



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

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

**POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS COINFECTADAS PELO HHV-8**

RECIFE - PE

2017

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

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

**POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS COINFECTADAS PELO HHV-8**

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

Área de concentração: Medicina Tropical

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

RECIFE - PE

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M827p Moraes, Viviane Martha Santos de.
Polimorfismos do gene *MBL2* e concentrações plasmáticas em pessoas vivendo com HIV/AIDS coinfectadas pelo HHV-8 / Viviane Martha Santos de Moraes. – 2017.
125 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Lectina ligante de manose. 2. Coinfecção. 3. Genotipagem. 4. Carga viral. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-314)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

VIVIANE MARTHA SANTOS DE MORAIS

**POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS EM
PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS E COINFECTADAS PELO HHV-8**

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

Aprovada em: 09/10/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Adriana Vieira Gomes (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque (Examinadora Externa)
Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES)

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

Prof^a. Dr^a. Tânia Regina Tozetto-Mendoza (Examinadora Externa)
Universidade de São Paulo (USP)

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

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia 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 Coelho

Rejane Pereira Alves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Dedico à conclusão desta etapa a meus pais, Cicero João de Moraes e Marildes Maria dos Santos Moraes, e a minha irmã, Vanessa Martha Santos de Moraes. Obrigada por acreditarem em mim, pela paciência, dedicação, incentivo e apoio incondicional!!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã por todo amor, cuidado e educação, por sempre me ajudaram em todos momentos da minha caminhada. Sou grata por tudo que fizeram por mim, pela confiança, compreensão, paciência, por me ensinarem a ser persistente e a lutar pelos meus ideais.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho, por toda paciência, ensinamentos compartilhados e pelo empenho para realização desta pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Pernambuco, em especial a Elker Lima e Profa. Dra. Tereza Cartaxo, pela colaboração e treinamento que me tornaram apta para a realização da genotipagem necessária para esta pesquisa.

Aos integrantes do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração prática e intelectual no desenvolvimento desta pesquisa, contribuindo para a minha formação.

A Evônio Campelo Júnior, Prof. Dr. Ricardo Ximenes e Cássia Nóbrega por todos os esclarecimentos que me auxiliaram no desenvolvimento das análises estatísticas.

A Marcelo Ramos, Flávia Santoro e Juliana Gonçalves por toda paciência, carinho e suporte oferecido, vocês foram fundamentais no decorrer deste processo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, aos amigos conquistados durante o mestrado e o doutorado pela dedicação, auxílio e grandes ensinamentos repassados durante o curso.

Aos meus amigos e parceiros desde a graduação em Ciências Biológicas da UFAL, especialmente Washington Ferreira Júnior, Bruna Melo, Fernanda Ancelmo, Phoeve Macário e Jonathas Pereira, por todo incentivo e carinho.

Aos meus grandes amigos Alexandre Antônio, André Borba, Andresa Alves, Edclecia Morais, Georgea Cahú, Jefferson Almeida, Joanne Costa, Juliane Hora, Karolina Calado, Regina Cele, Taline Silva, Thiago Galvão e especialmente a Wendy Avilez, por tantos momentos de união e aprendizagem juntos.

Aos facilitadores Luciana Castro e Júlio Lins pelas práticas integrativas e complementares que renovaram minhas energias durante esta caminhada.

A todos vocês, minha sincera gratidão!

“... É impossível ser feliz sozinho...”

(Wave – Tom Jobim)

RESUMO

A lectina ligante de manose (MBL) desempenha papel fundamental na resposta imune inata ao ativar o sistema complemento através da via das lectinas e tem sido estudada em diversas infecções virais por se ligar a vários patógenos, no entanto, não se conhece a influência da MBL na coinfeção HIV/HHV-8. O objetivo deste estudo foi verificar a associação entre os polimorfismos -550 -221 e exon 1 do gene *MBL2* com a coinfeção HIV/HHV-8 e comparar as concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados e monoinfectados pelo HIV. Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo caso-controle composto de pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) acompanhadas no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do hospital das clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. A genotipagem da região promotora (-550 e -221) foi realizada com o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays), a região estrutural (exon1) com o kit *Express Sybr Greener Supermix* (Invitrogen, USA) e as concentrações plasmáticas da MBL com o ELISA comercial *Human Mannose Binding Lectin* (MyBioSource, Inc), sendo consideradas concentrações deficientes valores <100 ng/ml. Foram genotipadas 124 amostras de indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 e 213 monoinfectados pelo HIV, sendo mais frequentes os genótipos LL, YY e AA para os *locus* -550, -221 e exon1, respectivamente em ambos os grupos. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas com a infecção pelo HHV-8 em PVHA. No entanto, após a análise multivariada, os coinfectados com haplótipo da MBL de expressão intermediária tiveram uma razão de chance de 3,06 vezes da última contagem do TCD4 estar abaixo de 350 células/mm³. Foram consideradas como concentrações plasmáticas deficientes da MBL 5,1% (6/118) dos coinfectados e 3,2% (4/127) dos monoinfectados ($p=0,445$), apresentando mediana de 2,803 log₁₀ ng/ml e 2,959 log₁₀ ng/ml, respectivamente, com $p=0,001$. Houve uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas da MBL e a carga viral do HIV em ambos os grupos, porém não houve correlação com a contagem do TCD4. Portanto, considerando a capacidade da MBL de se ligar à glicoproteína gp120 do HIV, os coinfectados apresentaram concentrações plasmáticas da MBL menores que os monoinfectados, sugerindo que pode haver consumo e redução da MBL devido à opsonização do HIV e do HHV-8, levando a redução da MBL plasmática e o não acúmulo na circulação.

Palavras-chave: Lectina ligante de manose. Coinfeção. Genotipagem. Carga viral.

ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) plays an important role in the innate immune response by activating the complement system via the lectin pathway, and it has been studied in several viral infections; however, the influence of MBL on HIV/HHV-8 coinfection is unknown. The objective of this study was to verify the association between the polymorphisms -550 -221 and exon 1 of the MBL2 gene and the HIV/HHV-8 coinfection and to compare the plasma concentrations of MBL in coinfectados and monoinfectados by HIV. This is an observational analytical study of the case-control type composed of people living with HIV/AIDS (PLWHA) monitored at the outpatient of infectious and parasitic diseases of clinic hospital at the Federal University of Pernambuco, Recife-PE. Genotyping of the promoter region (-550 and -221) was performed with the TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) system, the structural region (exon1) with the Sybr Greener Supermix Express Kit (Invitrogen, USA) and the plasma concentrations of MBL with the Human Mannose Binding Lectin (MyBioSource, Inc) commercial ELISA, being considered deficient concentrations <100 ng/ml. One hundred twenty-four samples of HIV/HHV-8 coinfectados and 213 HIV monoinfectados patients were genotyped, with LL, YY and AA genotypes being more frequent for the -550, -221 and exon1 locus, respectively in both groups, no association of allelic, genotypic and haplotype frequencies was found with the HHV-8 infection in PLWHA. However, after the multivariate analysis, coinfectados patients with the intermediate expression MBL haplotype had a 3.06-fold chance of the last TCD4 count being below 350 cells/mm³. The plasma concentrations deficient MBL were 5.1% (6/118) in coinfectados patients and 3.2% (4/127) in monoinfectados patients ($p = 0.445$), presenting a median of 2.803 log₁₀ ng/ml and 2.959 log₁₀ ng/ml, respectively, with $p = 0.001$. There was an inverse correlation between plasma concentrations of MBL and HIV viral load in both groups, but there was no correlation with the TCD4 count. Therefore, considering the ability of MBL to bind to the HIV glycoprotein gp120, coinfectados patients had lower MBL plasma concentrations than monoinfectados patients, suggesting that MBL may be consumed and reduced due to opsonization of HIV and HHV-8, leading to the reduction of plasma MBL and the non-accumulation in the circulation.

Key words: Mannose-binding lectin. Coinfection. Genotyping. Viral load.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representativo da partícula do HHV-8.....	19
Figura 2. Principais produtos dos genes expressos no ciclo latente e lítico do HHV-8	21
Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação do sistema complemento através da via clássica, via das lectinas e via alternativa.....	32
Figura 4. Subunidades estruturais da MBL. A: Região N-terminal (a), domínio colagenoso (b), região do pescoço (c) e domínio de reconhecimento à carboidrato (d) da subunidade básica ou monômero; B: oligômero e C: tetrâmero.....	33
Figura 5. Gene <i>MBL-2</i> alinhado com as regiões codificadas, indicando os polimorfismos da região promotora (-550, -221) e da região estrutural (exon 1).....	34
Figura 6. Esquema ilustrativo de oligômeros não funcionais devido aos polimorfismos do gene <i>MBL2</i>	35
Quadro 1. Definição e categorização das variáveis relacionadas aos coinfectados e monoinfectados.....	41
Figura 1. Distribuição e mediana das concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 monoinfectados pelo HIV. A mediana das concentrações plasmáticas da MBL nos coinfectados foi 2,803 log ₁₀ ng/ml (1,0-3,581; IC: 2,650-2,792) e nos monoinfectados foi 2,959 log ₁₀ ng/ml (1,301- 3,545; IC: 2,877- 2,964), apresentando diferença estatisticamente ($p = 0.001$) utilizando o teste de Mann Whitney.....	69
Figura 2. Correlação de Spearman entre a carga viral do HIV e a concentração plasmática da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 ($n = 50$, $p = 0,018$ e $r = -0,333$) e monoinfectados pelo HIV ($n = 56$, $p = 0,031$ e $r = -0,289$).....	70
Figura 3. Correlação de Spearman entre a contagem do TCD4 e a concentração plasmática da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 ($n = 118$, $p = 0,346$ e $r = 0,087$) e monoinfectados pelo HIV ($n = 127$, $p = 0,132$ e $r = -0,134$).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers e sondas utilizados para detecção dos polimorfismos na região promotora e estrutural do gene <i>MBL2</i>	44, 50
Tabela 2. Frequência das variáveis sociodemográficos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	51
Tabela 3. Mediana das variáveis clínicas analisadas em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	52
Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas do gene <i>MBL2</i> entre coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	52
Tabela 5. Distribuição das frequências dos haplótipos do gene <i>MBL2</i> segundo os níveis de expressão em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	53
Tabela 6. Análise univariada das contagens da carga viral e TCD4 segundo a expressão dos haplótipos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	54
Tabela 7. Análise multivariada das contagens da carga viral e TCD4 segundo a expressão dos haplótipos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	55
Tabela 1. Medianas das concentrações plasmáticas da MBL conforme a carga viral do HIV e contagem do TCD4 em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMV	citomegalovírus
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
Gp	glicoproteína P
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HHV-8	herpesvírus humano tipo 8
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	papilomavírus humano, do inglês <i>human papiloma virus</i>
HSH	homens que fazem sexo com homens
HTLV	vírus linfotrópico das células T humano
IgG	Imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
KSHV	herpesvírus do sarcoma de Kaposi, do inglês <i>kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LANA-1	antígeno nuclear associado a latência, do inglês <i>latency-associated nuclear antigen</i>
LIKA	laboratório de imunopatologia Keizo Asami
MASP	serina protease associada a MBL, do inglês <i>mannose-binding lectin-associated serine protease</i>
MBL	lectina ligante de manose, do inglês <i>mannose-binding lectin</i>
MCD	doença multicêntrica de Castleman, do inglês <i>multicentric Castleman's disease</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MTA	temperatura de melting do ensaio, do inglês <i>melting temperature assay</i>
ORF	sequências de leituras aberta, do inglês <i>open reading frames</i>
PBMC	células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PEL	linfoma de efusão primário, do inglês <i>primary effusion lymphoma</i>

PRR	receptores de reconhecimento padrão, do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
PVHA	pessoas vivendo com HIV/aids
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
Rta	ativador de replicação e transcrição, do inglês <i>replication and transcription activator</i>
SK	sarcoma de Kaposi
STAT3	transdutor de sinal e ativador de transcrição 3, do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TARV	terapia antirretroviral
Tat	proteína transativadora do HIV-1, do inglês <i>HIV-1-trans-activating protein</i>
vBCL-2	análogo viral da leucemia-2 de células B, do inglês <i>viral analogue of B-cell leukemia-2</i>
vCyclin	ciclina D viral, do inglês <i>viral cyclin D</i>
vFLIP	Fas-ligando de interleucina-1B viral proteína, do inglês <i>viral Fas-ligand interleukin-1B-converting enzyme inhibitory protein</i>
vGPCR	receptor acoplado a proteína G viral, do inglês <i>viral G-protein-coupled receptor</i>
vIL-6	interleucina-6 viral
vIRFs	fatores de regulação do interferon viral, do inglês <i>viral interferon regulatory factors</i>
vMIP	proteínas virais inflamatórias de macrófagos, do inglês <i>viral macrophage inflammatory proteins</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Características gerais do HHV-8.....	19
2.2	Transmissão do HHV-8.....	23
2.3	Manifestações clínicas do HHV-8.....	24
2.3.1	<i>Doença multicêntrica de Castleman.....</i>	24
2.3.2	<i>Linfoma de efusão primário.....</i>	24
2.3.3	<i>Sarcoma de Kaposi.....</i>	25
2.4	Diagnóstico do HHV-8.....	26
2.5	Prevenção e tratamento do HHV-8.....	28
2.6	Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HHV-8.....	28
2.7	Lectina ligante de manose.....	31
2.8	MBL e infecções virais.....	35
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Desenho do estudo.....	40
4.2	População e local do estudo.....	40
4.3	Critérios de inclusão e exclusão.....	40
4.3.1	<i>Critérios de inclusão.....</i>	40
4.3.2	<i>Critérios de exclusão.....</i>	41
4.4	Tamanho amostral.....	41
4.5	Definição das variáveis.....	41
4.5.1	<i>Variáveis dependentes.....</i>	41
4.5.2	<i>Variáveis independentes.....</i>	41
4.6	Operacionalização do estudo.....	43
4.6.1	<i>Extração do DNA e genotipagem da MBL.....</i>	43
4.6.2	<i>Haplótipos da MBL de acordo com o agrupamento dos genótipos.....</i>	44
4.6.3	<i>Concentrações plasmáticas da MBL.....</i>	45
4.6.4	<i>Análise estatística.....</i>	46

4.7	Considerações éticas.....	47
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Artigo 1.....	47
5.2	Artigo 2.....	66
6	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICES.....	88
	Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	88
	Apêndice B – Artigo 1 em inglês.....	91
	Apêndice C – Artigo 2 em inglês.....	109
	ANEXO.....	122
	Anexo A – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa.....	122
	Anexo B – Comprovante de Submissão artigo 1.....	124
	Anexo C – Comprovante de Submissão artigo 2.....	125

1. INTRODUÇÃO

A prevalência do herpesvírus humano 8 (HHV-8) varia de acordo com as diferentes regiões geográficas e sub-populações (MOHANNA et al., 2005; SULLIVAN et al., 2008; CAHÚ et al., 2016), no entanto, a infecção pelo HHV-8 tem aumentado em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) em comparação com os indivíduos HIV negativos (BATISTA et al., 2009; PRIA; HAYWARD; BOWER, 2013; BROCCOLO et al., 2016; DITTMER; DAMANIA, 2016). O HHV-8 está associado à todas as formas do sarcoma de Kaposi (SK), à doença multicêntrica de Castleman e ao linfoma de efusão primária, sendo o agente etiológico necessário, mas insuficiente para o desenvolvimento destas doenças (BATISTA et al., 2009; BROCCOLO et al., 2016; GONCALVES et al., 2017).

Com a epidemia do HIV/aids, a incidência do SK aumentou drasticamente, apresentando um curso clínico mais agressivo e com progressão ao óbito (ABLASHI et al., 2002; SULLIVAN et al., 2008; ROHNER et al., 2014). Embora a terapia antirretroviral (TARV) tenha reduzido significativamente a incidência e a morbidade causada pelo SK, esta neoplasia ainda é a mais comum em PVHA, podendo se desenvolver em indivíduos mesmo sob tratamento, com carga viral indetectável e contagens de células T CD4 superiores a 350 células/mm³ (ABLASHI et al., 2002; PRIA; HAYWARD; BOWER, 2013; BROCCOLO et al., 2016; CAHÚ et al., 2016; MUNAWWAR; SINGH, 2016). Segundo Broccolo et al. (2016) até 40% destes pacientes necessitam de quimioterapia antineoplásica em associação com a TARV.

O controle da infecção pelo HHV-8 e os estágios iniciais do desenvolvimento do SK são mediados pelas respostas da imunidade inata e adaptativa (ARESTÉ; BLACKBOURN, 2009; LEE et al., 2012; BRULOIS; JUNG, 2014). Nesse contexto, a lectina ligante de manose (MBL) desempenha papel fundamental na defesa imune inata do hospedeiro como receptor de reconhecimento padrão, ligando-se com alta afinidade aos padrões de resíduos de carboidratos presentes na superfície de vírus ou de células infectadas com vírus, especialmente quando a imunidade humoral não é totalmente funcional, como na infância ou em populações ou imunodeprimidas (FUJITA, 2002; MANUEL et al., 2007; MASON; TARR, 2015). Assim, a MBL contribui para a ativação da via das lectinas do sistema complemento em um mecanismo independente de anticorpo, podendo promover a opsonofagocitose, modular a inflamação e induzir a lise celular (VALLINOTO et al., 2008; BRULOIS; JUNG, 2014; MASON; TARR, 2015; ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a; MARTIN; BLOM, 2016; AURITI et al., 2017).

A expressão protéica da MBL é determinada geneticamente e as variações nas concentrações plasmáticas podem ser atribuídas aos polimorfismos do gene *MBL2* na região estrutural do exon 1 (códon -52, -54 e -57) e a outros sítios polimórficos na região promotora

(-550 e -221). Estes *loci* adjacentes apresentam um forte desequilíbrio de ligação e as combinações alélicas destas regiões podem ser herdadas como uma unidade, assim, resultando em diferentes haplótipos, que podem ocasionar defeitos na polimerização da molécula levando a deficiência funcional e/ou nos níveis séricos (EISEN; MINCHINTON, 2003; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; EDDIE et al., 2009; IP et al., 2009; BAUTISTA-RODRIGUEZ et al., 2017; HARTZ et al., 2017).

Vários estudos têm sido realizados associando os polimorfismos à susceptibilidade ou resistência às infecções, no entanto, esta associação tem se mostrado diferente frente às diversas infecções virais, podendo aumentar o risco ou a proteção (MANUEL et al., 2007; SHENG et al., 2008; HALLA et al., 2010; KWAKKEL-VAN ERP et al., 2011; ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a). Por outro lado, a deficiência funcional das concentrações plasmáticas da MBL vem sendo associada às infecções ou progressão das manifestações clínicas (MANUEL et al., 2007; GUIMARAES et al., 2008; SEPPÄNEN et al., 2009; XU et al., 2013; ERDEMIR et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2016). Em relação as PVHA, pesquisas têm mostrado associação entre a deficiência funcional das concentrações plasmáticas da MBL e a susceptibilidade a infecção pelo HIV, assim como uma progressão mais rápida para a doença (HUNDT; HEIKEN; SCHMIDT, 2000; VALLINOTO et al., 2008; TAN et al., 2009; EGLI et al., 2013; TEODOROF et al., 2014), enquanto outros estudos não encontraram essa associação com a infecção, carga viral do HIV ou contagem do TCD4 (CATANO et al., 2008; ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a).

No entanto, ainda não se conhece a influência dos polimorfismos do gene *MBL2* ou das concentrações plasmáticas funcionais em PVHA infectados pelo HHV-8. Porém, em infecções causadas por outros herpesvírus, estudos têm sugerido que a deficiência das concentrações da MBL pode ser um fator de risco para a infecção sintomática pelo herpesvírus humano 2 (HHV-2) (GADJEVA et al., 2004) e reativação do citomegalovírus (CMV) (MANUEL et al., 2007; KWAKKEL-VAN ERP et al., 2011).

Embora os estudos tenham reportado que a MBL desempenha papel importante na resposta imune inata, ainda se desconhece este papel na coinfeção HIV/HHV-8. Por tanto, os objetivos deste estudo foram verificar se existe associação entre os alelos, genótipos e haplótipos do gene *MBL2* e a infecção pelo HHV-8 em PVHA, como também associar a expressão dos haplótipos com a carga viral do HIV e as contagens do TCD4. Assim como verificar a associação das concentrações plasmáticas da MBL funcional em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV, correlacionando com a carga viral e contagens do TCD4.

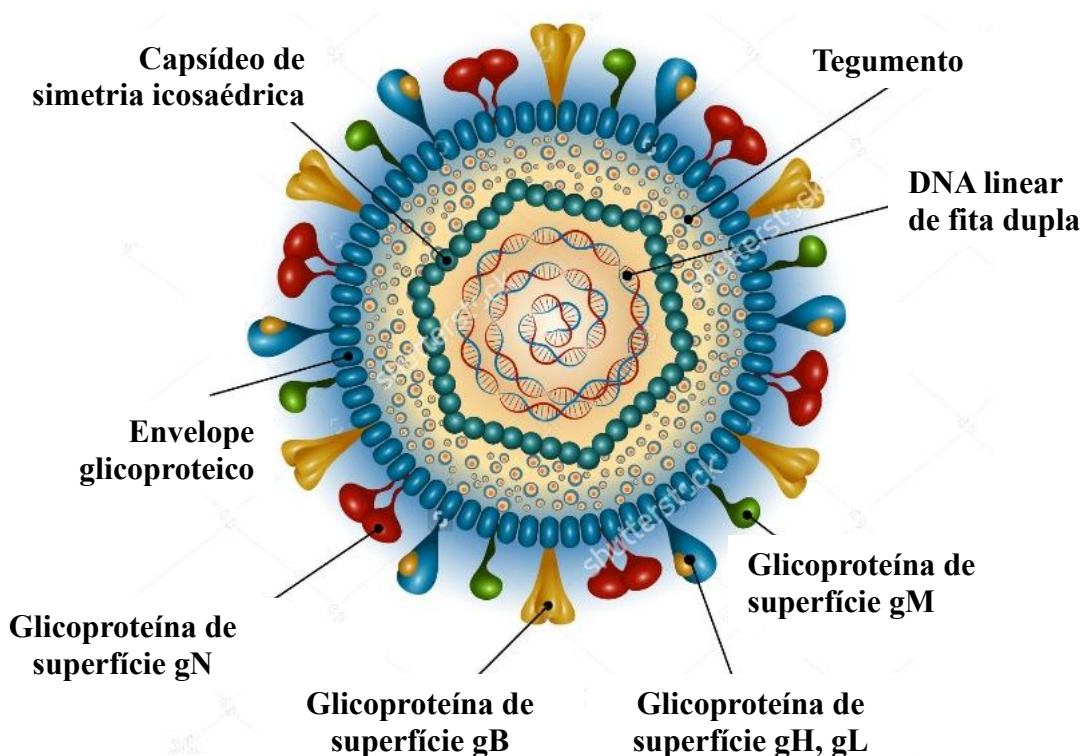
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do HHV-8

O HHV-8, também denominado de herpesvírus do sarcoma de Kaposi (KSHV), foi descoberto em 1994 por Yuan Chang e Patrick Moore e em 2010 foi declarado agente cancerígeno do grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, ganhando mais destaque devido sua importância na área da saúde pública (ROHNER et al., 2014; GONCALVES et al., 2017).

Este vírus pertence a família Herpesviridae, subfamília *Gammaherpesvirinae* e ao gênero *Rhadinovirus*. Apresenta um envelope glicoproteico com 100–120 nm de diâmetro, um capsídeo de simetria icosaédrica com 162 capsômeros contendo uma molécula de DNA linear de fita dupla e um espaço entre o envelope e o capsídeo contendo um material protéico amorfo denominado tegumento, conforme a figura 1. No envelope estão inseridas sete glicoproteínas, gB, gH, gM, gL, gN, ORF68 e K8.1 que estão envolvidas na replicação viral (EDELMAN, 2005; SATHISH; WANG; YUAN, 2012).

Figura 1. Esquema representativo da partícula do HHV-8.



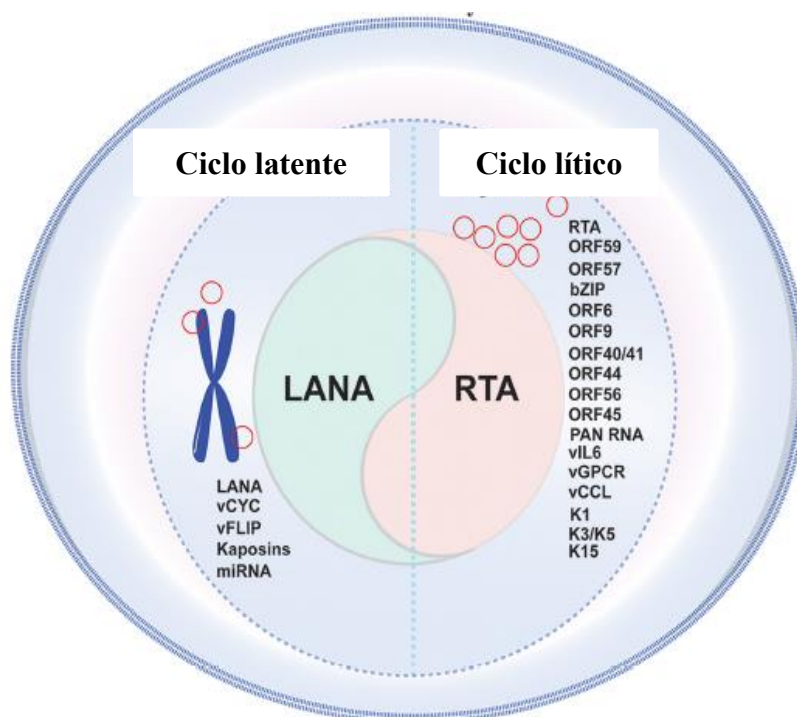
Fonte: Adaptado de SHUTTERSTOCK, 2003.

O HHV-8 apresenta um genoma que varia entre 170 a 270 Kb, com 145 kpb contendo todas as sequências de leituras aberta (ORF), que codificam proteínas envolvidas no metabolismo dos nucleotídeos, na replicação do DNA, na maturação, na estrutura viral como o capsídeo, tegumento e envelope, no bloqueio ou modificação das defesas imunes do hospedeiro, nas transições entre ciclo lítico e latente. Além disso, contém 86 genes e aproximadamente 22 codificam proteínas, com homologia estrutural e funcional das proteínas do hospedeiro. Possui grande variabilidade genética, no qual foram descritas cinco variantes moleculares, identificados como A, B, C, D, E, F e Z com base na sequência do gene *ORF-K1* (EDELMAN, 2005; MOHANNA et al., 2005; ARESTÉ; BLACKBOURN, 2009; LEE et al., 2012; BRULOIS; JUNG, 2014; FEITERNA-SPERLING et al., 2016; GONCALVES et al., 2017).

O ciclo replicativo do HHV-8 inicia ao infectar células endoteliais, linfócitos, monócitos, células dendríticas e células epiteliais. As glicoproteínas do HHV-8 medeiam a fusão entre o vírus e a célula-alvo, ligando-se ao sulfato de heparina, que auxilia o vírus a interagir com os receptores celulares. Uma vez ligado ao receptor, o vírus entra na célula principalmente via endocitose mediada por clatrina ou por micropinocitose. Após a entrada, as proteínas virais modulam as vias de sinalização celular para alterar o citoesqueleto, permitindo que o capsídeo seja transportado aos poros nucleares e o DNA liberado no núcleo. Este é codificado e direcionado ao citoplasma para incorporar-se ao capsídeo pré-formado, originando o nucleocapsídeo viral, em seguida ocorre à aquisição das proteínas do tegumento e do envelopamento viral a partir do complexo de Golgi. Por fim, os vírus são liberados das células através de mecanismo de brotamento (ABLASHI et al., 2002; GIFFIN; DAMANIA, 2014).

O material genético do HHV-8 pode ser encontrado inserido no genoma celular ou na forma episomal no núcleo da célula, permanecendo por toda a vida do hospedeiro, podendo expressar seus genes por dois ciclos transcricionais, ciclo latente e lítico (Figura 2). Tipicamente, após a infecção de uma célula, o HHV-8 estabelece latência, quando apenas alguns genes são expressos a partir do epissoma viral, como o *ORF72*, que codifica a v-ciclina tipo D; o *ORF73*, codifica o antígeno nuclear associado a latência (LANA-1) e o *K13*, codifica a enzima de conversão vFLIP (DI DOMENICO et al., 2016; PURUSHOTHAMAN et al., 2016; ANEJA; YUAN, 2017).

Figura 2. Principais produtos dos genes expressos no ciclo latente e lítico do HHV-8.



Fonte: Adaptado de PURUSHOTHAMAN et al, 2016.

Os produtos codificados por esses três genes desempenham um papel fundamental na tumorigênese através do controle do ciclo celular e da regulação da apoptose. O LANA-1 permite a propagação do epissoma viral em células hospedeiras submetidas a mitose, assegurando a transcrição através da ligação ao DNA-HHV-8 às histonas na cromatina do hospedeiro, pode também reprimir a atividade transcricional da p53 impedindo o desencadeamento da apoptose. De modo semelhante, a vFLIP protege as células infectadas com o vírus em ciclo latente da apoptose através da inativação do receptor de morte denominado Fas. Por fim, a v-ciclina tipo D regula a proliferação celular através das quinases dependentes de ciclina (DOURMISHEV et al., 2003; DI DOMENICO et al., 2016; PURUSHOTHAMAN et al., 2016; ANEJA; YUAN, 2017).

A infecção latente é observada na maioria das células tumorais em lesões de SK, no entanto, cerca de 1% das células infectadas expressam genes líticos, enquanto que uma percentagem mais elevada expressa os genes líticos no linfoma de efusão primária e ainda mais na doença multicêntrica de Castleman (GIFFIN; DAMANIA, 2014; GONCALVES et al., 2017).

Embora a ação de agentes químicos como o butirato de sódio e ésteres de forbol, ou determinados estímulos fisiológicos oriundos de estresse ambiental, como superinfecção por

outro vírus, por exemplo o HIV, o CMV, o papilomavírus (HPV), possam induzir o ciclo lítico, o produto do gene *orf50* (Rta) é necessário e suficiente para iniciar este ciclo. Após o início do ciclo lítico, os primeiros genes expressos regulam a expressão genética subsequente e são seguidos por aqueles que regulam a replicação do DNA, por outros necessários para a produção das partículas virais e por genes que codificam proteínas homólogas às proteínas celulares (LAURENT; MEGGETTO; BROUSSET, 2008; PURUSHOTHAMAN; UPPAL; VERMA, 2015; GONCALVES et al., 2017).

As proteínas virais homólogas às celulares transcritas no ciclo lítico são classificadas de acordo com a função que desempenham, podendo promover o crescimento tumoral, auxiliar a evasão da resposta imune humana e contribuir diretamente para a patogênese clínica. Nesse contexto, a K1 é uma proteína transmembrana que se comunica com as vias de sinalização das células B, levando à transcrição mediada pelo fator nuclear kappa B e o análogo viral BCL-2, com aproximadamente 60% de homologia com a BCL-2 humana, a vBCL-2 pode proteger da apoptose. O receptor acoplado a proteína G viral (vGPCR), codificado pelo gene *orf74* tem uma série de efeitos mediados através de vias de proteína quinase levando à sobrevivência de células endoteliais e à produção de fatores de crescimento ou citocinas. Estes fatores de crescimento podem desempenhar um papel direto na patogênese do KS, células que apresentam o vGPCR secretam o fator de crescimento endotelial vascular, que é encontrado em excesso no tecido do SK. O HHV-8 também codifica outro análogo de citocina humana, a interleucina-6 viral (vIL-6) que pode induzir a expressão da IL-6, mesmo apresentando apenas 25% de homologia entre os aminoácidos (DI DOMENICO et al., 2016; ANEJA; YUAN, 2017).

Três proteínas virais inflamatórias de macrófagos (vMIP) são codificadas pelos genes K4 e K6, sendo consideradas pró-inflamatórias. A vMIP-II também auxilia o HHV-8 na evasão imune do hospedeiro, pois pode restringir o recrutamento de linfócitos Th1 para células infectada. O HHV-8 também possui outros mecanismos de evasão do sistema imunitário humano, como a repressão da transcrição do interferon, pelos fatores de regulação do interferon viral (vIRFs), a prevenção da ativação de células T mediada pelo MHC-II através dos antígenos do HHV-8 codificados pelo gene *K1* e a redução do número de moléculas MHC-I na superfície celular pela endocitose induzida pelo genes *K3* e *K5*. Dessa forma, todos os genes do ciclo lítico do HHV-8 são expressos, ocorrendo replicação e liberação viral com posterior lise da célula infectada (LAURENT; MEGGETTO; BROUSSET, 2008; GONCALVES et al., 2017).

