; v. 23, p. 1253–1260.
- GANEM, D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. **The Journal of clinical investigation**. 2010; v. 120, n. 4, p. 939-949.
- GANTT, S. et al. The HIV Protease Inhibitor Nelfinavir Inhibits Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2011; v. 55, n. 6, p. 2696–2703.

GIFFIN, L. et al. Modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interleukin-6 function by hypoxia-upregulated protein 1. **Journal of virology**. 2014; v. 88, n. 16, p. 9429-9441.

GUEDES, F. et al. The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon- γ response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus-infected and uninfected individuals. **British Journal of Dermatology**. 2008; v. 159, n. 4, p. 839-846.

GRUNDHOFF A, GANEM D. Inefficient establishment of KSHV latency suggests and additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. **J Clin Invest**. 2004; v.113; n. 1, p. 124-36.

HENGGE, U. R. et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. **Lancet Infected Dis**. 2002; v. 2, n. 5, p. 281-292.

HENNEY, Christopher S. et al. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. **Nature**. 1981; v. 291, n. 5813, p. 335-338.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Biological Agents, A Review of Human Carcinogen. Lyon, France. **International Agency for Research on Cancer**. 2012; v. 100 B.

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

JACOBSON, L. P.; ARMENIAN, H. K. An integrated approach to the epidemiology of Kaposi's sarcoma. **Current opinion in oncology**. 1995; v. 7, n. 5, p. 450-455.

JENNER, R. G.; BOSHOFF, C. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2002; v. 1602, p. 1-22.

KAPLAN, L. D. Human herpesvirus-8: Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. **ASH Education Program Book**. 2013; v. 2013, n. 1, p. 103-108.

KAPOSI, M. Idiopathisches multiples pigmentsarkom der haut. **Arch Dermatol Syph.** 1872; v. 4, p. 265-273.

KEDES, D. H.; GANEM, D. Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. **The Journal of Clinical Investigation.** 1997; v. 99, p. 2082-2086.

KELLY, G. D. et al. Purified Tat induces inflammatory response genes in Kaposi's sarcoma cells. **Aids.** 1998; v. 12, n. 14, p. 1753-1761.

KNOWLTON, E.R. et al. Human herpesvirus 8 induces polyfunctional B lymphocytes that drive Kaposi's sarcoma. **MBio.** 2014; v. 5, n. 5, p. e01277-14.

KROWN S. E. Highly active antiretroviral therapy in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: Implications for the design of the therapeutic trials in patients with advanced , symptomatic Kaposi's sarcoma. **J Clin Oncol.** 2004; v. 22, n. 3, p. 399-402.

LÄHDEVIRTA, J. et al. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **The American journal of medicine.** 1988; v. 85, n. 3, p. 289-291.

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

LEAO, J. C.; PORTER, S.; SCULLY, C. Human herpesvirus 8 and oral health care: An update. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics.** 2000; v. 90, p. 694-704.

LEVI, J. E. et al. Non-Detection of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-Seropositive Blood Donors from Three Brazilian Regions. **PLoS ONE.** 2011; v. 6, n. 8, p. 1-4.

LI, S. et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Epidemiology and Molecular Biology. **Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology.** 2017; p. 91-127.

LOGAN, C. et al. Rapid Multiplexed Immunoassay for Detection of Antibodies to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. **PloS one**. 2016; v. 11, n. 9, p. e0163616.

LUPPI, M. et al. Molecular evidence of organ-related transmission of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients. **Blood**. 2000; v. 96, p. 3279–3281.

MACHADO, P.R.L. et al. Disseminated Kaposi's sarcoma in patients with HIV infection correlates to high serum levels of IL-10. **Viral immunology**. 2014; v. 27, n. 7, p. 356-360.

MALLERY, S. R. et al. Thiol redox modulation of tumor necrosis factor- α responsiveness in cultured AIDS-related Kaposi's sarcoma cells. **Journal of cellular biochemistry**. 1998; v. 68, n. 3, p. 339-354.

MALNATI, M. et al. Retrospective analysis of HHV-8 viremia and cellular viral load in HIV-seropositive patients receiving interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy. **Blood**. 2002; v. 100, n. 5, p. 1575-1578.

MILES, S. Pathogenesis of HIV-related Kaposi's sarcoma. **Curr Opin Oncol**. 1994; v. 6; p. 497–502.

MINHAS, V.; WOOD, C. Epidemiology and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Viruses**. 2014; v. 6, n. 11, p. 4178-4194.

MOHANNA, A.; MACO, V.; BRAVO, F.; GOTUZZO, E.; Epidemiology and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma, seroprevalence, and variants of human herpesvirus 8 in South America: a critical review of an old disease. **Int J Infect Dis**. 2005; v. 9, p. 239-250.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. **J Allergy Clin Immunol**. 1997. v.100, p. 838-845.

NAKAMURA, S. et al. Kaposi's Sarcoma Cells: Long-Term Culture with Growth Factor from Retrovirus-Infected CD4⁺ T Cells. **Science**. 1988; p. 426-430.

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

OHNER, E. et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. **Systematic reviews**. 2014; v. 3, n. 1, p. 1.

OKSENHENDLER, Eric et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemans disease in HIV-infected patients. *Blood*. 2000, v. 96, n. 6, p. 2069-2073.

OSAWA, M. et al. Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Infectious Agents and Cancer**. 2016; v. 11, n. 1, p. 1.

OXHOLM, A. et al. Epidermal tumour necrosis factor α and interleukin 6-like activities in AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Apmis**. 1989; v. 97, n. 1-6; p. 533-538.

PAOLI, P. Human herpesvirus 8: an update. **Microbes and infection**. 2004; v. 6, n. 3, p. 328-335.

PALELLA, F. J. J. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. **The New England Journal of Medicine**. 2003; v. 43, p. 1260-1268.

