



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Thiago Franco Nasser

**DETECÇÃO DO *TORQUE TENO VIRUS* (TTV)
EM PACIENTES INFECTADOS E INDIVÍDUOS
NÃO INFECTADOS EXPOSTOS AO HIV NA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

LONDRINA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
EXPERIMENTAL

**DETECÇÃO DO *TORQUE TENO VIRUS* (TTV)
EM PACIENTES INFECTADOS E INDIVÍDUOS
NÃO INFECTADOS EXPOSTOS AO HIV NA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ**

THIAGO FRANCO NASSER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual
de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2007

THIAGO FRANCO NASSER

**DETECÇÃO DO *TORQUE TENO VIRUS* (TTV) EM
PACIENTES INFECTADOS E INDIVÍDUOS NÃO
INFECTADOS EXPOSTOS AO HIV NA REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª Dr^ª. Sueli Donizete Borelli
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, ____ de _____ de 2007.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos".

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus queridos pais, Roberto e
Glauce, pelo apoio, incentivo e
investimento em minha formação.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, pela dedicação, pela amizade, pelo exemplo, pela orientação e visão científica a qual foi de fundamental importância para minha formação acadêmica.

À professora Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche, pela importante colaboração sem a qual este trabalho não poderia ser concluído.

Ao professor Dr Emerson José Venâncio, pelas relevantes contribuições que enriqueceram este trabalho.

A professora Dr^a Sueli Donizete Borelli, pela importante participação na fase final deste trabalho.

À Professora Ms Karen Brajão de Oliveira, pela ajuda na realização dos experimentos e importante auxílio na parte final deste trabalho.

Às Professoras Dr^a Maria Helena P. Fungaro e Dr^a Marcia Cristina Furlanetto, pela amizade, pelos alegres momentos e pela disponibilização dos aparelhos de seus laboratórios.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e motivação durante todas as fases e dificuldades encontradas durante este trabalho.

A todos os professores do mestrado, pelo grande aprendizado que será de fundamental importância por toda minha vida.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos amigos de laboratório, Jaqueline, Juliana, Mateus, Paty, July, Roberto, pela ajuda na realização dos experimentos, pela alegria e pela convivência durante estes anos.

Aos meus amigos do laboratório e veteranos do mestrado, Kadu, Marla e Helen, pelo apoio, pela amigável convivência, pelo incentivo e motivação.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, em especial o Guga, Dani, Fran, Yuldi, Lara, Marcelo, pela alegre convivência.

A minha namorada Elisa Benassi, pelo companheirismo, dedicação, apoio e por estar sempre presente.

A todos meus amigos de Londrina, Campestre e Ribeirão Preto, em especial meus companheiros de república Diego e Ricardo, por sempre estarem presentes nos momentos difíceis e pela vibração nos momentos felizes.

Ao meu irmão Tchakerian e meus familiares por sempre terem torcido pelo meu sucesso.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

NASSER, Thiago F. **DETECÇÃO DO TORQUE TENO VIRUS (TTV) EM PACIENTES INFECTADOS E INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS EXPOSTOS AO HIV NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.** 2007 Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental) Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Angelica Ehara Watanabe

RESUMO

O vírus TT (TTV) recentemente proposto por taxonomistas como *Torque Teno vírus* foi inicialmente identificado em pacientes com elevados níveis de alanina aminotransferase (ALT), porém negativos para hepatites de A a G, entretanto o papel patogênico do TTV ainda não está elucidado. Indivíduos infectados com HIV constituem um grupo com maior predisposição a co-infecções diversas, entretanto, pouco se sabe sobre a infecção do TTV nesses pacientes e sua possível influência na patogênese da infecção pelo HIV. Inicialmente foi comparada a presença do TTV, através de PCR-nested, entre pacientes HIV relacionados e doadores saudáveis. Foi verificado que houve predominância deste vírus nos indivíduos expostos (grupo de risco) (21/100) quando comparados com os doadores saudáveis (6/100) [ODDS RATIO = 4,16 (IC 95% 1,60 – 10,83)]. As amostras positivas para o TTV foram seqüenciadas e comparadas com o banco de dados do NCBI-NIH. As análises demonstraram que o *amplicon* obtido é compatível com as seqüências cadastradas no *GenBank*. Portanto, foi investigada a presença do TTV em relação a contagem de células CD4⁺, CD8⁺ em indivíduos expostos ao HIV (G1), pacientes HIV positivos assintomáticos (G2) e pacientes HIV positivos sintomáticos (G3). Também foi verificado a influência do TTV na carga viral dos pacientes infectados pelo HIV. Em relação a contagem de células CD4⁺ e CD8⁺ entre o grupo de indivíduos expostos ao HIV e os grupos HIV positivos com e sem sintomas, não houve diferença estatisticamente significante quanto à presença do TTV. Entre os grupos HIV positivos sintomáticos e assintomáticos não houve diferença estatística em relação à carga viral na presença ou ausência do TTV, porém, o grupo de pacientes sintomáticos na presença do TTV apresentou menor carga viral. Portanto é possível que TTV passa a tender a uma diminuição da carga viral independente da concentração de células T CD4⁺, porém, a significância clínica do TTV em associação ao HIV permanece a ser elucidada.

Palavras chave: TTV, carga viral, células CD4⁺, células CD8⁺.

NASSER, Thiago F. **Detection of *Torque Teno Virus* (TTV) in patients infected and uninfected individuals exposed to HIV in North Parana Region.** 2007 Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental) Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The TT virus (TTV), recently proposed as Torque Teno Virus by taxonomists, was first described in patients with elevated alanine amino transferase (ALT) levels with negative serology to hepatitis A – G, however the TTV pathogenicity is still unknown. HIV infected patients constitute a group with wither predisposition to co-infections, the clinical significance of TTV in association with HIV remains to be clarified. Initially TTV presence was compared, through nested PCR, between HIV related individuals and healthy blood donors. It was verified TTV predominance in HIV-exposed individuals (21/100) when compared to blood donors (6/100) [ODDS RATIO = 4.16 (95%CI 1.60 – 10.83)]. The TTV positive samples were sequenced and compared with data in the NCBI-NIH database. The analysis demonstrated that the amplified fragment is compatible with TTV sequences deposited in GenBank. Therefore TTV presence was investigated regarding CD4 and CD8 counts in HIV exposed uninfected individuals (G1), asymptomatic HIV infected subjects (G2) and symptomatic HIV infected subjects (G3). It was also verified TTV presence influence in HIV infected patients viral load. There was no significant difference in CD4 and CD8 counts among HIV exposed but uninfected individuals and symptomatic and asymptomatic HIV infected subjects regarding TTV presence. Between symptomatic and asymptomatic HIV infected individuals there was no HIV viral load difference in TTV presence or absence. In the symptomatic HIV infected subjects group, the TTV positive patients presented lower HIV viral load. Therefore it is possible that TTV tends to induce low viral load independent of CD4+ T cell count, however the clinical significance of TTV in association with HIV remains to be clarified.

Keywords: TTV, Viral load, CD4 cells, CD8 cells.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Organização genômica do TTV.....	19
FIGURA 2-	Concentração de células T CD4 ⁺	38
FIGURA 3-	Concentração de células T CD8 ⁺	39
FIGURA 4-	Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (Carga viral).....	40
FIGURA 5-	Análise da Integridade do DNA.....	41
FIGURA 6-	Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos doadores saudáveis de sangue (DS).....	42
FIGURA 7-	Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1) gel 1.....	42
FIGURA 8-	Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1) gel 2.....	43
FIGURA 9-	Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos infectados pelo HIV-1, assintomaticos (G-2).....	43
FIGURA 10-	Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos infectados pelo HIV-1, sintomáticos (G-3).....	44
FIGURA 11-	Detecção do TT vírus através da PCR nos diferentes grupos.....	45
FIGURA 12-	Eletroferograma do produto da PCR <i>nested</i> do TTV.....	45
FIGURA 13-	Concentração de células T CD4 ⁺ de acordo com a presença ou ausência do TTV.....	47
FIGURA 14-	Concentração de células T CD8 ⁺ de acordo com a presença ou ausência do TTV.....	48
FIGURA 15-	Níveis plasmáticos do RNA do HIV-1 (Carga viral).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reagentes utilizados para a PCR TTV.....	33
Tabela 2- Reagentes utilizados para reação de sequenciamento.....	35
Tabela 3- Condições da reação de sequenciamento.....	35
Tabela 4- Características demográficas dos grupos independentes da presença do TTV.....	37
Tabela 5- Características demográficas quanto a presença ou ausência do TTV.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina Amino Transferase
Anti-HIV-1	Anticorpos anti-HIV-1
Anti-TTV	Anticorpos anti-TTV
CD4	Marcador de superfície celular - 4
CD8	Marcador de superfície celular - 8
CDC	<i>Center for Disease Control and prevention</i>
CsCl	Cloreto de Césio
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodiaminoteracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
gp120	Glicoproteína de 120kD
HCl	Acido Clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
LACEN	Laboratório Central
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biothechnology Information</i>
O.D.	<i>Odds Ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucléico

RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase Reversa
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
TTV	<i>Torque Teno Virus</i>
UDI	Usuários de Drogas Intravenosas
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1- Introdução.....	16
1.1- Aspectos Gerais.....	16
1.2- Aspectos Moleculares.....	18
1.3- Aspectos Patológicos.....	20
1.4- Aspectos Imunológicos.....	21
1.5- HIV-1 e AIDS.....	22
2- Justificativa.....	25
3- Objetivos.....	26
3.1- Geral.....	26
3.2- Específicos.....	26
4- Materiais e Métodos.....	28
4.1- Ética.....	28
4.2- Populações.....	28
4.3- Determinação de Anticorpos Anti-HIV-1.....	29
4.4- Contagem de Células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	30
4.5- Níveis Plasmáticos de RNA do Hiv-1 (Carga Viral).....	31
4.6- Obtenção do DNA.....	31
4.7- Detecção Qualitativa do TTV.....	32
4.8- Sequenciamento.....	34
4.9- Análise Estatística.....	36
5- Resultados.....	37
5.1- Características Demográficas.....	37
5.2- Análise das Células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	38
5.3- Análise dos Níveis Plasmáticos de RNA do HIV-1 (Carga Viral).....	40
5.4- Análise da Integridade do DNA.....	40
5.5- Detecção Qualitativa do TTV.....	41
5.6- Sequenciamento.....	45
5.7- Características Demográficas dos Grupos Quanto a Presença ou Ausência do TTV.....	46
5.8- Influência do TTV Vírus na Concentração de Células T CD4 ⁺ T CD8 ⁺ e Carga Viral.....	46

5.8.1- Influência da Infecção pelo TTV Vírus na Contagem de Células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	47
5.8.2- Influência da Infecção pelo TTV Vírus na Carga Viral do HIV-1.....	48
6- Discussão.....	50
7- Conclusão.....	63
Referências Bibliográficas.....	64
Anexos.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O *Torque Teno Vírus* (TTV) foi inicialmente identificado por Nishizawa *et al.* em 1997, em pacientes com elevados níveis de alanina aminotransferase (ALT), porém negativos para hepatites de A a G. Esse vírus tem seu nome associado às iniciais do primeiro paciente investigado pelo grupo de Nishizawa (paciente TT), contudo, essas iniciais também podem designar *transfusion-transmitted vírus* (Bendinelli *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 1997) ou ainda, como foi recentemente proposto por taxonomistas, *Torque Teno vírus* (Abraham, 2005). Desde sua descoberta, muitos trabalhos têm sido publicados, descrevendo a prevalência do TTV em doenças hepáticas, mas nenhuma relação concreta foi obtida (MacDonald *et al.*, 1999; Biagini *et al.*, 1999).

A infecção pelo TTV é altamente difundida pelo mundo, embora com consideráveis variações em diferentes países e em diferentes investigações na mesma região. De uma forma geral, a média de prevalência tende a ser moderada nos Estados Unidos e no Nordeste da Europa, intermediário na Ásia e norte na África e na América do Sul, inclusive no Brasil (Lyra *et al.*, 2005; Bendinelli *et al.*, 2001).

O TTV é um vírus DNA, que inicialmente foi considerado próximo da família dos circovírus (Okamoto *et al.*, 1998b), contudo, em virtude de diferenças encontradas, foi classificado como o único vírus membro de uma nova família, *circinoviridae* (Miyata *et al.*, 1999), *paracircoviridae* (Takahashi *et al.*, 2000) ou família TTV por diferentes grupos de pesquisadores (Tanaka *et al.*, 2001). Isolados do TTV têm uma variabilidade grande em suas seqüências genômicas (Khudyakov *et al.*, 2000; Muljono *et al.*, 2001) e diversas tentativas

têm sido feitas para a classificação e identificação dos genótipos. Muljono et al., (2001) classificaram o TTV em 23 genótipos diferentes com seqüência divergente em mais de 30% um dos outros ou em quatro grupos filogenéticos principais (Tanaka et al., 2001; Muljono et al., 2001), em contraste Irshad et al. (2006) relata o genoma do TTV como sendo heterogêneo e revela a existência de seis diferentes genótipos e diversos subtipos.

A história natural do TTV é mal compreendida. A transmissão provavelmente ocorre parenteralmente, transplacentariamente ou ainda pela via oral-fecal (Okamoto et al., 1998a; Kanda et al., 1999; Morrica et al., 2000). Estudos longitudinais têm mostrado que o TTV geralmente persiste por prolongados períodos ou mesmo indefinidamente no plasma de indivíduos infectados, embora casos de infecções limitadas têm sido relatados (Lefrere et al., 2000; Matsumoto et al., 1999; Oguchi et al., 1999, Takayama., 1999; Yuki et al., 1999).

Os tratamentos virucidas conhecidos por inativarem os vírus envelopados, como solvente-detergente e aquecimento a seco a 65°C/96 horas parecem ser pouco efetivos na destruição da infectividade por TTV e sua estrutura viral sugere que este vírus possa ser pelo menos tão estável quanto os parvovírus (Berns, 1996).

As dificuldades para o estudo aprofundado desse novo vírus são inúmeras. Já existem relatos da transfecção do TTV em chimpanzés e macacos *rhesus* (Luo et al., 2000; Mushahwar et al., 1999; Okamoto et al., 1998a). Porém não há evidências sobre transfecção em mamíferos menores, devido a grande dificuldade de se obter a replicação deste vírus em cultura de tecido (Maggi et al., 2001).

Apesar de pouco conhecimento sobre as propriedades biológicas desse vírus, com o advento do seqüenciamento, muito já pode ser elucidado com relação às suas propriedades moleculares.

1.2 ASPECTOS MOLECULARES

O TTV é um vírus comum nos seres humanos com prevalência elevada na população em geral (Takahashi et al., 2000; Niel et al., 1999). Seu genoma foi seqüenciado por Okamoto et al. (1998b) quase que inteiramente no isolado TA278 que abrange 3739 nucleotídeos e foi acreditado temporariamente ser um DNA linear. Entretanto, estudos posteriores (Mushahwar et al., 1999) com o isolado GHI e o isolado TA 278 (Miyata et al., 1999), identificaram uma região faltante rica em GC de aproximadamente 100 nucleotídeos, que determinaram o genoma do TTV como um DNA fechado circular com um comprimento de 3852 nucleotídeos e um tamanho de partícula de 30-50 nanômetro. Assim, o TTV é um vírus não envelopado cujo genoma consiste em uma molécula simples fita, circular de DNA, com polaridade negativa e um comprimento de aproximadamente 3.8 kb (Mushahwar et al., 1999). TTV tem uma densidade de 1.31-1.34 g/mL em CsCl (Mushahwar et al., 1999; Miyata et al., 1999). O genoma do TTV tem duas ou três possíveis *Open Reading Frame* (ORFs) capazes de codificar 770 aa (ORF1), 202 aa (ORF2) e 105 aa (ORF3) (Figura 1) (Miyata et al., 1999). A análise da transcrição de TTV em COS-1 (Kamahora et al., 2000) e em células da medula óssea (Okamoto et al., 2000) revelou a existência de pelo menos de três espécies de moléculas de RNAm de 2.9-3, 1.2, e 1.0 kb de comprimento com a região 5' e 3' terminais comuns, levando à criação de região novas de leitura (ORF3 e ORF4) além das previamente descritas ORF1 e ORF2 (Takahashi et al., 2000).