2.2 Transmissão do HHV-8

As vias de transmissão do HHV-8 variam em diferentes locais do mundo, a depender da endemicidade do vírus na região (MINHAS; WOOD, 2014; MUNAWWAR; SINGH, 2016). Em áreas não endêmicas, a transmissão horizontal em adultos pode ocorrer por via sexual, por relações homossexuais e heterossexuais (MUNAWWAR; SINGH, 2016). Estudos têm demonstrado que esta via, particularmente entre homens que fazem sexo com homens, pode desempenhar um papel importante na transmissão nestas áreas, como nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, uma vez que a soroprevalência é significativamente maior nesse grupo em comparação com a população em geral. Por outro lado, a possibilidade de transmissão sexual entre indivíduos heterossexuais permanece obscura ou com associação mais fraca entre aqueles que praticam comportamentos sexuais de baixo risco (BATISTA et al., 2009; ROHNER et al., 2016). Uma questão importante ao investigar a transmissão sexual é a troca salivar durante o contato hetero e homossexual, tornando mais difícil identificar se a transmissão foi sexual ou oral através da saliva (MINHAS; WOOD, 2014).

Em áreas endêmicas, a saliva é uma via de transmissão horizontal importante durante a infância (DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014), sendo também um fator de risco potencial para a aquisição do HHV-8 entre homens que fazem sexo com homens (PAUK et al., 2000). Ressaltando que o DNA do HHV-8 é detectado com maior frequência e com maior carga viral na saliva do que no sangue, sêmen ou secreções vaginais e prostáticas (ROHNER et al., 2016).

Outra possível via de transmissão é a transfusão de sangue infectado, porém essa transmissão pode ser ineficaz devido à integração do HHV-8 à célula, uma vez que o DNA viral pode ser detectado em apenas 10-15% das células mononucleares do sangue periférico (PBMcs) de indivíduos soropositivos saudáveis, além disso, a viremia é incomum nessa infecção (HLADIK et al., 2006; CATERINO-DE-ARAUJO et al., 2007).

Existe a hipótese que o HHV-8 pode ser transmitido verticalmente, de mãe para filho, devido ao alto nível da soroprevalência em crianças, especialmente em áreas endêmicas. Além disso, o HHV-8 foi encontrado nas secreções cervico-vaginais de mulheres coinfectadas HIV-1/HHV-8, assim como, o desenvolvimento de SK em crianças com menos de um ano de idade pode ser um indicativo de transmissão perinatal. A transmissão através do leite materno também foi hipotetizada em contribuir para a transmissão da mãe para o bebê, ressaltando que o HHV-8 pode infectar monócitos, macrófagos e células epiteliais e que estas células são encontradas nos componentes celulares do leite maduro (MINHAS; WOOD, 2014; ROHNER et al., 2016).

No entanto, é necessária uma melhor compreensão da transmissão do HHV-8 em diferentes grupos etários e comportamentais para o desenvolvimento de estratégias de prevenção para o HHV-8.

2.3 Manifestações clínicas do HHV-8

A maioria das infecções primárias ocasionadas pelo HHV-8 são assintomáticas, podendo ocorrer síndrome viral caracterizada por febre, fadiga, linfadenopatia, diarreia e rash cutâneo (EDELMAN, 2005). No entanto, após o surgimento do HIV/aids houve uma maior incidência das doenças associadas a infecção pelo HHV-8, no quais as principais manifestações são a partir do excesso de citocinas, como a doença multicêntrica de Castleman (MCD), e da formação de tumores, como o linfoma de efusão primário (PEL) e o SK (AUTEN et al., 2017; GONCALVES et al., 2017).

2.3.1 Doença multicêntrica de Castleman

A MCD é um distúrbio linfoproliferativo de células B mais comum que ocorre em PVHA. Apresenta sintomas inflamatórios intermitentes, como febre, suores noturnos, perda de peso, fadiga e sintomas respiratórios e gastrointestinais inespecíficos, juntamente com hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e edema, sintomas são causados pelo excesso de citocinas, especialmente vIL-6, hIL-6 e hIL-10. Durante os sintomas a carga viral do HHV-8 é elevada, diminuindo com o tratamento e remissão da doença (PENKA et al., ; GONCALVES et al., 2017).

O diagnóstico da MCD geralmente requer uma biópsia de linfonodos excisional e se não tratada geralmente é fatal em dois anos. No entanto, não existe um tratamento aprovado pelo FDA para o HHV-8, a TARV é indicada na MCD associado ao HIV, mas geralmente é insuficiente, embora, o controle da viremia do HIV pode reduzir a probabilidade de recorrência (GONCALVES et al., 2017).

2.3.2 Linfoma de efusão primário

O PEL é um subgrupo raro de linfomas de células B que se apresenta como derrames neoplásicos pleurais, peritoneais e pericárdicos na ausência de massa tumoral sólida ou envolvimento nodal reconhecível (CARBONE et al., 2010).

As formas extra-cavitárias podem envolver a pele, os gânglios linfáticos, o sistema digestivo gastrointestinal e o sistema nervoso central. Devido à identificação do HHV-8 em todos os casos que se apresentaram como derrames linfomatosos primários nos estudos iniciais, a presença deste vírus foi incorporada como critério de diagnóstico para PEL (SULLIVAN et al., 2008). As células tumorais do PEL são infectadas latencialmente por HHV-8 com expressão de várias proteínas virais e microRNAs que podem afetar a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (CARBONE et al., 2010).

O PEL é um tumor agressivo com média de sobrevivência de apenas seis meses. Morfológicamente, as células neoplásicas são grandes e muitas vezes pleomórficas, em alguns casos, há predominância de imunoblastos, e em outros, há características anaplásicas mais proeminentes (AUTEN et al., 2017). A avaliação serial da carga viral do HHV-8 pode fornecer informações adicionais sobre o estadiamento do tumor, no entanto, não existe uma terapia padrão. A administração da TARV é um componente essencial para as PVHA, porém é insuficiente (GONCALVES et al., 2017).

2.3.3 *Sarcoma de Kaposi*

O SK ocorria, antes da epidemia HIV/aids, principalmente em homens idosos da região do Mediterrâneo, sendo a forma clássica deste sarcoma, ou na África subsaariana, como uma forma endêmica que afetava adultos e crianças. Porém, foi observado outros dois subtipos epidemiológicos, o SK iatrogênico, principalmente em indivíduos transplantados devido às terapêuticas imunossupressoras, e o SK epidêmico ou associado ao HIV/aids (ABLASHI et al., 2002; ROHNER et al., 2014; DITTMER; DAMANIA, 2016). Embora a infecção pelo HHV-8 seja necessária para que o SK se desenvolva, não é suficiente, é necessários outros cofatores como a imunodepressão, que está sendo associada ao aumento do risco de desenvolver o SK, como por exemplo, em indivíduos submetidos ao transplante de órgãos sólidos, o risco de desenvolver SK é aumentado em um fator de até 50 (SULLIVAN et al., 2008; ROHNER et al., 2014).

Com a epidemia de HIV/aids a incidência do SK aumentou drasticamente e apresentou um curso clínico mais agressivo, com progressão ao óbito, pois o sarcoma não evolui apenas na pele e linfonodos, mas geralmente se dissemina no pulmão, trato gastrointestinal, fígado e baço. A partir de 1996, a TARV foi usada para reverter a imunodepressão associada ao HIV, reduzindo o risco de desenvolver SK (ABLASHI et al., 2002; SULLIVAN et al., 2008; ROHNER et al., 2014).

Embora a introdução da TARV tenha alterado em grande parte da história natural da infecção pelo HIV, o SK ainda é a neoplasia mais comum em PVHA. A terapia reduziu em aproximadamente 80% a incidência do SK, assim como a morbidade causada por esta doença, porém o SK permanece mais frequente em PVHA do que na população em geral, podendo se desenvolver em indivíduos tratados, com carga viral do HIV controlada e contagens de células T CD4 relativamente altas (superiores a 350 células/mm³), no qual até 40% destes pacientes necessitam de quimioterapia antineoplásica em associação com terapia antirretroviral (PRIA; HAYWARD; BOWER, 2013; BROCCOLO et al., 2016; GONCALVES et al., 2017).

O papel da replicação do HHV-8 em indivíduos com SK ainda permanece incerto, embora a replicação do HHV-8 ocorra entre 30% a 70% dos indivíduos com SK, enquanto que na doença multicêntrica de Castelman e no linfoma de efusão primário a replicação do HHV-8 desempenha um papel ativo na disseminação e progressão da doença (BROCCOLO et al., 2016). No entanto, o diagnóstico é estabelecido com uma biópsia mostrando células de fuso infectadas com o HHV-8, as quatro formas clínico-epidemiológicas possuem características histológicas indistinguíveis (ABLASHI et al., 2002; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014). As formas de tratamento são por cirurgia, crioterapia para lesões cutâneas superficiais e doxorubicina lipossomal como terapia de primeira linha para formas sistêmicas e mais extensas (AUTEN et al., 2017; SCHNEIDER; DITTMER, 2017).

2.4 Diagnóstico do HHV-8

Os testes de diagnósticos disponíveis para o HHV-8 não são comumente usados na prática clínica devido a dificuldade de padronização frente às necessidades específicas das diversas populações, o que torna difícil o desenvolvimento de um teste considerado padrão-ouro. Além disso, não há um teste confirmatório eficaz para o HHV-8, ao contrário do que ocorre com o HIV, no qual pode ser utilizado o *western blot* para confirmação de um teste sorológico. Face à grande variabilidade, é difícil encontrar uma concordância de dois testes para o HHV-8 devido a grande variabilidade de resultados entre as populações (EDELMAN, 2005; AUTEN et al., 2017).

O ensaio de imunofluorescência (IFA- immunofluorescence assays) foi o primeiro teste sorológico utilizado em inquéritos epidemiológicos, podendo apresentar uma boa especificidade na detecção de anticorpos contra o LANA, codificado pelo gene *ORF-73*. O teste utiliza uma linhagem de células de linfoma de efusão primário infectadas pelo HHV-8 e como resultado a fluorescência nuclear deve estar presente em aproximadamente 95% das células,

assim como, o IFA direto também pode ser utilizado para a detecção de antígenos líticos. O teste utilizando o LANA pode apresentar sensibilidade baixa não sendo a melhor escolha para a pesquisa do anti-HHV-8 em populações com baixo título de anticorpos, além de ser uma técnica laboriosa. (EDELMAN, 2005; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é outro teste sorológico que detecta o LANA, as proteínas líticas codificadas pelo gene *ORF-65*, a partícula viral intacta ou lisada, proteínas estruturais recombinantes, proteína do capsídeo viral (p19) e do envelope (gp35/37). O ELISA geralmente é utilizado em estudos de soroprevalência devido a facilidade de manipulação, execução e baixo custo quando comparado com outras técnicas, detectando uma resposta humoral específica e permitindo a identificação através de anticorpos IgM e IgG (EDELMAN, 2005; SULLIVAN et al., 2008).

As técnicas moleculares permitem detectar o DNA do HHV-8 a partir de tecidos e PBMCs, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), porém não diferencia a infecção lítica da latente, além de serem técnicas caras e não comumente usadas (DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014; MUNAWWAR; SINGH, 2016). Para a PCR deve-se escolher uma sequência de DNA específica para o HHV-8, porém deve-se levar em consideração a sensibilidade da técnica, uma vez que o vírus é encontrado em baixo número de cópias devido a sua característica latente (EDELMAN, 2005; AUTEN et al., 2017).

A PCR quantitativa (qPCR) também tem sido empregada para quantificar a carga viral nos infectados, investigar a associação entre a carga viral e progressão para SK, patogênese e transmissão do HHV-8. É importante ressaltar que apenas 10 a 15% dos soropositivos para o HHV-8 apresentam o DNA, mas essa porcentagem pode aumentar com o desenvolvimento do SK. A viremia do HHV-8 pode ser detectada em 10 a 60% dos pacientes com SK, podendo ser uma ferramenta importante principalmente para PVHA e um indicativo de fator de risco para progressão do SK (EDELMAN, 2005; GANTT; CASPER, 2011).

Exames histopatológicos podem ser empregados para a detecção do SK, porém, as vezes necessitam de um diagnóstico diferencial devido a lesão ser confundida com outras doenças, como hemangiomas, histiocitoma fibroso ou alguns melanomas. A imunohistoquímica em células fixas ou tecido permite a identificação de células que apresentam o vírus *in vivo*. Essa técnica pode ser utilizado para localizar proteínas do HHV-8, detectar a expressão específica de genes, principalmente quando se utiliza a coloração nuclear do LANA, e para confirmar ou descartar o diagnóstico clínico do SK (GANTT; CASPER, 2011).

2.5 Prevenção e tratamento do HHV-8

Não existe vacina ou esquema terapêutico específico recomendado para a prevenção da infecção pelo HHV-8 (GNANN; PELLETT; JAFFE, 2000; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014). A quimioterapia e/ou radioterapia são tratamentos bem sucedidos para a forma clássica do SK, porém, o DNA do HHV-8 permanece no local da lesão, isto explicaria as recorrências nestes casos (EDELMAN, 2005). No entanto, medicamentos anti-herpéticos e a TARV demonstraram reduzir a incidência de SK em pacientes com HIV (GNANN; PELLETT; JAFFE, 2000).

Os anti-herpéticos, como o aciclovir e seus derivados inibem a enzima DNA polimerase viral permitindo um tratamento apenas durante o ciclo lítico da infecção, ou seja, os vírus em ciclo latentes não são afetados (EDELMAN, 2005; CASPER, 2008). Com a introdução da TARV, o HIV foi tratado mais cedo e de forma mais eficaz, favorecendo um declínio nos casos epidêmicos de SK em países desenvolvidos (GANTT; CASPER, 2011; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014). Contudo, este risco reduzido foi apenas com terapia tripla, não incluindo o tratamento único ou duplo para o HIV. A TARV também parece ter um efeito mais eficaz no estágio inicial do SK associado à aids, sendo observada uma redução de aproximadamente 80% nas mortes devido ao SK (EDELMAN, 2005).

Ainda permanecem obscuras as razões para o desenvolvimento do SK em indivíduos sob a TARV, no entanto, a imunodeficiência desempenha um papel fundamental na patogênese desta coinfeção e o SK continua sendo um problema de saúde pública, principalmente em países com recursos limitados que apresentam uma alta prevalência da coinfeção HIV/HHV-8 e acesso limitado a TARV (GANTT; CASPER, 2011; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014).

2.6 Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HHV-8

A soroprevalência do HHV-8 varia amplamente entre diferentes regiões geográficas e sub-populações, variando de 1-3% em doadores de sangue da América do Norte a 70% dos indivíduos de regiões endêmicas da África, demonstrando diferentes padrões endêmicos (SULLIVAN et al., 2008). Bhutani et al (2015) sugerem três padrões endêmicos baseados na soroprevalência, o padrão alto é encontrado em vários locais da África, o intermediário inclui áreas que apresentam uma taxa entre 10-25%, como o Mediterrâneo, enquanto que o padrão

baixo é caracterizado por áreas não endêmicas com taxas menores que 10%, localizadas na América do Norte, Norte da Europa e parte da Ásia (BHUTANI et al., 2015).

Na Uganda, região endêmica para o SK, a soroprevalência atingiu taxas de 50% na população geral, enquanto que na Espanha e Grécia foi de 6-8%. No Norte e Centro da Itália a prevalência em doadores de sangue foi estimada em 7,3% e no Sul em 24,6%. Papua Nova Guiné apresentam um valor de 33% em adultos e a região do Sul do Texas é de aproximadamente 25% (LA FERLA et al., 2013; ROHNER et al., 2014; BHUTANI et al., 2015; MUNAWWAR; SINGH, 2016).

Além das regiões consideradas endêmicas, a prevalência dos anticorpos contra o HHV-8 é alta em algumas populações, no qual já foi estimada em 65% nas tribos Ameríndias da região Amazônica do Brasil, aproximadamente 50% desta população adulta apresenta anticorpos (ISHAK et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2009). Altas taxas de soroprevalência também tem sido relatada em homens que fazem sexo com homens (HSH), nos EUA entre 20-30% em HSH não infectados pelo HIV e de 25-60% em PVHA, embora a população geral apresente uma taxa menor que 5% (BHUTANI et al., 2015).

A soroprevalência do Brasil também varia conforme a população, Zago et al (2000) pesquisaram a soroprevalência do HHV-8 em 747 doadores de sangue, em 88 PVHA e em 136 não infectados com HIV, encontrando uma taxa de 4,6%, 44,3%, 3,7%, respectivamente (KELLER et al., 2001). Em São Paulo, Souza et al (2004) relataram uma soroprevalência de 32,6% em HSH, de 39,2% em PVHA que não tinham SK e 98,7% para pacientes com aids com diagnóstico de SK confirmado por exame histopatológico (SOUZA et al., 2004).

Ishak et al. (2007) relataram 15,5% (74/477) de prevalência do anti-HHV-8 em PVHA no Pará e encontraram uma frequência elevada da infecção entre HSH, 25,8% (25/97), concluindo que a transmissão sexual é uma importante via de disseminação do HHV-8 (ISHAK et al., 2007). Em 2008, Nascimento e colaboradores, estimaram uma soroprevalência de 25,1% entre 3.493 doadores de sangue das cidades de São Paulo, Salvador e Manaus (NASCIMENTO et al., 2008). Batista et al. (2009) realizaram uma coorte com 228 PVHA em São Paulo e relataram a soroprevalência da coinfeção em 25% dos avaliados, não encontraram diferença da mediana da contagem de linfócitos TCD4 e nem da carga viral do HIV, porém após um ano do seguimento da coorte houve uma incidência de 18,1% na soroconversão (BATISTA et al., 2009). Em Pernambuco, Cahú et al. (2016) relataram uma soroprevalência de 28,6% (143/500) da coinfeção HIV/HHV-8, com elevada frequência da coinfeção em HSH, 38,6% (55/143) (CAHÚ et al., 2016).

A associação entre HHV-8 e soropositividade para o HIV é um assunto em debate permanente (ROHNER et al., 2014). No entanto, PVHA são consideradas de alto risco para a infecção pelo HHV-8, uma vez que os vírus têm uma via de transmissão semelhante (BATISTA et al., 2009). Assim, o impacto da coinfeção HIV/HHV-8 tem sido avaliado e trabalhos têm demonstrado que o HIV pode ser um cofator importante na progressão da infecção pelo HHV-8 e no desenvolvimento e patogênese do SK (CASPER, 2008; DOW; CUNNINGHAM; BUCHANAN, 2014).

Zeng et al. (2007) mostraram que a proteína Tat, codificada pelo HIV-1, pode induzir o ciclo lítico do HHV-8 através da ativação da via de sinalização STAT3, assim como, ativar a indução da produção da hIL-6 e do receptor desta interleucina (ZENG et al., 2007). Além da proteína Tat, outros fatores relacionados ao HIV podem mediar o ciclo lítico do HHV-8 e interferir na história natural da infecção. Varthakavi et al. (2002) demonstraram que o HIV induz o ciclo lítico do HHV-8, em tecidos de linfoma de efusão primário, através da ativação da Rta, que é um produto do gene *ORF 50* capaz de controlar a transcrição do ciclo latente para ciclo lítico (VARTHAKAVI et al., 2002).

Por outro lado, o HHV-8 também interfere no curso e progressão do HIV, porém são interações complexas e que ainda não foram totalmente elucidadas. Como por exemplo, o LANA, antígeno específico do HHV-8, pode ativar o HIV através da regulação da LTR ou através da *ORF 50*, um gene do ciclo lítico, que interage com a proteína Tat do HIV resultando no aumento da susceptibilidade celular à infecção pelo HIV. Ressaltando que o HHV-8 também estimula a replicação do HIV nas células que apresentam infecção aguda, assim como, reativa as células que apresentam a infecção crônica (CASELLI et al., 2003; CASELLI, 2005; BATISTA et al., 2009).

Também pode haver implicações prognósticas quanto a ordem e o momento em que essas duas infecções ocorrem, aproximadamente 50% dos indivíduos que adquirem a infecção pelo HHV-8 com infecção prévia do HIV desenvolvem (MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010). Tem sido observado que a incidência do SK aumenta em pessoas com seroconversão para HHV-8 após o HIV, com razão de risco de 2,55 para 5,04. Por outro lado, às PVHA que foram previamente infectadas pelo HHV-8, apresentaram um risco é de 1,6 em desenvolver o SK. Além disso, o SK associado a aids é mais agressivo e resistente ao tratamento do que as outras formas, assim como, o risco é também é aumentando em até 20.000 em indivíduos infectados com o HIV e que não estão sob tratamento (BATISTA et al., 2009; ROHNER et al., 2014; VOLKOW et al., 2016).

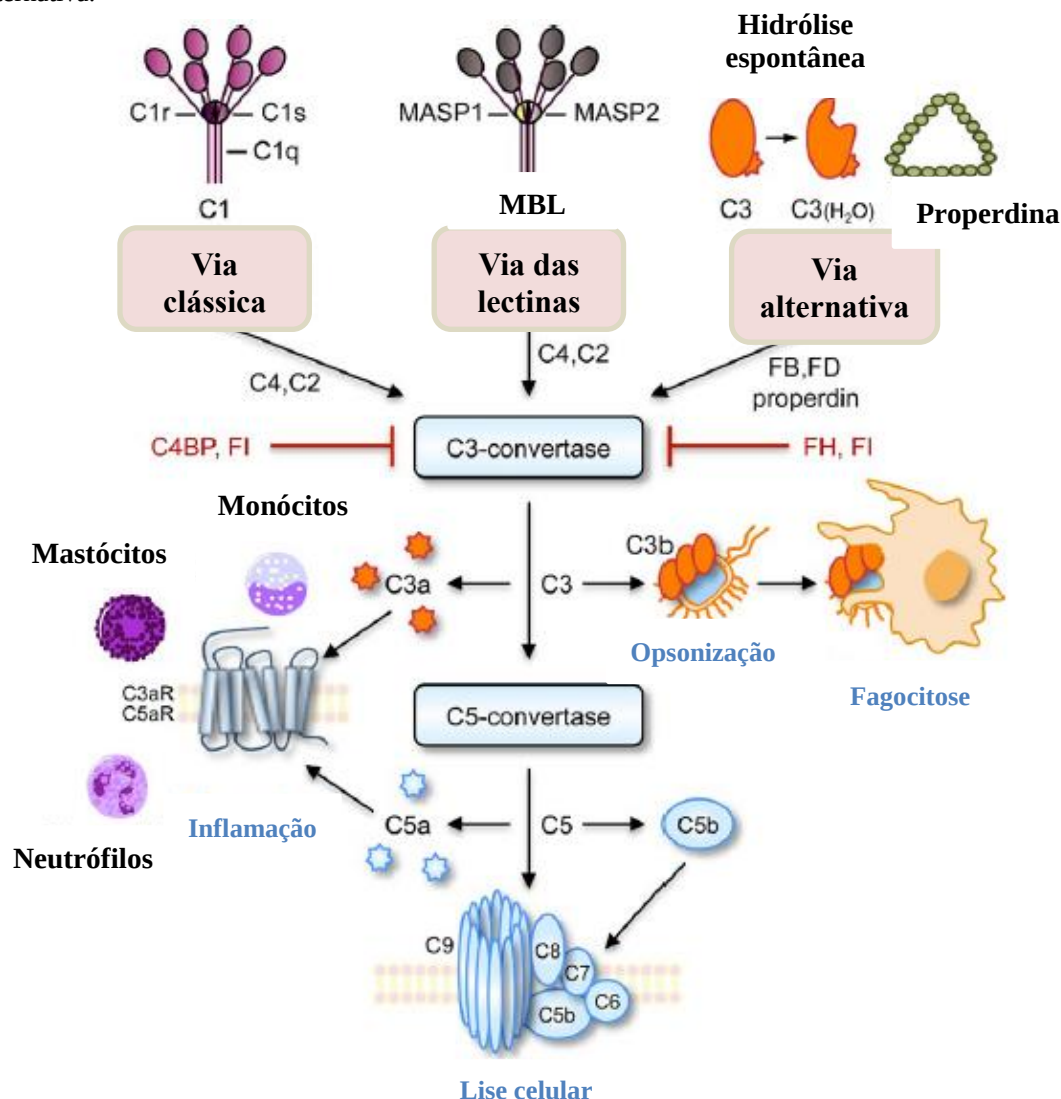
Sabe-se que o controle do HHV-8 em indivíduos infectados é coordenado pela imunidade inata e adaptativa, assim como, citocinas inflamatórias e infiltrados de células imunes, sendo provável que a ativação dessas respostas durante a infecção primária induza o vírus a entrar em latência. A resposta imune inata é iniciada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que engloba os receptores de lectina do tipo C, como por exemplo a MBL (DITTMER; DAMANIA, 2016; MARTIN; BLOM, 2016).

A MBL participa de um conjunto de mais de trinta proteínas séricas e de membranas denominadas coletivamente de complemento, que desempenham, de maneira regulada, papel fundamental no processo de defesa do hospedeiro, além de ser considerada a proteína central da ativação da via das lectinas do sistema complemento. Assim, a deficiência ou ausência de qualquer componente proteico pode gerar padrões anormais de ativação do sistema complemento levando a susceptibilidade à diversos patógenos e/ou a várias formas na evolução das doenças (EDDIE et al., 2009; STOERMER; MORRISON, 2011).

2.7 Lectina ligante de manose

A MBL pertence a uma família de proteínas denominadas de colectinas, devido aos domínios de colágenos e de lectinas. É sintetizada principalmente no fígado e circula predominantemente como proteína sérica, mas também já foi detectada no líquido sinovial da articulação inflamada, na secreção nasofaríngea, entre outras secreções, sendo amplamente estudada em diversas infecções causadas por vírus, bactérias e parasitas. Possui a capacidade de reconhecer unidades de açúcares como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetil-manosamina, fucose e glucose, expressos por diferentes microrganismos e estruturas, e ativar a via das lectinas do sistema complemento através da associação com as serinas proteases MASP-1, MASP-2 e MASP-3, conforme figura 3 (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; EDDIE et al., 2009; DOBÓ et al., 2016).

Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação do sistema complemento através da via clássica, via das lectinas e via alternativa.



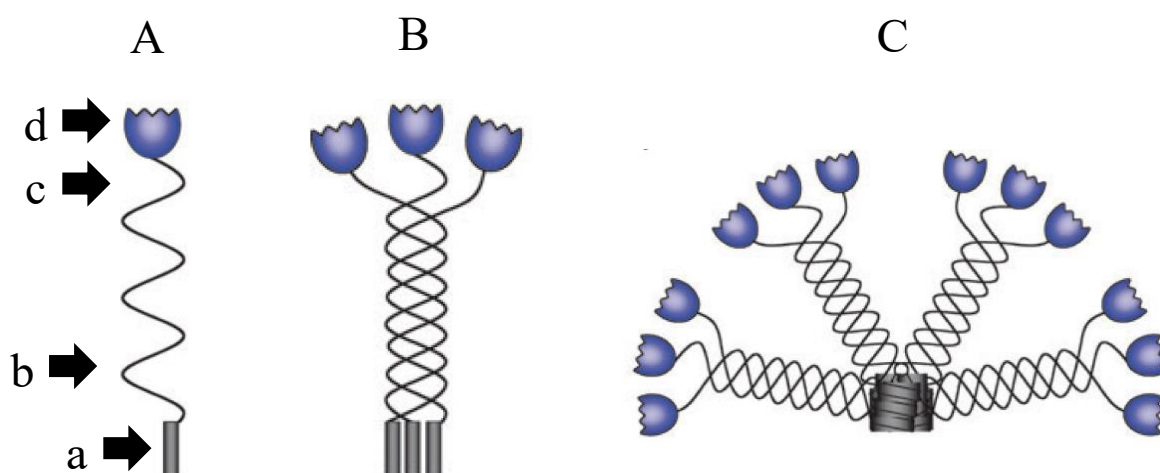
Fonte: Adaptada de MARTIN; BLOM, 2016.

A proteína MBL é codificada pelo gene *MBL-2* no cromossomo 10 com 32 kDa, sendo constituída por múltiplos de uma cadeia polipeptídica idêntica que compreende quatro regiões, a região N-terminal rica em cisteína, um domínio colagenoso, uma região hidrofóbica em espiral helicoidal chamada de pescoço e um domínio de reconhecimento à carboidrato, conforme demonstrado na figura 4 (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; MARTIN; BLOM, 2016).

A subunidade básica da MBL é formada por três cadeias polipeptídicas formando uma hélice tripla que interagem através da região colagenosa, essa estrutura é estabilizada por interações hidrofóbicas e ligações dissulfureto entre as região N-terminais ricas em cisteína, figura 4B. Esta forma trimérica é a estrutura básica encontrada em todos os tipos de MBL,

porém, no soro, a proteína consiste em oligômeros associados em duas a seis subunidades, ou seja, variando de dímeros a hexâmetros, figura 4C. Estes oligômeros são considerados de ordem superior, por apresentar estruturas de tetrâmeros a hexâmeros, são as formas mais eficazes em termos de função da MBL, como por exemplo em relação a interação de glicano e a ativação do complemento em superfícies microbianas (EISEN; MINCHINTON, 2003; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; GARRED et al., 2006; EDDIE et al., 2009).

Figura 4. Subunidades estruturais da MBL. A: Região N-terminal (a), domínio collagenoso (b), região do pescoço (c) e domínio de reconhecimento à carboidrato (d) da subunidade básica ou monômero; B: oligômero e C: tetrâmero.



Fonte: Adaptado de EDDIE et al, 2009.

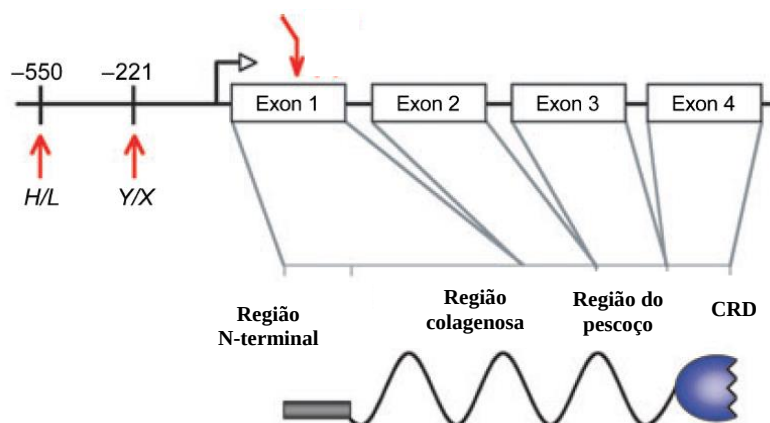
O genoma apresenta quatro exons interrompidos por três introns de 600, 1350 e 800 pares de base, o exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região collagenosa, e o restante da região collagenosa é codificada pelo exon 2. Enquanto o exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada e o exon 4 o domínio de reconhecimento ao carboidrato (EISEN; MINCHINTON, 2003; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; GARRED et al., 2006).

A expressão da MBL funcional é determinada geneticamente e sua concentração varia em função dos polimorfismos encontrados na região estrutural do exon 1 e de outros presentes a região promotora do gene *MBL-2* como -550 e -221. No exon 1 são comumente encontrados três polimorfismos nos códons 52, 54 e 57, que afetam significativamente a função e os níveis séricos da MBL, compreendendo as trocas de bases nos códons denominados de variantes D, B e C, respectivamente (EDDIE et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2016).

A variante D resulta da substituição de CGT por TGT, substituindo arginina por cisteína, enquanto na variante B ocorre a substituição de GGC por GAC, substituindo glicina por ácido aspártico e a variante D substitui GGA por GAA, substituindo glicina por ácido glutâmico no domínio colagenoso alterando a estrutura helicoidal do peptídeo e interferindo na oligomerização dos péptidos da MBL ou na montagem da forma trimerica em multímeros. Essas três variantes são coletivamente designadas como alelo O e o tipo selvagem é representado pelo alelo A, assim, indivíduos que são homozigotos, ou seja, O/O, onde O pode ser D, B ou C para um alelo mutante, podem produzir MBL em quantidades deficientes ou indetectáveis por ELISA, enquanto que os indivíduos considerados heterozigotos (A/O) para a mutação possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados aos indivíduos homozigotos (A/A) para o alelo selvagem (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; VASCONCELOS et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2016).