PATI, S. et al. Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat. **Journal of virology**. 2003; v. 77, n. 10, p. 5759-5773.

PELLET, C. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viremia is associated with the progression of classic and endemic Kaposi's sarcoma. **Journal of Investigative Dermatology**. 2006; v. 126, n. 3, p. 621-627.

PIERROTTI, L. C. et al. Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Infection in HIV/AIDS Patients From Santos, Brazil: Seroprevalence and Associated Factors. **Sexually Transmitted Diseases**. 2005; v. 32, n. 1, p.57–63.

POLIZZOTTO, M. N. et al. Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. **Blood**. 2013; v. 122, n. 26, p. 4189-4198.

PUGLIESE, A. et al. Cytokine detection in HIV-1/HHV-8 co-infected subjects. **Cell Biochem Funct**, v. 20, p. 191–194, 2002.

QIN, Z. et al. Pivotal advance: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded microRNA specifically induce IL-6 and IL-10 secretion by macrophages and monocytes. **Journal of leukocyte biology**. 2010; v. 87, n. 1, p. 25-34.

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

RADU, O.; PANTANOWITZ, L. Kaposi Sarcoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, p. 289–294, 2013.

REINHEIMER, C. et al. Do fewer cases of Kaposi's sarcoma in HIV- infected patients reflect a decrease in HHV-8 seroprevalence? **Medical Microbiology and Immunology**. 2011; v. 200, p. 161-164.

ROHNER, E. et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. **Systematic Reviews**. 2014; v. 3, p. 11.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. **Fields Virology**. 1996; 3ª edição, FIELDS, KNIPE, HOWLEY, Ed. Philadelphia, p. 2221-2230.

RUBIN, B. Y. et al. Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. **Journal of Experimental Medicine**. 1986; v. 164, n. 4, p. 1350-1355.

RUSSO, J. J. et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma associated-herpesvirus (HHV8). **Proc Natl Acad Sci USA**. 1996; v. 93, n. 25, p. 14862-14867.

SAID, J. W. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8 or HHV-8) in primary effusion lymphoma: ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cells. **Blood**. 1996; v. 87, p. 4937-4943.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. W. (2015) *Virologia Humana*. Terceira Edição. **Guanabara Koogan**, 2015.

SATHISH, N.; WANG, X.; YUAN, Y. Tegument proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-herpesviruses. **Frontiers in Microbiology**. 2012; v. 3, p. 98.

SATHISH, N.; YUAN, Y. Evasion and subversion of interferon-mediated antiviral immunity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: an overview. **Journal of virology**, 2011; v. 85, n. 21, p. 10934-10944.

SCHNEIDER, J. W.; DITTMER, D. P. Diagnosis and Treatment of Kaposi Sarcoma. **American Journal of Clinical Dermatology**. 2017; p. 1-11.

SCHULZ, T. F. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. **J Pathol**. 2006; v. 208, p. 187-198.

SEABERG, E. C. et al. Cancer incidence in the multicenter aids cohort study before and during the HAART era. **Cancer**. 2010; v. 116, n. 23, p. 5344-5347.

SEMEERE, A. S.; BUSAKHALA, N.; MARTIN, J. N. Impact of antiretroviral therapy on the incidence of Kaposi's sarcoma in resource-rich and resource-limited settings. **Curr Opin Oncol**. 2012; v. 24, p. 522-530.

SGADARI, C.; BARILLARI, G.; TOSCHI, E.; et al. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. **Nature Medicine**. 2002; v. 8, n. 3.

SIMONETTI, F. R. et al. Relapse of Kaposi's Sarcoma and HHV-8 viremia in an HIV-infected patient switching from protease inhibitor to integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. **Journal of Clinical Virology**. 2016; v. 74, p. 75-77.

SMITH, K. A. Low-dose daily interleukin-2 immunotherapy: accelerating immune restoration and expanding HIV-specific T-cell immunity without toxicity. **Aids**. 2001; v. 15, p. S28-S35.

SOUZA, J. R. M. et al. Serum levels of interleukin-6 (Il-6), interleukin-18 (Il-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos brasileiros de cardiologia**. 2008; v. 90, n. 2, p. 94-99.

SPIRA, T. J. et al. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. **Journal of Clinical Microbiology**. 2000; v. 38, p. 2174–2180.

STEBBING, J. et al. HIV associated multicentric Castleman's disease. **Am J Hematol**. 2008; v. 83, p. 498-503.

TAMBUSSI, G. et al. Efficacy of low-dose intermittent subcutaneous interleukin (IL)–2 in antiviral drug–experienced human immunodeficiency virus–infected persons with detectable virus load: a controlled study of 3 il-2 regimens with antiviral drug therapy. **The Journal of infectious diseases**. 2001; v. 183, n. 10, p. 1476-1484.

ULDRICK, T. S. et al. An interleukin-6-related systemic inflammatory syndrome in patients co-infected with Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and HIV but without Multicentric Castleman disease. **Clinical Infectious Diseases**. 2010; v. 51, n. 3, p. 350-358.

URSINI, F. et al. Kaposi's sarcoma in a psoriatic arthritis patient treated with infliximab. **International immunopharmacology**; 2010; v. 10, n. 7, p. 827-828.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. Q.. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 2007; v. 73, n. 1, p. 123-127.

WU, W. et al. Inhibition of HHV-8/KSHV infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by azidothymidine and interferon- α . **Leukemia research**. 2005; v. 29, n. 5, p. 545-555.

TASCA, K. I.; CALVI, S. A.; SOUZA, L. D. R. D. Immunovirological parameters and cytokines in HIV infection. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2012; v. 45 n. 6. p. 663–9.

XIE, J. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of virology**. 2005; v. 79, n. 24, p. 15027-15037.

ZAGO, A. et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 and its association with Kaposi sarcoma in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**. 2000; v. 27, p. 468-472.