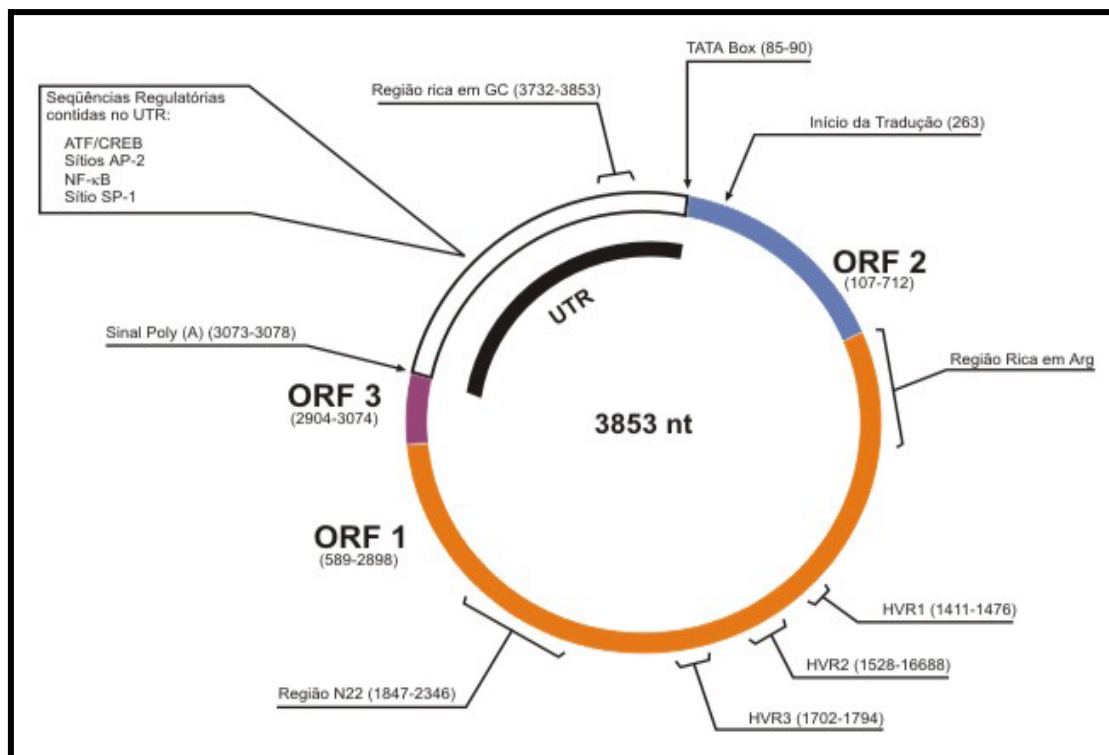


Figura 1. Organização genômica do TTV. DNA circular, simples-fita. Posições nucleotídicas do isolado TA278. O esquema mostra os ORFs 1, 2 e 3, a região UTR, bem como outras regiões importantes. É o caso da região N22, muito utilizada para estudos epidemiológicos e genotipagem (BENDINELLI et al, 2001).

Muitos estudos indicaram um grau elevado de diversidade genética do TTV. O genoma inteiro foi seqüenciado dos isolados de SANBAN e de TA 278 (Hijikata et al., 1999). A organização genética do genoma era similar em dois isolados: duas regiões abertas de leitura (ORF1 e ORF2) foram alinhadas pelos motivos *TATA Box*, sinal de poliadenilação, e por um estiramento curto, rico em GC que residiram no meio da região não traduzida. Nenhuma outra ORF de mais de 300nt comum a SANBAN e a TA278 foram encontrados. A identidade total da seqüência de nucleotídeos entre os dois isolados eram 56.7%, significativamente abaixo da encontrada entre TA278 e GH1 (93%) (Mushahwar et al., 1999). Interessantemente, a identidade da seqüência de nucleotídeos era relativamente mais elevada na região não traduzida (73.0%) do que na região traduzida (52.2%). O elevado grau de

diversidade genética para este grupo de vírus leva a crer que houve uma história longa variação e a adaptação aos seres humanos.

1.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS

O papel patogênico do TTV ainda é pouco discutido. TTV originalmente foi pensado como sendo um vírus patogênico para o fígado, sugerindo ser o causador da falência hepática fulminante (Nishizawa et al., 1997). Posteriormente, Kato et al, (2000) em seus estudos clínicos, concluíram que níveis séricos de TTV não estão relacionados com lesão hepática.

O TTV pode causar uma infecção transitória ou persistente, sendo que no Japão, foi encontrado em 47% de casos de hepatites fulminantes e crônicas não A-G, em 38% de casos de cirrose de etiologia não conhecida e 12% de doadores de sangue (Kato et al., 1998; Okamoto et al, 1998a; Simmonds et al, 1998). Sua presença também foi relatada em indivíduos saudáveis na Europa e Estados Unidos. No Brasil, nos estados de São Paulo e Pará, o TTV foi encontrado em pacientes com hepatopatias crônicas (Takahashi et al, 2000). Os genótipos 1 e 2 do TTV são os mais comuns no mundo todo (Okamoto et al., 2000).

Embora não se saiba precisamente em que células o TTV se replica, DNA de TTV foram detectados freqüentemente em PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) (Okamura et al., 1999; Okamoto et al., 1999) e também sugeriu-se que o TTV infecta e replica em células hematopoiéticas na medula óssea (Kikuchi et al., 2000; Kanda et al, 1999). Zhong et al., (2002) revelaram que pacientes com câncer apresentavam níveis mais elevados

de carga viral, no genoma de PBMCs do que em controles saudáveis (doadores de sangue). Isto poderia ter sido relacionado a anormalidades do sistema imune em pacientes do câncer quando comparado com os controles.

Demonstrou-se que o TTV está presente no núcleo e no citoplasma de algumas PBMCs. É possível que a infecção de células do sistema imune poderia facilitar o escape do vírus da resposta imune. Vírus escondido como um “Cavalo de troia”, em PBMCs pode servir como um reservatório para infecções crônicas, e para a transmissão em alguns aspectos clínicos e epidemiológicos (Allan et al., 1994; Berns, 1990).

Não há manifestações clínicas exclusivamente associadas com o TTV. Pelo fato da infecção ativa ser altamente prevalente entre indivíduos aparentemente saudáveis, há freqüentes sugestões de que o TTV seja considerado essencialmente desprovido de potencial patogênico. Estudos estão sendo realizados com o genótipo 1, pela possibilidade deste induzir uma doença no ser humano, além de sua prevalência e distribuição mundial (Bendinelli et al., 2001). Simmonds et al. (1999), propuseram que TTV pode fazer parte da microbiota normal.

1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Pouco se sabe sobre a vigilância imunológica do hospedeiro e da presença de anticorpos anti-TTV na circulação sangüínea. Ott *et al*, em 2000, confirmaram a existência de uma resposta imune contra o TTV em amostras de soro de doadores e de pacientes com hepatites de etiologia desconhecida, e também em crianças e animais como cachorros, gatos, cabras, carneiros e coelhos. Foi observada uma resposta humoral contra a região C-terminal

da proteína recombinante ORF1 com 98.6% de reatividade sorológica, indicando a alta prevalência de infecção em pacientes com hepatite de etiologia desconhecida. Poucos estudos vêm sendo realizados para detecção de anticorpos anti-TTV, talvez devido à limitada compreensão sobre as respostas imunes induzidas pelo vírus e a dificuldade na obtenção de antígenos. Em um estudo realizado por Ott *et al.* na França, em 2000, uma proteína recombinante foi gerada a partir de uma seqüência do ORF-1 viral a qual foi utilizada como antígeno para a detecção de anticorpos anti-TTV, por *Western blot*, em amostras de soro de pacientes com hepatite de etiologia desconhecida. Uma alta prevalência de anticorpos TTV-específicos foi encontrada (98%), enquanto que a detecção do TTV por PCR foi de 76,1%, nas mesmas amostras, indicando que a utilização da proteína recombinante da região ORF-1 poderia representar uma ferramenta útil no diagnóstico da infecção pelo TTV e tornaria possível a avaliação da resposta imune desenvolvida contra o vírus. Estudos complementares devem ser realizados para comprovar uma possível reação-cruzada com proteínas de outros organismos, principalmente entre vírus de mesma espécie.

1.5 HIV-1 e AIDS

O HIV-1 é um vírus citopático e não oncogênico com genoma RNA, membro da família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae* que necessita, para multiplicar-se, da enzima transcriptase reversa (RT), responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia de DNA, que pode, então, integrar-se ao genoma do hospedeiro (Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984; Barre-Sinoussi et al., 1983).

O ciclo de replicação viral para o HIV-1, comum aos outros retrovírus, é caracterizado por uma série de eventos complexos, divididos em três etapas: fusão, integração e tradução. A etapa de fusão ocorre por ligação específica de uma proteína do vírus a um constituinte da superfície celular do hospedeiro. A expressão ou ausência de receptores na superfície celular do hospedeiro determina o tropismo viral, isto é, o tipo de célula na qual o vírus é capaz de replicar-se. As moléculas do HIV-1, envolvidas na ligação com a célula do hospedeiro, são glicoproteínas de superfície (gp120) que fazem parte do envelope viral e que se ligam a um receptor específico na célula alvo (molécula CD4). Tal interação faz com que ocorra uma mudança conformacional na glicoproteína viral, que leva à fusão da bicamada lipídica da célula à membrana do vírus e permite que o material genético viral seja introduzido no citoplasma da célula hospedeira.

A principal forma de transmissão do HIV-1, em todo mundo, é a sexual, sendo a transmissão heterossexual considerada, pela OMS, como a mais freqüente. Estimativas indicam que, aproximadamente, 75% das infecções por HIV-1 que ocorreram em todo o mundo tenham sido transmitida sexualmente. Alguns fatores que aumentam o risco de transmissão do HIV-1 em uma relação sexual são a alta viremia e a presenças de DSTs, principalmente as ulcerativas como sífilis, cancro mole e herpes (Alarcon et al. 2003; Aklilu et al., 2001; Buvé et al., 2001; Fowke et al., 1996).

A transmissão sanguínea associada a UDI (Usuários de Drogas Intravenosas) é um meio muito eficaz de transmissão do HIV-1, pelo uso compartilhado de seringas e agulhas. A transmissão mediante transfusão de sangue e hemoderivados é cada vez menos relevantes nos países industrializados e naqueles que adotaram medidas de controle da qualidade do sangue utilizado, como é o caso do Brasil (Guerra et al., 2002).

A história natural da infecção pelo HIV-1 pode ser dividida em três fases clínicas, segundo Rizzardi e Pantaleo (1999): 1) infecção primária pelo HIV-1; 2) fase crônica assintomática e 3) AIDS. O tecido linfático serve como principal reservatório para o HIV-1, onde ocorre replicação viral e uma progressiva deterioração anatômica e funcional, prejudicando a capacidade de manutenção da resposta imune específica, refletida pelo rápido aumento dos níveis de viremia e uma queda na contagem de células T CD4⁺, que pode acelerar a transição da fase primária para um estágio mais avançado da doença (Pantaleo et al., 1998; Pantaleo et al., 1993).

A consequência da deterioração progressiva que ocorre com a maioria dos pacientes infectados pelo HIV-1 é o desenvolvimento de doença clinicamente aparente ou da AIDS. O último estágio da infecção é caracterizado pelo aparecimento ou reativação de infecções causadas por inúmeros agentes infecciosos (Marques & Mansur, 2002).

A quantificação dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1, denominado carga viral, é atualmente o parâmetro laboratorial mais importante para o monitoramento e avaliação do risco de progressão da doença e de morte. Mellors et al. (1997) demonstraram que o risco de progressão para AIDS e de morte nos pacientes infectados pelo HIV-1, inclusive nos que apresentaram valores normais na contagem de células T CD4⁺, foi diretamente relacionado com a carga viral plasmática observada neste pacientes na entrada do estudo.

2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos infectados com HIV constituem um grupo com maior predisposição a co-infecções diversas, entretanto, pouco se sabe sobre a infecção do TTV nesses pacientes e sua possível influência na patogênese dessa doença.

A sobrevivência de pacientes infectados pelo HIV-1 é relacionada à prevenção e ao tratamento eficaz de infecções oportunistas. É conhecido que os principais parâmetros para avaliar a progressão da doença causada pelo HIV-1 são contagem de células T CD4+ e carga viral do HIV-1.

Portanto este trabalho visa avaliar a influência do TTV na patogênese da infecção pelo HIV, onde pela primeira vez, separaram-se os pacientes de acordo com a sintomatologia, e foi inserido o grupo de indivíduos expostos ao HIV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença do TTV em pacientes infectados, e indivíduos expostos ao HIV na população da região norte do Estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Analisar as características demográficas dos grupos;
- B) Comparar a contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos dos indivíduos expostos, sintomáticos e assintomáticos;
- C) Comparar os níveis plasmáticos do RNA do HIV-1 nos grupos assintomáticos e sintomáticos;
- D) Investigar a presença do TTV:
 - Em indivíduos doadores de sangue saudáveis;
 - Em indivíduos expostos ao HIV-1, que permaneceram não infectados, parceiros sexuais sorodiscordante e/ou indivíduos que compartilharam seringas e agulhas com indivíduos infectados pelo HIV-1;
 - Em indivíduos infectados pelo HIV-1 assintomáticos;

- Em indivíduos infectados pelo HIV-1 sintomáticos, ou seja, que desenvolveram AIDS;
- E)** Sequenciar e comparar as amostras positivas para o TTV, com as seqüências cadastradas no *GenBank*;
- F)** Analisar as características epidemiológicas e demográficas associadas com a presença do TTV nos diferentes grupos deste estudo;
- G)** Avaliar a influência do TTV na contagem de células T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral do HIV-1, assim sendo determinada alguma possível associação entre o TTV e o HIV-1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÉTICA

Este trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual de Londrina, estando de acordo com a resolução 196/96, CNS. As amostras de DNA utilizadas neste trabalho foram provenientes de um banco de amostras cadastradas sob coordenação da Dra. Edna Maria V. Reiche. Os indivíduos doadores de amostras de DNA realizaram entrevista e foram agrupados de acordo com os critérios definidos pelo CDC (2001).

4.2 POPULAÇÕES

As populações estudadas constituíram-se de indivíduos maiores de 13 anos, de ambos os sexos. Indivíduos não infectados pelo HIV-1, candidatos a doadores de sangue; Indivíduos expostos ao HIV-1, mas não infectados, parceiros sexuais sorodiscordante e/ou com histórico de compartilhamento de agulhas ou seringas com usuários de drogas intravenosas (UDI) infectados pelo HIV-1; e indivíduos infectados pelo HIV-1 em todas fases evolutivas da infecção, atendidos em diversos serviços especializados de assistência aos indivíduos infectados pelo HIV-1 de Londrina e Região Norte do Estado do Paraná, em consulta ambulatorial.

A população estudada no presente trabalho foi constituída de 300 indivíduos classificados em 3 grupos:

- 100 indivíduos expostos ao HIV-1, mas não infectados, parceiros sexuais sorodiscordante e/ou com histórico de compartilhamento de seringas com UDI infectados com HIV-1 (G-1);
- 100 pacientes infectados com HIV-1 assintomáticos (G-2);
- 100 pacientes infectados com HIV-1 com sintomas da doença (AIDS) (G-3).

Para a comparação da presença de TTV entre indivíduos saudáveis e HIV relacionados, foi utilizadas 100 amostras de DNA provenientes de doadores de sangue saudáveis (DS) do Hemocentro Regional de Ribeirão Preto. mantidas no Banco de Amostras de DNA do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, cadastradas no Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Universidade estadual de Londrina.

A determinação de anticorpos anti-HIV-1, contagem de células CD4, CD8 e carga viral foi realizada previamente no Laboratório de Imunologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, sob a supervisão da Prof^a Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche, conforme metodologia descrita posteriormente.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HIV-1

Foram coletadas amostras de sangue periférico através de punção venosa com tubos de coleta a vácuo sem anticoagulante para a realização do teste sorológico. Após coleta as amostras foram centrifugadas a 2000rpm e o soro separado e armazenado a -20°C até realização das sorologias de triagens e testes confirmatórios.