Os polimorfismos nas posições -550 e -221, que ocorrem por substituição dos nucleotídeos G por C originam as variantes H/L e X/Y, respectivamente (figura 5). Considerando a localização citogenética do -550, -221 e do exon 1, estes três *loci* estão intimamente ligados e a combinação dos polimorfismos destas regiões resulta em diferentes haplótipos que podem estar associados a concentrações plasmáticas. Quando o alelo codificante A é herdado, os haplótipos HY, LY e LX da região promotora estão associados com altas, intermediárias e baixas concentrações séricas de MBL, respectivamente. Os genótipos O/O, A/O e LXA/LXA estão associados a níveis baixos de MBL e o genótipo O/O está associado com extrema deficiência da MBL (EISEN; MINCHINTON, 2003; WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005; HALLA et al., 2010).

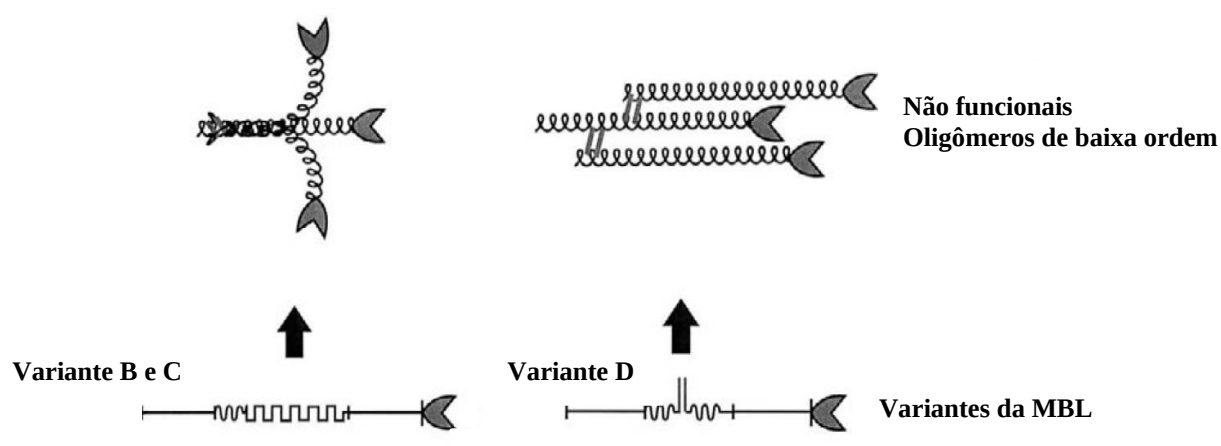
Figura 5. Gene *MBL2* alinhado com as regiões codificadas, indicando os polimorfismos da região promotora (-550, -221) e da região estrutural (exon 1).



Fonte: Adaptado de EDDIE et al, 2009.

Esses polimorfismos podem resultar em defeitos na polimerização da molécula ocasionando deficiência funcional e de expressão da proteína (figura 6). Eles também reduzem a formação de oligômeros de ordem superior, diminuindo as moléculas da MBL capazes de se ligar ao alvo pela região de domínio de carboidratos. A interferência na formação de oligômeros superiores também pode inibir a associação da MASP, e reduzir a capacidade de ativação do sistema complemento. Dessa forma, as variações afetam a integridade estrutural da MBL e estão associados com uma redução de 2 a 100 vezes nos níveis circulantes, e têm um efeito sobre a susceptibilidade ou a resistência do hospedeiro à infecção por vários agentes patogênicos, assim como à progressão da doença, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (EDDIE et al., 2009; HALLA et al., 2010; LI; FU; HONG, 2013).

Figura 6. Esquema ilustrativo de oligômeros não funcionais devido aos polimorfismos do gene *MBL2*.



Fonte: Adaptado de EISEN; MINCHINTON, 2003.

2.8 MBL e infecções virais

Estudos têm sido realizados sobre os polimorfismos do gene *MBL2* e as concentrações plasmáticas desta proteína, assim, essas variáveis estão sendo associadas à susceptibilidade aumentada às infecções e à progressão da doença, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (ALVES PEDROSO et al., 2008; HALLA et al., 2010; DA CRUZ et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2016). Relatos indicam que os indivíduos diferem na suscetibilidade à infecção pelo HIV e que os polimorfismos genéticos do hospedeiro são essenciais na regulação imunológica e podem aumentar ou reduzir o risco de infecções pelo

HIV (VALLINOTO et al., 2008, 2011; DA SILVA et al., 2011; ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a, 2015b).

Sabe-se que a MBL se liga diretamente a vírus de diversas famílias, como o dengue, Ebola, influenza, HIV, entre outros, e esta interação leva a neutralização por deposição do complemento C3 e C4 no vírus, prevenindo a interação do vírus com a célula hospedeira e conduzindo a uma maior fagocitose ou lise viral (THIELENS; TACNET-DELORME; ARLAUD, 2002; IP et al., 2005; STOERMER; MORRISON, 2011; BRUDNER et al., 2013; EGLI et al., 2013). Em relação a família Herpesviridae, foi relatado que a MBL se liga às glicoproteínas de superfície do HHV-2, embora não seja conhecida especificamente qual seria esta estrutura (SEPPÄNEN et al., 2009). Enquanto o CMV apresenta glicoproteínas que são alvos potenciais para a ligação da MBL, podendo impedir a entrada dos vírus nas células hospedeiras, outra possibilidade é que a MBL poderia reconhecer as glicoproteínas do CMV na superfície de uma célula infectada com este vírus e consequentemente induzir a destruição da célula mediada pelo complemento (CERVERA et al., 2007; WU et al., 2012). Em relação ao HHV-8, ainda não se sabe como a MBL poderia auxiliar no controle ou eliminação desta infecção, porém, este vírus apresenta no envelope viral uma estrutura de carboidratos de manose, a glicoproteína B (gB), que poderia ser um alvo em potencial para a ligação da MBL (CHAKRABORTY; VEETIL; CHANDRAN, 2012; HENSLER et al., 2014).

O papel dos polimorfismos e das concentrações deficientes da MBL funcional tem se mostrado diferente em relação às diversas infecções, podendo aumentar o risco ou a proteção para aquisição da infecção (ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a, 2015b). No entanto, é necessário ressaltar a escassez de pesquisas sobre os polimorfismos do gene *MBL2* e as dosagens das concentrações plasmáticas desta proteína em indivíduos infectados pelo HHV-8 ou coinfectados HIV/HHV-8, por isso os estudos abordados são referentes a família Herpesviridae e ao HIV.

Vallinoto et al (2006) investigaram a associação entre o polimorfismo do exon 1 (52, 54 e 57) e a susceptibilidade à infecção pelo HIV em 145 infectados e 99 controles saudáveis, sugerindo que os baixos níveis séricos da MBL, podem estar associados com uma eliminação ineficaz do HIV partir do sangue dos infectados, levando a um aumento da carga viral plasmática, porém, relataram que é prematuro afirmar que a presença dos genótipos pode estar associada à maior susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 (VALLINOTO et al., 2006).

Manuel et al (2007) dosaram as concentrações da MBL em 16 receptores de transplante renal de alto risco (doador positivo e receptor negativo) para o CMV, sendo considerados como funcionalmente deficientes as concentrações abaixo de 500 ng/ml. Os autores concluíram que

a deficiência da MBL pode ser um fator de risco significativo para o desenvolvimento de infecção por CMV em receptores de transplante renal, sugerindo o papel da imunidade inata no controle da infecção por CMV após o transplante de órgãos (MANUEL et al., 2007).

Sheng et al (2008) estudaram a associação dos polimorfismos do gene *MBL2* e as concentrações plasmáticas em 115 PVHA e 115 indivíduos saudáveis do norte da China. As frequências dos haplótipos LY, HY e LX apresentaram diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,041$) e a concentração plasmática média no grupo de PVHA foi de 1775,14 $\mu\text{g/L}$ ($\pm 786,31$), enquanto que nos indivíduos saudáveis foi de 3672,21 $\mu\text{g/L}$ ($\pm 597,13$), com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$). Dessa forma, os polimorfismos da região promotora do gene *MBL2* e as concentrações plasmáticas podem estar associadas com a suscetibilidade à infecção pelo HIV na população do norte da China e os indivíduos com baixa concentração plasmática da MBL são mais suscetíveis à infecção (SHENG et al., 2008).

Seppanen et al (2009), avaliaram o efeito dos genótipos do exon 1 (52, 54 e 57) e da região promotora (-221), sobre o risco de infecção recorrente pelo HHV-2 em 51 pacientes e 147 controles, e encontraram associação da variante O com um risco aumentado de recorrência da infecção ($p = 0,005$). Os autores concluíram que devido as mutações estruturais do gene *MBL2* o reconhecimento do HHV-2 é prejudicado e predisponhe os indivíduos as infecções recorrentes por este vírus (SEPPÄNEN et al., 2009).

Friborg et al (2010) realizaram um estudo de coorte para determinar se os polimorfismos do exon 1 (52, 54 e 57) e da região promotora (-221) do gene *MBL2* estavam associados com soroconversão pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em crianças menores de quatro anos de idade. Foram genotipadas 247 amostras e posteriormente divididas em dois grupos, um MBL em níveis suficiente (234) e outro como MBL em níveis insuficiente (13) e observaram que a soropositividade para o EBV foi significativamente menor para o grupo com MBL insuficiente, indicando que os polimorfismos do gene *MBL2* que determina baixos níveis da MBL funcional no soro são associados a um atraso na infecção primária por EBV.

Kwakkel-Van Erp et al (2011) avaliaram o papel da MBL na reativação do citomegalovírus (CMV) e no desenvolvimento da síndrome de bronquiolite obliterante em 85 pacientes antes e 57 após transplante pulmonar. Foi observado que os níveis da MBL diminuíram em média 20% ($p < 0,001$) após transplante e retornaram aos níveis do pré-transplante, porém não houve associação entre a deficiência da MBL e o desenvolvimento da síndrome de bronquiolite obliterante. Por outro lado, houve reativação do CMV quando ocorreu suspensão da profilaxia em 50% dos receptores que apresentaram níveis de MBL baixos pré-

transplante (<300 ng/ml), concluindo que a deficiência de MBL está associada a reativações do CMV (KWAKKEL-VAN ERP et al., 2011).

Silva et al (2011) genotiparam os polimorfismos -550, -221 e do exon 1 do gene *MBL2* em 410 PVHA e 345 doadores de sangue saudáveis do Sul do Brasil para investigar o papel da MBL na susceptibilidade à infecção pelo HIV. Inicialmente os indivíduos foram subdivididos em europeus e africanos de acordo com a origem étnica e foi verificado que nas PVHA de etnia europeia o haplótipo relacionado aos níveis baixos da MBL (LX/LX) foi mais frequente quando comparado com os controles ($p < 0,001$) (DA SILVA et al., 2011). Enquanto que as PVHA de etnia africana os haplótipos relacionados aos níveis intermediários (LY/LY; $p = 0,009$) e aos níveis elevados (HY/HY; $p = 0,02$) foram os mais frequentes. Os autores concluem que baixas concentrações séricas de MBL estão associadas a fagocitose e opsonização ineficientes e que os polimorfismos do gene *MBL2* podem gerar uma resposta ineficaz contra a infecção viral em indivíduos com ascendência europeia, sugerindo que indivíduos com variantes da MBL que são menos eficientes na remoção de patógenos seriam mais susceptíveis à infecção pelo HIV-1.

Zinyama-Gutsire et al (2015) realizaram um estudo em Zimbábue, na África do Sul, em 197 infectados pelo HIV e 181 negativos avaliando a concentração plasmática da MBL e os polimorfismos da região estrutural (54A>G, 57A>G 52T>C) e promotora do gene *MBL2* (-550 (H/L), -221 (X/Y) e +4 (P/Q)). Não houve diferença significativa entre as medianas dos grupos HIV negativo (912 µg/L) e HIV positivo (688 µg/L), porém o valor de p foi limítrofe ($p = 0,06$). Nenhuma das variantes do gene *MBL2* apresentaram associação com a infecção pelo HIV-1 nesta população (ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015b). Em outro estudo, considerando os mesmos 197 infectados pelo HIV, Zinyama-Gutsire et al (2015) detectaram uma frequência de 21% (42/197) da deficiência nas concentrações plasmáticas da MBL (<100 µg/L) enquanto que as variantes genéticas deficientes foram 39% (74/190). Concluíram que as concentrações deficientes da MBL plasmática não estão associadas com a contagem do TCD4 ou a carga viral do HIV (ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a).

Diante do exposto, estudos que avaliem os polimorfismos do gene *MBL2* e as concentrações plasmáticas em relação à susceptibilidade do hospedeiro à infecção ou progressão de doenças são essenciais e auxiliarão a compreender as interações entre o HHV-8 e o sistema imunológico, considerando que as mutações no gene *MBL2* poderiam ser responsáveis por diferentes respostas imunológicas interindividuais e contribuir para a maior susceptibilidade à infecção pelo HHV-8 em PVHA

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre os polimorfismos -550 -221 e exon 1 do gene *MBL2* e a expressão dos haplótipos com a coinfeção HIV/HHV-8 e comparar as concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados e monoinfectados pelo HIV.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Comparar as medianas das variáveis clínicas (carga viral do HIV, contagem do TCD4, tempo de infecção pelo HIV, tempo até o início da TARV, tempo de uso da TARV) em coinfectados e monoinfectados;
- ✓ Estimar as frequências dos alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos -550, -221 e exon 1 e verificar a associação com a coinfeção HIV/HHV-8;
- ✓ Verificar a associação entre os haplótipos de expressão baixa, intermediária e alta com a primeira carga viral do HIV e contagem do TCD4 e última carga viral do HIV e contagem do TCD4;
- ✓ Quantificar e comparar as concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados e monoinfectados;
- ✓ Estimar as frequências das concentrações plasmáticas deficientes da MBL e verificar a associação com a coinfeção HIV/HHV-8;
- ✓ Correlacionar as concentrações plasmáticas da MBL com a carga viral do HIV e contagem do TCD4 em coinfectados e monoinfectados.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo caso-controle aninhado ao corte transversal.

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.

Definição de caso: PVHA com o diagnóstico sorológico da infecção pelo HHV-8 detectada pelo ELISA, no qual identificou anticorpos contra proteínas estruturais e não estruturais do HHV-8, sendo caracterizados como coinfectados HIV/HHV-8, conforme Cahú et al. (2016).

4.2 População e local do estudo

Foram utilizadas as amostras biológicas e o bando de dados de PVHA acompanhadas no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no período de novembro de 2013 a julho de 2014, provenientes da linha de pesquisa sobre os “Aspectos epidemiológicos, clínicos, genéticos, imunológicos e laboratoriais da infecção pelo HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids” desenvolvida no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE).

As amostras biológicas, sangue total e plasma, estavam armazenadas em microtubos no freezer sob a temperatura de -86°C e -20°C, respectivamente. Enquanto as variáveis socioepidemiológicas e clínicas foram obtidas do banco de dados que estavam armazenados em planilhas do excel, essas informações foram obtidas conforme Cahú et al. (2016). O banco de amostras biológicas e o banco dados pertencem ao Setor de Virologia do LIKA.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

4.3.1 Critérios de inclusão

Amostras de indivíduos com diagnóstico sorológico para a infecção pelo HIV e para a coinfeção HIV/HHV-8.

4.3.2 Critérios de exclusão

Amostras de PVHA coinfectados com o vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus linfotrópico das células T humano (HTLV) e aqueles sob quimioterapia.

4.4 Tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado pelo software Epi Info, versão 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, EUA), baseando-se na menor prevalência referente aos polimorfismos do gene MBL2 pesquisados em doadores de sangue da cidade do Recife por Vasconcelos et al 2011. Para o cálculo utilizou-se intervalo de confiança de 99,9%, poder do estudo de 80%, número de controles por caso de 1 e com a proporção de controles expostos ao polimorfismo de 17%, resultando em um tamanho amostral de 91 casos e 91 controles.

4.5 Definição das variáveis

4.5.1 Variáveis dependentes

Foi considerada como variável dependente as concentrações plasmáticas da MBL funcional definida como a quantificação desta proteína no plasma, categorizada como variável numérica contínua expressa em ng/mL.

4.5.2 Variáveis independentes

As variáveis independentes estão indicadas no quadro 1.

Quadro 1. Definição e categorização das variáveis relacionadas aos coinfectados e monoinfectados.

Variável	Definição	Categorização
Sexo	Sexo biológico. Variável nominal dicotômica (masculino/feminino).	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea.	Variável numérica contínua expressa em anos.
Tempo da infecção pelo HIV	Tempo decorrido do diagnóstico do HIV até a data de coleta da amostra sanguínea, sendo referido no prontuário do paciente.	Variável numérica contínua expressa em anos.

Tempo de diagnóstico do HIV até o início da TARV	Tempo decorrido do diagnóstico do HIV até a data do início do uso da TARV, sendo referido no prontuário do paciente.	Variável numérica contínua expressa em anos.
Tempo de uso da TARV	Tempo decorrido do início do uso da TARV até a data de coleta da amostra sanguínea, sendo referido no prontuário do paciente.	Variável numérica contínua expressa em anos.
Primeiro TCD4	Primeira contagem dos linfócitos T CD4+ do paciente realizada no início do acompanhamento no ambulatório de DIP-UFPE, sendo referida no prontuário do paciente. Variável numérica contínua expressa em células/mm ³ .	1. ≤350 2. >350
Último TCD4	Última contagem dos linfócitos T CD4+ do paciente realizada no período máximo de três meses anteriores a data da última coleta da amostra sanguínea, sendo referida no prontuário do paciente. Variável numérica contínua expressa em células/mm ³ .	1. ≤350 2. >350
Primeira carga viral do HIV	Primeira quantificação do HIV-RNA no soro do paciente realizada no início do acompanhamento no ambulatório de DIP-UFPE, sendo referida no prontuário do paciente. Variável numérica contínua expressa em cópias/ml.	1. >150.000 2. ≤150.000
Última carga viral do HIV	Última quantificação do HIV-RNA no soro do paciente realizada no período máximo de três meses anteriores a data da última coleta da amostra sanguínea, sendo referida no prontuário do paciente. Variável numérica contínua expressa em cópias/ml.	1. Detectável 2. Indetectável
Sarcoma de Kaposi	Diagnóstico do sarcoma de Kaposi, sendo referido no prontuário do paciente.	1. Presente 2. Ausente
Alelo do -550	Presença do alelo H ou L referente à posição rs11003125 na região promotora do gene <i>MBL2</i> . Variável nominal.	H = selvagem L = mutante
Alelo do -221	Presença do alelo X ou Y referente à posição rs7096206 na região promotora do gene <i>MBL2</i> . Variável nominal.	Y = selvagem X = mutante
Alelo do éxon 1	Presença do alelo A ou O referente às posições rs1800450 (códon 54), rs1800451 (códon 57) e rs5030737 (códon 52) na região estrutural do gene <i>MBL2</i> . Variável nominal.	A = selvagem O = mutante
Genótipo do -550	Junção dos alelos H e/ou L do polimorfismo -550 da região promotora do gene <i>MBL2</i> . Variável categórica nominal.	H/H = homozigoto selvagem H/L = heterozigoto L/L = homozigoto mutante

Genótipo do -221	Junção dos alelos X e/ou Y do polimorfismo -221 da região promotora do gene <i>MBL2</i> . Variável categórica nominal.	Y/Y = homozigoto selvagem X/Y = heterozigoto X/X = homozigoto mutante
Genótipo do éxon 1 nos códons 54, 52 e 57	Junção dos alelos A e/ou O do polimorfismo éxon 1 da região estrutural do gene <i>MBL2</i> . Variável categórica nominal.	A/A = homozigoto selvagem A/O = heterozigoto O/O = homozigoto mutante
Haplótipos	Junção dos alelos referentes aos polimorfismos -550, -221 e éxon 1 do gene <i>MBL2</i> para categorização da expressão alta, intermediária e baixa da MBL. Variável categórica nominal.	Expressão alta=LYA/LYA, HYA/HYA e HYA/LYA Expressão intermediária =HYA/HXA, HYA/HYO, HYA/LXA, HYA/LYO, LYA/LXA, LYA/LYO e LXA/LXA Expressão baixa = HYO/HYO, HYO/LYO e LYO/LYO

4.6 Operacionalização do estudo

4.6.1 Extração do DNA e genotipagem da MBL

O DNA genômico foi extraído de leucócitos isolados a sangue total com anticoagulante (EDTA) utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram mensuradas em relação à concentração e ao grau de pureza do DNA, utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. As amostras foram diluídas para a concentração de DNA necessária para cada PCR, sendo realizada uma nova extração quando necessário.

A genotipagem da região estrutural (exon 1) do gene da *MBL2* foi realizada através da qPCR utilizando o kit *Express Sybr Greener Supermix* (Invitrogen, USA) e aplicando a metodologia da temperatura de *melting* (MTA). Para a solução de amplificação da qPCR foi utilizado 10µM de cada *primer* e 15ng de DNA para um volume final de 25µL. O perfil da temperatura utilizado na termociclagem foi de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos com rampa de *melt* de 60° para 95°C.

Os perfis da curva de *melting* foram obtidos utilizando o software de dissociação do Rotor Gene-6000 (Corbett Research, Sydney, Austrália), os três alelos variantes do exon nas posições do codons 52, 54, e 57 foram designadas O e o alelo do tipo selvagem foi designado A, conforme descrito por Hladnik et al (2002), Halla et al (2010), Vasconcelos et al (2011) e Figueiredo et al (2016), Constantino et al (2017).

Os polimorfismos -550 e -221 da região promotora do gene *MBL2* foram genotipados através da qPCR utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) e o Rotor Gene-6000 (Corbett Research, Sydney, Austrália). A solução de amplificação da qPCR para ambos os polimorfismos foi realizada utilizando 2µM de cada sonda, 10µM de cada *primer* e 50ng de DNA para um volume final de 25µL. O perfil de temperatura utilizado na termociclagem referente ao -550 e -221 foi de 50°C por 2 minutos, seguidos de 50 ciclos de 95°C por 10 minutos, 92°C por 30 segundos e um ciclo de 60°C por 60 segundos (Hladnik et al 2002, Halla et al 2010, Vasconcelos et al 2011, Figueiredo et al (2016), Constantino et al (2017). As sequências dos *primers* e das sondas utilizados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers e sondas utilizados para detecção dos polimorfismos na região promotora e estrutural do gene *MBL2*.

Regiões do gene <i>MBL2</i>		Sequência de nucleotídeos
Exon1		
	<i>Primer forward</i>	5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3'
	<i>Primer reverse</i>	5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'
-550		
	<i>Primer forward</i>	5'- CCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA-3'
	<i>Primer reverse</i>	5'- CAACCCAGCCCAGAATTAAGT-3'.
	Sonda VIC	5'-VIC-CCTGTCTAAAACACC-MGB-3
	Sonda FAM	5'-FAM-AGCCTGTGTAAAC-MGB-3
-221		
	<i>Primer forward</i>	5'- GCACGGTCCCATTGTTCTCA-3'
	<i>Primer reverse</i>	5'-GCGTTGCTGCTGGAAGACTATAAA-3'
	Sonda VIC	5'-VIC-CATGCTTTTCGGTGGCAG-MGB-3'
	Sonda FAM	5'-FAM-CATGCTTTCCGTGGCAG-MGB-3'

4.6.2 Haplótipos da MBL de acordo com o agrupamento dos genótipos

Os genótipos da região promotora (-550 H/L e -221 Y/X) e da região estrutural (exon 1 A/O) foram agrupados em coinfectados e monoinfectados, sendo categorizados como expressão baixa da MBL os haplótipos HYO/HYO, LYO/LYO e HYO/LYO, expressão intermediária os HYA/HXA, HYA/HYO, HYA/LXA, HYA/LYO, LXA/LXA, LYA/LXA e LYA/LYO e

expressão alta os LYA/LYA, HYA/HYA e HYA/LYA, conforme Garred et al (2003), Vasconcelos et al (2011) e Figueiredo et al (2016).

4.6.3 Concentrações plasmáticas da MBL

As concentrações plasmáticas da MBL foram obtidas pelo método do ELISA utilizando o kit comercial *Human Mannose Binding Lectin* (MyBioSource, San Diego, CA), que apresenta sensibilidade de detecção mínima de 0.05 ng/ml e ótima especificidade por não demonstrar reação cruzada com outros fatores. Utilizou-se o plasma diluído de 1:100 e o protocolo foi realizado seguindo as orientações do fabricante, considerando como concentrações plasmáticas deficientes aquelas <100 ng/ml (GADJEVA et al., 2004; EGLI et al., 2013; ZINYAMA-GUTSIRE et al., 2015a).

4.6.4 Análise estatística

O teste de normalidade foi aplicado para verificar se as frequências das concentrações plasmáticas da MBL, da carga viral do HIV e da contagem do TCD4 tinham uma distribuição normal, após esta análise foram utilizados dos testes não-paramétricos para as comparações entre os grupos.

Para verificar a existência da associação entre os polimorfismos do gene *MLB2* e a coinfeção HIV/HHV-8 foi utilizado o teste G (Williams) e o *Trend test* utilizando o Q de Cochran. As variáveis estudadas foram categorizadas para a análise univariada, com o objetivo de identificar presença da associação entre os grupos, sendo utilizado o teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher. Para esses testes, quando $p < 0,05$, foi possível estimar o risco através dos valores do *odds ratio* (ORs) juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95% (ICs).

As variáveis que apresentaram associação com o desfecho após a análise univariada, com valor de $p < 0,25$, foram selecionadas para compor o modelo inicial da análise multivariada, nos quais os modelos logísticos foram ajustados. Após o modelo final da análise multivariada, permaneceram associadas as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,05$.

As variáveis contínuas foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis e para correlacionar as concentrações plasmáticas da MBL com a carga viral do HIV e contagem do TCD4 foi utilizado o teste de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

As análises foram realizadas com o *software* Epi Info, versão 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, EUA), Bioestat versão 5.0 (Belém, Pará, Brasil) e Rstudio versão 1.0.143 (Northern Ave, Boston, MA), enquanto o GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para ilustração dos resultados através da construção de gráficos. Para verificar se a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg e para a construção de haplótipos foi utilizado o programa Arlequin (versão 3.11, Universidade de Berna, Suíça).

4.7 Considerações éticas

Esta pesquisa faz parte de um projeto intitulado “Aspectos epidemiológicos, clínicos, genéticos, imunológicos e laboratoriais da infecção pelo HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob o número CAAE 22428813.5.0000.5208, conforme anexo A.

5. RESULTADOS

5.1 Artigo 1

- Título do periódico: Plos One
- Classificação qualis: A2
- Área de avaliação: Medicina II

POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* E INFECÇÃO PELO HHV-8 EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS

Resumo

Fatores genéticos do hospedeiro, como os polimorfismos do gene *MBL2* ocasionam defeitos na polimerização da MBL resultando na deficiência funcional e/ou nos níveis séricos, podendo influenciar a susceptibilidade dos indivíduos frente às diversas infecções virais. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência dos alelos, genótipos e haplótipos referente aos polimorfismos -550, -221 e exon 1 do gene *MBL2* e verificar se existe associação com a infecção pelo HHV-8 em PVHA e com as variáveis clínicas contagem do TCD4 e carga viral do HIV. Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle composto de PVHA acompanhadas no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias em um hospital de referência. A extração do DNA genômico a partir dos leucócitos, foi realizada com o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI), a genotipagem da região promotora (-550 e -221) com o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) e da região estrutural (exon1) com o kit *Express Sybr Greener Supermix* (Invitrogen, USA). Foram analisados 124 indivíduos coinfectados HIV/HHV-8 e 213 monoinfectados pelo HIV, sendo mais frequente os genótipos LL, YY e AA dos polomorfismos -550, -221 e exon 1 respectivamente em ambos os grupos e não foi encontrada associação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas com a infecção pelo HHV-8 em PVHA. No entanto, na análise multivariada, os coinfectados com haplótipo da MBL de expressão intermediária tiveram uma razão de chance de 3,06 vezes da última contagem do TCD4 estar abaixo de 350 células/mm³. Dentre os coinfectados, quatro desenvolveram o SK e também apresentaram a combinação haplotípica da MBL de expressão intermediária, sendo três HYA/LXA e um LYA/LYO. Por tanto, considerando a capacidade da MBL de se ligar à glicoproteína gp120 do HIV-1, os coinfectados com a combinação haplotípica de expressão

intermediária podem apresentar uma eliminação ineficiente do HIV devido à deficiência da MBL sérica, levando ao aumento da carga viral plasmática e diminuição dos linfócitos TCD4, sugerindo que estes haplótipos podem interferir na clínica da coinfeção HIV/HHV-8.

Palavras-chave: Herpesvirus humano 8; lectina ligadora de manose; coinfeção HIV/HHV-8; gene *MBL2*.

Introdução

O herpesvírus humano 8 (HHV-8) está associado a todas as formas de sarcoma de Kaposi (SK), sendo o agente etiológico necessário, mas insuficiente para o desenvolvimento desta doença [1,2]. A prevalência do HHV-8 varia de acordo com as diferentes regiões geográficas e sub-populações, porém, após a epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a incidência do SK, câncer mais comum em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA), aumentou drasticamente em comparação com os indivíduos HIV negativos, apresentando um curso clínico mais agressivo e com progressão ao óbito [3–6].

As respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro desempenham papel fundamental no controle da infecção pelo HHV-8 e nos estágios iniciais do desenvolvimento do SK [7–9]. A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína do sistema imune inato que atua como molécula de reconhecimento padrão ligando-se com alta afinidade à manose ou a outros carboidratos que podem estar presentes na superfície dos patógenos. A MBL pode mediar a fagocitose por macrófagos e ativar o sistema complemento através da via das lectinas quando associada a serina protease (MASP) em um mecanismo independente de anticorpo [10,11].

A expressão protéica da MBL é determinada geneticamente e a concentração sérica está diretamente relacionada as mutações do gene *MBL2* na região estrutural (exon 1) e a outros sítios polimórficos na região promotora (-550 e -221). Estes três *loci* estão intimamente ligados e as combinações alélicas destas regiões resultam em diferentes haplótipos, que podem ocasionar defeitos na polimerização da molécula levando a deficiência funcional e/ou nos níveis séricos [12–16]. Assim, estes polimorfismos vêm sendo associados à susceptibilidade ou resistência às infecções virais ou ao desenvolvimento das manifestações clínicas, incluindo o vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), papilomavírus humano (HPV), vírus Epstein-Barr (EBV), herpesvírus humano 2 (HHV-2), vírus dengue [17–27].

A progressão da doença causada da infecção pelo HIV é caracterizada por declínio na contagem das células TCD4 e aumento na carga viral, podendo levar ao óbito na ausência de

terapia antirretroviral [28]. Dessa forma, autores sugerem que durante a coinfeção HIV/HHV-8 a depleção ou inativação grave de células T e o próprio HIV podem ser fatores importantes na evolução clínica da infecção pelo HHV-8 e no desenvolvimento do SK [4,29–31].

Por outro lado, fatores genéticos do hospedeiro, como os polimorfismos do gene *MBL2*, podem atuar no controle da coinfeção HIV/HHV-8 e influenciar a susceptibilidade da infecção pelo HHV-8 em PVHA e/ou a evolução clínica dos coinfectados. Por tanto, os objetivos deste estudo foram estimar as frequências dos polimorfismos -550, -221 e exon 1 do gene *MBL2*, verificar se existe associação entre os alelos, genótipos e haplótipos com a infecção pelo HHV-8 em PVHA, como também associar a expressão dos haplótipos com as contagens do TCD4 e a carga viral do HIV.

Material e Método

População de estudo

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo caso-controle, no qual foram utilizadas as amostras biológicas e o bando de dados de PVHA que estavam armazenados no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), provenientes da pesquisa sobre prevalência do HHV-8 em PVHA realizada por Cahú et al. (2016). A população foi composta de coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV acompanhados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de processo 22428813.5.0000.5208.

Extração do DNA e genotipagem

O DNA genômico foi extraído de leucócitos isolados a partir do sangue total com anticoagulante (EDTA) utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI) e seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, todas as amostras foram mensuradas para determinar a concentração e o grau de pureza do DNA, utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. Todas as amostras foram diluídas para a concentração de DNA necessária para cada reação.