ZENG, Y. et al. Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. **Journal of virology**. 2007; v. 81, n. 5, p. 2401-2417.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Formulário de Pesquisa

DADOS INDIVIDUAIS	
Data da entrevista <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Registro do paciente <input type="text"/> <input type="text"/>
1. Identificação do paciente na pesquisa <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	2. Data de nascimento <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
3. Nome do paciente na pesquisa _____ _____	4. Sexo biológico 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino <input type="checkbox"/>
Endereço _____ _____	5. Estado civil atual 1. Solteiro <input type="checkbox"/> 2. Casado 3. Viúvo 4. Divorciado 5. União estável
DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS	
6. Qual a sua raça? 01. Branca 02. Preta 03. Amarela 04. Parda 05. Indígena <input type="text"/> <input type="text"/>	
7. Em que você trabalha ou trabalhou nos últimos 6 meses? _____	8. Qual o seu rendimento em Reais no mês passado? 1- Tem 0- Não Tem <input type="checkbox"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
9. Qual é o seu grau de formação escolar? 01. Analfabeto, fundamental 1 incompleto ou primário incompleto 02. Alfabetização de adultos, Primário completo, Fundamental 1 Completo ou Fundamental 2 Incompleto 03. Ginásial completo, Colegial incompleto Fundamental 2 Completo ou Médio Incompleto 04. Colegial completo, Superior incompleto, Médio Completo ou Colegial Completo	05. Pré-vestibular 06. Superior – Graduação 07. Mestrado 08. Doutorado <input type="text"/> <input type="text"/> 09. Pós-doutorado 10. Não concluiu nenhum curso

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

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

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

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

Recife, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do participante (ou responsável legal): _____

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

Assinatura da testemunha 1: _____

Assinatura da testemunha 2: _____

APÊNDICE C – Artigo Científico

Instruções para os autores disponível em:

http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/705?detailsPage=pltdci_1060106

ASSOCIATION OF IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α AND IFN- γ WITH HIV VIRAL LOAD AND TCD4 COUNTING IN PERSONS LIVING WITH HIV / AIDS AND COINFECTED WITH HHV-8

Dayvson Maurício da Silva^{1,2}, Juliana Prado Gonçalves^{1,2}, Virginia Maria Barros de Lorena³, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2,4}

¹ *Virology Division, Laboratory of Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;*

² *Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center of Health Sciences (CCS), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;*

³ *Laboratory of Imunopatologia, Center of Search Aggeu-Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil;*

⁴ *Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biosciences (CB), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.*

E-mail: rcoelholika@gmail.com Phone: +55 (81) 2126-8586

Abstract: In people with diseases associated with human herpesvirus type 8, such as Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease and primary effusion lymphoma in people living with HIV/AIDS, the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ were reported. Considering that HHV-8 may influence the immune response of the host by increasing cytokine levels, increasing HIV viral load and developing diseases, we were motivated to carry out the present study comparing IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in HIV/HHV-8 coinfecting and monoinfected with HIV. The knowledge that there is an increase in the levels of cytokines in coinfecting without diseases associated with coinfection could be predictive markers and inspire to investigate more factors that can develop these clinical manifestations. A case-control study was carried out with 56 serum samples from people coinfecting and 95 from monoinfected. Cytokine quantification was performed by flow cytometry using commercial BD Cytometric Bead Array. There was an association of IL-4, IL-6 and IL-10 cytokines coinfecting compared to monoinfected. IL-4 was significantly increased in those co-infected with detectable and undetectable HIV viral load and IL-6 and IL-10 in those co-infected with undetectable HIV viral load. There was an inverse correlation between IL-10 levels and TCD4 counts in HIV monoinfected, but no association was found between the median of CD4 counts between coinfecting and monoinfected. The increase in cytokines in coinfecting underscores the importance of monitoring these patients, since it may be a predictive marker for HHV-8 associated diseases in HIV/HHV-8 coinfection.

Key-words: Coinfection. HIV. HHV-8. cytokines.

Introduction

In people living with HIV / AIDS with diseases associated with human herpesvirus type 8 (HHV-8), such as Kaposi's sarcoma (SK), multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL) an increase in cytokines, including TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10 and IFN- γ [1-8]. HHV-8 can also influence IL-2 and IL-4 cytokine levels (PATI, et al., 2003, PELLET, et al., 2006). In addition, increased serum levels of pro-inflammatory and inflammatory cytokines contribute to viral replication and HHV-8 associated manifestations [9,10].

For Caselli et al. [11], human chemokine homologous products produced by HHV-8 can induce the production of inflammatory cytokines in cells, suggesting that this could cause an increase in HIV replication, although it is not known which ones would be increased. Cahú et al. [12] showed that antibodies to HHV-8 were more frequent in individuals with detectable HIV viral load when compared to those with undetectable viral load. Therefore, HIV / HHV-8 coinfection could lead to a worse prognosis, since a significant increase in inflammatory cytokines would lead to increased production and recruitment of immune cells, contributing to HIV replication.

Considering that HHV-8 may influence the host immune response by increasing levels of cytokines, increasing HIV viral load, and developing diseases associated with coinfection, the present study aimed to compare the levels of IL-2 cytokines, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in HIV / HHV-8 coinfectados and monoinfected with HIV. The knowledge that there is an increase in the levels of cytokines in coinfectados without diseases associated with coinfection could be predictive markers for their development and inspire new research to explore more factors that may develop these clinical manifestations.

Materials and methods

Design, population and study site

An analytical case-control study was carried out, where the cases were PLHA with the serological diagnosis of the HHV-8 infection detected by the ELISA, in which antibodies were identified against structural and non-structural proteins of HHV-8, being characterized as HIV co-infected / HHV-8, according to Cahú et al. [12]. On the other hand, the controls were individuals with a serological diagnosis of HIV infection, established according to Administrative Rule no. 151 of October 14, 2009 [13], being characterized as monoinfected by HIV. All were accompanied at the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic (DIP) of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), PE, Brazil, both sexes and over 18 years old, coinfectados with HIV / HHV-8 and controls monoinfected with HIV.