As reações sorológicas para a pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 foram realizadas empregando-se reagentes disponíveis comercialmente e obedecendo-se à Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde nº. 4888, de 17/06/1998 (Brasil, 1998).

Na triagem sorológica, o primeiro teste anti-HIV foi realizado por MEIA (Abbott Axsyn[®] System, HIV1/2 Go, Abbott GmbH, Weisbaden, Delkenehin, Germany) e o segundo teste anti-HIV foi realizado por ELISA (Biotest[®], Murex, HIV-1.2.0, Murex Biotech Limited, Dartford Kent England, UK). As amostras que apresentaram resultados não reagentes nos dois testes foram consideradas como não reagente para HIV-1.

4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4⁺ e T CD8⁺

Foram coletadas amostras de sangue periférico dos indivíduos dos grupos 1, 2 e 3, por punção venosa, com tubos de coletas a vácuo, com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para a contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺. As amostras foram processadas até quatro horas após a coleta e foi utilizada a metodologia automatizada de citometria de fluxo, com reagentes disponíveis comercialmente (FACSCount[®] System, Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em células/mm³.

4.5 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV-1 (CARGA VIRAL)

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram obtidas por punção venosa, com tubos de coletas a vácuo, com anticoagulante EDTA e utilizada para detecção quantitativa dos níveis plasmáticos do RNA do HIV-1. Após separação do plasma, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório Central (LACEN) em Curitiba-PR e analisadas pelo método automatizado COBAS AMPLICOR[®] MONITOR HIV-1 (Roche Diagnostic System, Brachburg, NJ, USA), que apresenta um limite de detecção de carga viral acima de 400 cópias/mL.

4.6 OBTENÇÃO DO DNA

Para obtenção do DNA foi coletada uma alíquota de sangue periférico por punção venosa, com tubos de coletas a vácuo, com anticoagulante EDTA. A técnica utilizada para a extração do DNA origina uma molécula de alto peso molecular e consiste basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (Miller *et al.*, 1988).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm, por 15 min., seguida de aspiração do plasma deixando uma camada remanescente acima dos leucócitos. Adiciona-se solução de lise de hemácias (solução A: 0,32 M de sacarose; 10 mM de tris-HCl; 5 mM de MgCl₂; 1% de Triton X-100) para volume final de 15 ml e mantém-se em gelo por 20 min. Após centrifugação a 2500 rpm a temperatura ambiente, por 15 min, descarta-se o sobrenadante e adiciona-se ao *pellet* 15 ml de solução A de lise de hemácias e mantém-se em

gelo por 20 min. Após nova centrifugação a 2500 rpm à temperatura ambiente por 15 min., o sobrenadante é descartado. O *pellet* é ressuspendido em 1,5 mL da solução de lise de leucócitos (solução B: 10 mM de tris- HCl, pH- 7,5; 5 mM de NaCl; 2 mM de EDTA, pH 8,0). Adicionam-se 0,05mL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 20% e incuba-se em banho-maria à 37°C durante 3-4 horas. A seguir é adicionado 0,5 mL de NaCl a 6M e agita-se vigorosamente, seguido por centrifugação a 2500 rpm em temperatura ambiente durante 15 min. O sobrenadante foi separado e adicionou-se dois volumes de etanol absoluto, à 4°C, para precipitação do DNA. O DNA é então removido com auxílio de uma pipeta Pasteur. Ressuspende-se o DNA em 50 µL de água milli-Q autoclavada. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm (Ultraspec 2000 UV/Pharmacia Biotech, Cambridge, England), usando a seguinte fórmula: densidade óptica obtida a 260nm (OD 260) x diluição x 50 = µg de DNA. A concentração do DNA foi ajustada para 0,1µg/µL e as amostras foram mantidas a -20°C até a etapa da PCR para detecção qualitativa do TTV. A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

4.7 DETECÇÃO QUALITATIVA DO TTV

A presença do TTV foi determinada por *nested* PCR utilizando quatro *primers*, descrito por Nishizawa et al. (1997) e confirmados de acordo com a sequência no *GenBank* AB008394.

```

1921 atggttatgga tagactggct aagcaaaaaa aacatgaact atgacaaagt acaaagtaaa
1981 tgcttaatat cagacctacc tctatgggca gcagcatatg gatatgtaga attttgtgca
2041 aaaagtacag gagaccaaaa catacacatg aatgccaggc tactaataag aagtcctttt
2101 acagaccac aactactagt acacacagac cccacaaaag gctttgttcc ttactcttta
2161 aactttggaa atggtaaaat gccaggagggt agtagtaatg tgcctattag aatgagagct
2221 aaatgggtatc caacattatt tcaccagcaa gaagtactag aggccttagc acagtcaggc
2281 ccctttgcat accactcaga cattaaaaaa gtatctctgg gtatgaaata ccgttttaag

```

1º PCR

- RD037 *primer sense*: 5' GCA GCA GCA TAT GGA TAT GT 3'
- RD038 *primer anti-sense*: 5' TGA CTG TGC TAA GGC CTC TA 3'

2º PCR

- RD051 *primer sense*: 5' CAT ACA CAT GAA TGC CAG GC 3'
- RD052 *primer anti-sense*: 5' GTA CTT CTT GCT GGT GAA AT 3'

O produto da PCR desse sistema é um fragmento de DNA de 197pb localizado na seqüência aberta de leitura 1 (ORF1) denominada região N22.

As condições das duas reações de amplificação foram as mesmas, e foi realizada utilizando-se as soluções abaixo:

Tabela 1. Reagentes utilizados para a PCR TTV

Soluções	Volume
10X PCR <i>Buffer</i> *	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM) *	0,75 µL
dNTP (1,25 mM) **	2,0 µL
Primer <i>sense</i> (2,5 µM) *	1,0 µL
Primer <i>anti-sense</i> (2,5µM) *	1,0 µL
H ₂ O estéril <i>milli-Q</i>	12,75 µL
Taq Polimerase (1,25 U/reação) *	2,5 µL
Amostra de DNA genômico/ produto do PCR 1 (0,1 µg/µl)	2,5 µL
Volume Final	25,0 µL

* INVITROGEN *life technologies*- Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *PCR Sprint-Thermo Hybaid*[®] (Biosystems, Barcelona, Spain), onde a temperatura inicial de desnaturação foi de 94°C por dez minutos, seguida de 35 ciclos de trinta segundos à 94°C para desnaturar a dupla fita de DNA, 30 segundos à 53°C para temperatura de anelamento e quarenta e cinco segundos à 72°C para extensão das cópias, com extensão final de 10 minutos a 72°C. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos, e com um controle positivo, no qual utilizou-se DNA de amostra previamente testada e considerada positiva. As amostras foram analisadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 10%, coradas com nitrato de prata.

4.8 SEQUENCIAMENTO

As amostras positivas para o TTV foram seqüenciadas e analisadas no banco de dados (*GenBank*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Para a purificação do produto do *nested* PCR de 197pb, foram adicionados a 100µL do produto de PCR, 125µL de PEG 8000 a 20% e 25µL de NaCl 5M e incubados *overnight* a 4°C. Acrescentou-se 250µL de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 13000rpm a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 250µL de etanol 70% e novamente submetido a centrifugação a 13000rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* seco por 15 minutos a temperatura de 37°C e ressuspendido em 20µL de água milli-Q autoclavada. O produto purificado foi quantificado por espectrofotometria (Ultraspec 2000 UV/Pharmacia Biotech, Cambridge, England), ajustado para concentração de 400ng/µL. O produto purificado e quantificado foi submetido à

reação de sequenciamento no termociclador *Eppendorf mastercycler gradient* com *DYEnamicTM ET dye terminator cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Ohio, USA) seguindo o protocolo abaixo e instruções do fabricante.

Tabela 2. Reagentes utilizados para reação de sequenciamento

Reagentes	Volume
DYEnamic ET reagent premix	4 μ L
Primer RD051 ou RD052 (10pmoles)	2 μ L
Produto de PCR (400ng/ μ L)	4 μ L
Total	10μL

Tabela 3. Condições da reação de sequenciamento

Temperaturas	Tempo	Ciclos
95°C	30 seg.	30
53°C	15 seg.	
60°C	1 mim.	

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com 10 μ L de água milli-Q autoclavada, 2 μ L de acetato de amônio 7,5M estéril e 60 μ L de etanol 96%. Centrifugados por 15 segundos a 300rpm e mantidos em repouso por 15 minutos a 25°C. Novamente centrifugados a 4000rpm a 25°C por 45 minutos, o sobrenadante foi vertido e adicionou-se 140 μ L de etanol 70% e posterior centrifugação a 4000rpm por 14 minutos. O sobrenadante foi vertido, o *pellet* secado a 37°C por 15 minutos e ressuspenso em 10 μ L de tampão (*Loading buffer for Mega Bace*) e submetidos ao sequenciamento no seqüenciador automático Mega Bace 1000TM (Amershan Pharmacia Biotech – USA).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos e epidemiológicos foram analisados pelo teste de *ODDS RATIO* IC-95%, teste de qui-quadrado, A concentração de células T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral foram analisadas pelo teste t de *Student* pelo programa *Microcal Origin™ 6.0* com nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Foi analisado um total de 300 indivíduos quanto as suas características demográficas, divididos em 3 grupos. O primeiro (G-1) grupo foi composto de 100 indivíduos expostos ao HIV, porém com sorologia negativa, o segundo grupo (G-2) constituiu-se de 100 pacientes portadores do HIV sem os sintomas da AIDS e o terceiro grupo (G-3) constituiu-se de 100 pacientes portadores do HIV com sintomas da AIDS. A primeira análise foi feita relacionando estes grupos em relação à idade, sexo e etnia (Tabela 4).

Tabela 4. Características demográficas dos grupos independentes da presença do TTV

Características	Grupos		
	G-1	G-2	G-3
Sexo			
Masculino	40	52	59
Feminino	60	48	41
Etnia			
Branca	68	61	76
Negra	11	6	7
Parda	21	33	17
Idade* (s.e.)	36,5 (\pm 1,0)	32,4 (\pm 0,9)	36,9 (\pm 1,0)

* Mediana (*Microcal OriginTM 6.0*)

s.e. (Erro Padrão)

5.2 ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD4⁺ e T CD8⁺

Foi analisada a concentração de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para os grupos 1, 2 e 3. De acordo com o critério de inclusão dos pacientes nos grupos 2 e 3, os valores de células T CD4⁺ devem ser mais elevados nos pacientes infectados com HIV-1 assintomáticos quando comparados com os valores observados nos pacientes com AIDS. Quando comparados pelo teste t de *Student* os valores de células T CD4⁺ do grupo 1 foram diferentes dos grupos 2 e 3. Os indivíduos do grupo 1 expostos ao HIV-1, mas não infectados apresentaram valores de células T CD4⁺ significativamente mais elevados ($p < 0,05$) que os grupos 2 e 3, sendo que o grupo 2 apresentou contagem de células T CD4⁺ significativamente superior ao grupo 3 ($p < 0,05$) (Figura 2).

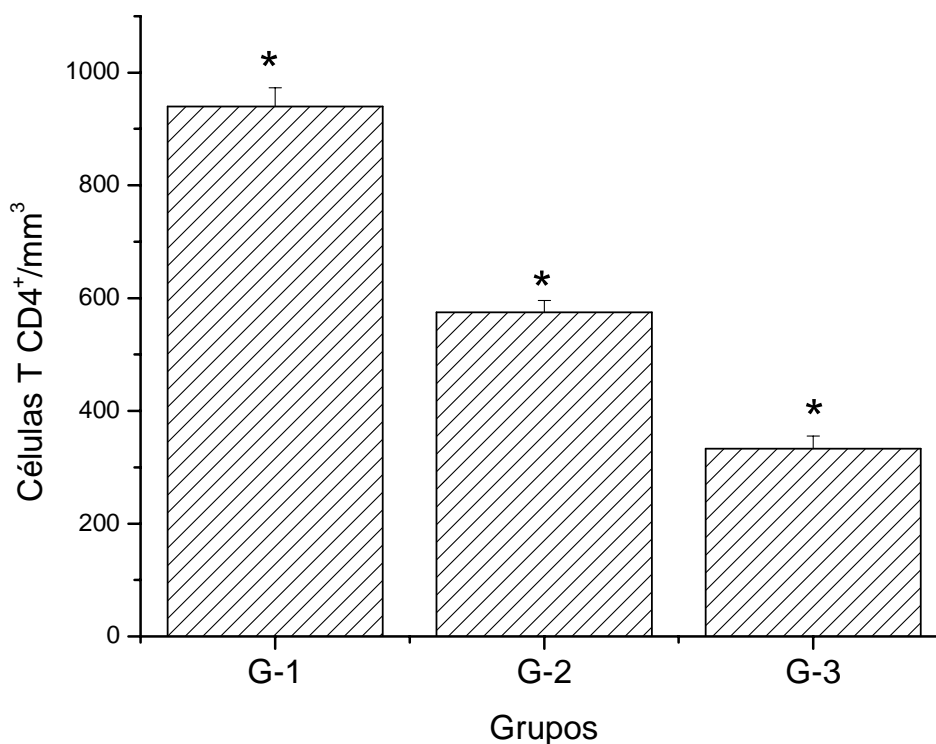


Figura 2. Concentração de células T CD4⁺. G-1: Indivíduos expostos HIV-1, mas não infectados; G-2: Pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomáticos.

* Teste t de *Student* ($p < 0,05$) (*Microcal Origin*TM 6.0).

Em relação aos valores de células T CD8⁺, no grupo 1, indivíduos expostos ao HIV-1, foi diferente dos grupos 2 e 3, pacientes portadores do HIV-1. Quando feita a análise pelo teste t de *Student*, os grupos 2 e 3 apresentaram valores de células T CD8⁺ estatisticamente mais elevados quando comparados ao grupo 1 ($p < 0,05$). Em relação aos grupos 2 e 3, não houve diferença estatística para os valores de células T CD8⁺ (Figura 3).

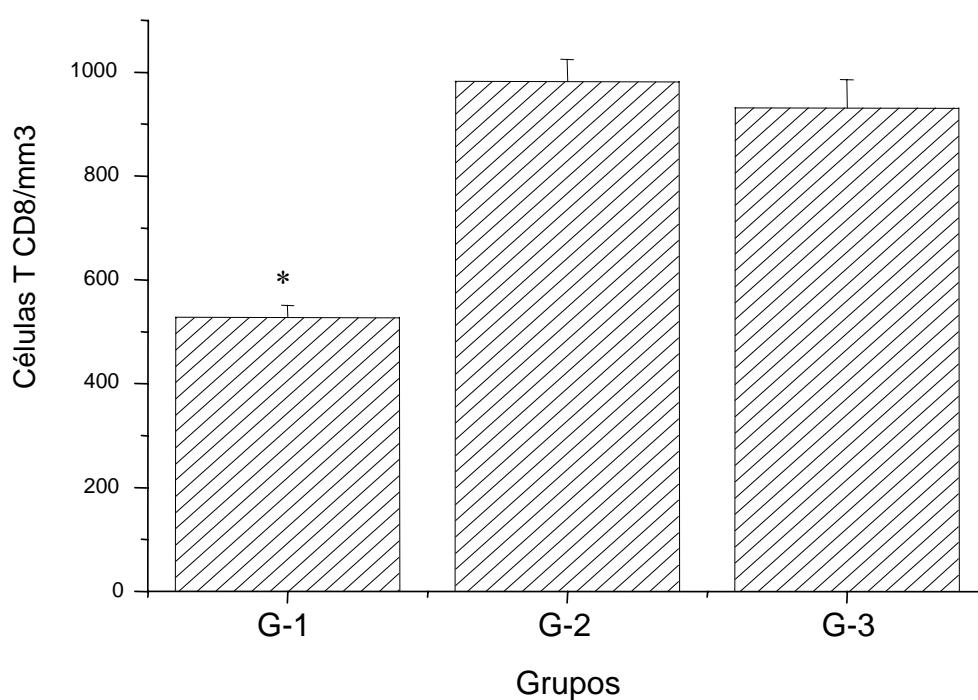


Figura 3. Concentração de células T CD8⁺. G-1: Indivíduos expostos HIV-1, mas não infectados; G-2: Pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomáticos.