A genotipagem da região promotora (-550 e -221) foi realizada utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) e para a região estrutural (exon

1) o kit *Express Sybr Greener Supermix* (Invitrogen, USA), aplicando a metodologia da temperatura de *melting* (melting temperature assay, MTA) e os perfis da curva de *melting* foram obtidos utilizando o software de dissociação do equipamento. Para a detecção dos polimorfismos nos códons -550, -221 e exon 1 no gene *MBL2* foi utilizado o Rotor Gene-6000 (Corbett Research, Sydney, Austrália). Os três alelos variantes do exon 1 nas posições do codons 52, 54, e 57 foram designados O e o alelo do tipo selvagem foi designado A, conforme descrito em vários estudos [21,27,33,34]. As sequências dos *primers* e sondas utilizadas estão descritas na tabela 1 e as condições do protocolo estão disponíveis no SNP500 Cancer Web site (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>).

Tabela 1. Sequência dos *primers* e sondas utilizadas para detecção dos polimorfismos das regiões promotora e estrutural do gene *MBL2*.

Região do gene <i>MBL2</i>	Sequência de nucleotídeos
Região promotora (-550)	
<i>Primer forward</i>	5'- CCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA-3'
<i>Primer reverse</i>	5'- CAACCCAGCCCAGAATTAAGT-3'.
Sonda VIC	5'-VIC-CCTGTCTAAAACACC-MGB-3
Sonda FAM	5'-FAM-AGCCTGTGTAAAAC-MGB-3
Região promotora (-221)	
<i>Primer forward</i>	5'- GCACGGTCCCATTGTGTTCTCA-3'
<i>Primer reverse</i>	5'-GCGTTGCTGCTGGAAGACTATAAA-3'
Sonda VIC	5'-VIC-CATGCTTTCGGTGGCAG-MGB-3'
Sonda FAM	5'-FAM-CATGCTTTCGGTGGCAG-MGB-3'
Região estrutural (exon-1)	
<i>Primer forward</i>	5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3'
<i>Primer reverse</i>	5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'

Haplótipos do gene *MBL2* de acordo com o agrupamento dos genótipos

Os alelos da região promotora (-550 H/L e -221 Y/X) foram agrupados ao alelo da região estrutural (exon 1 A/O) e categorizados conforme os haplótipos. Foram considerados de expressão alta os haplótipos LYA/LYA, HYA/HYA e HYA/LYA, de expressão intermediária os HYA/HXA, HYA/HYO, HYA/LXA, HYA/LYO, LXA/LXA, LYA/LXA e LYA/LYO e de expressão baixa os HYO/HYO, LYO/LYO e HYO/LYO, conforme descrito em trabalhos anteriores [27,34,35].

Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os *software* Epi Info versão 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, EUA), Bioestat versão 5.0 (Belém, Pará, Brasil) e Rstudio versão 1.0.143

(Northern Ave, Boston, MA), sendo considerado como estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Também foram utilizados os valores referente aos *odds ratios* (ORs) e dos intervalos de confiança de 95% (ICs) respectivo para cada valor de p . As variáveis categóricas foram analisadas através do teste G (Williams), teste do qui-quadrado (X^2) ou do teste exato de Fisher, enquanto as variáveis contínuas foram analisadas utilizando o Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Para verificar se a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg e para a construção das combinações haplotípicas foi utilizado o programa Arlequin versão 3.11 (Institute of Ecology and Evolution, University of Bern).

Resultados

Foram analisadas 337 amostras de PVHA, sendo 124 coinfectadas HIV/HHV-8 e 213 monoinfectadas pelo HIV. A tabela 2 demonstra a frequência das variáveis sociodemográficas distribuída entre coinfectados e monoinfectados.

Tabela 2. Frequência das variáveis sociodemográficos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Variáveis	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	Valor- p^1	OR ² (IC ³ 95%)
Idade	42,8 ($\pm$ 11,9) ⁴	42,7 ($\pm$ 11) ⁴	0,947 ⁵	-
Sexo				
Masculino	87 (70,2%)	131 (62,5%)	-	Referência
Feminino	37 (29,8%)	82 (38,5%)	0,109	1,471 (0,916-2,363)
Etnia				
Pardo	56 (45,16%)	101 (47,42%)	-	Referência
Branco	36 (29,03%)	60 (28,17%)	0,769	0,924 (0,546-1,565)
Negro	30 (24,19%)	48 (22,54%)	0,676	0,887 (0,506-1,550)
Indígena	1 (0,81%)	3(1,41%)	1,000	1,663 (0,169-16,371)
Amarelo	1 (0,81%)	1 (0,47%)	1,000	0,554 (0,034-9,036)

1-Valor de p referente ao teste estatístico chi-quadrado ou exato de Fischer; 2- OR: *odds ration*; 3- IC: Intervalo de confiança; 4- Valores referente a média da idade com o desvio padrão indicado entre parênteses; 5-Valor de p referente ao teste estatístico ANOVA.

Na tabela 3 são apresentadas as medianas das variáveis clínicas analisadas em coinfectados e monoinfectados

Tabela 3. Mediana das variáveis clínicas analisadas em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Mediana das variáveis	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	Valor-p ¹
Primeiro TCD4 (células/mm ³)	177,5 (4-1206)	275 (4-1565)	0,008
Último TCD4 (células/mm ³)	525 (20-1674)	573 (15-2171)	0,7947
Primeira carga viral do HIV (cópias/ml)	23859 (79- 4,500,000)	11892 (49- 1,642,215)	0,2706
Última carga viral do HIV (cópias/ml)	<40 (<40-346,326)	<40 (<40-1,873,483)	0,6904
Tempo da infecção pelo HIV (anos)	6,8111 (0- 24,2389)	5,7181 (0- 25,1556)	0,2983
Tempo do diagnóstico do HIV até o início da TARV (anos)	0,2944 (0- 20,1889)	0,2833 (0- 20,0000)	0,7381
Tempo de uso da TARV (anos)	4,6806 (0- 18,0056)	4,1431 (0- 18,0778)	0,1746

1- Valor de *p* referente ao teste estatístico Kruskal-Wallis.

As frequências dos alelos, genótipos e haplótipos referente aos polimorfismos -550, -221 e éxon 1 do gene *MBL2* estão apresentadas na tabela 4. Segundo o teste de Hardy-Weinberg os grupos estudados encontravam-se em equilíbrio.

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas do gene *MBL2* entre coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Polimorfismos do gene <i>MBL2</i>	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	Valor-p ¹	OR ² (IC ³ 95%)	Valor-p ¹
Promotor (-550)					
Alelo L	173 (70)	297 (70)			
Alelo H	75 (30)	129 (30)			
Genótipos					
LL	62 (50)	102 (48)		Referência	-
HL	49 (40)	93 (44)		1,154 (0,722-1,843)	0,550
HH	13 (10)	18 (8)	0,693	0,842 (0,386-1,836)	0,669
HL+HH	62 (50)	111 (52)			0,709
<i>Trend test</i> ⁴			0,682		
Promotor (-221)					
Alelo Y	210 (85)	356 (84)			
Alelo X	38 (15)	70 (16)			
Genótipos					
YY	89 (72)	148 (70)		Referência	-

YX	32 (26)	60 (28)		1,128 (0,682-1,865)	0,640
XX	3 (2)	5 (2)	0,899	1,002 (0,234-4,296)	0,998
YX+XX	35 (28)	65 (30)			0,657
<i>Trend test</i> ⁴			0,725		
Exon-1 (52, 54, 57)					
Alelo A	196 (79)	344 (81)			
Alelo O	52 (21)	82 (19)			
Genótipos					
AA	81 (65)	143 (67)		Referência	-
AO	34 (28)	58 (27)		0,966 (0,584-1,598)	0,894
OO	9 (7)	12 (6)	0,836	0,755 (0,305-1,869)	0,552
AO+OO	43 (35)	70 (33)			0,735
<i>Trend test</i> ⁴			0,713		
Haplótipos					
Expressão alta	46 (37)	78 (36)		Referência	-
Expressão intermediária	69 (56)	123 (58)		1,051 (0,658-1,679)	0,835
Expressão baixa	9 (7)	12 (6)	0,825	0,786 (0,308-2,009)	0,622
<i>Trend test</i> ⁴			0,696		

1- Valor de *p* referente ao teste-G (Williams); 2- OR: *odds ration*; 3-IC: Intervalo de confiança; 4-*Trend test*: valor de *p* referente ao Q de Cochran.

A frequência dos haplótipos segundo a expressão em coinfectados e monoinfectados está descrita na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das frequências dos haplótipos do gene *MBL2* segundo os níveis de expressão em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Haplótipos	Expressão	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	Valor- <i>p</i> ¹	OR ² (IC ³ 95%)
HYA/LYA	Alta	17 (13,7)	43 (20,2)	1	Referência
LYA/LYA	Alta	19 (15,3)	24 (11,3)	0,097	0,499 (0,219-1,137)
HYA/HYA	Alta	10 (8,1)	11 (5,2)	0,108	0,435 (0,156-1,211)
HYA/HXA	Intermediária	0 (0)	1 (0,5)	0,534	-
HYA/HYO	Intermediária	1 (0,8)	5 (2,3)	0,672	1,977 (0,215-18,187)
HYA/LXA	Intermediária	12 (9,7)	23 (10,8)	0,546	0,758 (0,309-1,856)
HYA/LYO	Intermediária	19 (15,3)	24 (11,3)	0,097	0,499 (0,219-1,137)
LYA/LXA	Intermediária	20 (16,1)	36 (16,9)	0,396	0,712 (0,325-1,558)
LYA/LYO	Intermediária	14 (11,3)	29 (13,6)	0,646	0,819 (0,350-1,916)
LXA/LXA	Intermediária	3 (2,4)	5 (2,3)	0,684	0,659 (0,142-3,066)
HYO/HYO	Baixa	2 (1,6)	1 (0,5)	0,214	0,197 (0,017-2,326)
HYO/LYO	Baixa	1 (0,8)	3 (1,4)	0,998	1,186 (0,115-12,212)
LYO/LYO	Baixa	6 (4,8)	8 (3,8)	0,342	0,527 (0,159-1,747)

1- Valor de *p* referente ao teste estatístico chi-quadrado ou exato de Fischer; 2- OR: *odds ration*; 3-IC: Intervalo de confiança.

Na tabela 6, são apresentadas as frequências das contagens da carga viral e TCD4 segundo os níveis de expressão alta, intermediária e baixa da MBL em coinfectados e monoinfectados.

Tabela 6. Análise univariada das contagens da carga viral e TCD4 segundo a expressão dos haplótipos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Variáveis	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	Valor- <i>p</i> ¹	OR ² (IC 95%) ³
Haplótipo de expressão alta				
Primeira carga viral HIV >150000	16 (34,8)	14 (17,9)	-	Referência
Primeira carga viral HIV ≤ 150000	30 (65,2)	64 (82,1)	0,035	2,438 (1,054-5,637)
Última carga viral HIV detectável	14 (30,4)	33 (42,3)	-	Referência
Última carga viral HIV indetectável	32 (69,6)	45 (57,7)	0,189	0,597 (0,276-1,291)
Primeiro TCD4 ≤350	34 (73,9)	41 (52,6)	-	Referência
Primeiro TCD4 >350	12 (26,1)	37 (47,4)	0,019	2,556 (1,156-5,657)
Último TCD4 ≤350	3 (6,5)	8 (10,3)	-	Referência
Último TCD4 >350	43 (93,5)	70 (89,7)	0,537	0,612 (0,153-2,427)
Haplótipo de expressão intermediária				
Primeira carga viral HIV >150000	15 (21,7)	23 (18,7)	-	Referência
Primeira carga viral HIV ≤ 150000	54 (78,3)	100 (81,3)	0,613	1,207 (0,582-2,506)
Última carga viral HIV detectável	34 (49,3)	52 (42,3)	-	Referência
Última carga viral HIV indetectável	35 (50,7)	71 (57,7)	0,351	1,326 (0,734-2,398)
Primeiro TCD4 ≤350	52 (75,4)	76 (61,8)	-	Referência
Primeiro TCD4 >350	17 (24,6)	47 (38,2)	0,060	1,892 (0,980-3,650)
Último TCD4 ≤350	15 (21,7)	9 (7,3)	-	Referência
Último TCD4 >350	54 (78,3)	114 (92,7)	0,004	3,518 (1,448-8,547)
Haplótipo de expressão baixa				
Primeira carga viral HIV >150000	2 (22,2)	3 (25)	-	Referência
Primeira carga viral HIV ≤ 150000	7 (77,8)	9 (75)	1,000	0,857 (0,111-6,617)
Última carga viral HIV detectável	5 (55,6)	8 (66,7)	-	Referência
Última carga viral HIV indetectável	4 (44,4)	4 (33,3)	0,673	0,625 (0,105-3,707)
Primeiro TCD4 ≤350	6 (66,7)	10 (83,3)	-	Referência
Primeiro TCD4 >350	3 (33,3)	2 (16,7)	0,612	0,400 (0,051-3,125)
Último TCD4 ≤350	3 (33,3)	3 (25)	-	Referência
Último TCD4 >350	6 (66,7)	9 (75)	1,000	1,500 (0,223-10,076)

1- Valor de *p* referente ao teste estatístico chi-quadrado ou exato de Fischer; 2- OR: *odds ration*; 3-IC: Intervalo de confiança.

A variável última contagem do TCD4 permaneceu associada com os haplótipos de expressão intermediária nos coinfectados após o modelo final da análise multivariada, conforme está apresentada na tabela 7, com os valores ajustados do *Odds ratio* (OR) e dos respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

Tabela 7. Análise multivariada das contagens da carga viral e TCD4 segundo a expressão dos haplótipos em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Variáveis	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	Valor- <i>p</i> ¹	OR ² (IC ³ 95%)
Haplótipo de expressão alta				
Primeira CV HIV >150000	16 (34,8)	14 (17,9)	-	Referência
Primeira CV HIV ≤ 150000	30 (65,2)	64 (82,1)	0,097	2,11 (0,87-5,11)
Última carga viral HIV detectável	6 (13)	17 (21,8)	-	Referência
Última carga viral HIV indetectável	40 (87)	61 (78,2)	0,165	0,45 (0,15-1,39)
Primeiro TCD4 ≤350	34 (73,9)	41 (52,6)	-	Referência
Primeiro TCD4 >350	12 (26,1)	37 (47,4)	0,093	2,04 (0,89-4,68)
Haplótipo de expressão intermediária				
Primeiro TCD4 ≤350	52 (75,4)	76 (61,8)	-	Referência
Primeiro TCD4 >350	17 (24,6)	47 (38,2)	0,193	1,57 (0,8-3,1)
Último TCD4 ≤350	15 (21,7)	9 (7,3)	-	Referência
Último TCD4 >350	54 (78,3)	114 (92,7)	0,016	3,06 (1,23-7,6)

1- Valor de *p* referente ao teste estatístico chi-quadrado; 2- OR: *odds ration*; 3-IC: Intervalo de confiança.

Discussão

A patogênese da coinfecção HIV/HHV-8 é complexa, podendo ser influenciada por fatores virais, uma vez que o HIV induz o ciclo lítico do HHV-8 através da ativação da proteína RTA e da proteína TAT [36-38], enquanto o HHV-8 interfere na replicação do HIV através da regulação da LTR pelo antígeno LANA, entretanto, fatores genéticos do hospedeiro, como os polimorfismos do gene *MBL2*, também podem influenciar na infecção pelo HHV-8 em PVHA, assim como, na carga viral do HIV e contagens do TCD4.

Em nosso estudo, os coinfectados e monoinfectados apresentaram média de idade semelhante a reportada em outras pesquisas [5,32,38,39]. O sexo masculino foi mais frequente,

não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos, corroborando os resultados de uma meta-análise que também não encontraram associação entre o sexo masculino e a infecção pelo HHV-8. No entanto, os autores reportaram que os homens da África Subsaariana, região onde o vírus é endêmico, apresentam uma razão de chance de 1.21 vezes de terem a infecção pelo HHV-8 e sugerem que a coinfecção é mais frequente em homens devido os estudos analisarem populações selecionadas, como doadores de sangue e PVHA [40].

Os resultados da pesquisa mostraram que a mediana da primeira contagem do TCD4 foi menor nos coinfectados, quando comparada aos monoinfectados com diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, um estudo demonstrou que o HHV-8 tem pouca influência na progressão do HIV em indivíduos inicialmente assintomáticos, repercutindo pouco na contagem de células do TCD4 [41]. No entanto, como o nosso estudo tratou-se de um caso-controle, não foi possível identificar o momento da soroconversão pelo HHV-8 e se as PVHA estavam assintomáticas.

A mediana da última contagem do TCD4 não se mostrou estatisticamente significativa entre os coinfectados e monoinfectados, corroborando com algumas pesquisas [38,39], assim como, em outro estudo que não encontrou associação entre a coinfecção em PVHA com SK e a última contagem do TCD4 [42]. A ausência da associação em PVHA com e sem SK pode sugerir que outros fatores, além do TCD4, influenciam na patogênese da coinfecção HIV/HHV-8. Da mesma forma, as medianas da primeira e última carga viral do HIV não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, entretanto os coinfectados tiveram a mediana da primeira carga viral duas vezes maior, sugerindo que o HHV-8 pode está ativando a replicação do HIV, levando a diminuição dos níveis de TCD4.

Alguns estudos mostram que a ordem e o momento em que ocorre a infecção pelo HIV e pelo HHV-8 podem ter implicações prognósticas e que a incidência do SK é maior em pessoas com soroconversão para HHV-8 após infecção pelo HIV [3,38,43–45]. Em nosso estudo, o tempo da infecção pelo HIV como também o tempo do diagnóstico até o início da TARV foi maior nos coinfectados, embora sem diferença estatisticamente significativa, corroborando com um estudo que avaliou o momento da soroconversão para o HHV-8 e também não encontrou associação entre o tempo de diagnóstico e a necessidade do uso da TARV [38].

A importância dos fatores genéticos do hospedeiro, como os polimorfismos do gene *MBL2*, na susceptibilidade às infecções vêm sendo estudado em diversas viroses [17–21,25–27]. Em nosso estudo, a frequência dos alelos, genótipos e haplotipos dos polimorfismos -550, -221 e exon 1 do gene *MBL2* não mostraram associação com a infecção pelo HHV-8 em PVHA. Porém, é importante ressaltar a dificuldade em comparar os resultados da pesquisa devido à

escassez de estudos sobre os polimorfismos do gene *MBL2* em indivíduos infectados pelo HHV-8 ou coinfectados HIV/HHV-8.

Um estudo avaliou os polimorfismos -550, -221 e exon 1 em PVHA e encontraram associação entre o genótipo LX/LX e os haplótipos de expressão menor com a infecção pelo HIV, quando comparados com doadores de sangue. Porém, os autores reportaram que a população estudada era composta por PVHA de etnia europeia e sugeriram que indivíduos desta origem podem ser susceptíveis a infecção pelo HIV [46]. Por outro lado, um estudo em Zimbabwean, na África do Sul, não encontrou associação desses polimorfismos com a infecção pelo HIV, quando comparados com indivíduos não infectados [47]. A maioria dos indivíduos avaliados no presente estudo se auto declarou pardo, o que pode ter contribuído para a não associação com a infecção pelo HHV-8 em PVHA, quando comparada com os monoinfectados pelo HIV. A ausência de associação pode estar relacionada a etnia de população do nordeste brasileiro, por ter uma mistura combinada dos genomas dos africanos, europeus e dos americanos nativos [48–50].

A análise simultânea dos polimorfismos -550, -221 e exon 1 é capaz de fornecer informações mais completas sobre o papel dos polimorfismos na susceptibilidade às infecções, uma vez que as concentrações da MBL podem variar conforme as combinações dos polimorfismos da região estrutural e promotora [12,14,51]. Segundo Vallinoto et al (2006) [52], esses polimorfismos podem ser marcadores genéticos associados a uma melhor resposta em infectados pelo HIV que utilizam uma terapia antirretroviral adequada. Quando estudado isoladamente, o polimorfismo do exon 1 mostrou associação entre a presença do alelo A com a redução da carga viral do HIV e com a melhora da contagem do TCD4 em PVHA [52]. Assim como, o haplotipo de expressão alta HY, referente aos códons -550 e -221, estava associado a diminuição da carga viral e ao aumento da contagem do TCD4 durante a evolução clínica de monoinfectados pelo HIV [53].

Contrariamente, os polimorfismos -550, -221 e exon 1 foram estudados simultaneamente em PVHA e não mostraram interferir na carga viral ou na contagem do TCD4 [54], assim como, não foram associados com a carga viral, contagem do TCD4, progressão da doença ou sobrevida de uma população de PVHA da África que não estava sob terapia antirretroviral [28]. No entanto, o presente estudo avaliou simultaneamente os três principais polimorfismos do gene *MBL2* e os haplotipos de expressão alta, intermediária e baixa, encontrando associação entre os coinfectados HIV/HHV-8 que tinham o haplótipo expressão intermediária com a contagem do TCD4, quando comparados com os monoinfectados pelo HIV.

Levando em consideração a capacidade da MBL de se ligar à glicoproteína gp120 do HIV-1, mediando a fagocitose ou ativando o sistema complemento [55–57], os nossos resultados demonstraram que os coinfectados que apresentam haplótipo da MBL de expressão intermediária podem ter a última contagem do TCD4 < 350 cels/mm³, sugerindo que pode haver uma eliminação ineficiente do HIV, devido à deficiência da MBL sérica, com aumento da carga viral plasmática e diminuição dos linfócitos TCD4. É necessário destacar que dentre os coinfectados, quatro que desenvolveram o SK tinham também os haplótipos da MBL de expressão intermediária, sendo três HYA/LXA e um LYA/LYO, sugerindo que estes haplótipos podem interferir na clínica da coinfecção HIV/HHV-8 levando ao desenvolvimento do SK. Ressaltando ainda que nenhum dos coinfectados que apresentou os haplótipos da MBL de expressão alta desenvolveu o SK até o momento da coleta sanguínea.

O papel dos polimorfismos do gene *MBL2* ainda é um tema que precisa ser mais estudado tanto em infectados pelo HHV-8 como em coinfectados HIV/HHV-8, devido à importância da proteína MBL para sistema imune inato e sua relação com a susceptibilidade do hospedeiro frente as diversas infecções. Portanto, fatores genéticos relacionados aos polimorfismos -550, -221 e exon 1 do gene *MBL2* podem influenciar a evolução clínica da coinfecção e/ou levar ao desenvolvimento do SK, principalmente em coinfectados HIV/HHV-8 que apresentam os haplótipos da MBL de expressão intermediária.

Referências

1. Gantt S, Casper C. Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24: 295–301. doi:10.1097/QCO.0b013e3283486d04
2. Goncalves PH, Ziegelbauer J, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017;12: 47–56. doi:10.1097/COH.0000000000000330
3. Rohner E, Wyss N, Trelle S, Mbulaiteye SM, Egger M, Novak U, et al. HHV-8 seroprevalence : a global view. *Syst Rev. Systematic Reviews*; 2014;3: 1–7. doi:doi:10.1186/2046-4053-3-11
4. Dittmer DP, Damania B. Kaposi sarcoma – associated herpesvirus : immunobiology , oncogenesis , and therapy. 2016;126: 3165–3175. doi:10.1172/JCI84418.KSHV

5. Broccolo F, Din CT, Viganò MG, Rutigliano T, Esposito S, Lusso P, et al. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Virol. Elsevier B.V.*; 2016;78: 47–52. doi:10.1016/j.jcv.2016.02.019
6. Paoli PDE, Carbone A. Kaposi ' s Sarcoma Herpesvirus : twenty years after its discovery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20: 1288–1294.
7. Laurent C, Meggetto F, Brousset P. Human herpesvirus 8 infections in patients with immunodeficiencies. *Hum Pathol.* 2008;39: 983–993. doi:10.1016/j.humpath.2008.02.010
8. Aresté C, Blackbourn DJ. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Trends Microbiol.* 2009;17: 119–129. doi:10.1016/j.tim.2008.12.001
9. Lee H-R, Amatya R, Jung JU. Multi-step regulation of innate immune signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virus Res. Elsevier B.V.*; 2015;209: 39–44. doi:10.1016/j.virusres.2015.03.004
10. Brulois K, Jung JU. Interplay between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and the innate immune system. *Cytokine Growth Factor Rev. Elsevier Ltd*; 2014;25: 597–609. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.001
11. Mason CP, Tarr AW. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules.* 2015;20: 2229–2271. doi:10.3390/molecules20022229
12. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2003;37: 1496–1505. doi:10.1086/379324
13. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern Med J.* 2005;35: 548–555. doi:10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x
14. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;230: 9–21. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19594626
15. Hartz A, Pagel J, Humberg A, Preuss M, Schreiter L, Herting E, et al. The association

- of mannose-binding lectin 2 polymorphisms with outcome in very low birth weight infants. 2017; 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0178032
16. Bautista-Rodriguez C, Launes C, Jordan I, Andres M, Arias MT, Lozano F, et al. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. 2017; 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0178377
 17. Guimaraes V, Guimaraes R, Brandao L, Baldez da Silva MFPT, Milanese M, Segat L, et al. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol*. 2008;69: 273–278. doi:10.1016/j.humimm.2008.03.002
 18. Alves Pedroso ML, Boldt ABW, Pereira-Ferrari L, Steffensen R, Strauss E, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: Association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008;152: 258–264. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03614.x
 19. Seppänen M, Lokki M-L, Lappalainen M, Hiltunen-Back E, Rovio AT, Kares S, et al. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism in recurrent herpes simplex virus 2 infection. *Hum Immunol*. 2009;70: 218–221. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.022
 20. Friborg JT, Jarrett RF, Koch A, Garred P, Freeland JML, Andersen A, et al. Mannose-binding lectin genotypes and susceptibility to epstein-barr virus infection in infancy. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17: 1484–1487. doi:10.1128/CVI.00527-09
 21. Halla MC, do Carmo RF, Silva Vasconcelos LR, Pereira LB, Moura P, de Siqueira ERF, et al. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. *Hum Immunol*. 2010;71: 883–887. doi:10.1016/j.humimm.2010.05.021
 22. Brudner M, Karpel M, Lear C, Chen L, Yantosca LM, Scully C, et al. Lectin-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection via Soluble and Transmembrane C-type Lectin Receptors. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0060838
 23. Egli A, Schäfer J, Osthoff M, Thiel S, Mikkelsen C, Rauch A, et al. Low Levels of Mannan-Binding Lectin or Ficolins Are Not Associated with an Increased Risk of

- Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients. *PLoS One*. 2013;8.
doi:10.1371/journal.pone.0051983
24. Xu H, Zhao M, Wan T, Song G, He J, Chen Z. Association between Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8: e75371. doi:10.1371/journal.pone.0075371
 25. Yanagisawa K, Ogawa Y, Uchiumi H, Gohda F, Mawatari M, Ishizaki T, et al. Gene polymorphisms of mannose-binding lectin confer susceptibility to *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Chemother*. Elsevier Ltd; 2015;21: 769–775. doi:10.1016/j.jiac.2015.07.006
 26. Erdemir G, Ozkan TB, Ozgur T, Budak F, Kilic SS, Onay H. Mannose-binding lectin gene polymorphism and chronic hepatitis B infection in children. *Saudi J Gastroenterol*. Medknow Publications; 2015;21: 84–9. doi:10.4103/1319-3767.153825
 27. Figueiredo GG, Cezar RD, Freire NM, Teixeira VG, Baptista P, Cordeiro M, et al. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. *Hum Immunol*. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2016;77: 571–575. doi:10.1016/j.humimm.2016.05.006
 28. Zinyama-Gutsire RBL, Chasela C, Kallestrup P, Rusakaniko S, Christiansen M, Ngara B, et al. HIV-1 Disease Progression and Survival in an Adult Population in Zimbabwe: Is There an Effect of the Mannose Binding Lectin Deficiency? *Omi A J Integr Biol*. 2015;19: 542–552. doi:10.1089/omi.2015.0047
 29. Casper C. New approaches to the treatment of human herpesvirus 8-associated disease. *Rev Med Virol*. NIH Public Access; 2008;18: 321–9. doi:10.1002/rmv.583
 30. Dow DE, Cunningham CK, Buchanan AM. A review of human herpesvirus 8, the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in the pediatric population. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3: 66–76. doi:10.1093/jpids/pit051
 31. Munawwar A, Singh S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. *J Lab Physicians*. 2016;8: 5. doi:10.4103/0974-2727.176228

32. de Oliveira Mendes Cahú GG, Morais VMS, Lopes TRR, da Silva DM, Tozetto-Mendoza TR, Pannuti CS, et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *J Med Virol.* 2016;88: 2016–2020. doi:10.1002/jmv.24550
33. Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso a, et al. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med.* 2002;2: 105–108.
34. Vasconcelos LRS, Fonseca JPL, Carmo RF do, Mendonça TF de, Pereira VRA, Lucena-Silva N, et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. *Int J Infect Dis.* 2011;15: 551–557. doi:10.1016/j.ijid.2011.04.008
35. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency - Revisited. *Mol Immunol.* 2003;40: 73–84. doi:10.1016/S0161-5890(03)00104-4
36. Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus through Induction of KSHV Rta. *Virology.* 2002;297: 270–280. doi:10.1006/viro.2002.1434
37. Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, et al. Intracellular Tat of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Role of JAK/STAT Signaling. *J Virol.* 2007;81: 2401–2417. doi:10.1128/JVI.02024-06
38. Batista MD, Ferreira S, Sauer MM, Tomiyama H, Giret MTM, Pannuti CS, et al. High human herpesvirus 8 (HHV-8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2009;4: 2–6. doi:10.1371/journal.pone.0005613
39. Hesamizadeh K, Keyvani H, Bokharaei-salim F, Monavari SH, Esghaei M, Sefidi FJ. Molecular Epidemiology of Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpes Virus , and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran , 2014. 2016;18. doi:10.5812/ircmj.32603.Research

40. Rohner E, Wyss N, Heg Z, Faralli Z, Mbulaiteye SM, Novak U, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;138: 45–54. doi:10.1002/ijc.29687
41. Ait-Arkoub Z, Robert-Visse C, Calvez V, Costagliola D, Autran B, Candotti D, et al. No influence of human herpesvirus 8 infection on the progression of HIV-1 infection in initially asymptomatic patients. *AIDS*. 2003;17: 1394–6. doi:10.1097/01.aids.0000072666.21517.3f
42. Tozetto-Mendoza TR, Ibrahim KY, Tateno AF, Oliveira CM de, Sumita LM, Sanchez MCA, et al. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95: e5291. doi:10.1097/MD.00000000000005291
43. Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, Dukers NH, Simpson GR, Coutinho RA, et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *Aids*. 1998;12: 2481–2488. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875587>
44. Jacobson LP, Jenkins FJ, Springer G, Munoz A, Shah K V, Phair J, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis*. 2000;181: 1940–1949. doi:10.1086/315503
45. Volkow P, Jacquemin B, Zinser JW, Pérez-Padilla R. Revisión histórica del sarcoma de Kaposi en la era pre-TARAA (Terapia antirretroviral altamente activa): Evolución con diferentes esquemas de quimioterapia y remisión con el uso de ganciclovir. *Gac Med Mex*. 2016;152: 96–102.
46. da Silva GK, Guimarães R, Mattevi VS, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *Aids*. 2011;25: 411–418. doi:10.1097/QAD.0b013e328342fef1
47. Zinyama-Gutsire RBL, Chasela C, Madsen HO, Rusakaniko S, Kallestrup P, Christiansen M, et al. Role of mannose-binding lectin deficiency in HIV-1 and schistosoma infections in a rural adult population in Zimbabwe. *PLoS One*. 2015;10:

- 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0122659
48. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67: 444–461. doi:10.1086/303004
 49. Da Cruz HLA, Da Silva RC, Segat L, De Carvalho MSZ de MG, Brandão LAC, Guimarães RL, et al. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population. *Infect Genet Evol. Elsevier B.V.;* 2013;19: 323–329. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.002
 50. Sandoval JR, Madsen HO, De Stefano G, Descailleaux-Dulanto J, Velazquez-Reinoso M, ?ique C, et al. Extreme high prevalence of a defective mannose-binding lectin (MBL2) genotype in native South American West Andean populations. *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0108943
 51. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin : biology and clinical implications. 2005; 548–555.
 52. Vallinoto ACR, Menezes-Costa MR, Alves AEM, Machado LFA, Azevedo VN, Souza LLB De, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. *Mol Immunol.* 2006;43: 1358–1362. doi:10.1016/j.molimm.2005.09.001
 53. Vallinoto AC, Muto NA, Alves AE, Machado LF, Azevedo VN, Souza LL, et al. Characterization of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene promoter among human immunodeficiency virus 1 infected subjects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103: 645–649. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057812>
 54. Catano G, Agan BK, Kulkarni H, Telles V, Marconi VC, Dolan MJ, et al. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *J Infect Dis.* 2008;198: 72–80. doi:10.1086/588712
 55. Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol.* 2005;42: 145–152. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.015

56. Eisen S, Dzwonek A, Klein NJ. Mannose-binding lectin in HIV infection. *Future Virol.* Europe PMC Funders; 2008;3: 225–233. doi:10.2217/17460794.3.3.225
57. Teodorof C, Divakar S, Soontornniyomkij B, Achim CL, Kaul M, Singh KK. Intracellular mannose binding lectin mediates subcellular trafficking of HIV-1 gp120 in neurons. *Neurobiol Dis.* 2014;69: 54–64. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.002

5.2 Artigo 2

- Título do periódico: Acta Tropica
- Classificação qualis: B1
- Área de avaliação: Medicina II

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DA MBL EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS INFECTADAS PELO HHV-8

Resumo

A MBL desempenha papel importante na resposta imune inata ao ativar o sistema complemento através da via da lectina e tem sido estudada em diversas infecções virais, no entanto, não se conhece a influência da MBL em PVHA infectadas pelo HHV-8. O objetivo deste estudo foi verificar a associação das concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV e correlacionar com a carga viral do HIV e as contagens de TCD4 em ambos os grupos. Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle composto de PVHA acompanhadas no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. As concentrações plasmáticas da MBL foram obtidas através do ensaio imunoenzimático utilizando o kit comercial *Human Mannose Binding Lectin* (MyBioSource, Inc), realizado conforme as orientações do fabricante, sendo consideradas como deficientes valores <100 ng/ml. Foram analisadas 245 amostras de PVHA, sendo 118 coinfectadas HIV/HHV-8 e 127 monoinfectados pelo HIV, sendo considerados com concentração plasmática deficiente 5,1% (6/118) dos coinfectados e 3,2% (4/127) dos monoinfectados ($p=0,445$). A mediana das concentrações plasmáticas da MBL nos coinfectados foi de $2,803 \log_{10}$ ng/ml e nos monoinfectados $2,959 \log_{10}$ ng/ml ($p = 0.001$), houve uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas da MBL e a carga viral do HIV em ambos os grupos, porém não houve correlação com a contagem do TCD4. Embora as concentrações plasmáticas consideradas deficientes da MBL não foram associadas à infecção pelo HHV-8 em PVHA, os coinfectados apresentaram concentrações da MBL menores e correlação inversa com a carga viral do HIV, sugerindo que pode haver consumo e redução da MBL devido à opsonização do HIV e do HHV-8, levando a redução da MBL plasmática e o não acúmulo na circulação.