Enzyme Immunoassay for HHV-8

The serological diagnosis of HHV-8 was performed through the indirect in-house ELISA described by Nascimento et al. [14].

Flow cytometry

The flow cytometry for the quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ was carried out at the Immunopathology Department of the Aggeu Magalhães Research Center in Recife, with commercial kits (Becton Dickinson Cytometric Bead Array CBA and Human Soluble Protein Master Buffer Kit) and using the BD FACSCalibur™ cytometer.

Statistical analysis

The D'Agostino & Pearson omnibus test was initially applied to verify the normality of the data obtained. Subsequently, the Fisher test and the chi-square test were used to analyze demographic variables. Analysis of the association of cytokine levels, HIV viral load, and TCD4 count was performed by the Mann-Whitney test. For the correlation between the time of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) use and the TCD4 count with cytokine levels, the Spearman test was applied using the GraphPad Prism program (version 6.0-San Diego / CA / USA).

Results

A total of 56 HIV/HHV-8 coinfecting individuals and 95 HIV monoinfected individuals, both with a mean age of 43 years. The other socio-demographic variables are shown in table 1. In the coinfecting, 12.5% (7/56) had detectable HIV viral load and 26.3% (25/95) of the monoinfected. The mean time of HIV diagnosis and time of use of ART in the coinfecting patients was 91.6 and 74.9 months, respectively, and in the monoinfected patients, 90.7 and 79.3 months. The median TCD4 counts, coinfecting and monoinfected, were 572 cells / mm³ and 479 cells / mm³, respectively. No significant differences were found between TCD4 counts between groups. These clinical manifestations may develop.

Table 1. Socio-demographic variables of patients coinfecting with HIV / HHV-8 and monoinfected by HIV.

	HIV/HHV-8 %(n)	HIV %(n)	<i>p</i>
Sex			0,1654*
Male	71,4% (40/56)	60% (57/95)	
Women	28,6% (16/56)	40% (38/95)	
Marital status			0,1336**
Single	60,7% (34/56)	47,5% (45/95)	
Married	19,7% (11/56)	33/95 (34,7%)	
Divorced	1,8% (1/56)	4,2% (4/95)	
Widower	5,3% (3/56)	1% (1/95)	
Stable Union	12,5% (7/56)	12,6% (12/95)	
Ethnicity			0,4305**
Brown	57,1% (32/56)	63,1% (60/95)	
White	23,2% (13/56)	13,7% (13/95)	
Black	19,7% (11/56)	22,1% (21/95)	
Indigenous	0% (0)	1% (1/95)	
Formation			0,6232**
Illiterate	5,3% (3/56)	7,4% (7/95)	
Elementary School	42,8% (24/56)	49,5% (47/95)	
High School	46,4% (26/56)	35,7% (34/95)	
Higher education	5,3% (3/56)	7,4% (7/95)	

* *p* obtained by Fisher's test. ** *p* obtained by chi-square test

The Table 2 shows the median concentrations of cytokines in HIV / HHV-8 coinfecting and monoinfected with HIV.

Table 2: Median of the concentrations of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in HIV / HHV-8 coinfecting persons and monoinfected with HIV.

Citocinas	HIV/HHV-8 Median in pg/mL	HIV Median in pg/mL	<i>p</i> *
IL-2	5,365 (4,53 – 48,23)	5,47 (4,41 – 7,07)	0,2126
IL-4	6,12 (5,42-33)	5,93 (5,32 – 6,78)	0,0030
IL-6	8,62 (6,59 – 36,37)	7,93 (5,97 – 144,76)	0,0319
IL-10	7,17 (6,44 – 42,62)	6,99 (6,22 – 16,15)	0,0042
TNF- α	5,495 (4,71 – 68,51)	5,42 (3,68-6,83)	0,2785
IFN- γ	6,195 (5,23 – 21,46)	6,09 (4,93 – 16,36)	0,0740

* *p* obtained by the Mann Whitney test.

The medians of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ dosages for HIV viral load among coinfecting and mono-infected persons are presented in Table 3.

Table 3: Medians of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ dosages for detectable and undetectable HIV viral load of HIV / HHV-8 coinfecting individuals and mono-infected with HIV.

Citocinas	Detectable VL of HIV Median in pg/mL		p^*	Undetectable VL of HIV Median in pg/mL		p^*
	HIV/HHV-8 (n=7)	HIV (n=25)		HIV/HHV8 (n=49)	HIV (n=70)	
IL-2	5,4 (4,99 – 48,23)	5,47 (4,41 – 6,51)	0,680	5,33 (4,53 – 7,15)	5,47 (4,73 – 7,07)	0,196
IL-4	6,37 (5,77 – 33)	5,88 (5,32 – 6,48)	0,022	6,09 (5,42 – 6,9)	5,93 (5,32 – 6,78)	0,023
IL-6	9,49 (7,61 – 36,37)	9,12 (7,06 – 24,85)	0,338	8,42 (6,59 – 21,51)	7,51 (5,97 – 144,76)	0,004
IL-10	7,53 (6,52 – 34,46)	7,11 (6,44 – 11,2)	0,338	7,15 (6,44 – 42,62)	6,95 (6,22 – 16,15)	0,002
TNF- α	5,13 (4,89 – 68,51)	5,47 (4,71 – 6,49)	0,452	5,52 (4,71 – 6,32)	5,42 (3,68 – 6,83)	0,135
IFN- γ	6,48 (5,75 – 21,46)	6,17 (5,31 – 16,36)	0,273	6,17 (5,23 – 7,14)	6,04 (4,93 – 8,18)	0,089

* p obtained by the Mann Whitney test.