* Teste t de *Student* ($p < 0,05$) (*Microcal Origin*TM 6.0).

5.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV-1 (CARGA VIRAL)

Na quantificação da carga viral dos grupos 2 e 3, considerando-se um nível de detecção mínimo de 400 cópias/mL do RNA do HIV-1, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos (figura 4).

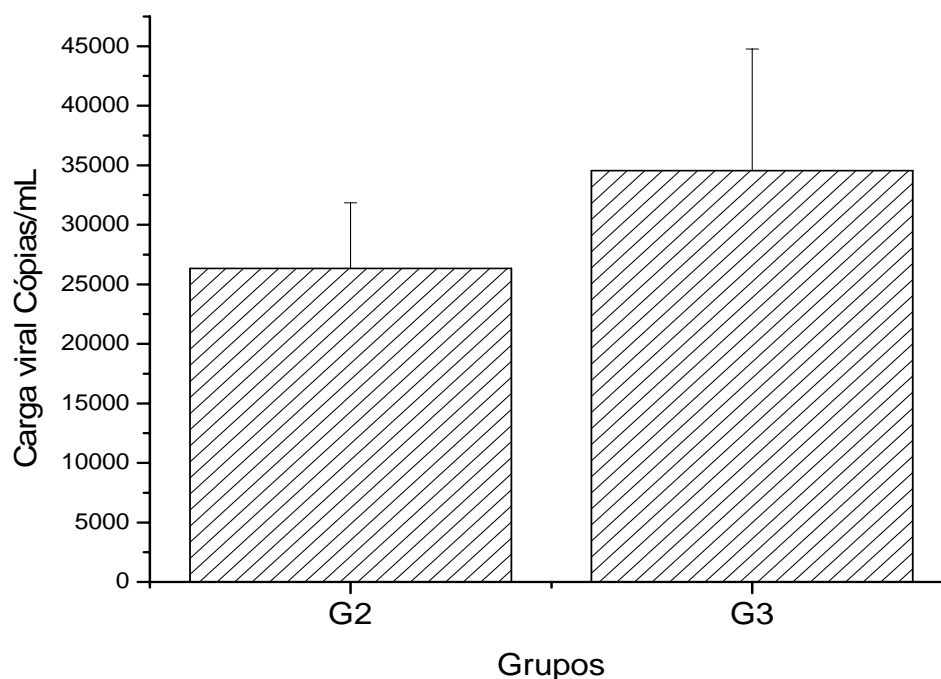


Figura 4. Média dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1. G-2: Pacientes infectados pelo HIV assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomáticos. (*Microcal Origin™ 6.0*).

5.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO DNA

Para realizar a detecção do TTV por *nested* PCR, foi feita a análise da integridade do DNA das amostras dos grupos. Esta análise foi realizada por eletroforese

em gel de agarose 1% (m/v) e apresentou um perfil eletroforético típico de amostra íntegra de DNA (Figura 5).

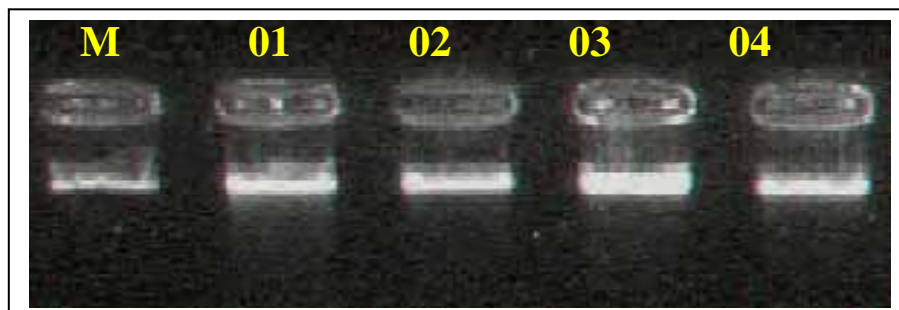


Figura 5. Análise da Integridade do DNA. Eletroforese em gel de agarose 1% em presença de brometo de etídio. Foi aplicado 5 μ L de DNA em solução de xileno cianol. (M) DNA conhecido como marcador. Amostras: 01, 02, 03 e 04 demonstrando a integridade do DNA.

Além da análise da integridade através de perfil eletroforético, todas as amostras foram amplificadas para o gene constitutivo do SDF-1, sendo, portanto amostras íntegras e viáveis para a realização da PCR para o TTV.

5.5 DETECÇÃO QUALITATIVA DO TTV

No presente trabalho foi realizada a detecção qualitativa do TTV por PCR *nested* a partir do DNA genômico dos indivíduos incluídos neste estudo, classificado nos diferentes grupos. O produto de PCR de 197pb foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e visualizados por coloração de prata, como descrito em materiais e métodos.

Com a finalidade de avaliar a presença do TTV na população normal e saudável, selecionamos amostras de DNA de doadores de banco de sangue (DS). A presença do TTV foi encontrada em 6 dos 100 indivíduos analisados (Figura 6).

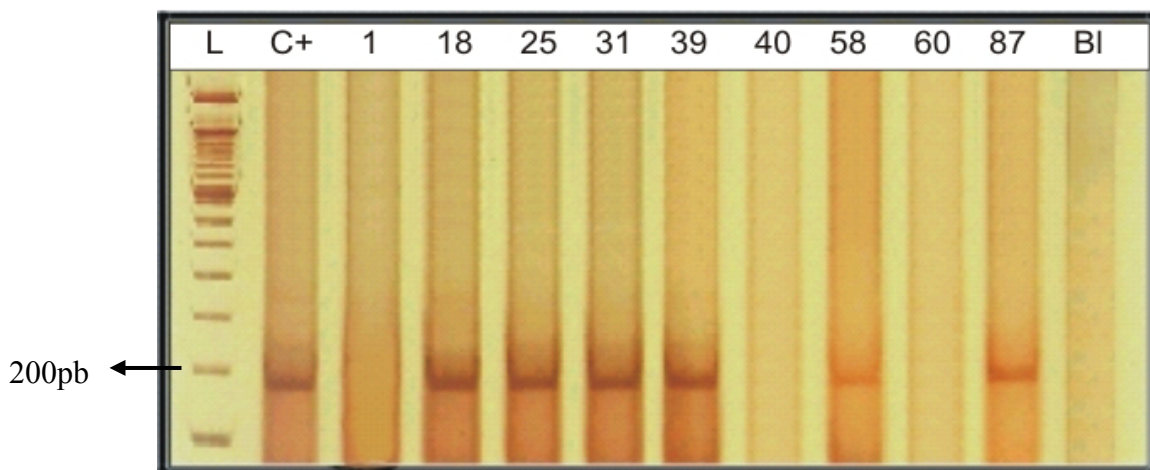


Figura 6. Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos doadores saudáveis de sangue (DS). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação por nitrato de prata. L (Ladder 100bp, Promega). Amostras: 18, 25, 31, 39, 58 e 87 positivas para o TTV. Amostras: 1, 40 e 60 negativas para o vírus. C+ controle positivo. BI – Blank ou controle negativo.

No grupo 1, representado por indivíduos expostos ao HIV-1, a presença do TTV foi encontrada em 21 dos 100 indivíduos analisados (Figura 7 e 8).

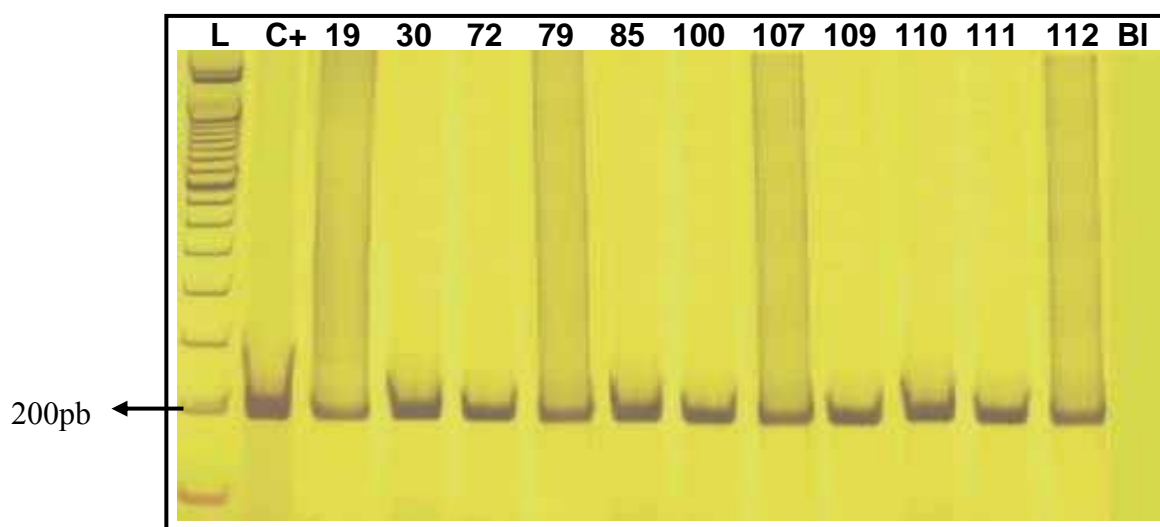


Figura 7. Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação por nitrato de prata. L (Ladder 100bp, Promega). Amostras: 19, 30, 72, 79, 85, 100, 107, 109, 110, 111 e 112 positivas para o TTV. C+ controle positivo. BI – Blank ou controle negativo.

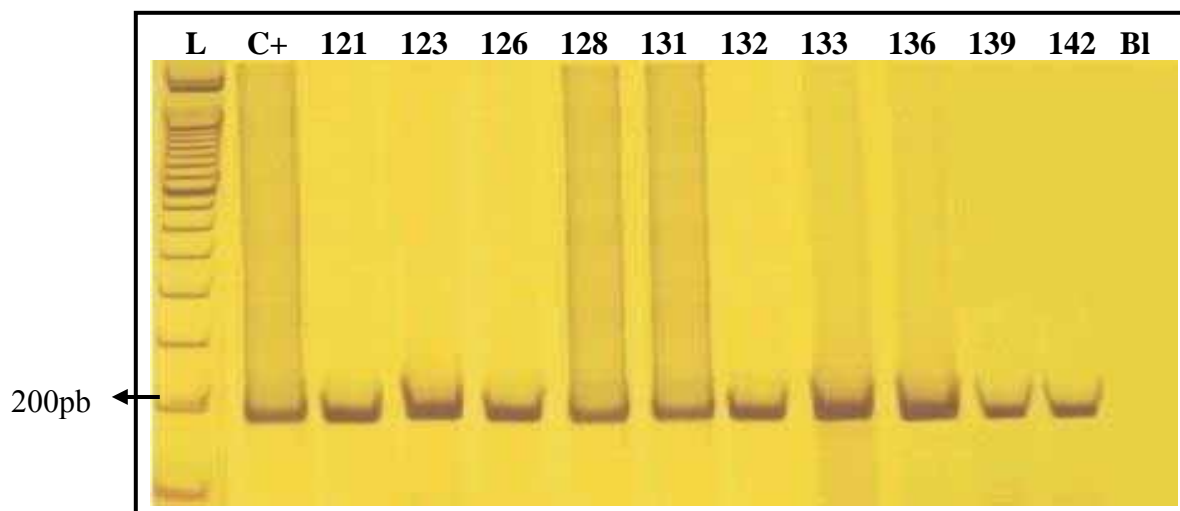


Figura 8. Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação por nitrato de prata. L (Ladder 100bp, Promega). Amostras: 121, 123, 126, 128, 131, 132, 133, 136, 139, 142 positivas para o TTV. C+ controle positivo. BI – Blank ou controle negativo.

Para a análise dos pacientes HIV-1 positivos os pacientes foram subdivididos em dois grupos, assintomáticos e sintomáticos. No grupo 2, representado pelos indivíduos infectados pelo HIV-1, assintomáticos (Figura 9).

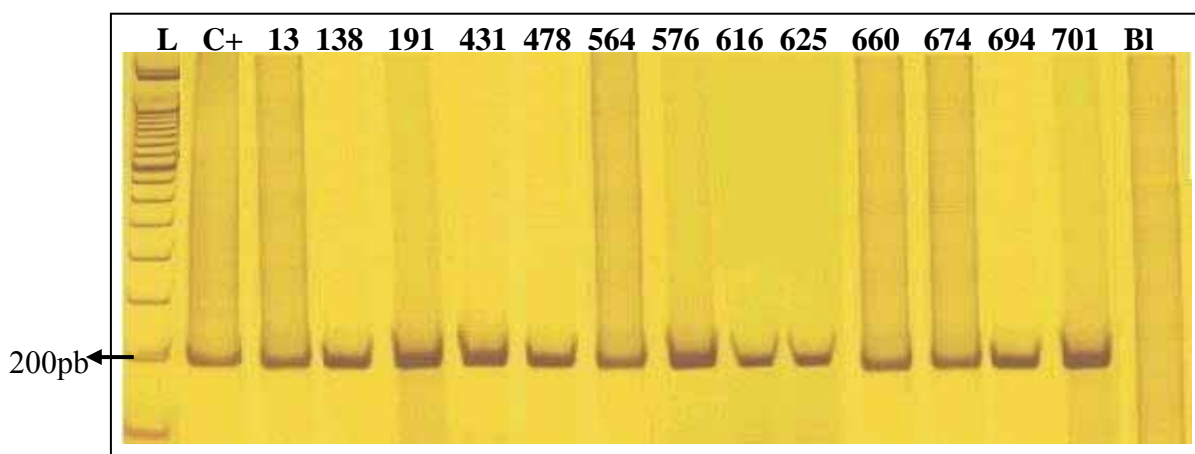


Figura 9. Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos infectados pelo HIV-1, assintomaticos (G-2). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação por nitrato de prata. L (Ladder 100bp, Promega). Amostras: 13, 138, 191, 431, 478, 564, 576, 616, 625, 660, 674, 694, 701 positivas para o TTV. C+ controle positivo. BI – Blank ou controle negativo.

No grupo 3 de pacientes portadores do HIV-1 sintomáticos a presença do TTV foi encontrada em 12 dos 100 indivíduos analisados (Figura 10).

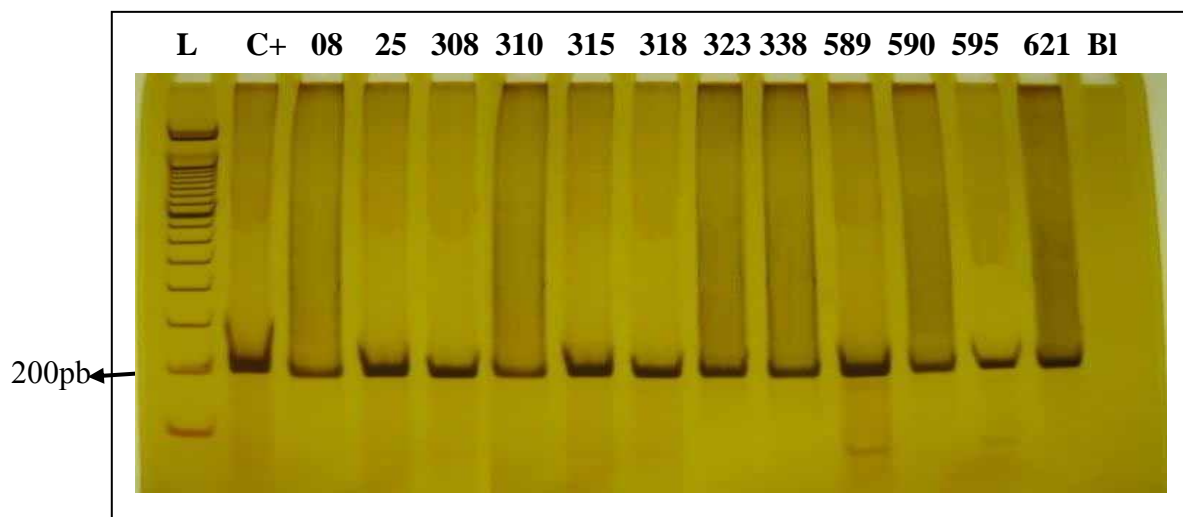


Figura 10. Detecção do TT vírus através da PCR em indivíduos infectados pelo HIV-1, sintomáticos (G-3). Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% visualizado por impregnação por nitrato de prata. L (Ladder 100bp, Promega). Amostras: 8, 25, 308, 310, 315, 318, 323, 338, 589, 590, 595, 621 positivas para o TTV. C+ controle positivo. Bl – Blank ou controle negativo.