Palavras-chave: Coinfecção HIV/HHV-8; lectina ligadora de manose; correlação inversa; concentrações deficientes; Herpesvirus humano 8.

1. Introdução

A incidência do sarcoma de Kaposi (SK), associado ao herpesvírus humano 8 (HHV-8), têm aumentado após a epidemia do HIV/aids, apresentando um curso clínico mais agressivo e com progressão ao óbito (Cahú et al., 2016; Dittmer and Damania, 2016; Mohanna et al., 2005; Paoli and Carbone, 2016; Rohner et al., 2014; Sullivan et al., 2008). O SK ainda é o tumor mais comum em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA), mesmo quando os indivíduos estão sob o uso da terapia antirretroviral (TARV), com carga viral do HIV indetectável e contagem de células TCD4 superior a 350 células/mm³ (Broccolo et al., 2016; Munawwar and Singh, 2016; Pria et al., 2013).

O controle da infecção pelo HHV-8, assim como os estágios iniciais do desenvolvimento do SK, é mediado pela imunidade inata e adaptativa (Aresté and Blackbourn, 2009; Brulois and Jung, 2014; Lee et al., 2012). Nesse contexto, a MBL desempenha papel fundamental na imunidade inata como receptor de reconhecimento padrão, ligando-se com alta afinidade aos padrões de resíduos de carboidratos presentes na superfície de vírus ou de células infectadas com vírus, especialmente quando a imunidade humoral não é totalmente funcional, como na infância, em populações imunossuprimidas ou imunodeprimidas (Fujita, 2002; Manuel et al., 2007; Mason and Tarr, 2015). Dessa forma, a MBL contribui para a defesa do sistema imune inato ao iniciar a ativação da via das lectinas do sistema complemento, podendo promover a opsonofagocitose, modular a inflamação e induzir a lise celular (Auriti et al., 2017; Martin and Blom, 2016; Zinyama-Gutsire et al., 2015a).

Em relação as PVHA, algumas pesquisas têm mostrado associação entre a deficiência da concentração plasmática da MBL e a infecção pelo HIV ou progressão mais rápida para a doença (Egli et al., 2013; Hundt et al., 2000; Tan et al., 2009; Teodorof et al., 2014; Vallinoto et al., 2008) e outras não encontraram essa associação com a infecção, carga viral do HIV ou contagem do TCD4 (Catano et al., 2008; Zinyama-Gutsire et al., 2015a). No entanto, não se conhece a influência da MBL na infecção pelo HHV-8, porém para outros herpesvírus, estudos têm sugerido que a deficiência das concentrações da MBL pode ser um fator de risco para o desenvolvimento sintomático pelo herpesvírus humano 2 (HHV-2) (Gadjeva et al., 2004) e para reativação do citomegalovírus (CMV) (Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007).

Embora a MBL desempenhe papel importante na resposta imune inata, ainda se desconhece se a deficiência da concentração plasmática da MBL está associada infecção pelo HHV-8 em PVHA. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a associação das

concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV e correlacionar com a carga viral do HIV e as contagens de TCD4 em ambos os grupos.

2. Material e Método

2.1 Desenho e população de estudo

Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle, cuja população foi composta de coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV acompanhadas no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, provenientes da pesquisa sobre prevalência do HHV-8 em PVHA realizada por Cahú et al. (2016). Foram excluídos do estudo as PVHA infectadas pelo HBV, HVC, HTLV I/II e os que não estavam sob TARV. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de processo 22428813.5.0000.5208.

2.2 Concentrações plasmáticas da MBL

As concentrações plasmáticas da MBL foram obtidas através do ELISA utilizando o kit comercial *Human Mannose Binding Lectin* (MyBioSource, Inc), apresentando mínimo detectável de até 0.05 ng/ml. As amostras foram diluídas 1:100 e o protocolo para o ELISA foi realizado seguindo as orientações do fabricante. Para a leitura da reação foi utilizado o espectrofotômetro (Thermoplate®) com o comprimento de onda de 450/630 nm. As concentrações plasmáticas foram consideradas como deficientes quando <100 ng/ml (Egli et al., 2013; Gadjeva et al., 2004; Zinyama-Gutsire et al., 2015a).

2.3 Análise estatística

Para avaliar a deficiência das concentrações foi utilizado os valores referente aos *odds ratios* (ORs) e intervalos de confiança de 95% (ICs), para associar as concentrações plasmáticas da MBL nos coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para correlacionar as concentrações plasmáticas da MBL com a carga viral do HIV e contagem do TCD4 foi utilizado o teste de Spearman, estas variáveis foram incluídas nos modelos estatísticos como unidades transformadas em $\log_{10}$. Para as análises estatística e construção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPadSoftware, EUA) e o *Epi Info* versão 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, EUA), sendo considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

Foram analisadas 245 amostras de PVHA, sendo 118 coinfectadas HIV/HHV-8 com média de idade de 42,5 ($\pm 11,8$), 127 monoinfectados pelo HIV com média de idade de 42,8 ($\pm 10,6$) e maioria do sexo masculino 71% (84/118) e 59% (75/127), respectivamente. A mediana da contagem do TCD4 foi de 2,713 $\log_{10}$ células/mm³ (1,301-3,224) nos coinfectados e 2,736 $\log_{10}$ células/mm³ (1,176-3,269) nos monoinfectados, com p de 0,872. A carga viral do HIV foi detectável em 42% (50/118) coinfectados e 44% (56/127) monoinfectados, com mediana de 2,057 $\log_{10}$ cópias/ml (1,672-5,539) e 2,363 $\log_{10}$ cópias/ml (1,602-6,273), respectivamente, com p de 0,595.

Foram considerados com concentração plasmática deficiente 5,1% (6/118) dos coinfectados e 3,2% (4/127) dos monoinfectados, apresentando p de 0,445 (OR=1,647; IC=0,453-5,989), no entanto, a mediana das concentrações plasmáticas da MBL foi significativamente menor nos coinfectados, como mostrado na figura 1.

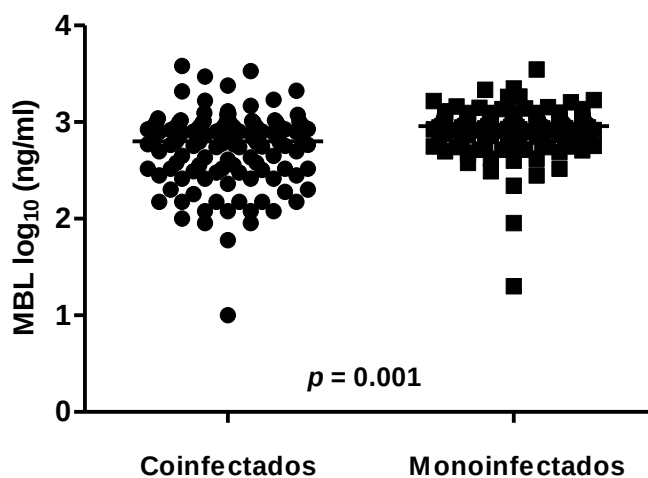


Figura 1: Distribuição e mediana das concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 monoinfectados pelo HIV. A mediana das concentrações plasmáticas da MBL nos coinfectados foi 2,803 $\log_{10}$ ng/ml (1,0-3,581; IC: 2,650-2,792) e nos monoinfectados foi 2,959 $\log_{10}$ ng/ml (1,301- 3,545; IC: 2,877- 2,964), apresentando diferença estatisticamente ($p = 0.001$) utilizando o teste de Mann Whitney.

Na tabela 1 são apresentadas as medianas das concentrações plasmáticas da MBL conforme as variáveis clínicas em coinfectados e monoinfectados.

Tabela 1. Medianas das concentrações plasmáticas da MBL conforme a carga viral do HIV e contagem do TCD4 em coinfectados e monoinfectados acompanhados no ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias do HC-UFPE.

Variáveis	Mediana da MBL ($\log_{10}$ ng/ml)			Valor de p^1	
	Coinfectados	N ²	Monoinfectados	N	
Carga viral do HIV detectável	2,752 (1,000- 3,318)	50	2,949 (1,301- 3,545)	56	0,001
Carga viral do HIV indetectável	2,874 (1,778-3,581)	68	2,961 (1,954-3,348)	71	0,377
TCD4 > 350	2,823 (1,778-3,581)	98	2,964 (1,954-3,545)	115	0,001
TCD4 $\leq$ 350	2,586 (1,000- 3,167)	20	2,926 (1,301- 3,093)	12	0,034

¹ Valor de p referente ao teste de Mann-Whitney; ² N = tamanho amostral.

Entre os coinfectados e monoinfectados houve uma correlação negativa entre a carga viral do HIV e a concentração plasmática da MBL, como demonstrado na figura 2.

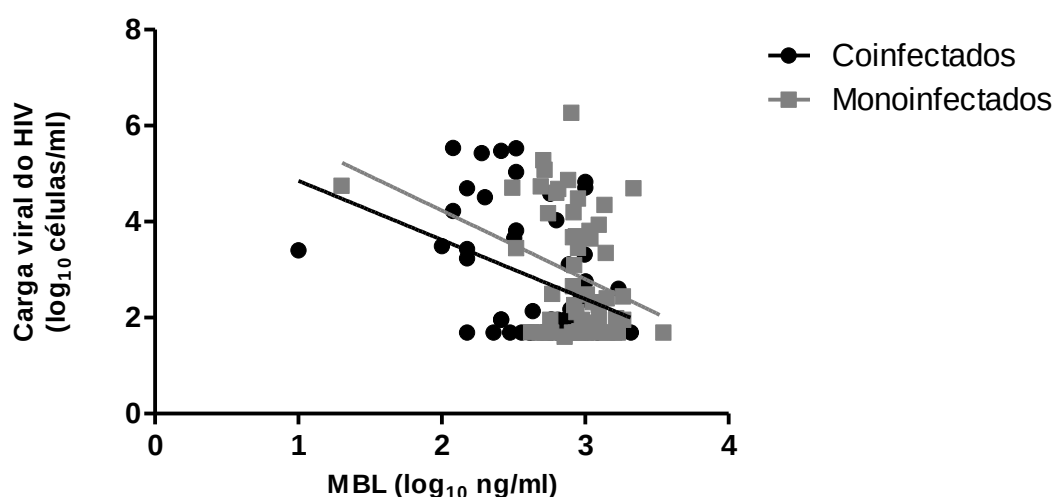


Figura 2: Correlação de Spearman entre a carga viral do HIV e a concentração plasmática da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 ($n = 50$, $p = 0,018$ e $r = -0,333$) e monoinfectados pelo HIV ($n = 56$, $p = 0,031$ e $r = -0,289$).

A figura 3 demonstra a correlação de Spearman entre a contagem do TCD4 e a concentração plasmática da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV.

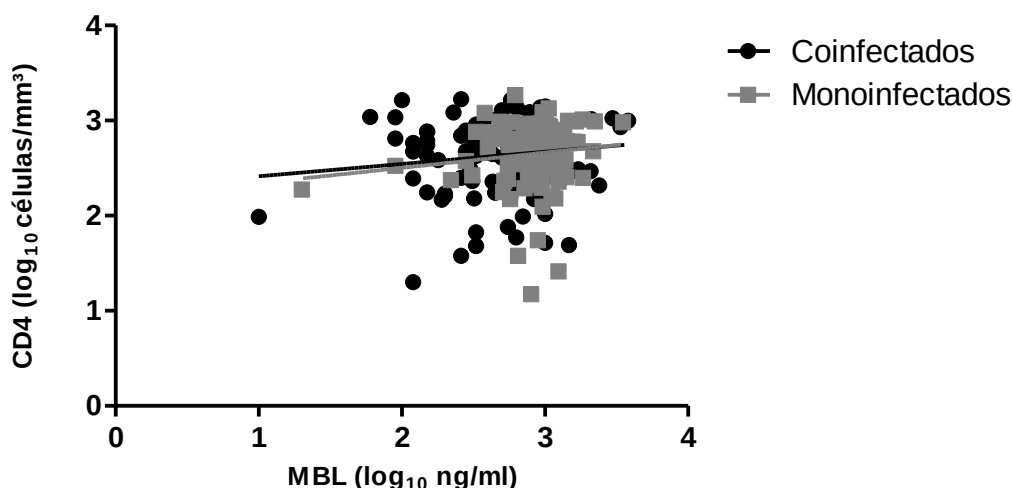


Figura 3: Correlação de Spearman entre a contagem do TCD4 e a concentração plasmática da MBL em coinfectados HIV/HHV-8 ($n = 118$, $p = 0,346$ e $r = 0,087$) e monoinfectados pelo HIV ($n = 127$, $p = 0,132$ e $r = -0,134$).

4. Discussão

A MBL desempenha papel importante na resposta imune inata ao ativar o sistema complemento através da via da lectina em um mecanismo independente de anticorpo mechanism (Martin and Blom, 2016; Mason and Tarr, 2015; Vallinoto et al., 2008). Esta proteína tem sido estudada em diversas infecções (Figueiredo et al., 2016; Guimaraes et al., 2008; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Rashidi et al., 2016; Zinyama-Gutsire et al., 2015b), no entanto, este é o primeiro estudo que avaliou as concentrações plasmáticas da MBL funcional em PVHA coinfectadas com o HHV-8 e correlacionou com a quantificação da carga viral do HIV e contagem do TCD4.

A população estudada não diferiu em relação a idade e sexo quando comparada com outros estudos que avaliaram PVHA infectadas com o HHV-8 (Batista et al., 2009; Broccolo et al., 2016; Cahú et al., 2016; Hesamizadeh et al., 2016; Rohner et al., 2016). Assim como, a mediana da carga viral do HIV e a contagem do TCD4 não apresentaram diferença estatisticamente significante entre coinfectados HIV/HHV-8 e monoinfectados pelo HIV, corroborando trabalhos que avaliaram também essas características clínicas (Batista et al., 2009; Hesamizadeh et al., 2016; Tozetto-Mendoza et al., 2016).

Ainda se desconhece como a MBL poderia auxiliar no controle ou eliminação da infecção pelo HHV-8. No entanto, em relação a infecção pelo HIV, estudos já demonstraram que a MBL se liga a glicoproteína gp 120 do HIV, auxiliando a depuração deste vírus através

da ativação do sistema complemento (Botos and Wlodawer, 2005; da Silva et al., 2011; Nielsen et al., 1995; Teodorof et al., 2014; Ying et al., 2004). Além disso, quando a MBL está ligada ao HIV também pode ser eliminada da circulação pelo receptor C1q, por apresentar afinidade estrutural e funcional pela MBL (Haurum et al., 1993; Malhotra et al., 1990; Zinyama-Gutsire et al., 2015b), sugerindo haver consumo e redução da MBL durante a infecção pelo HIV (Kwakkel-van Erp et al., 2011; Zinyama-Gutsire et al., 2015b).

Estudos utilizaram diferentes pontos de corte, <100 , <300 e <500 ng/ml, para definir as concentrações plasmáticas deficientes da MBL (Gadjeva et al., 2004; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007; Zinyama-Gutsire et al., 2015a, 2015b). Em nosso estudo, definimos como concentrações deficientes <100 ng/ml, não encontrando associação com a infecção pelo HHV-8 em PVHA, com a carga viral do HIV ou contagem do TCD4, porém a mediana destas concentrações foi significativamente menor nos coinfectados HIV/HHV-8 quando comparados com os monoinfectados pelo HIV. No entanto, as medianas das concentrações encontradas em ambos os grupos foram superiores aos valores considerados como deficientes por esses autores (Egli et al., 2013; Gadjeva et al., 2004; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007; Zinyama-Gutsire et al., 2015a, 2015b). Uma possível explicação para as menores concentrações da MBL nos coinfectados seria em relação ao consumo e redução desta proteína envolvendo a opsonização do HIV e do HHV-8, levando a redução da MBL plasmática e o não acúmulo na circulação (Kwakkel-van Erp et al., 2011).

Por outro lado, considerando o ponto de corte estabelecido por Manuel et al (2007) para caracterizar a concentração plasmática deficiente da MBL (<500 ng/ml), foi observado que quatro coinfectados que desenvolveram SK, apresentaram concentração da MBL deficientes $2,519 \log_{10}$ ng/ml (dado não mostrado). Em relação ao TCD4, foi verificado que as contagens superiores ou inferiores a 350 células/mm³ não influenciaram as concentrações plasmáticas da MBL, uma vez que as medianas permaneceram menores nos coinfectados em relação aos monoinfectados. No entanto, considerando a utilização de uma escala numérica contínua foi possível estabelecer uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas da MBL e a carga viral do HIV nos coinfectados e monoinfectados, sugerindo que as concentrações plasmáticas da MBL poderiam modular também a coinfecção.

Outros fatores podem influenciar as concentrações da MBL, como os polimorfismos no gene *MBL2*, resultando em defeitos na polimerização da molécula levando a deficiência funcional e da expressão da proteína, reduzindo a capacidade de ativação do sistema complemento (Eddie et al., 2009; Halla et al., 2010; Li et al., 2013). Assim como, pode haver influência de drogas utilizadas no tratamento de infecções, como as da TARV (Araújo-Mariz

et al., 2016; Solomon et al., 2017; Sonderup and Wainwright, 2017), drogas que são metabolizadas no fígado podem comprometer as concentrações da MBL, devido esta proteína ser sintetizada principalmente no fígado (Kwakkel-van Erp et al., 2011).

Nossa pesquisa apresentou algumas limitações, como a investigação quanto ao ciclo lítico ou latente e a quantificação da carga viral do HHV-8, então sugerimos que estudos prospectivos futuros avaliem essas variáveis associando ou correlacionando com as concentrações plasmáticas da MBL em coinfectados HIV/HHV-8. Portanto, embora as concentrações plasmáticas consideradas deficientes da MBL não foram associadas à infecção pelo HHV-8 em PVHA, os coinfectados apresentaram concentrações da MBL menores e correlação inversa com a carga viral do HIV, sugerindo que a MBL também pode estar modulando a coinfecção HIV/HHV-8.

Referências

- Araújo-Mariz, C., Lopes, E.P., Acioli-Santos, B., Maruza, M., Montarroyos, U.R., De Ximenes, R.A.A., Lacerda, H.R., Miranda-Filho, D.D.B., De Militão De Albuquerque, M.F.P., 2016. Hepatotoxicity during treatment for tuberculosis in people living with HIV/AIDS. *PLoS One* 11, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0157725
- Aresté, C., Blackbourn, D.J., 2009. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Trends Microbiol.* 17, 119–129. doi:10.1016/j.tim.2008.12.001
- Auriti, C., Prencipe, G., Moriondo, M., Bersani, I., Bertaina, C., Mond??, V., Inglese, R., 2017. Mannose-Binding Lectin: Biologic Characteristics and Role in the Susceptibility to Infections and Ischemia-Reperfusion Related Injury in Critically Ill Neonates. *J. Immunol. Res.* 2017. doi:10.1155/2017/7045630
- Batista, M.D., Ferreira, S., Sauer, M.M., Tomiyama, H., Giret, M.T.M., Pannuti, C.S., Diaz, R.S., Sabino, E.C., Kallas, E.G., 2009. High human herpesvirus 8 (HHV-8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 4, 2–6. doi:10.1371/journal.pone.0005613
- Botos, I., Wlodawer, A., 2005. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope, *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* doi:10.1016/j.pbiomolbio.2004.05.001
- Broccolo, F., Din, C.T., Viganò, M.G., Rutigliano, T., Esposito, S., Lusso, P., Tambussi, G.,

- Malnati, M.S., 2016. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Virol.* 78, 47–52. doi:10.1016/j.jcv.2016.02.019
- Brulois, K., Jung, J.U., 2014. Interplay between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and the innate immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 597–609. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.001
- Cahú, G.G. de O.M., Morais, V.M.S., Lopes, T.R.R., da Silva, D.M., Tozetto-Mendoza, T.R., Pannuti, C.S., Cunha Duarte Coêlho, M.R., 2016. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *J. Med. Virol.* 88, 2016–2020. doi:10.1002/jmv.24550
- Catano, G., Agan, B.K., Kulkarni, H., Telles, V., Marconi, V.C., Dolan, M.J., Ahuja, S.K., 2008. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *J. Infect. Dis.* 198, 72–80. doi:10.1086/588712
- da Silva, G.K., Guimarães, R., Mattevi, V.S., Lazzaretti, R.K., Sprinz, E., Kuhmmer, R., Brandão, L., Crovella, S., Chies, J.A.B., 2011. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS* 25, 411–8. doi:10.1097/QAD.0b013e328342fef1
- Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. Kaposi sarcoma – associated herpesvirus : immunobiology , oncogenesis , and therapy 126, 3165–3175. doi:10.1172/JCI84418.KSHV
- Eddie, W.K., Kazue, I., Ezekowitz, T.R.A., Stuart, L.M., Ip, W.K.E., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Alan, R., 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol. Rev.* 230, 9–21. doi:IMR789 [pii]\r10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x
- Egli, A., Schäfer, J., Osthoff, M., Thiel, S., Mikkelsen, C., Rauch, A., Hirsch, H.H., Bucher, H.C., Young, J., Jensenius, J.C., Battegay, M., Trendelenburg, M., 2013. Low Levels of Mannan-Binding Lectin or Ficolins Are Not Associated with an Increased Risk of Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0051983
- Figueiredo, G.G., Cezar, R.D., Freire, N.M., Teixeira, V.G., Baptista, P., Cordeiro, M., Carmo, R.F., Vasconcelos, L.R.S., Moura, P., 2016. Mannose-binding lectin gene

- (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. *Hum. Immunol.* 77, 571–575.
doi:10.1016/j.humimm.2016.05.006
- Fujita, T., 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 346–53. doi:10.1038/nri800
- Gadjeva, M., Paludan, S.R., Thiel, S., Slavov, V., Ruseva, M., Eriksson, K., Löwhagen, G.B., Shi, L., Takahashi, K., Ezekowitz, A., Jensenius, J.C., 2004. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 304–311.
doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02616.x
- Guimaraes, V., Guimaraes, R., Brandao, L., Baldez da Silva, M.F.P.T., Milanese, M., Segat, L., Castelletti, H., Bruneska, D., de Lima Filho, J.L., de Freitas, A.C., Arraes, L.C., Rocha, C., Crovella, S., 2008. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum. Immunol.* 69, 273–278. doi:10.1016/j.humimm.2008.03.002
- Halla, M.C., do Carmo, R.F., Silva Vasconcelos, L.R., Pereira, L.B., Moura, P., de Siqueira, E.R.F., Pereira, L.M.M.B., de Mendonça Cavalcanti, M. do S., 2010. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. *Hum. Immunol.* 71, 883–887.
doi:10.1016/j.humimm.2010.05.021
- Haurum, J.S., Thiel, S., Jones, I.M., Fischer, P.B., Laursen, S.B., Jensenius, J.C., 1993. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS* 7, 1307–13.
- Hesamizadeh, K., Keyvani, H., Bokharaei-Salim, F., Monavari, S.H., Esghaei, M., Jahanbakhsh Sefidi, F., 2016. Molecular Epidemiology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus, and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran, 2014. *Iran. Red Crescent Med. J.* 18, e32603. doi:10.5812/ircmj.32603
- Hundt, M., Heiken, H., Schmidt, R.E., 2000. Low Mannose-Binding Lectin Serum Concentrations in HIV Long-Term Nonprogressors? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1927–1927. doi:10.1089/08892220050195892

- Kwakkel-van Erp, J.M., Paantjens, A.W.M., van Kessel, D.A., Grutters, J.C., van den Bosch, J.M.M., van de Graaf, E.A., Otten, H.G., 2011. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 165, 410–416. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04436.x
- Lee, H.R., Brulois, K., Wong, L.Y., Jung, J.U., 2012. Modulation of immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: Lessons from viral evasion strategies. *Front. Microbiol.* 3, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2012.00044
- Li, H., Fu, W.P., Hong, Z.H., 2013. Replication study in Chinese Han population and meta-analysis supports association between the MBL2 gene polymorphism and HIV-1 infection. *Infect. Genet. Evol.* 20, 163–170. doi:10.1016/j.meegid.2013.09.010
- Malhotra, R., Sim, R.B., Reid, K.B.M., 1990. Interaction of C1q, and other proteins containing collagen-like domains, with the C1q receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 18.
- Manuel, O., Pascual, M., Trendelenburg, M., Meylan, P.R., 2007. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 83, 359–362. doi:10.1097/01.tp.0000251721.90688.c2
- Martin, M., Blom, A.M., 2016. Complement in removal of the dead ??? balancing inflammation. *Immunol. Rev.* 274, 218–232. doi:10.1111/imr.12462
- Mason, C.P., Tarr, A.W., 2015. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 20, 2229–2271. doi:10.3390/molecules20022229
- Mohanna, S., Ferrufino, J.C., Sanchez, J., Bravo, F., Gotuzzo, E., 2005. Epidemiological and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma in Peru. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 435–441. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.041
- Munawwar, A., Singh, S., 2016. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. *J. Lab. Physicians* 8, 5. doi:10.4103/0974-2727.176228
- Nielsen, S.L., Andersen, P.L., Koch, C., Jensenius, J.C., Thiel, S., 1995. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 219–22.

- Paoli, P.D.E., Carbone, A., 2016. Kaposi ' s Sarcoma Herpesvirus : twenty years after its discovery. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1288–1294. doi:10.1128/JVI.00283-14
- Pria, A.D., Hayward, K., Bower, M., 2013. Do we still need chemotherapy for AIDS-associated Kaposi's sarcoma? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 13, 203–209. doi:10.1586/era.12.179
- Rashidi, E., Fazlollahi, M.R., Zahedifard, S., Talebzadeh, A., Kazemnejad, A., Saghafi, S., Pourpak, Z., 2016. Mannose-binding lectin deficiency in patients with a history of recurrent infections. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* 15, 69–74.
- Rohner, E., Wyss, N., Heg, Z., Faralli, Z., Mbulaiteye, S.M., Novak, U., Zwahlen, M., Egger, M., Bohlius, J., 2016. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 138, 45–54. doi:10.1002/ijc.29687
- Rohner, E., Wyss, N., Trelle, S., Mbulaiteye, S.M., Egger, M., Novak, U., Zwahlen, M., Bohlius, J., 2014. HHV-8 seroprevalence : a global view 1–7.
- Solomon, I.H., De Girolami, U., Chettimada, S., Misra, V., Singer, E.J., Gabuzda, D., 2017. Brain and liver pathology, amyloid deposition, and interferon responses among older HIV-positive patients in the late HAART era. *BMC Infect. Dis.* 17, 151. doi:10.1186/s12879-017-2246-7
- Sonderup, M.W., Wainwright, H.C., 2017. Human Immunodeficiency Virus Infection, Antiretroviral Therapy, and Liver Pathology. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46, 327–343. doi:10.1016/j.gtc.2017.01.007
- Sullivan, R.J., Pantanowitz, L., Casper, C., Stebbing, J., Dezube, B.J., 2008. HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1209–15. doi:10.1086/592298
- Tan, Y., Liu, L., Luo, P., Wang, A., Jia, T., Shen, X., Wang, M., Zhang, S., 2009. Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population. *Mol. Immunol.* 47, 632–638. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.020
- Teodorof, C., Divakar, S., Soontornniyomkij, B., Achim, C.L., Kaul, M., Singh, K.K., 2014.

Intracellular mannose binding lectin mediates subcellular trafficking of HIV-1 gp120 in neurons. *Neurobiol. Dis.* 69, 54–64. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.002

Tozetto-Mendoza, T.R., Ibrahim, K.Y., Tateno, A.F., de Oliveira, C.M., Sumita, L.M., Sanchez, M.C.A., Luna, E.J., Pierrotti, L.C., Drexler, J.F., Braz-Silva, P.H., Pannuti, C.S., Romano, C.M., 2016. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 95, e5291. doi:10.1097/MD.0000000000005291

Vallinoto, A.C., Muto, N.A., Alves, A.E., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Souza, L.L., Ishak, M.O., Ishak, R., 2008. Characterization of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene promoter among human immunodeficiency virus 1 infected subjects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 645–649. doi:10.1590/S0074-02762008000700003

Ying, H., Ji, X., Hart, M.L., Gupta, K., Saifuddin, M., Zariffard, M.R., Spear, G.T., 2004. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 327–335. doi:10.1089/088922204322996563

Zinyama-Gutsire, R., Chasela, C., Kallestrup, P., Rusakaniko, S., Christiansen, M., Ngara, B., Gomo, E., Ullum, H., Erikstrup, C., Madsen, H.O., Stray-Pedersen, B., Garred, P., Mduluza, T., 2015a. HIV-1 Disease Progression and Survival in an Adult Population in Zimbabwe: Is There an Effect of the Mannose Binding Lectin Deficiency? *Omi. A J. Integr. Biol.* 19, 542–552. doi:10.1089/omi.2015.0047

Zinyama-Gutsire, R., Chasela, C., Madsen, H.O., Rusakaniko, S., Kallestrup, P., Christiansen, M., Gomo, E., Ullum, H., Erikstrup, C., Munyati, S., Kurewa, E.N., Stray-Pedersen, B., Garred, P., Mduluza, T., 2015b. Role of mannose-binding lectin deficiency in HIV-1 and schistosoma infections in a rural adult population in Zimbabwe. *PLoS One* 10, 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0122659

6. CONCLUSÕES

- ✓ A variável clínica primeira contagem do TCD4 foi estatisticamente menor nos coinfectados HIV/HHV-8;
- ✓ Os alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos -550, -221 e exon 1 não foram associados com a infecção pelo HHV-8 em PVHA;
- ✓ Nos coinfectados os haplótipos de expressão intermediária foram associados com a última contagem do TCD4 abaixo de 350 células/mm³;
- ✓ A mediana das concentrações plasmáticas da MBL foi estatisticamente menor nos coinfectados HIV/HHV-8;
- ✓ As concentrações plasmáticas deficientes da MBL não foram associadas com a infecção HIV/HHV-8;
- ✓ Houve uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas da MBL e a carga viral do HIV em coinfectados e monoinfectados.