The correlation between concentrations of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ and TCD4 count in coinfecting and mono-infected patients with undetectable HIV viral load is shown in figure 1.

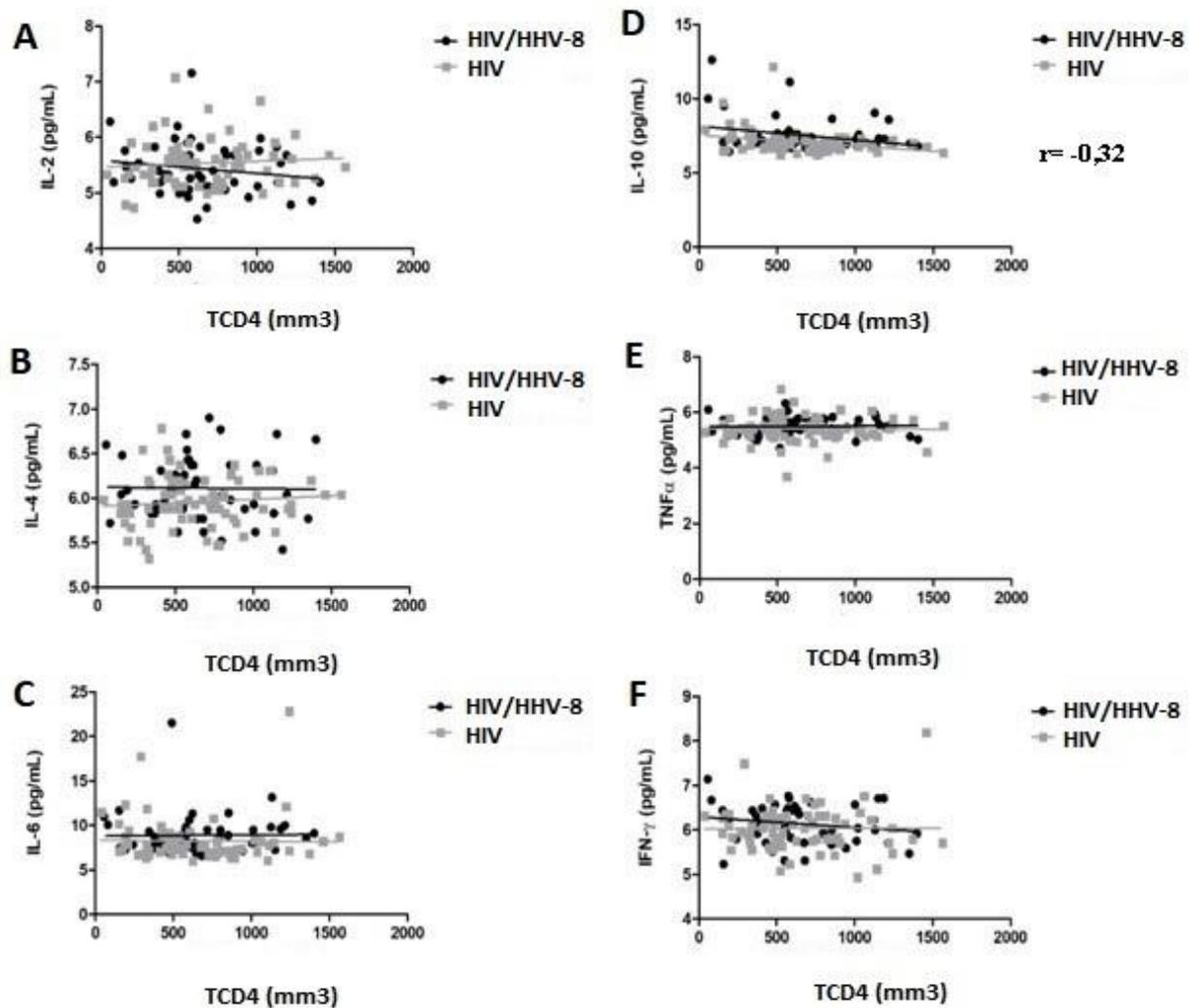


Figure 1. 1A. Spearman correlation between IL-2 and TCD4 counts between coinfecting (n = 46, $r = -0.1516$ and $p = 0.2983$) and mono-infected (n = 70, $r = 0.0838$ and $p = 0.4935$); 1B. Spearman correlation between IL-4 and TCD4 counts among coinfecting patients (n = 49, $r = 0.001$ and $p = 0.9942$) and mono-infected patients (n = 70, $r = 0.1052$ and $p = 0.3896$). 1C. Spearman correlation between IL-6 and TCD4 counts among coinfecting patients (n = 49, $r = -0.1116$ and $p = 0.4209$) and mono-infected patients (n = 70, $r = -0.1116$ and $p = 0.4209$); 1D. Spearman correlation between IL-10 and TCD4 counts between coinfecting (n = 49, $r = -0.1209$ and $p = 0.4079$) and mono-infected (n = 70, $r = -0.3257$ and $p = 0.0063$); 1E. Spearman correlation between TNF- α and TCD4 counts between coinfecting (n = 49, $r = 0.01712$ and $p = 0.9071$) and mono-infected (n = 70, $r = 0.0234$ and $p = 0.8484$); 1F. Spearman correlation between IFN- γ and TCD4 count between coinfecting (n = 49; $r = -0.11728$ and $p = 0.2350$) and mono-infected (n = 70; $r = -0.1054$ and $p = 0.3888$).

The correlation between the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ concentrations and the time to use of HAART in coinfecting and mono-infected patients with undetectable HIV viral load is shown in figure 2.