Relacionando a presença do TTV entre os grupos, houve diferença estatística quando comparado o grupo de doadores saudáveis de sangue (DS) (6/100) com o grupo de indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1) (21/100) para o teste de *ODDS RATIO*, onde houve uma maior prevalência do TTV no G-1 [O.D. = 4,16 (IC 95% 1,60 – 10,83)] (Figura 11). Quando comparado os grupos HIV-1 positivos assintomáticos e sintomáticos G-2 e G-3 respectivamente com o grupo de doadores saudáveis de sangue (DS) houve uma maior prevalência do TTV no Grupo 2 (13/100) e grupo 3 (12/1100) porém não significativo para o teste de *ODDS RATIO* (Figura 11).

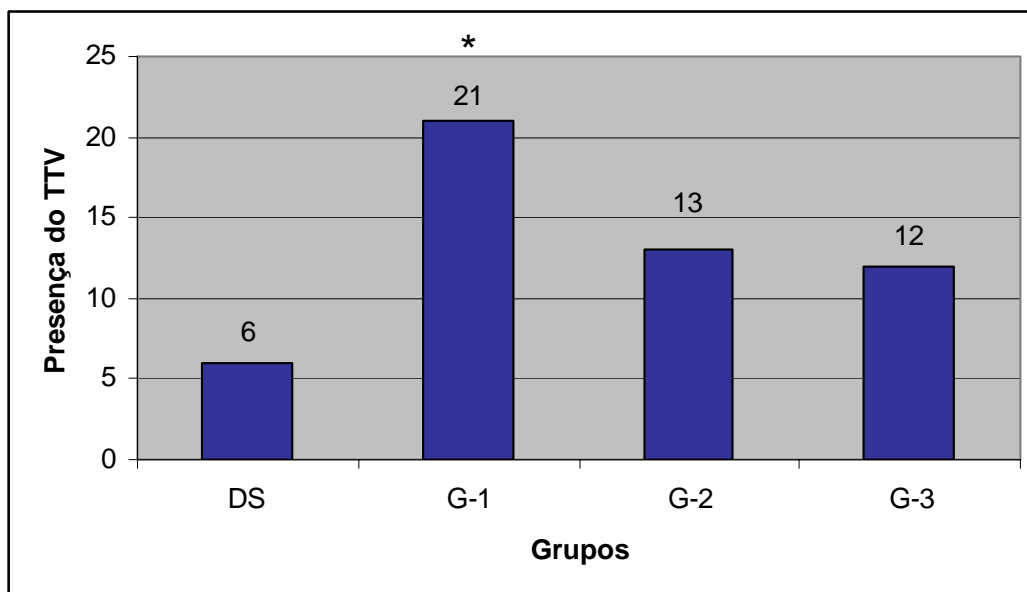


Figura 11. Detecção do TT vírus através de PCR nos diferentes grupos. DS: Doadores saudáveis de sangue; G-1: Indivíduos expostos ao HIV-1; G-2: Pacientes infectados com HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados com HIV-1 sintomáticos.

* Teste de *ODDS RATIO* - O.D. = 4,16 (IC 95% 1,60 – 10,83)

5.6 SEQUENCIAMENTO

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências disponíveis no *GenBank* da NCBI, onde estas seqüências apresentaram identidade significativa com as seqüências do TTV cadastradas neste banco de dados.

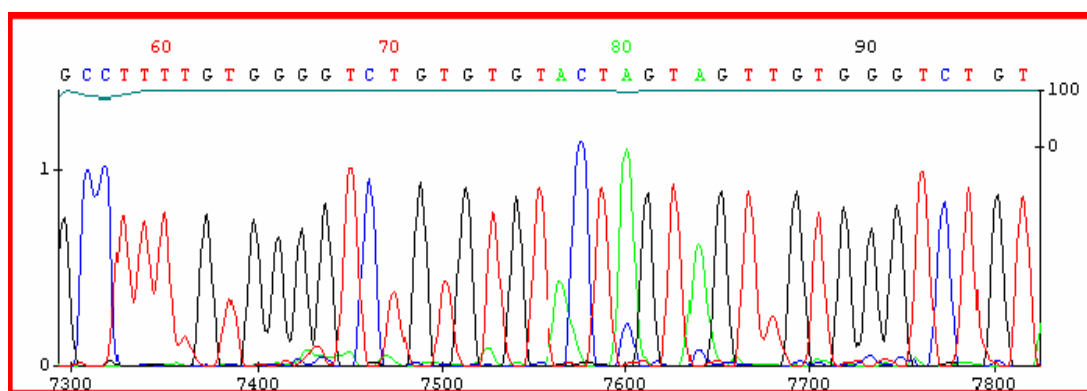


Figura 12 Eletroferograma do produto de PCR *nested* do TTV. O produto de PCR-*nested* foi precipitado e a reação de sequenciamento foi realizada segundo descrito em Materiais e Métodos. O cromatograma representa a seqüência do fragmento do produto do *nested* PCR.

5.7 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS GRUPOS QUANTO A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO TTV

Nos grupos 1, 2 e 3 estudados foi analisada a característica demográfica quanto à presença ou ausência do TTV. Para esta análise foram utilizados os testes estatísticos de *ODDS RATIO* e qui-quadrado (Tabela 5).

Tabela 5. Características demográficas quanto a presença ou ausência do TTV

Características	Grupos					
	G-1		G-2		G-3	
	Presença/Ausência		Presença/Ausência		Presença/Ausência	
Sexo						
Masculino	9	31	7	45	8	51
Feminino	12	48	6	42	4	37
Etnia						
Branca	13	55	10	51	8	68
Negra	3	8	1	5	1	6
Parda	5	16	2	31	3	14
Idade* (s.e.)	35,2 (±1,5)	36,9 (±1,2)	30,1(±2,3)	33,4 (±0,9)	36,9 (±1,0)	38,0 (±4,1)

* Mediana

s.e. (erro padrão)

5.8 INFLUÊNCIA DO TTV VÍRUS NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺, T CD8⁺ E CARGA VIRAL

Para verificar a influência do TTV vírus na progressão da infecção pelo HIV-1, foram realizadas contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos 1, 2 e 3 e quantificação da carga viral do HIV-1 para os grupos 2 e 3, correlacionando com a presença do TTV vírus.

Contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e quantificação da carga viral, são os principais parâmetros para verificar a progressão e evolução do HIV-1 (Cozzi et al., 1998).

5.8.1 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO TTV VÍRUS NA CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4⁺ e T CD8⁺

Nos grupos 1, 2 e 3 foi realizada a contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e detecção do TTV para avaliar a influência do TTV vírus sobre as células T CD4⁺ e T CD8⁺.

Em relação à contagem de células T CD4⁺, não houve influência do TTV vírus em nenhum dos grupos estudados, não sendo significativo para o teste t de *student* ($p > 0,05$) (Figura 13).

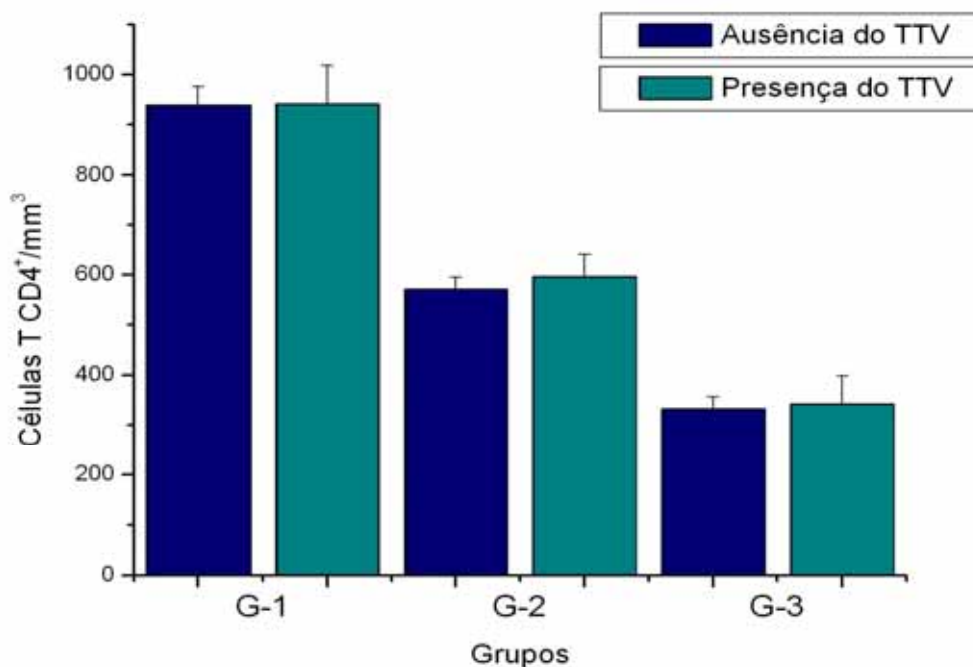


Figura 13. Concentração de células T CD4⁺ de acordo com a presença ou ausência do TTV. G-1: Indivíduos expostos HIV-1, mas não infectados; G-2: Pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomáticos.

Em relação à contagem de células T CD8⁺ também não houve diferença estatística para a presença do TTV vírus em nenhum dos grupos estudados ($p>0,05$) (Figura 14). Estes resultados demonstram que o TTV vírus, não altera a contagem de células T CD8⁺.

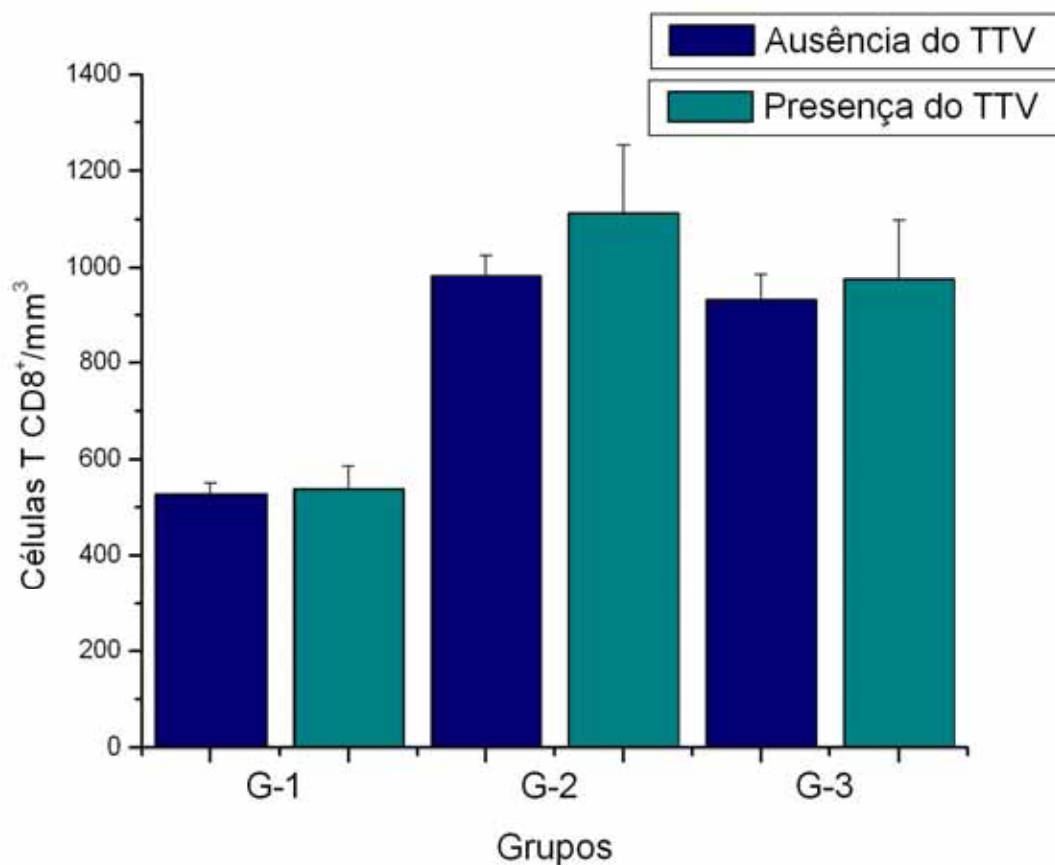


Figura 14. Concentração de células T CD8⁺ de acordo com a presença ou ausência do TTV. G-1: Indivíduos expostos HIV-1, mas não infectados; G-2: Pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomáticos.

5.8.2 INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO TTV VÍRUS NA CARGA VIRAL DO HIV-1

Entre os grupos HIV positivos assintomáticos (G-2) e sintomáticos (G-3) não houve diferença estatística ($p>0,05$) em relação à carga viral e presença ou ausência do TTV.

Porém uma tendência de diminuição na carga viral dos pacientes sintomáticos (G-3) TTV positivos, quando comparados com o subgrupo TTV negativos (Figura 15).

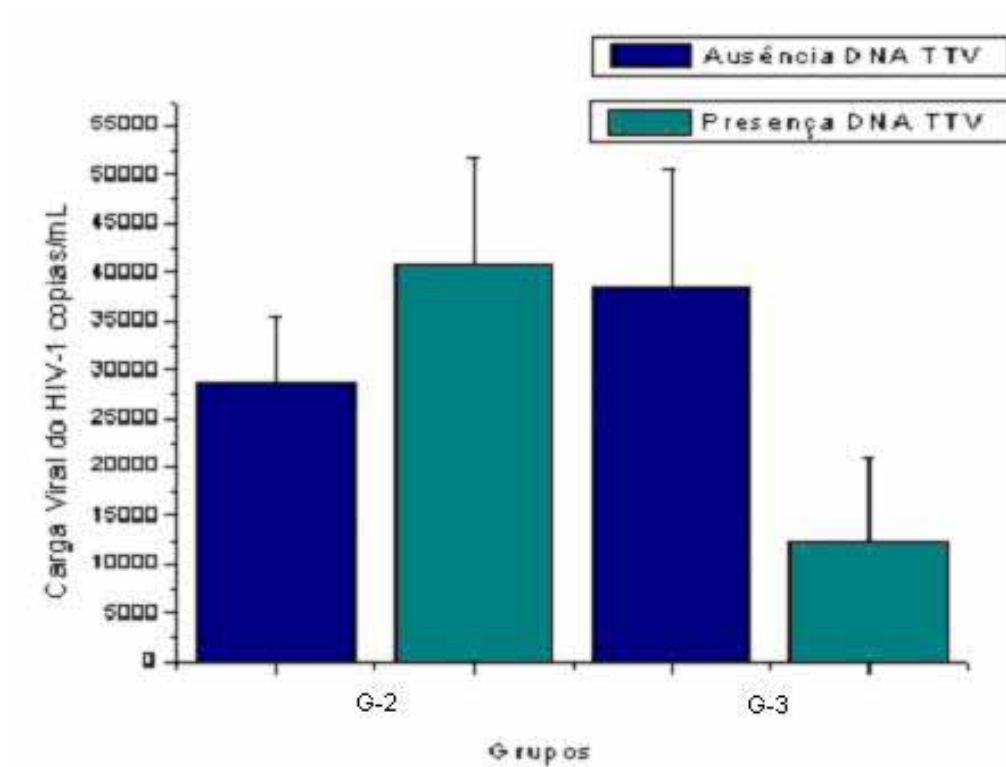


Figura 15. Níveis plasmáticos do RNA do HIV-1 (Carga viral) . G-2: Pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos; G-3: Pacientes infectados pelo HIV-1 sintomático.