REFERÊNCIAS

- ABLASHI, D. V.; CHATLYNNE, L. G.; WHITMAN, J. E.; CESARMAN, E. Spectrum of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, or Human Herpesvirus 8, Diseases. **Society**, v. 15, n. 3, p. 439–464, 2002.
- ALVES PEDROSO, M. L.; BOLDT, A. B. W.; PEREIRA-FERRARI, L.; STEFFENSEN, R.; STRAUSS, E.; JENSENIUS, J. C.; IOSHII, S. O.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: Association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 2, p. 258–264, 2008.
- ANEJA, K. K.; YUAN, Y. Reactivation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: An Update. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 613, 2017.
- ARESTÉ, C.; BLACKBOURN, D. J. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 119–129, 2009.
- AURITI, C.; PRENCIPE, G.; MORIONDO, M.; BERSANI, I.; BERTAINA, C.; MONDINI, V.; INGLESE, R. Mannose-Binding Lectin: Biologic Characteristics and Role in the Susceptibility to Infections and Ischemia-Reperfusion Related Injury in Critically Ill Neonates. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.
- AUTEN, M.; KIM, A. S.; BRADLEY, K. T.; ROSADO, F. G. Human herpesvirus 8-related diseases: Histopathologic diagnosis and disease mechanisms. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 34, n. 4, p. 371–376, 2017.
- BATISTA, M. D.; FERREIRA, S.; SAUER, M. M.; TOMIYAMA, H.; GIRET, M. T. M.; PANNUTI, C. S.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; KALLAS, E. G. High human herpesvirus 8 (HHV-8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. 2–6, 2009.
- BAUTISTA-RODRIGUEZ, C.; LAUNES, C.; JORDAN, I.; ANDRES, M.; ARIAS, M. T.; LOZANO, F.; GARCIA-GARCIA, J. J.; MUÑOZ-ALMAGRO, C. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. p. 1–9, 2017.
- BHUTANI, M.; POLIZZOTTO, M. N.; ULDRICK, T. S.; YARCHOAN, R. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-associated malignancies: Epidemiology, pathogenesis, and advances in treatment. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 2, p. 223–246, 2015.
- BROCCOLO, F.; DIN, C. T.; VIGANÒ, M. G.; RUTIGLIANO, T.; ESPOSITO, S.; LUSO, P.; TAMBUSI, G.; MALNATI, M. S. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Journal of Clinical Virology**, v. 78, p. 47–52, 2016.
- BRUDNER, M.; KARPEL, M.; LEAR, C.; CHEN, L.; YANTOSCA, L. M.; SCULLY, C.; SARRAJU, A.; SOKOLOVSKA, A.; ZARIFARD, M. R.; EISEN, D. P.; MUNGALL, B. A.; KOTTON, D. N.; OMARI, A.; HUANG, I. C.; FARZAN, M.; TAKAHASHI, K.; STUART, L.; STAHL, G. L.; EZEKOWITZ, A. B.; SPEAR, G. T.; OLINGER, G. G.; SCHMIDT, E. V.; MICHELOW, I. C. Lectin-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection via Soluble and Transmembrane C-type Lectin Receptors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

BRULOIS, K.; JUNG, J. U. Interplay between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and the innate immune system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 5, p. 597–609, 2014.

CAHÚ, G. G. de O. M.; MORAIS, V. M. S.; LOPES, T. R. R.; DA SILVA, D. M.; TOZETTO-MENDOZA, T. R.; PANNUTI, C. S.; CUNHA DUARTE COELHO, M. R. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 11, p. 2016–2020, 2016.

CARBONE, A.; CESARMAN, E.; GLOGHINI, A.; DREXLER, H. G. Understanding pathogenetic aspects and clinical presentation of primary effusion lymphoma through its derived cell lines. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 4, p. 479–90, 2010.

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

CASELLI, E.; GALVAN, M.; SANTONI, F.; ROTOLA, A.; CARUSO, A.; CASSAI, E.; LUCA, D. Di. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated virus) ORF50 increases in vitro cell susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 5, p. 1123–1131, 2003.

CASPER, C. New Approaches to the Treatment of Human Herpesvirus 8- Associated Disease. **Rev Med Virol**, v. 18, n. 5, p. 321–329, 2008.

CATANO, G.; AGAN, B. K.; KULKARNI, H.; TELLES, V.; MARCONI, V. C.; DOLAN, M. J.; AHUJA, S. K. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 1, p. 72–80, 2008.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; MAGRI, M. C.; SANTOS-FORTUNA, E.; SOUZA, J. F.; SENS, Y. A. S.; JABUR, P. **Human Herpesvirus-8 Infection in Hemodialysis Patients From São Paulo, Brazil: Preliminary Results** *Transplantation Proceedings*, v.39, n.10, p.3044-3046, 2007.

CERVERA, C.; LOZANO, F.; SAVAL, N.; GIMFERRER, I.; IBAÑEZ, A.; SUÁREZ, B.; LINARES, L.; COFÁN, F.; RICART, M. J.; ESFORZADO, N.; MARCOS, M. A.; PUMAROLA, T.; OPPENHEIMER, F.; CAMPISTOL, J. M.; MORENO, A. The Influence of Innate Immunity Gene Receptors Polymorphisms in Renal Transplant Infections. **Transplantation**, v. 83, n. 11, p. 1493–1500, 2007.

CHAKRABORTY, S.; VEETIL, M. V.; CHANDRAN, B. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus entry into target cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2012.

DA CRUZ, H. L. A.; DA SILVA, R. C.; SEGAT, L.; DE CARVALHO, M. S. Z. de M. G.; BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARÃES, R. L.; SANTOS, F. C. F.; DE LIRA, L. A. S.; MONTENEGRO, L. M. L.; SCHINDLER, H. C.; CROVELLA, S. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 323–329, 2013.

DA SILVA, G. K.; GUIMARÃES, R.; MATTEVI, V. S.; LAZZARETTI, R. K.; SPRINZ, E.; KUHMMER, R.; BRANDÃO, L.; CROVELLA, S.; CHIES, J. A. B. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. **AIDS (London, England)**, v. 25, n. 4, p. 411–8, 2011.

- DI DOMENICO, E.; TOMA, L.; BORDIGNON, V.; TRENTA, E.; D'AGOSTO, G.; CORDIALI-FEI, P.; ENSOLI, F. Activation of DNA Damage Response Induced by the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 854, 2016.
- DITTMER, D. P.; DAMANIA, B. Kaposi sarcoma – associated herpesvirus : immunobiology , oncogenesis , and therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 9, p. 3165–3175, 2016.
- DOBÓ, J.; PÁL, G.; CERVENAK, L.; GÁL, P. The emerging roles of mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) in the lectin pathway of complement and beyond. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 98–111, 2016.
- DOURMISHEV, L. A.; DOURMISHEV, A. L.; SCHWARTZ, R. A.; LUKAC, D. M.; PALMERI, D. Molecular Genetics of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Epidemiology and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 2, p. 175–212, 2003.
- DOW, D. E.; CUNNINGHAM, C. K.; BUCHANAN, A. M. A review of human herpesvirus 8, the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in the pediatric population. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. 66–76, 2014.
- EDDIE, W. K.; KAZUE, I.; EZEKOWITZ, T. R. A.; STUART, L. M.; IP, W. K. E.; TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R. A.; ALAN, R. Mannose-binding lectin and innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 9–21, 2009.
- EDELMAN, D. C. Human herpesvirus 8--a novel human pathogen. **Virology journal**, v. 2, p. 78, 2005.
- EGLI, A.; SCHÄFER, J.; OSTHOFF, M.; THIEL, S.; MIKKELSEN, C.; RAUCH, A.; HIRSCH, H. H.; BUCHER, H. C.; YOUNG, J.; JENSENIUS, J. C.; BATTEGAY, M.; TRENDELENBURG, M. Low Levels of Mannan-Binding Lectin or Ficolins Are Not Associated with an Increased Risk of Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- EISEN, D. P.; MINCHINTON, R. M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 11, p. 1496–1505, 2003.
- ERDEMIR, G.; OZKAN, T. B.; OZGUR, T.; BUDAK, F.; KILIC, S. S.; ONAY, H. Mannose-binding lectin gene polymorphism and chronic hepatitis B infection in children. **Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 21, n. 2, p. 84–9, 2015.
- FEITERNA-SPERLING, C.; KÖNIGS, C.; NOTHEIS, G.; BUCHHOLZ, B.; KRÜGER, R.; WEIZSÄCKER, K.; EBERLE, J.; HANHOFF, N.; GÄRTNER, B.; HEIDER, H.; KRÜGER, D. H.; HOFMANN, J. High seroprevalence of antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) among HIV-1-infected children and adolescents in a non-endemic population. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 5, p. 425–434, 2016.
- FIGUEIREDO, G. G.; CEZAR, R. D.; FREIRE, N. M.; TEIXEIRA, V. G.; BAPTISTA, P.; CORDEIRO, M.; CARMO, R. F.; VASCONCELOS, L. R. S.; MOURA, P. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are

associated to dengue disease severity. **Human Immunology**, v. 77, n. 7, p. 571–575, 2016.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 5, p. 346–353, 2002.

GADJEVA, M.; PALUDAN, S. R.; THIEL, S.; SLAVOV, V.; RUSEVA, M.; ERIKSSON, K.; LÖWHAGEN, G. B.; SHI, L.; TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, A.; JENSENIUS, J. C. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 2, p. 304–311, 2004.

GANTT, S.; CASPER, C. Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 4, p. 295–301, 2011.

GARRED, P.; LARSEN, F.; SEYFARTH, J.; FUJITA, R.; MADSEN, H. O. Mannose-binding lectin and its genetic variants. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 85–94, 2006.

GIFFIN, L.; DAMANIA, B. KSHV: Pathways to Tumorigenesis and Persistent Infection Louise. **Adv Virus Res**, v. 88, p. 111–159, 2014.

GNANN, J. W.; PELLETT, P. E.; JAFFE, H. W. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 30 Suppl 1, p. S72-6, 2000.

GONCALVES, P. H.; ZIEGELBAUER, J.; ULDRICK, T. S.; YARCHOAN, R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 1, p. 47–56, 2017.

GUIMARAES, V.; GUIMARAES, R.; BRANDAO, L.; BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T.; MILANESE, M.; SEGAT, L.; CASTELLETTI, H.; BRUNESKA, D.; DE LIMA FILHO, J. L.; DE FREITAS, A. C.; ARRAES, L. C.; ROCHA, C.; CROVELLA, S. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. **Human Immunology**, v. 69, n. 4–5, p. 273–278, 2008.

HALLA, M. C.; DO CARMO, R. F.; SILVA VASCONCELOS, L. R.; PEREIRA, L. B.; MOURA, P.; DE SIQUEIRA, E. R. F.; PEREIRA, L. M. M. B.; MENDONÇA, C. A. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. **Human Immunology**, v. 71, n. 9, p. 883–887, 2010.

HARTZ, A.; PAGEL, J.; HUMBERG, A.; PREUSS, M.; SCHREITER, L.; RUPP, J.; FIGGE, J.; KARSTEN, C. M.; NERNBERG, P.; HERTING, E.; GÖPEL, W.; HERTTEL, C.; GERMAN NEONATAL NETWORK (GNN). The association of mannose-binding lectin 2 polymorphisms with outcome in very low birth weight infants. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178032, 2017.

HENSLER, H. R.; TOMASZEWSKI, M. J.; RAPPOCCIOLO, G.; RINALDO, C. R.; JENKINS, F. J. Human herpesvirus 8 glycoprotein B binds the entry receptor DC-SIGN. **Virus Research**, v. 190, p. 97–103, 2014.

HLADIK, W.; DOLLARD, S. C.; MERMIN, J.; FOWLKES, A. L.; DOWNING, R.; AMIN, M. M.; BANAGE, F.; NZARO, E.; KATAHA, P.; DONDERO, T. J.; PELLETT, P. E.; LACKRITZ, E. M. Transmission of Human Herpesvirus 8 by Blood Transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 13, p. 1331–1338, 2006.

HUNDT, M.; HEIKEN, H.; SCHMIDT, R. E. Low Mannose-Binding Lectin Serum Concentrations in HIV Long-Term Nonprogressors? **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, n. 17, p. 1927–1927, 2000.

IP, W. K. E.; CHAN, K. H.; LAW, H. K. W.; TSO, G. H. W.; KONG, E. K. P.; WONG, W. H. S.; TO, Y. F.; YUNG, R. W. H.; CHOW, E. Y.; AU, K. L.; CHAN, E. Y. T.; LIM, W.; JENSENIUS, J. C.; TURNER, M. W.; PEIRIS, J. S. M.; LAU, Y. L. Mannose-Binding Lectin in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 10, p. 1697–1704, 2005.

IP, W. K.; TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R. A.; STUART, L. M. Mannose-binding lectin and innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 9–21, 2009.

ISHAK, M. de O. G.; MARTINS, R. N.; MACHADO, P. R. L.; DE SOUZA, L. L. B.; MACHADO, L. F. A.; AZEVEDO, V. N.; KATANO, H.; SATA, T.; HASEGAWA, H.; VALLINOTO, A. C. R.; ISHAK, R. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: Evidence of an ancient human infection. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1537–1544, 2007.

KELLER, R.; ZAGO, A.; VIANA, M. C.; BOURBOULIA, D.; DESGRANGES, C.; CASSEB, J.; MOURA, W. V.; DIETZE, R.; COLLANDRE, H. HHV-8 infection in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 7, p. 879–886, 2001.

KWAKKEL-VAN ERP, J. M.; PAANTJENS, A. W. M.; VAN KESSEL, D. A.; GRUTTERS, J. C.; VAN DEN BOSCH, J. M. M.; VAN DE GRAAF, E. A.; OTTEN, H. G. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 165, n. 3, p. 410–416, 2011.

LA FERLA, L.; PINZONE, M. R.; NUNNARI, G.; MARTELOTTA, F.; LLESHI, A.; TIRELLI, U.; DE PAOLI, P.; BERRETTA, M.; CACOPARDO, B. Kaposi's sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 17, p. 2354–2365, 2013.

LAURENT, C.; MEGGETTO, F.; BROUSSET, P. Human herpesvirus 8 infections in patients with immunodeficiencies. **Human Pathology**, v. 39, n. 7, p. 983–993, 2008.

LEE, H. R.; BRULOIS, K.; WONG, L. Y.; JUNG, J. U. Modulation of immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: Lessons from viral evasion strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAR, p. 1–14, 2012.

LI, H.; FU, W. P.; HONG, Z. H. Replication study in Chinese Han population and meta-analysis supports association between the MBL2 gene polymorphism and HIV-1 infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 163–170, 2013.

MANUEL, O.; PASCUAL, M.; TRENDELENBURG, M.; MEYLAN, P. R. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. **Transplantation**, v. 83, n. 3, p. 359–362, 2007.

MARTIN, M.; BLOM, A. M. Complement in removal of the dead - balancing inflammation. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 218–232, 2016.

MASON, C. P.; TARR, A. W. Human lectins and their roles in viral infections. **Molecules**, v.

20, n. 2, p. 2229–2271, 2015.

MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOF, C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707–19, 2010.

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

MOHANNA, S.; FERRUFINO, J. C.; SANCHEZ, J.; BRAVO, F.; GOTUZZO, E. Epidemiological and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma in Peru. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 435–441, 2005.

MUNAWWAR, A.; SINGH, S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 8, n. 1, p. 5, 2016.

NASCIMENTO, M. C.; DE SOUZA, V. A.; SUMITA, L. M.; FREIRE, W.; WEISS, H. A.; SABINO, E. C.; FRANCESCHI, S.; PANNUTI, C. S.; MAYAUD, P. Prevalence of, and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors in Brazil: A multi-center serosurvey. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 7, p. 1202–1210, 2008.

NASCIMENTO, M. C.; SUMITA, L. M.; SOUZA, V. U.; WEISS, H. A.; OLIVEIRA, J.; MASCHERETTI, M.; QUIROGA, M.; VELA, R. A. R.; SABINO, E.; PANNUTI, C. S.; MAYAUD, P. Seroprevalence of kaposi sarcoma-Associated herpesvirus and other serologic markers in the Brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 663–667, 2009.

PAUK, J.; HUANG, M.-L.; BRODIE, S. J.; WALD, A.; KOELLE, D. M.; SCHACKER, T.; CELUM, C.; SELKE, S.; COREY, L. Mucosal Shedding of Human Herpesvirus 8 in Men. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 19, p. 1369–1377, 2000.

PENKA, I.; KALA, Z.; ZETELOVÁ, A.; KUNOVSKY, L.; SZTURZ, P.; KREN, L.; MECHL, M.; REHAK, Z.; HANKE, I. Castlemans disease - surgical treatment, case reports. **Rozhledy v chirurgii : mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti**, v. 95, n. 12, p. 457–461, 2016.

PRIA, A. D.; HAYWARD, K.; BOWER, M. Do we still need chemotherapy for AIDS-associated Kaposi's sarcoma? **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 2, p. 203–209, 2013.

PURUSHOTHAMAN, P.; DABRAL, P.; GUPTA, N.; SARKAR, R.; VERMA, S. C. KSHV genome replication and maintenance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.2 p. 1–14, 2016.

PURUSHOTHAMAN, P.; UPPAL, T.; VERMA, S. C. Molecular biology of KSHV lytic reactivation. **Viruses**, v. 7, n. 1, p. 116–153, 2015.

ROHNER, E.; WYSS, N.; HEG, Z.; FARALLI, Z.; MBULAITEYE, S. M.; NOVAK, U.; ZWAHLEN, M.; EGGER, M.; BOHLIUS, J. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 1, p. 45–54, 2016.

ROHNER, E.; WYSS, N.; TRELLE, S.; MBULAITEYE, S. M.; EGGER, M.; NOVAK, U.; ZWAHLEN, M.; BOHLIUS, J. HHV-8 seroprevalence : a global view. **Systemic Reviews**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.

SATHISH, N.; WANG, X.; YUAN, Y. Tegument proteins of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-herpesviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAR, p. 1–13, 2012.

SCHNEIDER, J. W.; DITTMER, D. P. Diagnosis and Treatment of Kaposi Sarcoma. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 529–539, 2017.

SEPPÄNEN, M.; LOKKI, M.-L.; LAPPALAINEN, M.; HILTUNEN-BACK, E.; ROVIO, A. T.; KARES, S.; HURME, M.; AITTONIEMI, J. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism in recurrent herpes simplex virus 2 infection. **Human Immunology**, v. 70, n. 4, p. 218–221, 2009.

SHENG, A.; LIU, L.; WU, H.; WANG, Y.; PENG, X.; WANG, W. Correlation of mannose-binding lectin gene promoter polymorphism and plasma MBL concentration with HIV susceptibility in northern Chinese Han population. **Journal of Southern Medical University**, v. 28, n. 4, p. 567–71, 2008.

SHUTTERSOTCK. **Diagram Herpes Simplex Virus Particle Structure Ilustração De Banco 173727899 - Shutterstock**. 2003, Disponível em: <https://www.shutterstock.com/pt/image-illustration/diagram-herpes-simplex-virus-particle-structure-173727899?src=slgSnEBCKrJIF2CvTQRpeg-1-6&drawer=open>. Acesso em: 19 set. 2017.

SOUZA, V. A. U. F.; SUMITA, L. M.; FREIRE, W.; SATO, H. K.; GRANDI, J. L.; PIERROTTI, L. C.; NASCIMENTO, M. C. Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in Sao Paulo state. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 1, p. 123–127, 2004.

STOERMER, K. A.; MORRISON, T. E. Complement and viral pathogenesis. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 362–373, 2011.

SULLIVAN, R. J.; PANTANOWITZ, L.; CASPER, C.; STEBBING, J.; DEZUBE, B. J. HIV/AIDS: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment of Kaposi Sarcoma–Associated Herpesvirus Disease: Kaposi Sarcoma, Primary Effusion Lymphoma, and Multicentric Castlemann Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1209–1215, 2008.

TAN, Y.; LIU, L.; LUO, P.; WANG, A.; JIA, T.; SHEN, X.; WANG, M.; ZHANG, S. Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2–3, p. 632–638, 2009.

TEODOROF, C.; DIVAKAR, S.; SOONTORNNIYOMKIJ, B.; ACHIM, C. L.; KAUL, M.; SINGH, K. K. Intracellular mannose binding lectin mediates subcellular trafficking of HIV-1 gp120 in neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 69, p. 54–64, 2014.

THIELENS, N. M.; TACNET-DELORME, P.; ARLAUD, G. J. Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. **Immunobiology**, v. 205, n. 4–5, p. 563–574, 2002.

VALLINOTO, A. C.; MUTO, N. A.; ALVES, A. E.; MACHADO, L. F.; AZEVEDO, V. N.; SOUZA, L. L.; ISHAK, M. O.; ISHAK, R. Characterization of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene promoter among human immunodeficiency virus 1 infected subjects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 645–649, 2008.

VALLINOTO, A. C. R.; FREITAS, F. B.; GUIRELLI, I.; MACHADO, L. F. A.; AZEVEDO, V. N.; CAYRES-VALLINOTO, I.; ISHAK, M. O. G.; ISHAK, R. Characterization of mannose-binding lectin plasma levels and genetic polymorphisms in HIV-1-infected

individuals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 1–3, 2011.

VALLINOTO, A. C. R.; MENEZES-COSTA, M. R.; ALVES, A. E. M.; MACHADO, L. F. A.; AZEVEDO, V. N.; SOUZA, L. L. B. De; DE OLIVEIRA GUIMARÃES ISHAK, M.; ISHAK, R. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 9, p. 1358–1362, 2006.

VARTHAKAVI, V.; SMITH, R. M.; DENG, H.; SUN, R.; SPEARMAN, P. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus through Induction of KSHV Rta. **Virology**, v. 297, n. 2, p. 270–280, 2002.

VASCONCELOS, L. R. S.; FONSECA, J. P. L.; CARMO, R. F. do; MENDONÇA, T. F. de; PEREIRA, V. R. A.; LUCENA-SILVA, N.; PEREIRA, L. M. M. B.; MOURA, P.; CAVALCANTI, M. do S. de M. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 551–557, 2011.

VOLKOW, P.; JACQUEMIN, B.; ZINSER, J. W.; PÉREZ-PADILLA, R. Revisión histórica del sarcoma de Kaposi en la era pre-TARAA (Terapia antirretroviral altamente activa): Evolución con diferentes esquemas de quimioterapia y remisión con el uso de ganciclovir. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 152, p. 96–102, 2016.

WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 9, p. 548–555, set. 2005.

WU, W.; CHEN, Y.; QIAO, H.; TAO, R.; GU, W.; SHANG, S. Human mannose-binding lectin inhibits human cytomegalovirus infection in human embryonic pulmonary fibroblast. **Apmis**, v. 120, n. 8, p. 675–682, 2012.

XU, H.; ZHAO, M.; WAN, T.; SONG, G.; HE, J.; CHEN, Z. Association between Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75371, 2013.

ZENG, Y.; ZHANG, X.; HUANG, Z.; CHENG, L.; YAO, S.; QIN, D.; CHEN, X.; TANG, Q.; LV, Z.; ZHANG, L.; LU, C. Intracellular Tat of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Role of JAK/STAT Signaling. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2401–2417, 2007.

ZINYAMA-GUTSIRE, R. B. L.; CHASELA, C.; KALLESTRUP, P.; RUSAKANIKO, S.; CHRISTIANSEN, M.; NGARA, B.; GOMO, E.; ULLUM, H.; ERIKSTRUP, C.; MADSEN, H. O.; STRAY-PEDERSEN, B.; GARRED, P.; MDULUZA, T. HIV-1 Disease Progression and Survival in an Adult Population in Zimbabwe: Is There an Effect of the Mannose Binding Lectin Deficiency? **Omics: A Journal of Integrative Biology**, v. 19, n. 9, p. 542–552, 2015a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348711>>.

ZINYAMA-GUTSIRE, R. B. L.; CHASELA, C.; MADSEN, H. O.; RUSAKANIKO, S.; KALLESTRUP, P.; CHRISTIANSEN, M.; GOMO, E.; ULLUM, H.; ERIKSTRUP, C.; MUNYATI, S.; KUREWA, E. N.; STRAY-PEDERSEN, B.; GARRED, P.; MDULUZA, T. Role of mannose-binding lectin deficiency in HIV-1 and schistosoma infections in a rural adult population in Zimbabwe. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–23, 2015b.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, GENÉTICOS, IMUNOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO HHV-8 EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú, com endereço: Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. Cidade Universitária 50670-420/Telefone: (81) 32513881,98606389/e-mail: georgea_cahu@hotmail.com; para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação da Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho. Telefones para contato: 21268586, e-mail: rcoelholika@gmail.com.

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

O objetivo desta pesquisa é estimar a prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo HHV-8, além de descrever os genótipos do vírus 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, a infecção pelo HHV-8 será informada ao médico que o acompanha, a fim de auxiliá-lo a decidir sobre a conduta clínica neste caso. Sua participação será muito importante e ajudará a criar mais informação sobre as infecções virais no contexto das pessoas vivendo com HIV/aids.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados

coletados nesta pesquisa, através do formulário aplicado pela pesquisadora, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora e da orientada, no endereço, acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

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 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, GENÉTICOS, IMUNOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO HHV-8 EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de 201__

Assinatura do participante (ou responsável legal):

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

Assinatura da testemunha 1: _____

Assinatura da testemunha 2: _____

Apêndice B – Artigo 1 em inglês

***MBL2* gene polymorphisms and HHV-8 infection in people living with HIV/AIDS**

Viviane Martha Santos de Moraes¹, Elker Lene Santos de Lima², Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú¹, Thaisa Regina Rocha Lopes¹, Juliana Prado Gonçalves¹, Maria Tereza Cartaxo Muniz², Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,3*}

1 Virology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Laboratory of Molecular Biology, Center of Pediatric Oncohematology, Oswaldo Cruz University Hospital, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, **3** Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence to: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária. P.O. Box: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brasil. E-mail: rcoelholika@gmail.com

Abstract

Host genetic factors such as *MBL2* gene polymorphisms cause defects in the polymerization of MBL protein and result in a functional deficiency and/or in low serum levels that can influence susceptibility to various viral infections. The aim of this study was to estimate the frequency of alleles, genotypes and haplotypes related to -550, -221 and exon 1 polymorphisms of the *MBL2* gene and investigate their association with the HHV-8 infection in people living with HIV/AIDS (PLWHA) and clinical variables of TCD4 cell count and HIV viral load. A case-control study was performed in PLWHA from the outpatient infectious and parasitic diseases clinic at a referral hospital. Genomic DNA extractions from leukocytes were performed using a commercial Wizard® *Genomic DNA Purification* kit (Promega, Madison, WI). The promoter region (-550 and -221) was genotyped with the TaqMan system (Applied TaqMan Biosystems® genotyping Assays), and the structural region (exon1) was genotyped with *Express Sybr Greener Supermix* kit (Invitrogen, USA). In total, 124 HIV/HHV-8 coinfecting and 213 HIV monoinfecting patients were analysed. The LL, YY and AA genotypes were most frequent in both groups, and there was no association of allelic, genotypic and haplotype frequencies with the susceptibility of HHV-8 infection in PLWHA. However, in a multivariate analysis, coinfecting patients with the intermediate expression haplotype of the *MBL2* gene had an odds ratio of 3.06-fold of their last TCD4 cell count being below 350 cells/mm³. Among the coinfecting individuals, four developed KS and presented the intermediate expression *MBL*

haplotype, with three being HYA/LXA and one being LYA/LYO. Therefore, considering the ability of MBL to bind to the HIV-1 gp120 glycoprotein, the coinfecting individuals with the intermediate expression haplotype may exhibit inefficient HIV elimination due to serum MBL deficiency, leading to increased plasma viral load and decreased TCD4 lymphocytes. This suggests that these haplotypes may interfere with the clinical course of HIV/HHV-8 coinfection.

Keywords: Human Herpesvirus 8; Mannose binding lectin; HIV/HHV-8 coinfection; *MBL2* gene.

Introduction

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is associated with all forms of Kaposi's sarcoma (KS), being the necessary aetiological agent but insufficient for the development of this disease [1,2]. The prevalence of HHV-8 varies according to geographic regions and sub-populations, but after the human immunodeficiency virus (HIV) epidemic, the incidence of KS increased drastically compared to HIV-negative individuals, as it is the most common cancer in people living with HIV (PLWHA). These coinfecting patients have a more aggressive clinical course and progression to death [3–6].

The host's innate and adaptive immune responses have a key role in the control of HHV-8 infection and the early stages of KS development [7–9]. Mannose-binding lectin (MBL) is a protein of the innate immune system that binds with high affinity to mannose or other carbohydrates that may be present on the surface of the pathogens. MBL can mediate phagocytosis by macrophages, and when associated with serine protease (MASP), it activates the complement system by the lectin pathway in an antibody-independent mechanism [10,11].

The protein expression of MBL is determined genetically, and the serum concentration is directly related to mutations in the structural region of the *MBL2* gene (exon 1) and in other polymorphic sites in the promoter region (-550 and -221). These three loci are closely related, and the allelic combinations of these regions result in different haplotypes that can cause defects in the polymerization of the molecule resulting in a functional deficiency and/or in low serum levels of MBL [12–16]. Thus, these polymorphisms have been associated with susceptibility or resistance to viral infections or the development of clinical manifestations and were studied in patients with hepatitis C virus, hepatitis B virus, human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and dengue virus [17–27].

The progression of the disease caused by HIV infection is characterized by a decline in TCD4 cell count and an increase in viral load, leading to patient death in the absence of antiretroviral therapy [28]. Thus, some studies suggest that in HIV/HHV-8 coinfection, severe depletion or inactivation of T cells and HIV replication may be important factors in the clinical evolution of HHV-8 infection and the development of KS [4,29–31].

However, host genetic factors such as *MBL2* gene polymorphisms can control HIV/HHV-8 coinfection and influence susceptibility of HHV-8 in PLWHA and/or the clinical evolution of coinfecting individuals. Therefore, the aims of this study were to estimate the frequencies of -550, -221 and exon 1 polymorphisms of the *MBL2* gene, verify the association between alleles, genotypes and haplotypes with the HHV-8 infection in PLWHA, and associate the expression of these haplotypes with TCD4 cell count and HIV viral load.

Methodology

Study population

This is a case-control study in which patients' demographic and clinical variable data were originally selected and described by Cahú et al. (2016)[32]. The population was composed of HIV/HHV-8 coinfecting and HIV mono-infected patients from the outpatient clinic of infectious and parasitic diseases in the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco. This research was approved by the ethics committee and the institutional review board of the Federal University of Pernambuco under case number 22428813.5.0000.5208.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from leukocytes isolated from whole blood in anticoagulant solution (EDTA) using a commercial kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. After extraction, all samples were measured to determine the concentration and the degree of purity of DNA using the Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer. All samples were diluted to the DNA concentration required for each reaction.

The promoter region (-550 and -221) was genotyped using the TaqMan system (Applied Biosystems® Genotyping Assays TaqMan), and the structural region (exon 1) genotyping was performed using the *Express Sybr Greener Supermix* kit (Invitrogen, USA). The melting temperature (melting temperature assay, MTA) and the melting curve profiles were obtained

using the decoupling device software. The detection of polymorphisms in the codons -550, -221 and the exon 1 *MBL2* gene was performed using the Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). The three allelic variants of the *MBL2* gene in codon positions 52, 54, and 57 in exon-1 were designated 'O', and the wild-type allele was designated 'A', as previously described in several studies [21,27,33,34]. The sequences of the primers and probes used are described in Table 1, and the protocol conditions are available on the website SNP500 Cancer (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>).

Table 1: Sequence of primers and probes used to detect polymorphisms of the promoter and structural regions of the *MBL2* gene.