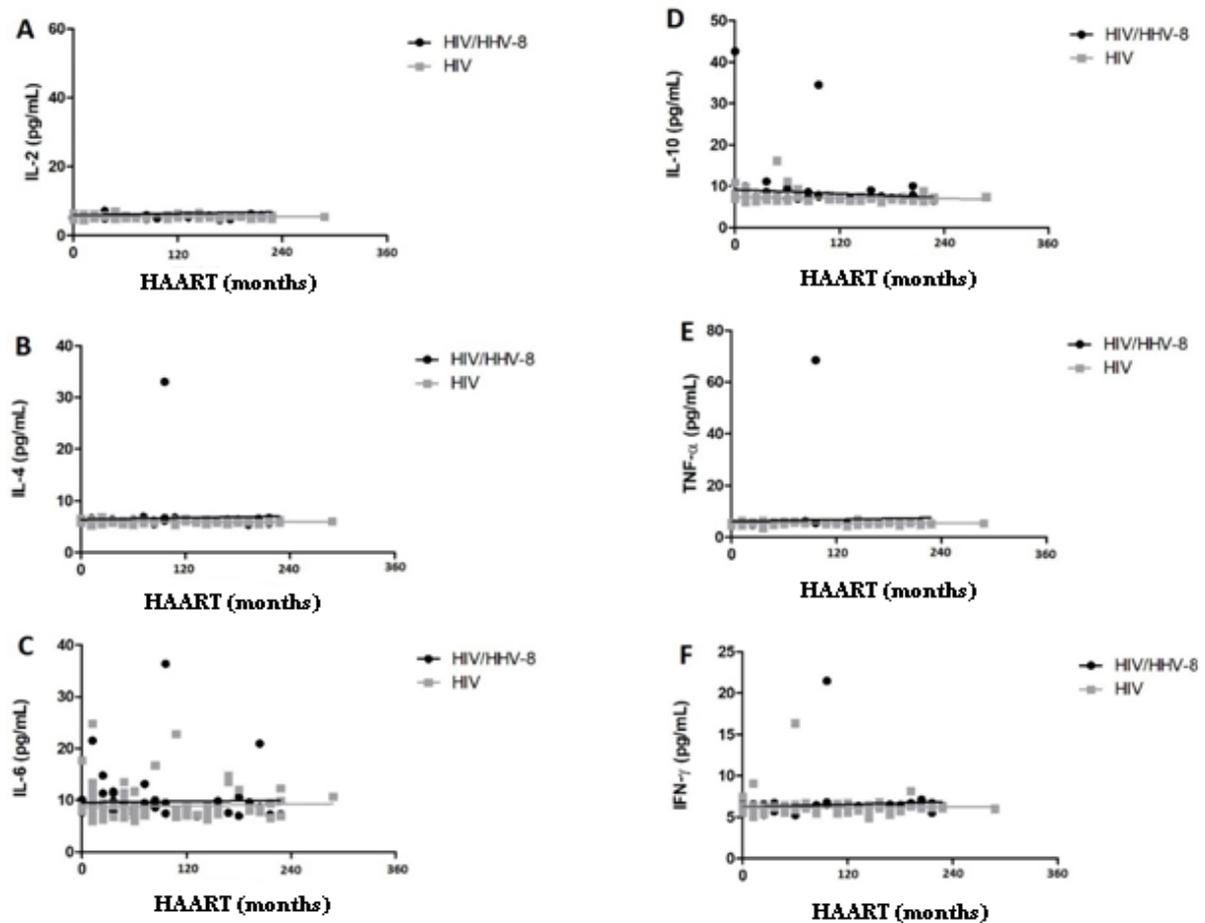


Figure 2. 2A. Spearman correlation between IL-2 and time of HAART between coinfectd (n = 46, $r = 0.2234$ and $p = 0.0979$) and monoinfected (n = 70, $r = -0.0260$ and $p = 0.8024$); 2B. Spearman correlation between IL-4 and time of HAART (n = 49, $r = 0.1435$ and $p = 0.2915$) and monoinfected (n = 70, $r = -0.004$ and $p = 0.9677$). 2C. Spearman correlation between IL-6 and time of HAART among coinfectd patients (n = 49, $r = -0.1050$ and $p = 0.4414$) and monoinfected patients (n=70, $r = 0.0370$ and $p = 0.7218$); 2D. Spearman's correlation between IL-10 and time of HAART among coinfectd patients (n = 49, $r = -0.0050$ and $p = 0.9708$) and monoinfected patients (n = 70, $r = -0.0343$ and $p = 0.7414$); 2E. Spearman correlation between TNF- α and time of use of HAART among coinfectd patients (n = 49, $r = 0.2209$ and $p = 0.1272$) and monoinfected patients (n = 70, $r = 0.0084$ and $p = 0.9356$); 2F. Spearman correlation between the IFN- γ and the time of HAART use between coinfectd (n = 49, $r = 0.2150$ and $p = 0.2350$) and monoinfected (n = 70, $r = -0.1695$ and $p = 0.1005$).

Discussion

Regarding the socio-demographic variables, our data corroborate with worldwide studies [12,15,16] that show a higher frequency of infection of both coinfectd and monoinfected individuals among males, mean age of 43 years, brown ethnicity and low schooling. The median TCD4 count showed no association between coinfectd and monoinfected, although it was higher in the coinfectd, corroborating with Altuđlu et al. [17] who also found no association.

Increased levels of IL-4 in coinfectd cells corroborate with data found by Zeng, et al. [18] suggesting that this increase may occur by inducing the HIV Tat protein and activating tyrosine kinase 6 (STAT6), the HHV-8 transcription protein, contributing to the replication of this virus. In addition, HHV-8 encodes a G protein-coupled viral receptor (vGPCR) that has been implicated in the pathogenesis of KS and activates an activated T-cell nuclear transcription factor (NF-AT), which is important in regulating the expression of IL-4 [19]. In addition, Valentin et al. [20] IL-4 suggest that increased IL-4 might be responsible for increasing HIV viral load in HIV / HHV-8 coinfectd patients. In contrast, Publiese et al. [21] found no association of IL-4 levels between coinfectd and monoinfected by HIV. We emphasize that the mentioned study studied a small number of participants, being 24 coinfectd patients and 20 monoinfected patients.