6 DISCUSSÃO

A epidemia mundial de AIDS se caracterizou pela ligação entre a transmissão de HIV e o uso de drogas injetáveis. Esta característica predominante se instalou inicialmente na Europa, e em algumas regiões da América do Norte, e tornou-se rapidamente um fenômeno mundial. O perfil da epidemia da AIDS no Brasil sofreu mudanças significativas, desde o seu surgimento, em 1980 quando acometia principalmente homens homossexuais e mostrava-se restrita aos grandes centros urbanos, até os dias atuais, com um grande crescimento do número de casos entre homens heterossexuais, que, por contaminarem suas parceiras sexuais, contribuem para feminização da doença. Na população de estudo deste trabalho (Tabela 4) não houve predominância de sexo embora houve maior incidência de indivíduos no sexo feminino no grupo 1, indivíduos não infectados expostos ao HIV. Quanto à etnia, há predominância de indivíduos caucasóides em todos os grupos analisados, sendo que entre negros e pardos, houve maior incidência para pardos, fato explicado pela grande miscigenação na população brasileira, principalmente com influência dos negros. Tem sido observado que as condições de ordem social, econômica, gênero e étnica/racial contribuem de forma significativa para o aumento da vulnerabilidade masculina à infecção pelo HIV. O preenchimento do quesito cor apresenta uma grande lacuna, esta é uma variável necessária, devendo ser adotada nos estudos e dados epidemiológicos sobre DST/AIDS como um indicador da vulnerabilidade de diferentes grupos étnicos (Silva & Soares, 2006).

Desde os primeiros anos da epidemia da AIDS, a monitorização das células T CD4⁺ vem sendo utilizada como um parâmetro laboratorial preditivo do prognóstico da doença causada pelo HIV e também como um excelente indicador da magnitude do risco

para as principais infecções oportunistas, principalmente em pacientes com doença sintomática. Sua avaliação seriada vem sendo utilizada, tanto na indicação como na avaliação da necessidade de modificação dos esquemas anti-retrovirais, e apresenta uma boa correlação com a resposta ao tratamento. Além disso, a indicação de quimioprofilaxia, bem como a abordagem clínica dos principais processos oportunistas presentes no espectro da imunodeficiência crônica induzida pelo HIV é frequentemente avaliada e monitorada pela contagem seriada dessas células.

No presente trabalho, a contagem de células T CD4⁺ demonstra que este parâmetro é uma das características que representa a fase de doença dos indivíduos infectados pelo HIV (Figura 2), onde os indivíduos expostos ao HIV (G-1) apresentam a concentração de células T CD4⁺ no sangue periférico superior aos demais grupos e o grupo sintomático apresenta contagem média de células T CD4⁺ inferior a 400 células/mL, entre aqueles submetidos ou não à terapia anti-retroviral.

É conhecido que os portadores de HIV realizam exames como a contagem de células CD4⁺ e carga viral para se conhecer o estado de progressão da doença. Normalmente a terapia envolvendo anti-retrovirais melhora os parâmetros de células T CD4⁺. A população de células T CD4⁺ diminui à medida que a infecção pelo HIV progride, diminuindo a capacidade do organismo de responder contra vários microrganismos, as chamadas infecções oportunistas. Nos indivíduos não infectados, como no caso do grupo 1 que são expostos, a contagem de células CD4⁺ é normal. A contagem de células T CD4⁺, mesmo sendo considerado um clássico marcador de progressão, apresenta uma grande variabilidade intra e interindividual, principalmente quando os valores estão acima de 200 células/mm³, dificultando a sua utilização em fases mais precoces da infecção. Pacientes com contagens

abaixo de 200 células/mm³ apresentam um risco bastante aumentado para processos oportunistas como a pneumocistose e a toxoplasmose. Já pacientes com contagens abaixo de 50-100 células/mm³ apresentam um quadro de imunodeficiência mais grave e um risco bastante elevado para infecções disseminadas, como por citomegalovírus e micobactérias atípicas.

Células T CD4⁺ vírus específicas são críticas na imunidade antiviral (Correa et al., 2007). O valor absoluto de células T CD4⁺ é um importante marcador para a progressão da infecção pelo HIV como também, para a restituição da resposta imune. Embora tenha sido descrito que a resposta de células T a antígenos apresenta-se reduzida em indivíduos infectados pelo HIV, permanece obscuro se este fato se deve a uma diminuição nos números de células T ou a defeitos qualitativos nos linfócitos remanescentes (Knox et al., 2006). Entretanto, há muitas evidências de que a linfopenia não é o único mecanismo responsável pela disfunção imunológica, baixos níveis de células T CD4⁺ podem estar relacionados com uma recuperação imunológica deficitária após o início da terapia anti-retroviral, e o aumento nos números de linfócitos T CD4⁺ durante a terapia anti-retroviral não é preditivo de êxito na restituição das respostas imunes a antígenos (Valdez et al., 2002; Elrefaei et al., 2004; D'Amico et al., 2005).

A infecção pelo HIV se caracteriza por um progressivo declínio da contagem de células CD4⁺ e inversão da relação CD4⁺/CD8⁺, com aumento relativo das células CD8⁺ (Miziara et al., 2005). Portanto, a próxima etapa do nosso trabalho foi analisar a contagem de células T CD8⁺ nos grupos de estudo. A Figura 3 a qual representa células T CD8⁺ apresenta valores inversos em relação à Figura 2, demonstrando aumento de células T CD8⁺ em relação a contagem de células T CD4⁺. É suposto que quando o HIV se acumula no sangue

periférico, as células CD8⁺ começam a produzir moléculas que induzem apoptose e diminuem as citocinas necessárias para a citotoxicidade específica contra o HIV. Logo, as células CD8⁺, embora em quantidade elevada, perdem a capacidade de bloquear a progressão para AIDS.

Vários fatores podem influenciar a replicação viral durante a infecção aguda até a o estabelecimento do ponto estável viral. Incluem-se a aptidão do vírus infectante, fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro. Enquanto que anticorpos anti HIV-1 são detectados durante a infecção primária pelo HIV, diversos estudos demonstraram um papel crucial das respostas imunes celulares para o controle inicial da replicação durante este estágio da infecção. Uma maciça expansão da resposta das células T CD8⁺ foi descrita durante a infecção aguda pelo HIV-1 (Pantaleo et al., 1994).

Os grupos 2 e 3 do presente trabalho são representados por indivíduos infectados pelo HIV, sendo indivíduos assintomáticos (G-2) e sintomáticos (G-3). Sabendo-se que o nível de RNA do HIV no plasma é um marcador clínico importante, a análise da carga viral realizada não apresentou diferenças estatisticamente significantes (Figura 4). Tanto a média como a mediana do número de cópias do vírus foi similar nos dois grupos (G-2 e G-3), sendo que os valores de carga viral foram abaixo de 35.000 cópias/mL. Existe uma relação direta entre a quantidade de HIV detectada e a rapidez com que a infecção progride. Níveis elevados de replicação do vírus e o aumento da carga viral estão associados à deterioração acelerada do sistema imune. Portanto, a carga viral é muito útil para avaliar a progressão da doença, indicar o início de terapia e para determinar a eficácia dos anti-retrovirais.

Durante uma infecção aguda pelo HIV, o vírus replica-se largamente na ausência de qualquer resposta imune adaptativa, atingindo níveis acima de 100 milhões de cópias/mL. É durante este ciclo inicial de replicação viral que importantes processos patogênicos têm lugar. Incluem-se a disseminação para uma série de reservatórios tissulares e a destruição de linfócitos T CD4⁺ específicos para o HIV. Os elevados níveis de viremia são normalmente de curta duração, indicando que o hospedeiro é capaz de gerar uma resposta imune que controla a replicação. Nas semanas seguintes a viremia diminui antes de atingir um ponto estável. Este nível de viremia que se segue à resolução da infecção aguda é um fator preditivo muito forte da taxa de progressão da doença em longo prazo (Mellors et al., 1995).

Nesta última década tem sido evidenciado que o *Torque Teno Vírus* (TTV) apresenta alta prevalência na população geral e embora nenhuma doença tenha sido associada ao vírus, co-infecções com outros vírus patogênicos são frequentes. É um vírus com grande variabilidade, especialmente por se tratar de um vírus DNA, e o papel do sistema imune em controlar a infecção ainda não está bem estabelecido (Thom & Petrik, 2007). Tem sido proposto que assim como outras doenças oportunistas, em indivíduos imunocomprometidos (HIV infectados), o TTV poderia levar uma maior severidade das doenças. Desta forma investigações clínicas em relação à persistência viral (TTV) em indivíduos imunocomprometidos (HIV infectados) forneceriam indícios do possível papel patogênico para o TTV e suas conseqüências a curto e longo prazo (Debiaggi et al., 2000). Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez, a presença do TTV agrupando-se em pacientes expostos, pacientes infectados pelo HIV assintomáticos e sintomáticos na região Norte do Paraná. Para a detecção de TTV foram utilizados iniciadores da região N22 do TTV. Tem sido verificado que a utilização de iniciadores da região UTR do TTV tem detectado elevada

porcentagem deste vírus em indivíduos soropositivos para o HIV e doadores normais. Por outro lado, a utilização de primers da região N22 tem demonstrado detectar TTV associados com hepatites de etiologia não conhecida. O TTV foi encontrado em 43,3% (103/238) dos pacientes infectados e 9,7% (22/226) dos doadores normais (Debiaggi et al., 2000). A persistência e elevada frequência da infecção detectada através de primers N22 em pacientes soropositivos para HIV tem sugerido investigação clínica em pacientes imunocomprometidos para um melhor entendimento sobre a patogênese do TTV (Debiaggi et al., 2000). Com a utilização de primers N22 o TTV foi detectado em 25,4% de doadores com elevados níveis de alanina aminotransferase (ALT) e 15,7% de doadores com níveis normais de ALT. Ao contrario, com a utilização de primers da região UTR, o TTV foi detectado em 93% de indivíduos com ALT alterados, sendo que este valor não foi muito diferente em relação aos doadores normais com valores de ALT normais. Estes resultados demonstrados por Itoh et al. (1999) indicam que a escolha de primers para PCR influencia na detecção do TTV. Os resultados destes autores sugerem que o TTV de genótipos restritos, detectados por primers da região N22 estaria associado com danos hepáticos entre indivíduos normais.

A prevalência da infecção pelo TTV foi investigada por técnica de PCR em indivíduos de baixo (doadores de sangue, crianças) e elevado risco (hemofílicos) no Estado de São Paulo, Brasil utilizando-se primers da região UTR do genoma viral, o qual demonstrou maior índice de detecção do que primers da região N22 o qual inclui a região ORF-1 (Bassit et al., 2002). Hu et al. (2005) investigaram a presença do TTV através de primers RD037/038/051/052 os quais são seletos para região N22 e amplificam fragmentos somente para o genótipo 1. Portanto neste trabalho optamos por estes primers para detectar TTV no sangue periférico dos indivíduos.

Tem sido demonstrado replicação do TTV em hepatócitos e leucócitos (Desai et al 2005). Barril et al. (2000) verificaram a presença do TTV no soro e células mononucleares do sangue periférico de pacientes submetidos à diálise peritoneal contínua, através de primers para região ORF1 e ORF2 do TTV. É sugerido que o TTV atua como um cavalo de Tróia “Trojan horse” no sangue periférico, servido como um reservatório para TTV (Zhong et al, 2002).

Neste trabalho, foi investigado a presença de TTV a partir do DNA obtido do sangue periférico das amostras de todos os grupos. No grupo de indivíduos doadores saudáveis de sangue (DS) a presença do TTV foi encontrada em 6% dos indivíduos analisados (Figura 6). Este resultado é compatível com alguns achados da literatura que utilizam o mesmo conjunto de primers, para a região N22, utilizado em nosso trabalho, onde a prevalência do TTV foi de 5 a 18,6% (Rey et al., 2003; Sherman et al., 2001; Handa et al., 2000; Colombatto et al., 1999).

Knox et al. (2006) delinearum um estudo em pacientes infectados pelo HIV nos Estados Unidos incluindo 86 indivíduos HIV positivos e como controle, 118 indivíduos HIV negativo. Cerca de 38% de pacientes HIV positivos apresentaram infecção pelo TTV. Puig-Basagoiti et al (2000) verificaram elevada prevalência do TTV entre indivíduos infectados pelo HIV na Espanha.

Tem sido demonstrado que indivíduos com elevado risco de contrair viroses de transmissão parenteral, como os hemofílicos, pacientes de hemodiálise e usuários de drogas endovenosas, são particularmente susceptíveis à infecção pelo TTV (Okamoto et al., 1998a).

No grupo 1, representado por indivíduos expostos ao HIV-1, a presença do TTV foi encontrada em 21 % dos indivíduos analisados (Figura 7 e 8), uma prevalência baixa, quando comparados com outros achados da literatura onde a prevalência foi de 50% em usuários de drogas intravenosa, 36,5% para grupo de alto risco de transmissão sexual e de 53,3% para a combinação destes dois fatores (Sherman et al., 2001). No presente trabalho, todos os indivíduos positivos para TTV no grupo 1 eram parceiros sorodiscordantes, de convivência sexual há pelo menos dois anos com seus parceiros infectados pelo HIV. Nos grupos 2 (assintomáticos) e grupo 3 (sintomáticos) a presença de TTV foi menor que o grupo 1, sendo 13% e 12% , respectivamente (Figura 9 e 10). Assim como outras doenças oportunistas, em indivíduos imunocomprometidos (HIV infectados), o TTV poderia levar uma maior severidade das doenças. Desta forma investigações clínicas em relação à persistência viral (TTV) em indivíduos imunocomprometidos (HIV infectados) forneceriam indícios do possível papel patogênico para o TTV e suas conseqüências a curto e longo prazo (Debiaggi et al., 2000).

Um estudo realizado em pacientes dinamarqueses reportou a prevalência de 76% entre indivíduos infectados pelo HIV e sugeriu que a presença do TTV era um fator independente na sobrevivência do paciente (Christensen et al., 2000). Sherman et al. (2001) relataram que o TTV é mais prevalente em pacientes infectados pelo HIV em comparação aos pacientes infectados pelo HCV ou outros casos de doença hepática.

Quanto à análise da presença do TTV entre os grupos, houve diferença estatística quando foi comparado o grupo de doadores saudáveis de sangue (DS) com o grupo de indivíduos expostos ao HIV-1 (G-1). Estes resultados são compatíveis com dados encontrados na literatura que usam primers para a mesma região N22 (Debiaggi et al., 2000),

porém foi menos prevalente do que trabalhos que utilizam primer para a região UTR (Rey et al., 2003; Sherman et al., 2001).

Quando comparado os grupos HIV-1 positivos assintomáticos e sintomáticos G-2 e G-3 respectivamente com o grupo de doadores saudáveis de sangue (DS) houve uma maior prevalência do TTV no Grupo 2 (assintomáticos) e grupo 3 (sintomático) porém não significativo para o teste de *ODDS RATIO*. Esta prevalência foi estatisticamente significativa em trabalhos, que utilizaram apenas um grupo de pacientes HIV-1 positivos na ausência de classificação do estágio clínico da infecção, e que utilizaram primers tanto para a região N22 e região UTR (Rey et al., 2003; Sherman et al., 2001; Debiaggi et al., 2000). Quanto às características demográficas relacionadas à idade, etnia e sexo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 2), o que está de acordo com outros trabalhos relacionados (Rey et al., 2003). Em contrapartida Debiaggi et al. (2000) encontrou uma prevalência maior (81.55%) em pacientes masculinos TTVs positivos.

Thom & Petrik (2007) avaliaram os níveis de TTV na medula óssea e no baço de indivíduos HIV negativos, HIV positivos, e HIV positivos que progrediram para AIDS com conseqüente imunossupressão, e observaram que indivíduos com AIDS apresentaram títulos de TTV significativamente mais elevados quando comparados aos outros grupos. Enquanto a análise dos títulos de TTV e do número de linfócitos T CD4⁺ demonstrou uma significativa correlação inversa, demonstrando uma possível associação entre a deterioração do sistema imune e o aumento da carga viral nos tecidos avaliados (Thom & Petrik, 2007).