<i>MBL2</i> gene region	Nucleotide sequence
Promoter region (-550)	
Primer forward	5'- CCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA-3'
Primer reverse	5'- CAACCCAGCCCAGAATTAAGT-3'.
Sonda VIC	5'-VIC-CCTGTCTAAAACACC-MGB-3
Sonda FAM	5'-FAM-AGCCTGTGTAAAAC-MGB-3
Promoter region (-221)	
Primer forward	5'- GCACGGTCCCATTGTTCTCA-3'
Primer reverse	5'-GCGTTGCTGCTGGAAGACTATAAA-3'
Sonda VIC	5'-VIC-CATGCTTTCGGTGGCAG-MGB-3'
Sonda FAM	5'-FAM-CATGCTTTCGGTGGCAG-MGB-3'
Structural region (exon-1)	
Primer forward	5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3'
Primer reverse	5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'

MBL2 gene haplotypes according to the grouping of the genotypes

The genotypes of the promoter region (-550 H/L and -221 Y/X) were grouped into the genotype of the structural region (exon 1 A/O) and categorized according to the haplotypes. We considered high expression haplotypes to be LYA/LYA, HYA/HYA and HYA/LYA. Intermediate expression haplotypes to be HYA/HXA, HYA/HYO, HYA/LXA, HYA/LYO, LXA/LXA, LYA/LXA and LYA/LYO. Low expression haplotypes to be HYO/HYO, LYO/LYO and HYO/LYO, according to some studies [27,34,35].

Statistical analysis

For the statistical analysis, we used Epi Info version 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, USA), Bioestat version 5.0 (Belém, Pará, Brasil) and Rstudio version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, MA) and considered values of $p < 0.05$ as statistically significant. Additionally, the values of the odds ratios (ORs) and confidence intervals (95% CIs) were used for each respective value of p . Categorical variables were analysed using the G-test (Williams), chi-square test (X^2) or

Fisher's exact test, while continuous variables were analysed using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. To verify if the population was in Hardy-Weinberg equilibrium and for the construction of the haplotypal combination, we used the programme Arlequin version 3.11 (Institute of Ecology and Evolution, University of Bern).

Results

In total, 337 samples of PLWHA were analysed, of which 124 were HIV/HHV-8 coinfecting, and 213 were HIV monoinfected patients. Table 2 shows the frequency of the sociodemographic variables distributed between coinfecting and monoinfected patients.

Table 2 - Frequency of sociodemographic variables in coinfecting and monoinfected patients.

Variables	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	p-value¹	OR² (95% CI)³
Age	42,8 (± 11,9) ⁴	42,7 (±11) ⁴	0, 947 ⁵	-
Sex				
Male	87 (70,2%)	131 (62,5%)	-	Reference
Female	37 (29,8%)	82 (38,5%)	0,109	1,471 (0,916-2,363)
Ethnicity				
Brown	56 (45,16%)	101 (47,42%)	-	Reference
White	36 (29,03%)	60 (28,17%)	0,769	0,924 (0,546-1,565)
Black	30 (24,19%)	48 (22,54%)	0,676	0,887 (0,506-1,550)
Indigenous	1 (0,81%)	3(1,41%)	1,000	1,663 (0,169-16,371)
Yellow	1 (0,81%)	1 (0,47%)	1,000	0,554 (0,034-9,036)

1- p-Values chi-square test or Fisher's exact test; 2-OR: odds ration; 3-CI: Confidence interval; 4- Values referring to mean age with the standard deviation indicated in parentheses; 5- p-Values ANOVA test.

Table 3 shows the median values of the clinical variables analysed in coinfecting and monoinfected patients.

Table 3 - Median values of the clinical variables analysed in coinfecting and monoinfected patients.

Median of variables	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	p-value ¹
First count of TCD4 cell (cell/mm ³)	177,5 (4-1206)	275 (4-1565)	0,008
Last count of TCD4 cell (cell/mm ³)	525 (20-1674)	573 (15-2171)	0,7947
First viral load of HIV (copies/ml)	23859 (79- 4,500,000)	11892 (49- 1,642,215)	0,2706

Last viral load of HIV (copies/ml)	<40 (<40-346,326)	<40 (<40-1,873,483)	0,6904
Time of HIV infection (years)	6,8111 (0- 24,2389)	5,7181 (0- 25,1556)	0,2983
Time from HIV diagnosis to the start of ART (years)	0,2944 (0- 20,1889)	0,2833 (0- 20,0000)	0,7381
Time to use ART (years)	4,6806 (0- 18,0056)	4,1431 (0- 18,0778)	0,1746

1- *p*-Values Kruskal-Wallis test.

The frequencies of the alleles, genotypes and haplotypes related to -550, -221 and exon 1 polymorphisms of the *MBL2* gene are shown in Table 4. According to the Hardy-Weinberg test, the groups were balanced.

Table 4 - Distribution of frequencies of alleles, genotypes and haplotypes of the *MBL2* gene between monoinfected and coinfecting patients.

<i>MBL2</i> gene polymorphisms	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	<i>p</i>-value¹	OR² (IC³ 95%)	<i>p</i>-value¹
Promoter (-550)					
Allele L	173 (70)	297 (70)			
Allele H	75 (30)	129 (30)			
Genotypes					
LL	62 (50)	102 (48)		Reference	-
HL	49 (40)	93 (44)		1.154 (0.722-1.843)	0.550
HH	13 (10)	18 (8)	0.693	0.842 (0.386-1.836)	0.669
HL+HH	62 (50)	111 (52)			0.709
<i>Trend test</i> ⁴			0.682		
Promoter (-221)					
Allele Y	210 (85)	356 (84)			
Allele X	38 (15)	70 (16)			
Genotypes					
YY	89 (72)	148 (70)		Reference	-
YX	32 (26)	60 (28)		1.128 (0.682-1.865)	0.640
XX	3 (2)	5 (2)	0.899	1.002 (0.234-4.296)	0.998
YX+XX	35 (28)	65 (30)			0.657
<i>Trend test</i> ⁴			0.725		
Exon-1 (52, 54, 57)					
Allele A	196 (79)	344 (81)			
Allele O	52 (21)	82 (19)			
Genotypes					
AA	81 (65)	143 (67)		Reference	-
AO	34 (28)	58 (27)		0.966 (0.584-1.598)	0.894
OO	9 (7)	12 (6)	0.836	0.755 (0.305-1.869)	0.552
AO+OO	43 (35)	70 (33)			0.735
<i>Trend test</i> ⁴			0.713		
Haplotypes					
High expression	46 (37)	78 (36)		Reference	-

Intermediate expression	69 (56)	123 (58)		1.051 (0.658-1.679)	0.835
Low expression	9 (7)	12 (6)	0.825	0.786 (0.308-2.009)	0.622
<i>Trend test</i> ⁴			0.696		

1- *p*-Values of G-test (Williams); 2-OR: odds ration; 3-CI: confidence interval; *Trend test*: *p*-Values of Q Cochran.

The frequency of haplotypes according to expression in coinfecting and monoinfecting patients is described in table 5.

Table 5 - Distribution of *MBL2* gene haplotype frequencies according to coinfecting and monoinfecting expression levels.

Haplotypes	Expression	HIV/HHV-8 n = 124 (%)	HIV n = 213 (%)	<i>p</i> -value ¹	OR ² (95%CI) ³
HYA/LYA	High	17 (13,7)	43 (20,2)	1	Reference
LYA/LYA	High	19 (15,3)	24 (11,3)	0,097	0,499 (0,219-1,137)
HYA/HYA	High	10 (8,1)	11 (5,2)	0,108	0,435 (0,156-1,211)
HYA/HXA	Intermediate	0 (0)	1 (0,5)	0,534	-
HYA/HYO	Intermediate	1 (0,8)	5 (2,3)	0,672	1,977 (0,215-18,187)
HYA/LXA	Intermediate	12 (9,7)	23 (10,8)	0,546	0,758 (0,309-1,856)
HYA/LYO	Intermediate	19 (15,3)	24 (11,3)	0,097	0,499 (0,219-1,137)
LYA/LXA	Intermediate	20 (16,1)	36 (16,9)	0,396	0,712 (0,325-1,558)
LYA/LYO	Intermediate	14 (11,3)	29 (13,6)	0,646	0,819 (0,350-1,916)
LXA/LXA	Intermediate	3 (2,4)	5 (2,3)	0,684	0,659 (0,142-3,066)
HYO/HYO	Low	2 (1,6)	1 (0,5)	0,214	0,197 (0,017-2,326)
HYO/LYO	Low	1 (0,8)	3 (1,4)	0,998	1,186 (0,115-12,212)
LYO/LYO	Low	6 (4,8)	8 (3,8)	0,342	0,527 (0,159-1,747)

1- *p*-Values chi-square test or Fisher's exact test; 2- OR: odds ration; 3-CI: confidence interval.

Table 6 shows the frequencies of viral load of HIV and TCD4 counts according to high, intermediate and low expression levels of MBL in coinfecting and monoinfecting patients.

Table 6 - Univariate analysis of HIV viral load and TCD4 counts according to the expression of haplotypes in coinfecting and monoinfecting patients.

Variables	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	<i>p</i> -value ¹	OR ² (95% CI) ³
High expression haplotype				
First HIV viral load >150000	16 (34,8)	14 (17,9)	-	Reference
First HIV viral load ≤ 150000	30 (65,2)	64 (82,1)	0,035	2,438 (1,054-5,637)
Last HIV viral load detectable	14 (30,4)	33 (42,3)	-	Referência
Last HIV viral load undetectable	32 (69,6)	45 (57,7)	0,189	0,597 (0,276-1,291)
First TCD4 cell count ≤350	34 (73,9)	41 (52,6)	-	Reference
First TCD4 cellcount >350	12 (26,1)	37 (47,4)	0,019	2,556 (1,156-5,657)
Last TCD4 cell count ≤350	3 (6,5)	8 (10,3)	-	Reference
Last TCD4 cell count >350	43 (93,5)	70 (89,7)	0,537	0,612 (0,153-2,427)

Intermediate expression haplotype				
First HIV viral load >150000	15 (21,7)	23 (18,7)	-	Reference
First HIV viral load ≤150000	54 (78,3)	100 (81,3)	0,613	1,207 (0,582-2,506)
Last HIV viral load detectable	34 (49,3)	52 (42,3)	-	Referência
Last HIV viral load undetectable	35 (50,7)	71 (57,7)	0,351	1,326 (0,734-2,398)
First TCD4 cell count ≤350	52 (75,4)	76 (61,8)	-	Reference
First TCD4 cell count >350	17 (24,6)	47 (38,2)	0,060	1,892 (0,980-3,650)
Last TCD4 cell count ≤350	15 (21,7)	9 (7,3)	-	Reference
Last TCD4 cell count >350	54 (78,3)	114 (92,7)	0,004	3,518 (1,448-8,547)
Low expression haplotype				
First HIV viral load >150000	2 (22,2)	3 (25)	-	Reference
First HIV viral load ≤150000	7 (77,8)	9 (75)	1,000	0,857 (0,111-6,617)
Last HIV viral load detectable	5 (55,6)	8 (66,7)	-	Referência
Last HIV viral load undetectable	4 (44,4)	4 (33,3)	0,673	0,625 (0,105-3,707)
First TCD4 cell count ≤350	6 (66,7)	10 (83,3)	-	Reference
First TCD4 cell count >350	3 (33,3)	2 (16,7)	0,612	0,400 (0,051-3,125)
Last TCD4 cell count ≤350	3 (33,3)	3 (25)	-	Reference
Last TCD4 cell count >350	6 (66,7)	9 (75)	1,000	1,500 (0,223-10,076)

1- *p*-Values chi-square test or Fisher's exact test; 2- OR: odds ratio; 3-CI: confidence interval.

The variable last TCD4 count in coinfecting patients with intermediate expression haplotype remained associated following the final model in the multivariate analysis, as is shown in table 7 with the adjusted odds ratio (OR) and confidence intervals (95% CI).

Table 7 - Multivariate analysis of HIV viral load and TCD4 cell count according to the expression of haplotypes in coinfecting and mono-infected patients.

Variables	HIV/HHV-8 n = 124	HIV n = 213	<i>p</i> -value ¹	OR ² (95% CI) ³
High expression haplotype				
First HIV viral load >150000	16 (34,8)	14 (17,9)	-	Referência
First HIV viral load ≤ 150000	30 (65,2)	64 (82,1)	0,097	2,11 (0,87-5,11)
Last HIV viral load detectable	6 (13)	17 (21,8)	-	Referência
Last HIV viral load undetectable	40 (87)	61 (78,2)	0,165	0,45 (0,15-1,39)
First TCD4 cell count ≤350	34 (73,9)	41 (52,6)	-	Referência
First TCD4 cell count >350	12 (26,1)	37 (47,4)	0,093	2,04 (0,89-4,68)
Intermediate expression haplotype				
First TCD4 cell count ≤350	52 (75,4)	76 (61,8)	-	Referência
First TCD4 cell count >350	17 (24,6)	47 (38,2)	0,193	1,57 (0,8-3,1)

Last TCD4 cell count ≤ 350	15 (21,7)	9 (7,3)	-	Referência
Last TCD4 cell count > 350	54 (78,3)	114 (92,7)	0,016	3,06 (1,23-7,6)

1- *p*-Values chi-square test; 2- OR: odds ration; 3-CI: confidence interval.

Discussion

The pathogenesis of HIV/HHV-8 coinfection is complex and can be influenced by viral factors; for example, HIV induces the HHV-8 lytic cycle through the activation of the RTA protein and the TAT protein, and HHV-8 interferes with HIV replication by regulating the LTR by LANA antigen [36–38]. However, host genetic factors such as *MBL2* gene polymorphisms may also influence in the HHV-8 infection in PLWHA as well as HIV viral load and TCD4 counts.

In the present study, coinfectd and monoinfected patients presented a mean age similar to that reported in other studies [5,32,38,39]. Males were more frequent with no statistically significant difference between the groups, corroborating the results of a meta-analysis that also found no association between male sex and HHV-8 infection. However, the authors reported that men in Sub-Saharan Africa, where the virus is endemic, have an odds ratio of 1.21 of having HHV-8 and suggest that coinfection is more common in men because studies have analysed selected populations such as blood donors and PLWHA [40].

The results of our research showed that the median of the first TCD4 cell count was lower in coinfectd patients than monoinfected patients with a statistically significant difference. However, another study has shown that HHV-8 has little influence on HIV progression in initially asymptomatic individuals, with little repercussion in TCD4 cell count [41]. Nonetheless, because our study was a case-control, it was not possible to identify the time of HHV-8 seroconversion and whether PLWHA were asymptomatic.

The median of the last TCD4 count was not statistically significant between the coinfectd and monoinfected patients, corroborating with some previous studies[38,39]. Additionally, another study did not find an association between coinfection in PLWHA with KS and the last TCD4 count [42]. The absence of an association in PLWHA with and without KS may suggest that factors other than TCD4 influence the pathogenesis of HIV/HHV-8 coinfection. Similarly, the median values of the first and last HIV viral load did not present statistically significant differences between the groups. However, the coinfectd patients had a median value of the first viral load that was two times higher, suggesting that HHV-8 may be activating HIV replication and leading to a decrease in TCD4 levels.

Some studies have shown that the order and timing of HIV and HHV-8 infection may have prognostic implications and that the incidence of KS is higher in people with HHV-8 seroconversion following HIV infection [3,38,43–45]. In the present study, the time of HIV infection as well as the time from diagnosis to the initiation of antiretroviral therapy (ART) was lower in coinfecting patients, although not statistically significant. This corroborates a study that evaluated the time of seroconversion for HHV-8 and did not find an association between the time of diagnosis and the need to use ART [38].

The importance of the host genetic factors such as *MBL2* gene polymorphisms in susceptibility to infection has been studied for several viruses [17–21,25–27]. In this study, the frequency of the alleles, genotypes and haplotypes of -550, -221 and exon 1 polymorphisms of the *MBL2* gene had no association with HHV-8 infection in PLWHA. However, it is important to highlight the difficulty in comparing the results of our research due to the lack of studies on *MBL2* gene polymorphisms in patients infected with HHV-8 or coinfecting HIV/HHV-8.

One study evaluated the -550, -221 and exon 1 polymorphisms in PLWHA and found an association between the LX/LX genotype and low expression haplotypes with HIV infection when compared with blood donors. However, the authors reported that the study population was composed of PLWHA of European ethnicity and suggested that individuals of this origin may be more susceptible to HIV infection [46]. Nonetheless, a study of Zimbabweans in South Africa found no association of these polymorphisms with the HIV infection when compared to uninfected individuals [47]. Most of the individuals evaluated in the present study declared themselves brown, which may have contributed to the non-association with HHV-8 infection in PLWHA. The absence of an association may be related to the ethnic groups of Northeast Brazil, which have a combined mixture of the genomes of Africans, Europeans and Native Americans [48–50].

Simultaneous analysis of the -550, -221 and exon 1 polymorphisms can provide more complete information on the role of polymorphisms in susceptibility to infections since the concentrations of MBL may vary depending on the combinations of the structural and promoter polymorphisms [12–14]. According to Vallinoto et al. (2006) [51], these polymorphisms may be genetic markers associated with a better response in HIV-infected individuals using adequate antiretroviral therapy. When exon 1 polymorphism was studied in isolation, the presence of the A allele was associated with the reduction of HIV viral load and the improvement of the TCD4 count in PLWHA [51]. The high expression haplotype HY, referring to codons -550 and -221, was associated with a decrease in viral load and an increase in TCD4 counts during the clinical course of monoinfected HIV patients [52].

In contrast, the -550, -221 and exon 1 polymorphisms were studied simultaneously in PLWHA and did not show interference with viral load or TCD4 count [53], and they were also not associated with viral load, TCD4 count, disease progression, or survival of a population of PLWHA from Africa who was not under antiretroviral therapy [28]. However, the present study simultaneously evaluated the three main polymorphisms of the *MBL2* gene and the high, intermediate and low expression haplotypes and found an association between the HIV/HHV-8 coinfecting patients who had the intermediate expression haplotype with TCD4 count when compared with patients monoinfected by HIV.

Considering the ability of MBL to bind to the HIV-1 gp120 glycoprotein and mediating phagocytosis or activating the complement system [54–56], our results demonstrate that coinfecting patients who present the intermediate expression haplotype of *MBL2* gene may have the last TCD4 count <350 cells / mm³. This suggests that there is an inefficient elimination of HIV due to a deficiency of serum MBL with increased viral load and a decrease in TCD4 lymphocytes. It is important to note that among the coinfecting patients, the four who developed KS also had intermediate expression MBL haplotypes, three with HYA/LXA and one with LYA/LYO, suggesting that these haplotypes may interfere with the clinical development of KS in HIV/HHV-8 coinfecting patients. It should also be emphasized that none of the coinfecting patients who presented the high expression haplotypes of *MBL2* gene developed KS during clinical follow-up.

The role of *MBL2* gene polymorphisms is still a subject that needs to be further studied both in patients infected with HHV-8 and HIV/HHV-8 coinfecting patients due to the importance of MBL protein in the innate immune system and its relation to the susceptibility of the host to various infections. Therefore, genetic factors related to -550, -221 and exon 1 polymorphisms of the *MBL2* gene may influence the clinical course of coinfection and/or lead to the development of KS, especially in HIV/HHV-8 coinfecting patients who present the intermediate expression haplotypes of MBL.

Acknowledgments

The authors thank all patients and technical support from the virology laboratory of the tropical medicine institute of the University of São Paulo for the realization of HHV-8 serology.

The authors received no specific funding for this work.

References

1. Gantt S, Casper C. Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24: 295–301. doi:10.1097/QCO.0b013e3283486d04
2. Goncalves PH, Ziegelbauer J, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. *Curr Opin HIV AIDS.* 2017;12: 47–56. doi:10.1097/COH.0000000000000330
3. Rohner E, Wyss N, Trelle S, Mbulaiteye SM, Egger M, Novak U, et al. HHV-8 seroprevalence : a global view. *Syst Rev. Systematic Reviews;* 2014;3: 1–7. doi:10.1186/2046-4053-3-11
4. Dittmer DP, Damania B. Kaposi sarcoma – associated herpesvirus : immunobiology , oncogenesis , and therapy. 2016;126: 3165–3175. doi:10.1172/JCI84418.KSHV
5. Broccolo F, Din CT, Viganò MG, Rutigliano T, Esposito S, Lusso P, et al. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Virol. Elsevier B.V.;* 2016;78: 47–52. doi:10.1016/j.jcv.2016.02.019
6. Paoli PDE, Carbone A. Kaposi ' s Sarcoma Herpesvirus : twenty years after its discovery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20: 1288–1294. doi:10.1128/JVI.00283-14
7. Laurent C, Meggetto F, Brousset P. Human herpesvirus 8 infections in patients with immunodeficiencies. *Hum Pathol.* 2008;39: 983–993. doi:10.1016/j.humpath.2008.02.010
8. Aresté C, Blackbourn DJ. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Trends Microbiol.* 2009;17: 119–129. doi:10.1016/j.tim.2008.12.001
9. Lee H-R, Amatya R, Jung JU. Multi-step regulation of innate immune signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virus Res. Elsevier B.V.;* 2015;209: 39–44. doi:10.1016/j.virusres.2015.03.004
10. Brulois K, Jung JU. Interplay between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and the innate immune system. *Cytokine Growth Factor Rev. Elsevier Ltd;* 2014;25: 597–

609. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.001
11. Mason CP, Tarr AW. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules*. 2015;20: 2229–2271. doi:10.3390/molecules20022229
 12. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2003;37: 1496–1505. doi:10.1086/379324
 13. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern Med J*. 2005;35: 548–555. doi:10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x
 14. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*. 2009;230: 9–21. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x
 15. Hartz A, Pagel J, Humberg A, Preuss M, Schreiter L, Rupp J, et al. The association of mannose-binding lectin 2 polymorphisms with outcome in very low birth weight infants. Simeoni U, editor. *PLoS One*. 2017;12: e0178032. doi:10.1371/journal.pone.0178032
 16. Bautista-Rodriguez C, Launes C, Jordan I, Andres M, Arias MT, Lozano F, et al. Mannose-binding lectin-deficient genotypes as a risk factor of pneumococcal meningitis in infants. 2017; 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0178377
 17. Guimaraes V, Guimaraes R, Brandao L, Baldez da Silva MFPT, Milanese M, Segat L, et al. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol*. 2008;69: 273–278. doi:10.1016/j.humimm.2008.03.002
 18. Alves Pedroso ML, Boldt ABW, Pereira-Ferrari L, Steffensen R, Strauss E, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: Association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008;152: 258–264. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03614.x
 19. Seppänen M, Lokki M-L, Lappalainen M, Hiltunen-Back E, Rovio AT, Kares S, et al. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism in recurrent herpes simplex virus 2 infection. *Hum Immunol*. 2009;70: 218–221. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.022
 20. Friborg JT, Jarrett RF, Koch A, Garred P, Freeland JML, Andersen A, et al. Mannose-

- binding lectin genotypes and susceptibility to epstein-barr virus infection in infancy. Clin Vaccine Immunol. 2010;17: 1484–1487. doi:10.1128/CVI.00527-09
21. Halla MC, do Carmo RF, Silva Vasconcelos LR, Pereira LB, Moura P, de Siqueira ERF, et al. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. Hum Immunol. 2010;71: 883–887. doi:10.1016/j.humimm.2010.05.021
 22. Brudner M, Karpel M, Lear C, Chen L, Yantosca LM, Scully C, et al. Lectin-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection via Soluble and Transmembrane C-type Lectin Receptors. PLoS One. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0060838
 23. Egli A, Schäfer J, Osthoff M, Thiel S, Mikkelsen C, Rauch A, et al. Low Levels of Mannan-Binding Lectin or Ficolins Are Not Associated with an Increased Risk of Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients. PLoS One. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0051983
 24. Xu H, Zhao M, Wan T, Song G, He J, Chen Z. Association between Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection: A Meta-Analysis. PLoS One. 2013;8: e75371. doi:10.1371/journal.pone.0075371
 25. Yanagisawa K, Ogawa Y, Uchiumi H, Gohda F, Mawatari M, Ishizaki T, et al. Gene polymorphisms of mannose-binding lectin confer susceptibility to Pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients. J Infect Chemother. Elsevier Ltd; 2015;21: 769–775. doi:10.1016/j.jiac.2015.07.006
 26. Erdemir G, Ozkan TB, Ozgur T, Budak F, Kilic SS, Onay H. Mannose-binding lectin gene polymorphism and chronic hepatitis B infection in children. Saudi J Gastroenterol. Medknow Publications; 2015;21: 84–9. doi:10.4103/1319-3767.153825
 27. Figueiredo GG, Cezar RD, Freire NM, Teixeira VG, Baptista P, Cordeiro M, et al. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2016;77: 571–575. doi:10.1016/j.humimm.2016.05.006
 28. Zinyama-Gutsire RBL, Chasela C, Kallestrup P, Rusakaniko S, Christiansen M, Ngara B, et al. HIV-1 Disease Progression and Survival in an Adult Population in Zimbabwe:

- Is There an Effect of the Mannose Binding Lectin Deficiency? *Omi A J Integr Biol.* 2015;19: 542–552. doi:10.1089/omi.2015.0047
29. Casper C. New approaches to the treatment of human herpesvirus 8-associated disease. *Rev Med Virol. NIH Public Access*; 2008;18: 321–9. doi:10.1002/rmv.583
 30. Dow DE, Cunningham CK, Buchanan AM. A review of human herpesvirus 8, the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in the pediatric population. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3: 66–76. doi:10.1093/jpids/pit051
 31. Munawwar A, Singh S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. *J Lab Physicians.* 2016;8: 5. doi:10.4103/0974-2727.176228
 32. de Oliveira Mendes Cahú GG, Moraes VMS, Lopes TRR, da Silva DM, Tozetto-Mendoza TR, Pannuti CS, et al. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *J Med Virol.* 2016;88: 2016–2020. doi:10.1002/jmv.24550
 33. Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A, et al. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med.* 2002;2: 105–108. doi:10.1007/s102380200014
 34. Vasconcelos LRS, Fonseca JPL, Carmo RF do, Mendonça TF de, Pereira VRA, Lucena-Silva N, et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. *Int J Infect Dis.* 2011;15: 551–557. doi:10.1016/j.ijid.2011.04.008
 35. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency - Revisited. *Mol Immunol.* 2003;40: 73–84. doi:10.1016/S0161-5890(03)00104-4
 36. Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus through Induction of KSHV Rta. *Virology.* 2002;297: 270–280. doi:10.1006/viro.2002.1434
 37. Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, et al. Intracellular Tat of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's

- Sarcoma-Associated Herpesvirus: Role of JAK/STAT Signaling. *J Virol.* 2007;81: 2401–2417. doi:10.1128/JVI.02024-06
38. Batista MD, Ferreira S, Sauer MM, Tomiyama H, Giret MTM, Pannuti CS, et al. High human herpesvirus 8 (HHV-8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2009;4: 2–6. doi:10.1371/journal.pone.0005613
 39. Hesamizadeh K, Keyvani H, Bokharaei-salim F, Monavari SH, Esghaei M, Sefidi FJ. Molecular Epidemiology of Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpes Virus , and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran , 2014. 2016;18. doi:10.5812/ircmj.32603.Research
 40. Bègré L, Rohner E, Mbulaiteye SM, Egger M, Bohlius J. Is human herpesvirus 8 infection more common in men than in women? Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2016;139: 776–783. doi:10.1002/ijc.30129
 41. Ait-Arkoub Z, Robert-Visse C, Calvez V, Costagliola D, Autran B, Candotti D, et al. No influence of human herpesvirus 8 infection on the progression of HIV-1 infection in initially asymptomatic patients. *AIDS.* 2003;17: 1394–6. doi:10.1097/01.aids.0000072666.21517.3f
 42. Tozetto-Mendoza TR, Ibrahim KY, Tateno AF, Oliveira CM de, Sumita LM, Sanchez MCA, et al. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma. *Medicine (Baltimore).* 2016;95: e5291. doi:10.1097/MD.00000000000005291
 43. Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, Dukers NH, Simpson GR, Coutinho RA, et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *Aids.* 1998;12: 2481–2488. doi:10.1097/00002030-199818000-00018
 44. Jacobson LP, Jenkins FJ, Springer G, Munoz A, Shah K V, Phair J, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis.* 2000;181: 1940–1949. doi:10.1086/315503
 45. Volkow P, Jacquemin B, Zinser JW, P??rez-Padilla R. Revisión histórica del sarcoma

- de Kaposi en la era pre-TARAA (terapia antirretroviral altamente activa): evolución con diferentes esquemas de quimioterapia y remisión con el uso de ganciclovir. *Gac Med Mex.* 2016;152: 96–102.
46. da Silva GK, Guimarães R, Mattevi VS, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *Aids.* 2011;25: 411–418.
doi:10.1097/QAD.0b013e328342fef1
 47. Zinyama-Gutsire RBL, Chasela C, Madsen HO, Rusakaniko S, Kallestrup P, Christiansen M, et al. Role of mannose-binding lectin deficiency in HIV-1 and schistosoma infections in a rural adult population in Zimbabwe. *PLoS One.* 2015;10: 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0122659
 48. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67: 444–461. doi:10.1086/303004
 49. Da Cruz HLA, Da Silva RC, Segat L, De Carvalho MSZ de MG, Brandão LAC, Guimarães RL, et al. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population. *Infect Genet Evol. Elsevier B.V.;* 2013;19: 323–329. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.002
 50. Sandoval JR, Madsen HO, De Stefano G, Descailleaux-Dulanto J, Velazquez-Reinoso M, ?ique C, et al. Extreme high prevalence of a defective mannose-binding lectin (MBL2) genotype in native South American West Andean populations. *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0108943
 51. Vallinoto ACR, Menezes-Costa MR, Alves AEM, Machado LFA, Azevedo VN, Souza LLB De, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. *Mol Immunol.* 2006;43: 1358–1362.
doi:10.1016/j.molimm.2005.09.001
 52. Vallinoto AC, Muto NA, Alves AE, Machado LF, Azevedo VN, Souza LL, et al. Characterization of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene promoter among human immunodeficiency virus 1 infected subjects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103: 645–649. doi:10.1590/S0074-02762008000700003

53. Catano G, Agan BK, Kulkarni H, Telles V, Marconi VC, Dolan MJ, et al. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *J Infect Dis.* 2008;198: 72–80. doi:10.1086/588712
54. Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol.* 2005;42: 145–152. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.015
55. Eisen S, Dzwonek A, Klein NJ. Mannose-binding lectin in HIV infection. *Future Virol.* Europe PMC Funders; 2008;3: 225–233. doi:10.2217/17460794.3.3.225
56. Teodorof C, Divakar S, Soontornniyomkij B, Achim CL, Kaul M, Singh KK. Intracellular mannose binding lectin mediates subcellular trafficking of HIV-1 gp120 in neurons. *Neurobiol Dis.* 2014;69: 54–64. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.002

Apêndice C – Artigo 2 em inglês

MANNOSE-BINDING LECTIN CONCENTRATIONS IN PEOPLE LIVING WITH HIV/AIDS INFECTED BY HHV-8

Viviane Martha Santos de Moraes¹, Juliana Prado Gonçalves¹, Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2*}

1 Virology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Departament of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence to: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária. P.O. Box: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brasil. E-mail: rcoelholika@gmail.com

Abstract

Mannose-binding lectin (MBL) plays an important role in the innate immune response by activating the complement system via the lectin pathway, and it has been studied in several viral infections; however, the influence of MBL in PLWHA infected with HHV-8 is unknown. The objective of this study was to verify the association of MBL plasma concentrations in HIV/HHV-8 coinfecting and HIV monoinfected patients and to correlate these concentrations with HIV viral load and TCD4 counts in both groups. This was an analytical study of case-controls consisting of PLWHA monitored at the medical outpatient of Infectious and Parasitic Diseases of the clinical hospital in the Federal University of Pernambuco. Plasma concentrations of MBL were obtained by an enzyme immunoassay (ELISA) using a commercial Human Mannose Binding Lectin kit (MyBioSource, Inc.) that was performed according to the manufacturer's guidelines, with values below <100 ng/ml considered deficient. A total of 245 PLWHA samples were analysed; 118 were HIV/HHV-8 coinfecting and 127 were HIV monoinfected; 5.1% (6/118) of the coinfecting patients and 3.2% (4/127) of the monoinfected patients ($p=0.445$) were considered plasma concentration deficient. The median of the plasma concentrations of MBL in the coinfecting patients was 2,803 log₁₀ ng/ml and was 2.959 log₁₀ ng/ml in the monoinfected patients ($p= 0.001$). There was an inverse correlation between the plasma concentrations of MBL and the HIV viral load in both groups, but no correlation with the TCD4 count. Although the plasma concentrations considered deficient in MBL were not associated with HHV-8 infection in PLWHA, the coinfecting patients showed lower MBL concentrations and an inverse correlation with HIV viral load, suggesting that there

may be consumption and reduction of MBL due to opsonization of HIV and HHV-8, leading to the reduction of plasma MBL and non-accumulation in the circulation.