Research has shown an increase in IL-6 and IL-10 levels in coinfectd patients, suggesting that these patients are at an increased risk of developing HHV-8 associated diseases. Pollizzotto et al. [6] showed that high

levels of IL-6 were correlated with the symptoms of MCD and that IL-6 blockade would be sufficient to treat the disease. IL-6 is overexpressed in KS lesions being considered important in angiogenesis and as an autocrine growth factor for sarcoma cells [22]. In addition, Machado et al. [8] observed that IL-10 levels were higher in patients with KS-aids compared to those with classic KS or only HIV infected. According to Oksenhendler, et al. [23], IL-10 is related to B-cell lymphoma and HHV-8-infected PEL cell lines.

However, the finding that the increase of IL-6 and IL-10 would be related to the development of HHV-8 associated diseases can not be verified because all the patients in the study did not present symptoms of HHV-8. future monitoring.

In people with KS and without HIV infection, a significant increase in IL-2 production was found, suggesting that HHV-8 stimulates the production of IL-2 by CD4 T cells [24]. However, the non-association of IL-2 between coinfecting and monoinfected in the research can be explained by the increase in IL-10 coinfecting, which is a cytokine inhibitor of IL-2 synthesis [25].

No association between TNF- α levels and coinfecting and monoinfected levels suggests that elevated levels of IL-4 and IL-10 may have had an inhibitory effect on TNF- α production [4,26,27].

Like Pugliese et al. [21] and Machado et al. [8] no increase in IFN- γ levels was found between coinfecting and monoinfected. However, Fiorelli et al. [1] related the increase of the IFN- γ at the beginning of KS and not the previous or later phases of the disease, noting that the patients studied did not have KS.

As regards the concentration of IL-4, it has been significantly higher in the co-infected patients, regardless of whether the HIV viral load is detectable or undetectable, indicating that the two viruses induce the production of this cytokine. The concentrations of IL-6 and IL-10 were higher in those co-infected with undetectable viral load, but this was not observed in individuals with detectable viral load, suggesting that in the presence of detectable HIV viral load, coinfection would not influence IL- and IL-10.

There was a negative correlation between the IL-10 and TCD4 variables in the monoinfected people, which may corroborate with the study by Akase et al [28], who found higher concentrations of IL-10 in PLHA with a low TCD4 count. However, there was no correlation between the other cytokines and the TCD4 counts.

In the research, no correlation was found between IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ and time of HAART use. However, studies on the interference of antiretroviral use with cytokine levels are conflicting, considering that the treatment does not completely restore the individual's immune system and the period of initiation of HAART is often late [10]. Therefore, the relationship between HAART and levels of cytokines among coinfecting compared with monoinfected is still to be understood more deeply.

In conclusion, in HIV / HHV-8 coinfection, the increase in levels of IL-4, IL-6 and IL-10 indicates that there is not a significant increase in cytokines only in coinfecting with diseases associated with coinfection, being able to relate these individuals with greater risk of HHV-8-associated diseases or to indicate future research to explore other factors that lead to HIV/HHV-8 coinfection-related diseases in addition to altered levels of cytokines.

Acknowledgements: The authors thank the staff and patients of the Hospital das Clínicas of UFPE for their support in the project and also the donor agencies.

References

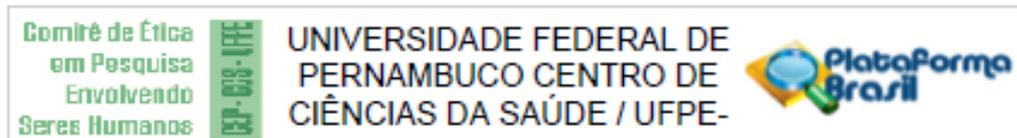
1. Fiorelli, V, Gendelman, R, Sirianni, MC et al (1998) γ -Interferon Produced by CD8+ T Cells Infiltrating Kaposi's Sarcoma Induces Spindle Cells With Angiogenic Phenotype and Synergy With Human Immunodeficiency Virus-1 Tat Protein: An Immune Response to Human Herpesvirus-8 Infection?. *Blood* 91(3): 956-967.
2. Guedes, F, de Andrade Jr, HF, Fernandes, ER, Tuon, F F, Brasil, RA, Pagliari, C, Duarte, MIS (2008) The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon- γ response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus- infected and uninfected individuals. *British Journal of Dermatology* 159(4):839-846.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08755.x>
3. Qin, Z, Kearney, P, Plaisance, K, Parsons, CH (2010) Pivotal Advance: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded microRNA specifically induce IL-6 and IL-10 secretion by macrophages and monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 86:1-10.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0409251>
4. Ursini, F, Naty, S, Mazzei, V, Spagnolo, F, & Grembiale, RD (2010) Kaposi's sarcoma in a psoriatic arthritis patient treated with infliximab. *International immunopharmacology* 10(7):827-828.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.04.016>