A presença do TTV não influenciou na contagem de células CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos analisados (Figura 13 e 14). Embora a integridade do sistema imune e o esquema da

terapia antiretroviral possam influenciar na concentração de células T CD4⁺ e supressão da replicação viral, neste trabalho, não houve diferença entre os grupos com TTV ou ausente de TTV. Este vírus é altamente prevalente e apresenta níveis elevados em pacientes infectados pelo HIV. Os elevados níveis de TTV podem refletir o grau de imunocomprometimento destes indivíduos (Shibayama et al., 2001).

Entre os grupos HIV positivos assintomáticos (G-2) e sintomáticos (G-3) não houve diferença estatística em relação à carga viral na presença ou ausência do TTV. Porém houve uma tendência na diminuição na carga viral dos pacientes sintomáticos (G-3) TTV positivos, quando comparados dentro do mesmo grupo TTV negativos (Figura 15). Esta análise foi compatível com o trabalho de Sherman et al. (2001) os quais demonstraram que o número de células T CD4⁺ entre pacientes TTV positivos e negativos HIV infectados não apresenta diferença significativa. Contudo, os mesmos autores observaram uma tendência para carga viral (HIV) diminuída em pacientes TTV positivos. Portanto, é suposto que a infecção do TTV em pacientes infectados pelo HIV-1 pode influenciar na carga viral do HIV-1 conseqüentemente alterando o curso clínico da infecção do HIV-1.

Indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma maior viremia para o TTV que doadores de sangue saudáveis, indicando que a carga viral do TTV é controlada por mecanismos celulares da resposta imune, o que é corroborado pela correlação inversa entre a contagem de células T CD4⁺ e a viremia do TTV (Christensen et al., 2000).

Títulos elevados de TTV têm sido observados em indivíduos com baixa contagem de células T CD4⁺ e também naqueles com alta carga viral HIV (Shibayama et al., 2001; Christensen et al., 2000).

Debiaggi et al. (2000) não observaram associação entre a infecção pelo TTV e estágio clínico, número de células T CD4⁺, HIV-viremia ou tempo da primeira soroconversão, indicando que variáveis clínicas relacionadas à imunossupressão não influenciam a frequência da viremia do TTV.

Tem sido verificado que o TTV altera a carga viral do HIV independentemente a concentração de células CD4⁺. Pacientes com TTV apresentam uma tendência para diminuição da carga viral. Ao contrário, Christensen et al. (2000) sugeriram que a contagem baixa de células CD4⁺ estava associada com elevado nível de TTV e que esta ocorrência era independente de sobrevida. Neste trabalho, pacientes com TTV pertencentes ao grupo dos sintomáticos (G-3) tiveram uma tendência para menor carga viral, embora não houvesse diferença estatisticamente significativa. Shibayama et al (2000) tem demonstrado que o TTV tem sido encontrado significativamente com maior prevalência em pacientes infectados pelo HIV do que o grupo controle de indivíduos normais, com a utilização de primers para região UTR e N22. O título do TTV foi maior em pacientes com AIDS com baixa contagem de células CD4⁺ e elevada carga viral.

Sherman et al (2001) tem reportado a prevalência do TTV em 50% de pacientes usuários de drogas intravenosas. Nosso trabalho encontrou uma elevada positividade entre pacientes infectados e indivíduos expostos ao HIV comparado com doadores normais saudáveis. A incidência mais elevada foi entre os indivíduos expostos (G-1), que não apresentavam histórico de UDI, mas são indivíduos que tiveram relações sexuais desprotegidas com parceiros HIV-1 positivos.

Desde a década de 80, a situação do consumo de drogas passou por duas mudanças radicais, mudando profundamente o panorama do consumo de drogas psicoativas no mundo e no Brasil. Por um lado, o alastramento do consumo de drogas ilícitas, em consequência da expansão mercadológica do narcotráfico e do fracasso, em escala internacional, dos mecanismos de repressão implantados por forças nacionais, a começar pelos Estados Unidos e pelas próprias Nações Unidas. O surgimento da pandemia de AIDS e da disseminação mundial do HIV, considerada inicialmente como uma doença que afetava principalmente os homo e bissexuais, a infecção pelo HIV tomou rumos insuspeitados, de modo que, até hoje, é considerada uma doença que pode atingir a todos. Se as formas de transmissão hoje são totalmente conhecidas, a saber, pelas vias sexual e sanguínea, estas duas formas se sobrepõem e se potencializam. Apesar dos indivíduos do grupo 1, que foram positivos para TTV terem sido submetidos a uma anamnese rigorosa, é possível que além de parceiros sorodiscordantes, estes indivíduos sejam UDI compartilhadas. A utilização de seringas, agulhas ou outros materiais contaminados e compartilhados, transformou-se em um fator adicional, com elevada significância para a disseminação do vírus com tal rapidez que representa, hoje, em termos epidemiológicos, a segunda conduta de risco mais frequente, alcançando mesmo o primeiro lugar em alguns países europeus. No Brasil, segundo dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, o uso de drogas injetáveis representa o segundo comportamento de risco mais frequente de exposição ao HIV. A infecção pelo HIV não se limita neste meio somente ao compartilhamento de seringas. A grande maioria dos usuários continua a praticar uma vida sexual ativa, quase sempre insegura e imprudente, pois na maioria das vezes a relação sexual ocorre durante o uso de drogas, o que afasta qualquer preocupação com exposição as DST (Doenças Sexualmente Transmissíveis). Por conseguinte, a transmissão aos parceiros sexuais, em particular às mulheres, representa um foco de disseminação constante da AIDS. Deste modo, atrela-se cada vez mais a transmissão

sexual ao consumo de drogas injetáveis e aos problemas sociais que as cercam de um modo multicausal.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, TTV é mais prevalente em pacientes HIV e indivíduos expostos ao HIV em comparação com doadores normais saudáveis. Embora o presente estudo tenha avaliado um pequeno número de indivíduos com presença de TTV, a presença deste vírus foi maior no grupo de indivíduos expostos, parceiros sexuais de portadores do HIV-1, provavelmente UDI, fatores que poderiam contribuir potencializando a transmissão do TTV. Pode-se sugerir que TTV pode tender a diminuir a carga viral independente da concentração de células T CD4⁺, porém, a significância clínica do TTV em associação ao HIV permanece a ser elucidada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham P. TT viruses: how much do we know? *Indian J Med Res.* 2005 122:7-10.
- Aklilu M, Messele T, Tsegaye A, Biru T, Mariam DH, van Benthem B, Coutinho R, Rinke de Wit T, Fontanet A. Factors associated with HIV-1 infection among sex workers of Addis Ababa, Ethiopia. *AIDS.* 2001 15(1):87-96.
- Alarcon JO, Johnson KM, Courtois B, Rodriguez C, Sanchez J, Watts DM, Holmes KK. Determinants and prevalence of HIV infection in pregnant Peruvian women. *AIDS.* 2003 17(4):613-8.
- Allan GM, McNeilly F, Foster JC, Adair BM. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol.* 1994 41(3):267-79.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *science* 1983. 220:868-71.
- Barril G, López-Alcorocho JM, Bajo A, Ortiz-Movilla N, Sánchez-Tomero JA, Bartolomé J, Selgas R, Carreño V. Prevalence of TT virus in serum and peripheral mononuclear cells from a CAPD population. *Peritoneal Dialysis International.* 2000 20:65-68.
- Bassitt L, Takei K, Hoshino-Shimizu S, Nishiya A, Sabino EC, Bassitt RP, Focaccia R, D'Amico E, Chamone DE, Ribeiro dos Santos G. New prevalence estimate of TT virus (TTV) infection in low- and high-risk population from São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002 44(4):233-4.
- Bandinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Vírus a Recently Identified Widespread Infectious Agent of Humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001 98-113.
- Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* 1990 54(3):316-29.
- Berns, KI. *Parvoviridae: the virus and their replication.* In: FIELDS, B.N. et al. *Fields virology*, 3.ed. Philadelphia, Pa: Lippincot-Raven 1996 2173-99.
- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X. Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J Gen Virol.* 1999 (Pt 2):419-24.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no. 488 de 17 de junho de 1998.
- Buve A, Weiss HA, Laga M, Van Dyck E, Musonda R, Zekeng L, Kahindo M, Anagonou S, Morison L, Robinson NJ, Hayes RJ; Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. The epidemiology of trichomoniasis in women in four African cities. *AIDS.* 2001 Suppl 4:S89-96.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral MMWR. 2001 50 (RR-19): 1-58.

Chen BP, Rumi MG, Colombo M, Lin YH, Ramaswamy L, Luna J, Liu JK, Prati D, Mannucci PM. TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood*. 1999 94(12):4333-6.

Christensen JK, Eugen-Olsen J, Sørensen M, Ullum H, Gjedde B, Pedersen BK, Nielsen JO, Krosgaard K. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 2000 81(5):1796-1799.

Colombatto P, Brunetto MR, Kansopon J, Oliveri F, Maina A, Aragon U, Bortoli ML, Scatena F, Baicchi U, Houghton M, Bonino F, Weiner AJ. High prevalence of G1 and G2 TT-virus infection in subjects with high and low blood exposure risk: identification of G4 isolates in Italy. *J Hepatol*. 1999 (6):990-6.

Cozzi LA, Katzenstein TL, Ullum IL. The relative prognostic value of plasma HIV RNA levels and CD4 lymphocyte counts in advanced HIV infection. *AIDS*. 1998 12:789-99.

Correa R, Harari A, Vallelian F, Resino S, Munoz-Fernandez MA, Pantaleo G. Functional patterns of HIV-1-specific CD4 T-cell responses in children are influenced by the extent of virus suppression and exposure. *AIDS*. 2007 21(1):23-30.

D'Amico R, Yang Y, Mildvan D, et al., Lower CD4+ T lymphocyte nadirs may indicate limited immune reconstitution in HIV-1 infected individuals on potent antiretroviral therapy: analysis of immunophenotypic marker results of AACTG 5067, *J. Clin. Immunol*. 2005 25 (2): 106–115.

Debiaggi M, Zara F, Sacchi P, Bruno R, Mzzucco M, Poma R, Raffaldi F, Gerace L, Perini M, Pistorio A, Romero E, Filice G. Transfusion-transmitted virus infection in HIV-1 seropositive patients. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000 6:246-250.

Desai M, Pal R, Deshmukh R, Banker D. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *Journal of Medical Virology*. 2005 77:136-143.

Elrefaei M, McElroy MD, Preas CP, et al., Central memory CD4+ T cell responses in chronic HIV infection are not restored by antiretroviral therapy. *J. Immunol*. 2004 173 (3): 2184–2189.

Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, MacDonald KS, Ngugi EN, Plummer FA. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996 348(9038):1347-51.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 224(4648):500-3.

Guerra MAT, Veras MASM, Ribeiro AF. Epidemiologia In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 2 ed. 2002; 88-99.

- Handa A, Dickstein B, Young NS, Brown KE. Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion*. 2000 40: 245–51.
- Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology*. 1999 260(1):17-22.
- Hu Y-W, Al-Moslih MI, Ali MTA, Khameneh SR, Perkins H, Diaz-Mitoma F, Roy JN, Uzicanin S, Brown EG. Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 43:3747-3754.
- Irshad M, Sharma Y, Dhar I, Singh J, Joshi YK. Transfusion-transmitted virus in association with hepatitis A-E viral infections in various forms disease in India. *World Journal of Gastroenterology*. 2006 12:2432-2436.
- Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H. Influence of primers on the detection of TTV virus DNA by polymerase chain reaction. *The journal of Infectious Diseases*. 1999 180:1750-1751.
- Kamahora T, Hino S, Miyata H. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol*. 2000 74(21):9980-6.
- Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood*. 1999 93(8):2485-90.
- Kato T, Mizokami M, Mukaide M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Tanaka Y, Kato H, Sugauchi F, Ueda R, Hirashima N, Shimamatsu K, Kage M, Kojiro M. Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 38(1):94-8.
- Kato T, Mizokami M, Nakano T, Orito E, Ohba K, Kondo Y, Tanaka Y, Ueda R, Mukaide M, Fujita K, Yasuda K, Iino S. Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1998 55(2):109-17.
- Khudyakov YE, Cong ME, Nichols B, Reed D, Dou XG, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I, Bower W, Lambert S, Purdy M, Roggendorf M, Fields HA. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. *J Virol*. 2000 (7):2990-3000.
- Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, Mishiro S. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol*. 2000 61(1):165-70.
- Knox KS, Day RB, Kohli LM, Hage CA, Twigg HL III. Functional impairment of CD4 T cells despite normalization of T cell number in HIV. *Cell. Immunol*. 2006 Article in Press.
- Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Lefrere F, Kanfer A, Mariotti M, Lerable J, Thauvin M, Lefevre G, Rouger P, Girot R. Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood*. 2000 95(1):347-51.

- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 1984 225(4664):840-2.
- Luo K, Liang W, He H, Yang S, Wang Y, Xiao H, Liu D, Zhang L. Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in rhesus monkey. *J Med Virol*. 2000 61(1):159-64.
- Lyra AC, Pinho JR, Silva LK, Sousa L, Saraceni CP, Braga EL, Pereira JE, Zarife MA, Reis MG, Lyra LG, Silva LC, Carrilho FJ. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2005 38(5):767-75.
- MacDonald DM, Scott GR, Clutterbuck D, Simmonds P. Infrequent detection of TT virus infection in intravenous drug users, prostitutes, and homosexual men. *J Infect Dis*. 1999 179(3):686-9.
- Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, Marchi S, Ricchiuti A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *Journal of Medical Virology*. 2001 64:190-194.
- Marques A, Masur H. Manifestações Clínicas In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 2 ed. 2002; 99-101.
- Matsumoto A, Yeo AE, Shih JW, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology*. 1999 30(1):283-8.
- Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR Jr, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, Gupta P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med*. 1995 15;122(8):573-9.
- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 1997 126(12):946-54.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 16(3):1215.
- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol*. 1999 73(5):3582-6.
- Miziara ID, Araujo Filho BC, Weber, R. Aids e estomatite aftóide recidivante *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2005 71(4): 517-20.
- Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, Grassi E, Gennazzani A, Bendinelli M. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis*. 2000 181(2):803-804.

- Muljono DH, Nishizawa T, Tsuda F, Takahashi M, Okamoto H. Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol*. 2001 146(7):1249-66.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 96(6):3177-82.
- NCBI. National Center for Biothechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol*. 1999 57(3):259-63.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Comm*. 1997 241: 92-97.
- Oguchi T, Tanaka E, Orii K, Kobayashi M, Hora K, Kiyosawa K. Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J Gastroenterol*. 1999 34(2):234-40.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol*. 1998a 56(2):128-32.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology*. 1998b 10:1-16.
- Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, Sugai Y. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 279(2):700-7.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology*. 1999 259(2):428-36.
- Okamura A, Yoshioka M, Kubota M, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 1999 58(2):174-7.
- Ott C, Duret L, Chemin I, Trepo C, Mandrand B, Komurian-Pradel F. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol*. 2000 81(Pt 12):2949-58.
- Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardi GP, Kahn J, Fox CH, Schnittman SM, Schwartz DH, Corey L, Fauci AS. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med*. 1998 4(3):341-5.

Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyans H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature*. 1994 370(6489):463-7.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993 362(6418):355-8.

Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, Clotet B, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC, Martinez MA. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J AIDS*. 2000 23:89-94.

Rey D, Fuchs A, Frick-Michot E, Meyer P, Lang J-M, Stoll-Keller F. Prevalence and persistence of TT virus DNA in HIV-1 infected individuals. *Clinical and Epidemiological Study*. 2003 31:226-231.

Rizzardi GP, Pantaleo G. The immunopathogenesis of HIV-1 infection. In: Polsky BW, Clumeck N. HIV and AIDS. London: *Mosby-Wolfe Medical Communications*; 1999: 6.1-6.12.

Sherman KE, Rouster SD, Feinberg J. Prevalence and genotypic variability of TTV in HIV-infected patients. *Digestive diseases and Sciences*. 2001 46:2401-2407.

Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Res Commun*. 2000 279:718-724.

Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, Okamoto H. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS*. 2001 15(5): 563-570.