Keywords: HIV/HHV8 coinfection; MBL; inverse correlation; deficient concentrations; human herpesvirus 8.

1. Introduction

The incidence of Kaposi's sarcoma (KS) associated with human herpesvirus 8 (HHV-8) has increased in people living with HIV/AIDS (PLWHA), with a more aggressive clinical course and progression to death (Cahú et al., 2016; Dittmer and Damania, 2016; Mohanna et al., 2005; Paoli and Carbone, 2016; Rohner et al., 2014; Sullivan et al., 2008). KS is still the most common tumour in PLWHA, even when the individuals are treated with antiretroviral therapy (ART) and have an undetectable HIV viral load and CD4 + T cell counts that are above 350 cells/mm³ (Broccolo et al., 2016; Munawwar and Singh, 2016; Pria et al., 2013).

The control of HHV-8, just as in the early stages of the development of KS, is mediated by the innate and adaptive immunity (Aresté and Blackbourn, 2009; Brulois and Jung, 2014; Lee et al., 2012). In this context, mannose-binding lectin (MBL) plays a key role in innate immunity as a standard recognition receptor, binding with a high affinity to the residue patterns of carbohydrates present on the surface of viruses or virus-infected cells, especially when the humoral immunity is not fully functional, such as in childhood or in immunosuppressed or immunocompromised populations (Fujita, 2002; Manuel et al., 2007; Mason and Tarr, 2015). Thus, MBL contributes to the defence of the innate immune system by initiating the activation of the lectin-complement pathway, which promotes opsonophagocytosis, modulates inflammation and induces cellular lysis (Auriti et al., 2017; Martin and Blom, 2016; Zinyama-Gutsire et al., 2015a).

Regarding PLWHA, some studies have shown an association between MBL plasma concentration deficiency and HIV infection or a more rapid disease progression (Egli et al., 2013; Hundt et al., 2000; Tan et al., 2009; Teodorof et al., 2014; Vallinoto et al., 2008), and others found no association with this infection, the HIV viral load or the TCD4 count (Catano et al., 2008; Zinyama-Gutsire et al., 2015a). However, the influence of MBL on HHV-8 infection is not known, but for other herpes viruses, studies suggest that MBL deficiency may be a risk factor for the symptomatic development of human herpesvirus 2 (HHV-2) (Gadjeva et al., 2004) and for cytomegalovirus reactivation (CMV) (Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007).

Although MBL plays an important role in the innate immune response, it is still unknown whether a deficiency in the MBL plasma concentration is associated with HHV-8 infection in PLWHA. In view of the above, the objective of this study was to verify the association of MBL plasma concentrations in HIV/HHV-8 coinfecting and HIV mono-infected patients and correlate the concentration with the HIV viral load and TCD4 counts in both groups.

2. Material and Methods

2.1 Design and study population

This was an analytical study of case-controls, consisting of PLWHA that were monitored at the medical outpatient of Infectious and Parasitic Diseases of the clinical hospital in the Federal University of Pernambuco, based on the research on HHV-8 prevalence in PLWHA performed by Cahú et al. (2016). We excluded PLWHA infected by HBV, HVC, HTLV I/II and those not under ART. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (number: 22428813.5.0000.5208).

2.2 MBL plasma concentrations

The plasma concentrations of MBL were obtained by an enzyme immunoassay (ELISA) using a commercial *Human Mannose Binding Lectin* kit (MyBioSource, Inc.), with a detection threshold of 0.05 ng/ml. The samples were diluted at 1:100, and the protocol for the ELISA was performed following the manufacturer's guidelines. The readings were performed on a spectrophotometer (Thermoplate®) with a wavelength of 450/630 nm. The plasma concentrations were considered deficient when they were <100 ng/ml (Egli et al., 2013; Gadjeva et al., 2004; Zinyama-Gutsire et al., 2015a).

2.3 Statistical analysis

To evaluate the deficiency of the concentrations, we used the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs), and the Mann-Whitney test was used to associate the MBL plasma concentrations in the HIV/HHV-8 coinfecting and HIV mono-infected patients. The Spearman test was used to correlate the plasma MBL concentrations with HIV viral load and CD4 count, and these variables were included in the statistical models as units transformed into log₁₀. For the statistical analyses and the construction of the graphs, we used GraphPad Prism software

version 6.1 (GraphPad Software, USA) and Epi Info version 7.1.5 (CDC, Atlanta, GA, USA). Statistically significant values were indicated by $p < 0.05$.

3. Results

We analysed 245 samples from PLWHA, including 118 HIV/ HHV-8 coinfecting patients, with a mean age of $42.5 (\pm 11.8)$, and 127 patients monoinfected with HIV, with mean age of $42.8 (\pm 10.6)$, and the majority of these patients were males 71% (84/118) and 59% (75/127), respectively. The median TCD4 count was $2.713 \log_{10} \text{ cells/mm}^3$ (1.301-3.224) in the coinfecting patients and $2.736 \log_{10} \text{ cells /mm}^3$ (1.176-3.269) in the monoinfected patients ($p=0.872$). The HIV viral load was detectable in 42% (50/118) of the coinfecting patients and in 44% (56/127) in the monoinfected patients, with a median of $2.057 \log_{10} \text{ copies/ml}$ (1.672-5.539) and $2,363 \log_{10} \text{ copies/ml}$ (1.602-6.273), respectively, with $p=0.595$.

The plasma concentrations were considered deficient in 5.1% (6/118) of the coinfecting patients and in 3.2% (4/127) of the monoinfected patients, with a p value of 0.445 (OR=1.647; IC=0.453-5.989). However, the MBL plasma concentration median were significantly lower in the coinfecting patients, as shown in figure 1.

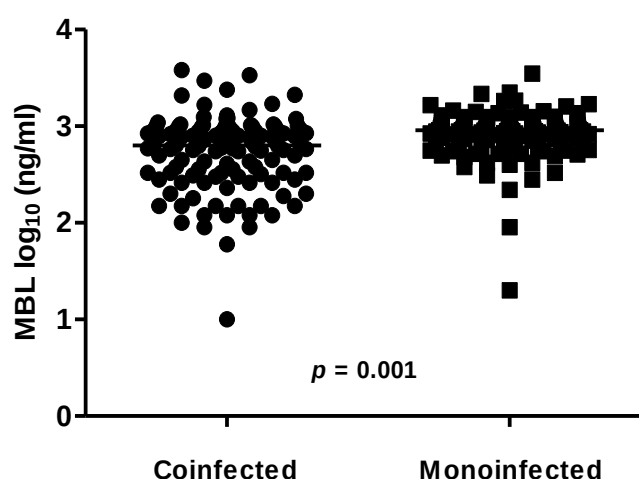


Figure 1: Distribution and median of MBL plasma concentrations in HIV/HHV8 coinfecting and HIV monoinfected patients. The median of the coinfecting patients was $2.803 \log_{10} \text{ ng/ml}$ (1.0-3.581; CI: 2.650-2.792), and in the monoinfected, it was $2.959 \log_{10} \text{ ng/ml}$ (1.301-3.545; CI: 2.877-2.964), which was statistically significant ($p=0.001$) using the Mann-Whitney test.

Table 1 shows the median MBL plasma concentrations according to the clinical variables in the coinfecting and monoinfected patients.

Table 1: Median plasma concentrations of MBL according to HIV viral load and TCD4 count in coinfectd and monoinfected patients.

Variables	Median of MBL ($\log_{10}$ ng/ml)				<i>p</i> -value ¹
	Coinfected	N ²	Monoinfected	N ²	
Detectable HIV viral load	2.752 (1.000- 3.318)	50	2.949 (1.301- 3.545)	56	0.001
Undetectable HIV viral load	2.874 (1.778-3.581)	68	2.961 (1.954-3.348)	71	0.377
TCD4 > 350	2.823 (1.778-3.581)	98	2.964 (1.954-3.545)	115	0.001
TCD4 ≤ 3500	2.586 (1.000- 3.167)	20	2.926 (1.301- 3.093)	12	0.034

¹ *p*-value for the Mann-Whitney test; ² N=sample size.

Among the coinfectd and monoinfected patients, there was a negative correlation between the HIV viral load and the MBL plasma concentration, as shown in figure 2.

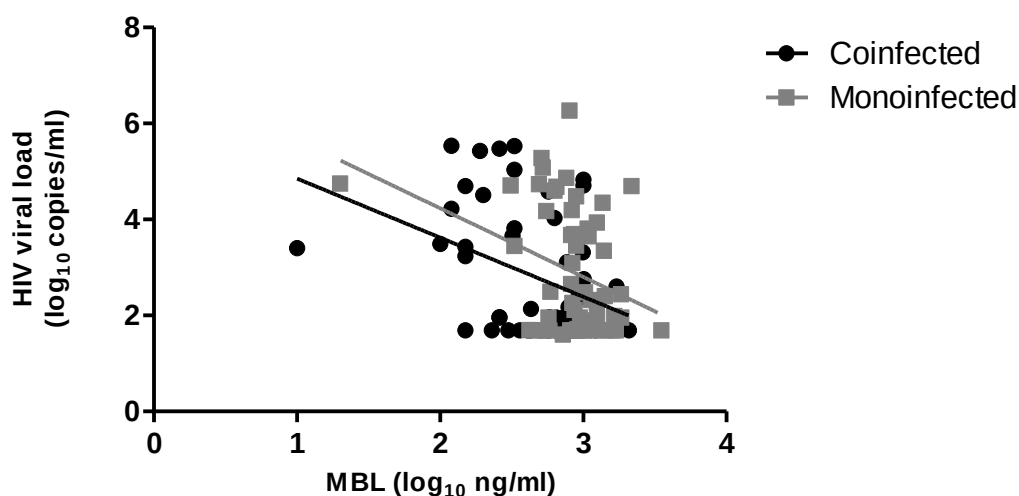


Figure 2: Spearman correlation between HIV viral load and MBL plasma concentration in HIV/HHV-8 coinfectd (n = 50; *p* = 0.018; *r* = -0.333) and HIV monoinfected patients (n = 56; *p* = 0.031; *r* = -0.289).

Figure 3 shows the Spearman correlation between the TCD4 count and the MBL plasma concentration in the HIV/HHV-8 coinfectd and HIV monoinfected patients.

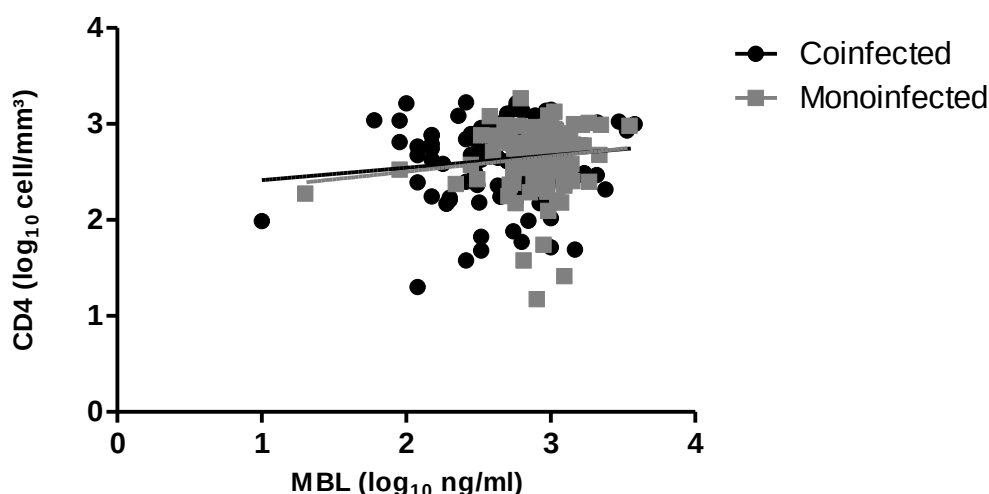


Figure 2: Spearman correlation between the TCD4 counts and MBL plasma concentration in the HIV/HHV-8 coinfectd ($n = 118$; $p = 0.346$; $r = 0.087$) and HIV monoinfected patients ($n = 127$; $p = 0.132$; $r = -0.134$).

4. Discussion

MBL plays an important role in the innate immune response by activating the complement system via the lectin pathway in an antibody-independent mechanism (Martin and Blom, 2016; Mason and Tarr, 2015; Vallinoto et al., 2008). This protein has been studied in several infections (Figueiredo et al., 2016; Guimaraes et al., 2008; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Rashidi et al., 2016; Zinyama-Gutsire et al., 2015b); however, this is the first study to evaluate the plasma concentrations of functional MBL in PLWHA coinfectd with HHV-8 and correlate the concentrations with HIV viral load and TCD4 counts.

The study population did not differ in age and sex when compared to other studies evaluating PLWHA infected with HHV-8 (Batista et al., 2009; Broccolo et al., 2016; Cahú et al., 2016; Hesamizadeh et al., 2016; Rohner et al., 2016). Similarly, the median HIV viral load and TCD4 count did not show a statistically significant difference between the HIV/HHV-8 coinfectd and the HIV monoinfected patients, corroborating works that also evaluated these clinical characteristics (Batista et al., 2009; Hesamizadeh et al., 2016; Tozetto-Mendoza et al., 2016).

It is still unknown how MBL aids in the control or elimination of HHV-8 infection; however, in relation to HIV infection, studies show that MBL binds to HIV gp120 glycoprotein, helping to clear this virus through the activation of the complement system (Botos and Wlodawer, 2005; da Silva et al., 2011; Nielsen et al., 1995; Teodorof et al., 2014; Ying et al., 2004). In addition, when MBL is bound to HIV it can also be eliminated from the circulation

by the C1q receptor, which has a structural and functional affinity for MBL (Haurum et al., 1993; Malhotra et al., 1990; Zinyama-Gutsire et al., 2015b), suggesting the consumption and reduction of MBL during HIV infection (Kwakkel-van Erp et al., 2011; Zinyama-Gutsire et al., 2015b)

Studies use different cut-off points, including <100, <300 and <500 ng/ml, to define MBL deficient plasma concentrations (Gadjeva et al., 2004; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007; Zinyama-Gutsire et al., 2015a, 2015b). In our study, we defined deficient concentrations as <100 ng/ml and found no association with HHV-8 infection in PLWHA, the HIV viral load or the TCD4 count; however, the median of these concentrations was significantly lower in the HIV/HHV-8 coinfecting patients compared to the HIV monoinfected patients. However, the median concentrations found in both groups were higher than the values considered deficient by these authors (Egli et al., 2013; Gadjeva et al., 2004; Kwakkel-van Erp et al., 2011; Manuel et al., 2007; Zinyama-Gutsire et al., 2015a, 2015b). A possible explanation for the lower concentrations of MBL in coinfecting patients would be the consumption and reduction of this protein, involving the opsonization of HIV and HHV-8, leading to the reduction of plasma MBL and its non-accumulation in the circulation (Kwakkel-van Erp et al., 2011).

On the other hand, considering the cut-off point established by Manuel et al (2007) to characterize the deficient plasma concentration of MBL (<500 ng/ml), in our study, four coinfecting patients who developed KS showed a deficient MBL concentration 2,519 log₁₀ ng/ml (data not shown). In relation to TCD4, the counts above or below 350 cells/mm³ did not influence the MBL plasma concentrations, because the medians remained smaller in the coinfecting patients in relation to the monoinfected patients. However, considering the use of a continuous numerical scale, it was possible to establish an inverse correlation between the plasma MBL concentrations and the HIV viral load in the coinfecting and monoinfected patients, suggesting that MBL plasma concentrations might also modulate coinfection.

Other factors may influence the MBL concentration, such as polymorphisms in the *MBL2* gene, resulting in defects in the polymerization of the molecule, leading to functional deficiency and protein expression and reducing the activation capacity of the complement system (Eddie et al., 2009; Halla et al., 2010; Li et al., 2013). Furthermore, the drugs used in the treatment of infections, such as those of ART (Araújo-Mariz et al., 2016; Solomon et al., 2017; Sonderup and Wainwright, 2017), are drugs that are metabolized in the liver and may affect the concentration of MBL because this protein is mainly synthesized in the liver (Kwakkel-van Erp et al., 2011).

Our research has some limitations, such as the investigation of the latent or latent cycle and the quantification of the HHV-8 viral load. We suggest that future prospective studies evaluate these variables by associating or correlating them with plasma MBL concentrations in HIV/HHV-8 coinfecting patients. Therefore, although the plasma concentrations considered deficient of MBL were not associated with HHV-8 infection in PLWHA, the coinfecting patients had lower concentrations of MBL and an inverse correlation with the HIV viral load, suggesting that MBL might also be modulating HIV/HHV-8 coinfection.

Acknowledgements

The authors thank all patients and technical support from the virology laboratory of the tropical medicine institute of the University of São Paulo for the realization of HHV-8 serology.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Araújo-Mariz, C., Lopes, E.P., Acioli-Santos, B., Maruza, M., Montarroyos, U.R., De Ximenes, R.A.A., Lacerda, H.R., Miranda-Filho, D.D.B., De Militão De Albuquerque, M.F.P., 2016. Hepatotoxicity during treatment for tuberculosis in people living with HIV/AIDS. *PLoS One* 11, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0157725
- Aresté, C., Blackbourn, D.J., 2009. Modulation of the immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Trends Microbiol.* 17, 119–129. doi:10.1016/j.tim.2008.12.001
- Auriti, C., Prencipe, G., Moriondo, M., Bersani, I., Bertaina, C., Mond??, V., Inglese, R., 2017. Mannose-Binding Lectin: Biologic Characteristics and Role in the Susceptibility to Infections and Ischemia-Reperfusion Related Injury in Critically Ill Neonates. *J. Immunol. Res.* 2017. doi:10.1155/2017/7045630
- Batista, M.D., Ferreira, S., Sauer, M.M., Tomiyama, H., Giret, M.T.M., Pannuti, C.S., Diaz, R.S., Sabino, E.C., Kallas, E.G., 2009. High human herpesvirus 8 (HHV-8) prevalence, clinical correlates and high incidence among recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 4, 2–6. doi:10.1371/journal.pone.0005613

- Botos, I., Wlodawer, A., 2005. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2004.05.001
- Broccolo, F., Din, C.T., Viganò, M.G., Rutigliano, T., Esposito, S., Lusso, P., Tambussi, G., Malnati, M.S., 2016. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Virol.* 78, 47–52. doi:10.1016/j.jcv.2016.02.019
- Brulois, K., Jung, J.U., 2014. Interplay between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and the innate immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 597–609. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.001
- Cahú, G.G. de O.M., Morais, V.M.S., Lopes, T.R.R., da Silva, D.M., Tozetto-Mendoza, T.R., Pannuti, C.S., Cunha Duarte Coêlho, M.R., 2016. Prevalence of human herpesvirus 8 infection in people living with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. *J. Med. Virol.* 88, 2016–2020. doi:10.1002/jmv.24550
- Catano, G., Agan, B.K., Kulkarni, H., Telles, V., Marconi, V.C., Dolan, M.J., Ahuja, S.K., 2008. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *J. Infect. Dis.* 198, 72–80. doi:10.1086/588712
- da Silva, G.K., Guimarães, R., Mattevi, V.S., Lazzaretti, R.K., Sprinz, E., Kuhmmer, R., Brandão, L., Crovella, S., Chies, J.A.B., 2011. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS* 25, 411–8. doi:10.1097/QAD.0b013e328342fef1
- Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. Kaposi sarcoma – associated herpesvirus : immunobiology , oncogenesis , and therapy 126, 3165–3175. doi:10.1172/JCI84418.KSHV
- Eddie, W.K., Kazue, I., Ezekowitz, T.R.A., Stuart, L.M., Ip, W.K.E., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Alan, R., 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol. Rev.* 230, 9–21. doi:IMR789 [pii]r10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x
- Egli, A., Schäfer, J., Osthoff, M., Thiel, S., Mikkelsen, C., Rauch, A., Hirsch, H.H., Bucher, H.C., Young, J., Jensenius, J.C., Battegay, M., Trendelenburg, M., 2013. Low Levels of Mannan-Binding Lectin or Ficolins Are Not Associated with an Increased Risk of Cytomegalovirus Disease in HIV-Infected Patients. *PLoS One* 8.

doi:10.1371/journal.pone.0051983

- Figueiredo, G.G., Cezar, R.D., Freire, N.M., Teixeira, V.G., Baptista, P., Cordeiro, M., Carmo, R.F., Vasconcelos, L.R.S., Moura, P., 2016. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. *Hum. Immunol.* 77, 571–575.
doi:10.1016/j.humimm.2016.05.006
- Fujita, T., 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 346–53. doi:10.1038/nri800
- Gadjeva, M., Paludan, S.R., Thiel, S., Slavov, V., Ruseva, M., Eriksson, K., Löwhagen, G.B., Shi, L., Takahashi, K., Ezekowitz, A., Jensenius, J.C., 2004. Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 304–311.
doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02616.x
- Guimaraes, V., Guimaraes, R., Brandao, L., Baldez da Silva, M.F.P.T., Milanese, M., Segat, L., Castelletti, H., Bruneska, D., de Lima Filho, J.L., de Freitas, A.C., Arraes, L.C., Rocha, C., Crovella, S., 2008. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum. Immunol.* 69, 273–278. doi:10.1016/j.humimm.2008.03.002
- Halla, M.C., do Carmo, R.F., Silva Vasconcelos, L.R., Pereira, L.B., Moura, P., de Siqueira, E.R.F., Pereira, L.M.M.B., de Mendonça Cavalcanti, M. do S., 2010. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variants alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. *Hum. Immunol.* 71, 883–887.
doi:10.1016/j.humimm.2010.05.021
- Haurum, J.S., Thiel, S., Jones, I.M., Fischer, P.B., Laursen, S.B., Jensenius, J.C., 1993. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS* 7, 1307–13.
- Hesamizadeh, K., Keyvani, H., Bokharaei-Salim, F., Monavari, S.H., Esghaei, M., Jahanbakhsh Sefidi, F., 2016. Molecular Epidemiology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus, and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran, 2014. *Iran. Red Crescent Med. J.* 18, e32603. doi:10.5812/ircmj.32603

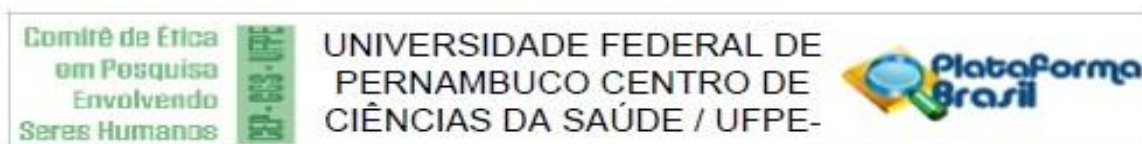
- Hundt, M., Heiken, H., Schmidt, R.E., 2000. Low Mannose-Binding Lectin Serum Concentrations in HIV Long-Term Nonprogressors? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1927–1927. doi:10.1089/08892220050195892
- Kwakkel-van Erp, J.M., Paantjens, A.W.M., van Kessel, D.A., Grutters, J.C., van den Bosch, J.M.M., van de Graaf, E.A., Otten, H.G., 2011. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 165, 410–416. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04436.x
- Lee, H.R., Brulois, K., Wong, L.Y., Jung, J.U., 2012. Modulation of immune system by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: Lessons from viral evasion strategies. *Front. Microbiol.* 3, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2012.00044
- Li, H., Fu, W.P., Hong, Z.H., 2013. Replication study in Chinese Han population and meta-analysis supports association between the MBL2 gene polymorphism and HIV-1 infection. *Infect. Genet. Evol.* 20, 163–170. doi:10.1016/j.meegid.2013.09.010
- Malhotra, R., Sim, R.B., Reid, K.B.M., 1990. Interaction of C1q, and other proteins containing collagen-like domains, with the C1q receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 18.
- Manuel, O., Pascual, M., Trendelenburg, M., Meylan, P.R., 2007. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 83, 359–362. doi:10.1097/01.tp.0000251721.90688.c2
- Martin, M., Blom, A.M., 2016. Complement in removal of the dead ??? balancing inflammation. *Immunol. Rev.* 274, 218–232. doi:10.1111/imr.12462
- Mason, C.P., Tarr, A.W., 2015. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 20, 2229–2271. doi:10.3390/molecules20022229
- Mohanna, S., Ferrufino, J.C., Sanchez, J., Bravo, F., Gotuzzo, E., 2005. Epidemiological and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma in Peru. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 435–441. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.041
- Munawwar, A., Singh, S., 2016. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. *J. Lab. Physicians* 8, 5. doi:10.4103/0974-2727.176228

- Nielsen, S.L., Andersen, P.L., Koch, C., Jensenius, J.C., Thiel, S., 1995. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 219–22.
- Paoli, P.D.E., Carbone, A., 2016. Kaposi ' s Sarcoma Herpesvirus : twenty years after its discovery. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1288–1294. doi:10.1128/JVI.00283-14
- Pria, A.D., Hayward, K., Bower, M., 2013. Do we still need chemotherapy for AIDS-associated Kaposi's sarcoma? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 13, 203–209. doi:10.1586/era.12.179
- Rashidi, E., Fazlollahi, M.R., Zahedifard, S., Talebzadeh, A., Kazemnejad, A., Saghafi, S., Pourpak, Z., 2016. Mannose-binding lectin deficiency in patients with a history of recurrent infections. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* 15, 69–74.
- Rohner, E., Wyss, N., Heg, Z., Faralli, Z., Mbulaiteye, S.M., Novak, U., Zwahlen, M., Egger, M., Bohlius, J., 2016. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 138, 45–54. doi:10.1002/ijc.29687
- Rohner, E., Wyss, N., Trelle, S., Mbulaiteye, S.M., Egger, M., Novak, U., Zwahlen, M., Bohlius, J., 2014. HHV-8 seroprevalence : a global view 1–7.
- Solomon, I.H., De Girolami, U., Chettimada, S., Misra, V., Singer, E.J., Gabuzda, D., 2017. Brain and liver pathology, amyloid deposition, and interferon responses among older HIV-positive patients in the late HAART era. *BMC Infect. Dis.* 17, 151. doi:10.1186/s12879-017-2246-7
- Sonderup, M.W., Wainwright, H.C., 2017. Human Immunodeficiency Virus Infection, Antiretroviral Therapy, and Liver Pathology. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46, 327–343. doi:10.1016/j.gtc.2017.01.007
- Sullivan, R.J., Pantanowitz, L., Casper, C., Stebbing, J., Dezube, B.J., 2008. HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1209–15. doi:10.1086/592298
- Tan, Y., Liu, L., Luo, P., Wang, A., Jia, T., Shen, X., Wang, M., Zhang, S., 2009. Association

- between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population. *Mol. Immunol.* 47, 632–638. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.020
- Teodorof, C., Divakar, S., Soontornniyomkij, B., Achim, C.L., Kaul, M., Singh, K.K., 2014. Intracellular mannose binding lectin mediates subcellular trafficking of HIV-1 gp120 in neurons. *Neurobiol. Dis.* 69, 54–64. doi:10.1016/j.nbd.2014.05.002
- Tozetto-Mendoza, T.R., Ibrahim, K.Y., Tateno, A.F., de Oliveira, C.M., Sumita, L.M., Sanchez, M.C.A., Luna, E.J., Pierrotti, L.C., Drexler, J.F., Braz-Silva, P.H., Pannuti, C.S., Romano, C.M., 2016. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi sarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 95, e5291. doi:10.1097/MD.00000000000005291
- Vallinoto, A.C., Muto, N.A., Alves, A.E., Machado, L.F., Azevedo, V.N., Souza, L.L., Ishak, M.O., Ishak, R., 2008. Characterization of polymorphisms in the mannose-binding lectin gene promoter among human immunodeficiency virus 1 infected subjects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 645–649. doi:10.1590/S0074-02762008000700003
- Ying, H., Ji, X., Hart, M.L., Gupta, K., Saifuddin, M., Zariffard, M.R., Spear, G.T., 2004. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 327–335. doi:10.1089/088922204322996563
- Zinyama-Gutsire, R., Chasela, C., Kallestrup, P., Rusakaniko, S., Christiansen, M., Ngara, B., Gomo, E., Ullum, H., Erikstrup, C., Madsen, H.O., Stray-Pedersen, B., Garred, P., Mduluz, T., 2015a. HIV-1 Disease Progression and Survival in an Adult Population in Zimbabwe: Is There an Effect of the Mannose Binding Lectin Deficiency? *Omi. A J. Integr. Biol.* 19, 542–552. doi:10.1089/omi.2015.0047
- Zinyama-Gutsire, R., Chasela, C., Madsen, H.O., Rusakaniko, S., Kallestrup, P., Christiansen, M., Gomo, E., Ullum, H., Erikstrup, C., Munyati, S., Kurewa, E.N., Stray-Pedersen, B., Garred, P., Mduluz, T., 2015b. Role of mannose-binding lectin deficiency in HIV-1 and schistosoma infections in a rural adult population in Zimbabwe. *PLoS One* 10, 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0122659

ANEXO

Anexo A - Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, GENÉTICOS, IMUNOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO HHV-8 EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS

Pesquisador: GEORGEA GERTRUDES DE OLIVEIRA MENDES CAHU

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22428813.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 449.182

Data da Relatoria: 06/11/2013

Apresentação do Projeto:

O herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) é o agente causal do sarcoma de Kaposi (SK) que ocorre principalmente em pacientes com AIDS. A prevalência do HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids até o ano de 2002, variou de 13,9% a 25,9%, em dois estados do Brasil (SP e PA).

Este é um estudo transversal analítico que será realizado em 100 pacientes com HIV/aids de ambos os sexos que nunca receberam TARV (terapia antirretroviral) ou com até um ano de TARV acompanhados no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE).

Trata-se de projeto de pesquisa para a obtenção de grau de mestre e orientada pela Profa Draa. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho financiado pelo edital do PQ-Multiusuário 2012 e PROPESQ- UFPE.

Objetivo da Pesquisa:

Estimar a prevalência, a frequência dos genótipos virais e descrever os fatores de risco associados à infecção pelo HHV-8 em pessoas vivendo com HIV/aids que nunca receberam TARV ou com até um ano de TARV, acompanhadas em serviço de referência no Recife/PE, de novembro de 2013 a agosto de 2014.

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 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



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



Continuação do Parecer: 449.182

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa altamente relevante para o conhecimento da população local incetada pelo vírus da imunodeficiência adquirida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo a aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

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 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Anexo B – Comprovante de submissão do artigo 1

From: **PLOS ONE** <em@editorialmanager.com>

Date: 2017-07-07 12:23 GMT-03:00

Subject: Submission Confirmation for PONE-D-17-25661 - [EMID:1f8752adde2ff272]

To: Maria Rosângela Coêlho <rcoelholika@gmail.com>

PONE-D-17-25661

MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to HHV-8 infection in people living with HIV/AIDS

PLOS ONE

Dear Dr Coêlho,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to HHV-8 infection in people living with HIV/AIDS' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-17-25661.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>. If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact plosone@plos.org.

We'd like to learn more about your experience with peer review. For journals that make them available, do you ever read the peer review history that accompanies a published journal article?

Yes, I have read publicly posted peer reviews.

<http://surveys.plos.org/s3/pONEAuReadPosted?answer=YesRead>

I am familiar with publicly posted peer reviews, but have not read them.

<http://surveys.plos.org/s3/pONEAuReadPosted?answer=YesFamiliar>

I have not seen publicly posted peer reviews before.

<http://surveys.plos.org/s3/pONEAuReadPosted?answer=NeverSeen>

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

Anexo C – Comprovante de submissão do artigo 2

From: **Acta Tropica** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: 2017-09-01 12:14 GMT-03:00

Subject: Successfully received: submission MANNOSE-BINDING LECTIN CONCENTRATIONS IN PEOPLE LIVING WITH HIV/AIDS INFECTED BY HHV-8 for Acta Tropica

To: rcoelholika@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: ACTROP_2017_888

Title: MANNOSE-BINDING LECTIN CONCENTRATIONS IN PEOPLE LIVING WITH HIV/AIDS INFECTED BY HHV-8

Journal: Acta Tropica

Dear Professor Coêlho,

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

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsx?JRNL_ACR=ACTROP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Acta Tropica