5. Sathish, N, Yuan, Y (2011) Evasion and Subversion of Interferon-Mediated Antiviral Immunity by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: an Overview. *Journal of Virology* 85:10934–10944.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00687-11>
6. Polizzotto, MN, Uldrick, TS, Wang, V, Aleman, K, Wyvill, KM, Marshall, V, Pittaluga, S, O'Mahony, D, Whitby, D, Tosato, G, et al (2013) Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. *Blood* 122: 4189–74198.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519959>
7. Knowlton, ER, Rappocciolo, G, Piazza, P (2014) Human Herpesvirus 8 Induces Polyfunctional B Lymphocytes *Th1*. *MBio* 5, e10277-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01277-14.Editor>
8. Machado, PRL, Farias, KJS, Genre, J, Oliveira, CJF, Guedes, PMM, da Fonseca, BAL (2014) Disseminated Kaposi's Sarcoma in Patients with HIV Infection Correlates to High Serum Levels of IL-10. *Viral Immunology* 27: 356–360.
<https://doi.org/10.1089/vim.2013.0134>
9. Munoz-Fernandez MA, Navarro J, Garcia A, Punzón C, Fernández-Cruz E, Fresno M (1997) Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. *J Allergy Clin Immunol* 100:838-845.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70282-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70282-3)
10. Tasca, KI, Calvi, SA, Souza, LDRD. (2012). Immunovirological parameters and cytokines in HIV infection. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(6): 663–9.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000600002>
11. Caselli, E, Galvan, M, Cassai, E, Caruso, A, Sighinolfi, L, Di Luca, D (2005) Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood* 106: 2790–2797.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1390>
12. Cahú, GGOM, Morais, VMS, Lopes, T RR, da Silva, DM, Tozetto, M., TR., Pannuti, CS, Coêlho, MRCD (2016) Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *Journal of medical virology* 88:11.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24550>
13. Brasil. Portaria N° 151, october 14 (2009) Secretary of Vigilancy in Health, Ministry of Health, Brasília, DF.
14. Nascimento, MC, de Souza, VA, Sumita, LM, Freire, W, Munoz, F, Kim, J et al (2007). Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *Journal of clinical microbiology* 45(3): 715-720.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01264-06>
15. Guadalupe, M, Pollock, BH, Westbrook, S, Redding, S., Bullock, D., Anstead, G. & Rebeles, J (2011). Risk Factors Influencing Antibody Responses to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent and Lytic Antigens in Patients Under Antiretroviral Therapy in South Texas. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999), 56(1): 83.
<https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181fdc928>
16. Magri, MC, Carbone, PHL, de los Santos-Fortuna, 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. *Journal of medical virology* 81(7): 1292-1297.
<https://doi.org/10.1002/jmv.21513>
17. Altuğlu, İ, Yolcu, A, Öcek, ZA, Yazan, SR, Gökengin, D (2016). Investigation of human herpesvirus-8 seroprevalence in blood donors and HIV-positive patients admitted to Ege University Medical School Hospital, Turkey. *Mikrobiyoloji bulteni* 50(1): 104-111.

18. Zeng, Y, Zhang, X, Huang, Z, Cheng, L, Yao, S, Qin, D et al (2007). Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. *Journal of virology* 81(5): 2401-2417.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02024-06>
19. Pati, S, Foulke, JS, Barabitskaya, O, Kim, J, Nair, BC, Hone, D et al (2003). Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Journal of virology* 77(10): 5759-5773.
<https://doi.org/10.1128/JVI.77.10.5759-5773.2003>
20. Valentin, A, Lu, W, Rosati, M, Schneider, R, Albert, J, Karlsson, A, Pavlakis, GN, (1998). Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(15): 8886-8891.
21. Pugliese A, Torre, D, Saini, A, Pagliano, G, Gallo, G, Pistono, PG, Paggi, GC (2002) Cytokine detection in HIV-1/HHV-8 co-infected subjects. *Cell Biochemistry and Function* 20: 191–194.
<https://doi.org/10.1002/cbf.935>
22. Xie, J, Pan, H, Yoo, S, Gao, SJ (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Virology* 79 (24): 15027–37.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15027-15037.2005>
23. Oksenhendler, E, Carcelain, G, Aoki, Y, Boulanger, E, Maillard, A, Clauvel, JP, & Agbalika, F (2000). High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemans disease in HIV-infected patients. *Blood* 96(6): 2069-2073.
<https://doi.org/10.1056/nejm199805283382204>
24. Pellet, C, Kerob, D, Dupuy, A, Carmagnat, MV, Mourah, S, Podgorniak, MP et al. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viremia is associated with the progression of classic and endemic Kaposi's sarcoma. *Journal of Investigative Dermatology* 126(3): 621–627.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700083>
25. Weiss, E, Mamelak, AJ, La Morgia, S, Wang, B, Feliciani, C, Tulli, A, Sauder, DN (2004). The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50(5): 657-675.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.11.075>
26. De Oliveira, CMB, Sakata, RK, Issy, AM, Gerola, LR, & Salomão, R (2011). Cytokines and pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 61(2): 255–265.
[https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)
27. Chung, YH, Means, RE, Choi, JK, Lee, BS, Jung, JU (2002). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus OX2 glycoprotein activates myeloid-lineage cells to induce inflammatory cytokine production. *Journal of Virology* 76(10): 4688–4698.
<https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.4688-4698.2002>
28. Akase, IE, Musa, BO, Obiako, RO, Ahmad Elfulatiy, A, Mohammed, AA (2017). Immune Dysfunction in HIV: A Possible Role for Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in HIV Staging. *Journal of immunology research*.
<https://doi.org/10.1155/2017/4128398>

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA DOS GENES NF-KB1/NF-KB2 COM A INFECÇÃO LATENTE/LÍTICA PELO HHV-8 EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM HIV/aids

Pesquisador: Juliana Prado Gonçalves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45156215.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.135.049

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram devidamente esclarecidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Aprovação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos	CEP - CCS - UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	-------------------------	---	---

Continuação do Parecer: 1.135.040

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Concluo que o projeto apresentado está adequando do ponto de vista das diretrizes éticas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

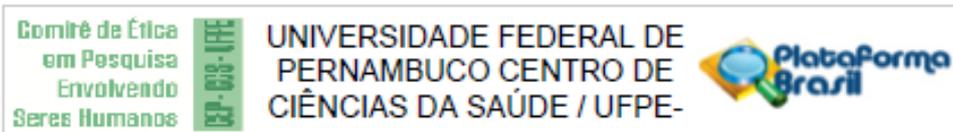
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.135.049

RECIFE, 02 de Julho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)