Silva, JAN & Soares, KS. Raça/etnia e vulnerabilidade masculina frente ao HIV. *VI Congresso Brasileiro de prevenção das DST e AIDS*. 2006 Belo Horizonte, Brasil.

Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet*. 1998 352(9137):1394.

Simmonds P, Prescott LE, Logue C, Davidson F, Thomas AE, Ludlam CA. TT virus--part of the normal human flora? *J Infect Dis*. 1999 180(5):1748-50.

Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiro S. Full or near-full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TTV-like mini virus. *Intervirology*. 2000 43:119-23.

Takayama S, Miura T, Matsuo S, Taki M, Sugii S. Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol*. 1999 104(3):626-9.

Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Kato T, Ding X, Ohno T, Ueda R, Sonoda S, Tajima K, Miura T, Hayami M. A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. *J Med Virol.* 1999 57(3):264-8.

Thom K & Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased torque teno virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J. Med. Virol.* 2007 79:1-7.

Valdez H, Connick E, Smith KY, et al., Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease, *Aids* 2002 16 (14): 1859–1866.

Wu, JS. *Transfusion transmitted virus. Dr. Wu's Liver diseases.* (Apr, 2004). Disponível em: <http://olddoc.tmu.edu.tw/chiaungo/profes/TTV.htm>. Acesso em 19 mar. 2005.

Yuki N, Kato M, Masuzawa M, Ishida H, Inoue T, Tabata T, Matsushita Y, Kishimoto H, Sasaki Y, Hayashi N, Hori M. Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis. *J Med Virol.* 1999 59(4):431-6.

Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin XR, Ho WM, Hui P, Johnson PJ. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol.* 2002 66(3):428-34.

Detection of TT virus in HIV-1 exposed but uninfected individuals and in HIV-1 infected patients and its influence on CD4+ lymphocytes and viral load.

Thiago Franco Nasser (M) - Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil.

Este artigo esta sendo submetido para revista Microbial Pathogenesis

ABSTRACT

The TT virus (TTV) was detected for the first time in the serum of a patient with post-transfusion hepatitis of unknown origin. TTV was subsequently, also found in the serum of blood donors with no history of blood transfusion. In the present study, the percentage of TTV carriers among HIV-infected and noninfected patients was determined. The study was conducted to evaluate CD4 count and HIV viral load in 100 asymptomatic patients infected with HIV-1, 100 symptomatic patients with AIDS, 100 HIV-1 exposed but uninfected individuals and 100 normal healthy blood donors. In this work, the presence of TTV was investigated by nested-PCR. TTV was detected in 6% of normal donors, 12.5% of HIV-infected individuals and 21% of exposed individuals. The presence of TTV was statistically significant in the HIV-exposed individuals (21/100) compared with blood donors (6/100). ODDS RATIO = 4.16 (95%CI 1.60 – 10.83). No inter-group relations were found for CD4 and CD8 counts or HIV viral load. In the symptomatic group, patients with TTV presented minor viral load. This work demonstrated that TTV was detected in HIV-exposed individuals and no relation was verified for CD4, CD8 and viral load in the asymptomatic and symptomatic HIV patients.

Keywords: TTV, HIV, Viral load, CD4 cells.

1. INTRODUCTION

The TT virus (TTV) was first described in patients with post-transfusion hepatitis by [1], who designated this agent as TTV, after the initials of the patient in whom it was discovered. However, taxonomists have since proposed that the full name Torque Teno Virus be used for TTV, within the genus Anellovirus [2, 3]. The viral genome is a circular molecule of negative-sense single stranded DNA of approximately 3.8 kb and is organized in at least two open reading frames (ORF1 and ORF2, with potential coding capacity for approximately 770 and 202 amino acids, respectively) and a noncoding region (UTR) containing regulatory elements believed to be involved in virus replication [4].

TTV DNA has been detected in liver and bile specimens at concentrations 10-100 times higher than in the corresponding plasma samples and in fecal extracts at lower concentrations [5, 6]. Maggi *et al.* (2001) [7] demonstrated TT virus loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells.

TTV is usually detected by PCR [7, 8], which coupled with the higher frequency of TTV infection in patients with liver disease [9] or hemophiliacs [10] or in coinfection with other hepatotropic viruses [11, 12, 13] compared to blood donors, as reported in initial studies, suggested a pathogenic role for this virus. However, subsequent studies revealed a similar prevalence across these groups and studies on TTV pathogenesis suggest weak or no pathogenic capability [14, 15]. Recently, it was verified that TT infection is prevalent both in patients and healthy individuals in India. However, it shows no significant correlation with other hepatitis viral infections, nor does it demonstrate any evidence of severe liver patients, suggesting that TTV does not cause severe liver damage [16].

The significant diversity of the TTV genome allows for its classification into more than 30 genotypes. Several studies have shown that TTV is distributed widely throughout the

world [17, 18]. Due to its high genetic heterogeneity, TTV is currently subdivided into five highly divergent genogroups, designated 1 to 5. It has been verified that in TTV positive people, multiple-genogroup infections were common and associated with higher viral loads than would be expected from simple additive effects, however, the latter observation was restricted to the infections which included both genogroups 1 and 3, indicating the possible existence of some kind of infection facilitation between these genogroups [19].

Several reports have been published on the prevalence of TTV infection in patients infected with HIV [20, 21, 22]. This population is of special interest because of immunosuppression and the frequency of coinfection.

In this work, the presence of TT virus was investigated in HIV-1 exposed but uninfected individuals, including intravenous drug users, and in HIV-1 infected patients, as well as its influence on CD4+ lymphocytes and viral load.

2. RESULTS

The prevalence of TTV DNA in HIV-infected patients (G3 and G4) was 12.5% (25/200) and 6% (6/100) among the blood donors (G1), using primers for the detection of 197bp localized in a region of the large ORF-1. The virological status of TTV in the healthy blood donors (G1), HIV-1 exposed but uninfected individuals (G2), asymptomatic patients infected with HIV-1 (G3) and symptomatic patients with AIDS (G4) are shown in Figure 1, without considering the use of antiretroviral therapy. TTV DNA was detected in all groups, however, among individuals exposed to HIV (G2), it was significantly higher when compared with normal donors (G1) (OR: 4.16; 95%CI: 1.60-10.83). A very low prevalence of TTV was observed in healthy blood donors (6%).

To analyze primer specificity, three randomly chosen samples were sequenced and compared with data in the NCBI-NIH database. The analysis demonstrated that the amplified fragment was compatible with a sequence in the GenBank, under accession **AB008394**.

The presence of TTV was evaluated in terms of CD4+ count and viral load in HIV-positive subjects. The mean CD4+ among TTV positive HIV patients (G3 and G4) was 597 cells/mm³ and 341 cells/mm³, respectively, and 941 cells/mm³ in the exposed individuals (G2), however, no significant differences were found. The mean CD8+ among TTV positive HIV patients (G3 and G4) was 1114 cells/mm³ and 974 cells/mm³, respectively, and 528 cells/mm³ in the exposed individuals (G2), however, again no significant differences were found. The CD4+ and CD8+ count was similar between these three groups in relation regarding the absence or presence of TTV, as shown in the Figure 2.

The presence of TTV was also investigated in terms of HIV-1 plasma viral load (Table 1), which was showed no evidence of association with CD4+ and CD8+ T cell counts in asymptomatic and symptomatic HIV patients. Despite the fact that RNA viral load was higher in the group without TTV, no significant difference was found.

3. DISCUSSION

This study investigated TTV DNA in HIV-infected patients, HIV-exposed but uninfected individuals and in healthy blood donors. For TTV DNA detection, N22 primers sets were used. It has been verified that using PCR with UTR primers, TTV DNA was detected in a very high percentage of samples, both from HIV-1 seropositive subjects and from blood donors. The use of PCR with N22 primers was shown to detect viral strains associated with hepatitis of unknown etiology. TTV DNA was found in 43.3% (103/238) of infected patients 9.7% (22/226) of blood donors. The persistence and high frequency of infection detected by PCR with N22 primers in HIV-1 seropositive patients suggest that

further clinical investigation of immunocompromised hosts will provide information that clarifies the pathogenic role of TTV [20]. TTV DNA was detected by N22 PCR in 25.4% of blood donors presenting elevated alanine aminotransferase (ALT) levels at a frequency significantly higher than the 15.7% donors presenting normal ALT levels. In contrast, TTV DNA was detected by UTR PCR at a high frequency (93%) with no difference in prevalence between blood donors presenting elevated ALT levels and those presenting normal levels. These results demonstrated by Itoh *et al.* (1999) [23] indicate that the selection of PCR primers influences TTV DNA detection. Furthermore, these results suggest that restricted TTV genotypes detected by N22 PCR could be associated with liver damage among blood donors. The prevalence of TTV infection was investigated by polymerase chain reaction in low (blood donors, healthy children) and high-risk (hemophiliacs) groups from São Paulo, Brazil, using primers based on the untranslated region (UTR) of the viral genome proved to be much more ubiquitous than the earlier N22 PCR directed to the ORF-1 [24]. Hu *et al.* (2005) [25] investigated the ability of specific primer sets to detect known TTV genotypes and verified that the set of primers RD037/038/051/052 only amplified PCR products for genotype 1. Therefore, in this work the presence of TTV DNA in the peripheral blood cells was investigated using N22 primers specific for TTV genotype 1.

TTV replication has been demonstrated in hepatocyte and leukocyte cell lines [26]. Barril *et al.* (2000) [15] verified the presence of TTV in serum and peripheral mononuclear cells from continuous ambulatory peritoneal dialysis using primers for the ORF1 and ORF 2 regions of TTV. It has been suggested that concealed as a “Trojan horse”, TTV in peripheral blood cells might serve as a TTV reservoir inducing infection and transmission chronicity in some clinical and epidemiological settings [27].

Sherman *et al.* (2001) [28] performed cross-sectional analysis of HIV-infected patients in the United States including 86 HIV positive subjects and 118 HIV negative controls. Thirty

eight percent of HIV positive patients presented TTV infection. Puig-Basagoiti *et al.* (2000) [29] described high TTV prevalence among a large HIV-infected group in Spain.

It has been shown that individuals at high risk of contracting parenterally transmitted viruses, such as hemophiliacs, hemodialysis patients and intravenous drug users, are particularly susceptible to TTV infection [5].

The reported prevalence of TTV in discrete risk groups has been variable. Sherman *et al.* (2001) [28] reported a 50% TTV prevalence among patients with historic use of intravenous drugs. This study found a higher rate of TTV DNA positivity among HIV-infected and exposed individuals compared to HIV-negative blood donors (Figure 1). Therefore, the highest detection for TTV was found in exposed individuals (G2) with a history of intravenous drug use.

A Danish cohort study reported 76% prevalence among subjects with HIV and suggested that the presence of TTV is an independent factor in patient survival [21]. Sherman *et al.* (2001) [28] reported that TTV is more prevalent in HIV-infected patients than patients with HCV alone or compared to other liver disease controls.

Due to the integrity of the immune system, antiretroviral therapy schedules could influence the changes in CD4+ T cell counts and the suppression of viral replication, however, in this work no relation was observed between the groups with or without TTV.

It has been suggested that TTV alters HIV infection in terms of viral load, independent of CD4+ counts. Patients with TTV tended to present lower HIV viral loads. In contrast, Christensen *et al.* (2000) [21] suggested that a low CD4+ count was associated with a high TTV titer and that this was an independent predictor of survival. In this work, patients with TTV from the symptomatic group (G4) tended to present lower HIV viral loads, although without statistical significance. Shibayama *et al.* (2000) [30] demonstrated that using UTR PCR and N22 PCR, TTV DNA was detected significantly more frequently in HIV-infected

patients than in controls. The titer of TTV DNA was significantly higher in HIV-infected patients presenting AIDS, those presenting low CD4 T cell counts or high HIV viral loads.

In conclusion, TTV is more prevalent in HIV patients and HIV-exposed individuals than blood healthy donors. Although the present study evaluated a limited number of subjects, HIV exposed patients presented a higher TTV DNA prevalence, suggesting that this group of individuals might intensify TTV transmission. It is possible that TTV tends to induce low viral load independent of CD4⁺ T cell count, however, the clinical significance of TTV in association with HIV remains to be clarified.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Patients

Following approval from the Human Ethics Committee of Londrina State University (UEL), 400 DNA samples of individuals attending the University Hospital of UEL, Parana, Brazil were evaluated. They were divided in 100 normal healthy blood donors with negative serology for HIV, HBV and HCV (G1), 100 HIV-1 exposed but uninfected individuals (G2), 100 asymptomatic patients infected with HIV-1 (G3) and 100 symptomatic patients with AIDS (G4).

4.2. Sample selection

Screening tests by enzyme immunosorbent assay (ELISA, Murex™ HIV-1.2.0, Murex Biotech Limited, Dartford Kent England, UK), microparticle enzyme immunoassay (MEIA, Abbott AxSYM™ System, HIV-1/2 gO, Abbott GmbH, Weisbaden, Delkenhein, Germany), confirmatory tests of indirect immunofluorescence (slides from Fiocruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil) and Western Blot for anti-HIV-1 (Genelabs Diagnostics, Singapore) were

performed on serum samples, according to standard government procedures. All patients were submitted for antiretroviral therapy.

4.3. TTV-DNA Detection

Genomic DNA was isolate from 5 mL of peripheral blood cells extracted from total blood in the presence of 0.2M NaCl, 0.25% SDS, for 4h at 37°C. After precipitation with ethanol, the pellet was dried and resuspended in 50 µL of *milli Q* water. The presence of TTV DNA was determined by nested PCR (Polymerase Chain Reaction) using a set of four primers, as described by Nishizawa *et al.* (1997) [1] (GenBank Accession **AB 008394**). In this system, the PCR product is a DNA fragment of 197bp localized in a region of the large open reading frame (ORF-1) that has been denominated the N22 region. Reaction conditions for the two PCR rounds were the same (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP and 1.25 units of Taq polymerase) and consisted of an initial denaturation step of 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 10min using a thermocycler (*PCRSprint ThermoHybaid*, Biosystems, São Paulo, SP, Brazil). PCR products of 197 base pairs were analyzed by electrophoresis on acrylamide gel (10%) and detected by a nonradioisotopic technique using a commercially available silver staining method.

4.4. Sequencing

After purification, some products of the second-round PCR were sequenced with MegaBACE1000 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) using a DYEnamicTM ET Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). Sequence analysis of TTV was performed comparing with data in the NCBI-NIH database (Blastn), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

4.5. Flow cytometry analysis for CD4+ and CD8+ T cells

A total of $1-3 \times 10^6$ cells were saturated with purified normal mouse Ig (Becton Dickinson, CA, USA) at room temperature for 10 min. The cells were then incubated for 30 min. at 4°C with the fluorescence isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated monoclonal antibodies (mAB) anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE and anti-CD8-PE. Cell associated immunofluorescence was measured using a FACS Count Flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Baseline and follow-up CD4⁺T and CD8⁺T cell counts were evaluated by flow cytofluorimetry (FACSCount™, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) and the results were recorded as number of cells/mm³.

4.6. HIV viral load assay

The baseline and follow-up plasma HIV-1 RNA levels were obtained by the Cobas Amplicor™ Monitor HIV-1 (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ, USA), with a lower limit of detection of 400 copies/mL and a linear dynamic range of up to 750 000 copies/mL. The viral load was recorded as the number of HIV-1 RNA copies/mL and was log₁₀ copies/ml transformed.

4.7. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the Student t test and Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95%CI), using the software Microcal Origin™ 6.1. A P value ≤0.05 was considered statistically significant.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Thiago Franco Nasser received a fellowship grant from the

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to express their gratitude to GENOPAR for supplying laboratory equipment.

6. REFERENCES

- [1] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA vírus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997; 241:92-7.
- [2] Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol.* 2002; 12:151-8.
- [3] Abraham P. TT viruses: how much do we know? *Indian J Med Res.* 2005; 122:7-10.
- [4] Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Vírus a Recently Identified Widespread Infectious Agent of Humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 98-113.
- [5] Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology.* 1998; 10:1-16.
- [6] Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Lopez-Alcorocho JM, Herrero M, *et al.* Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol.* 2000; 156(4):1227-34.
- [7] Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, *et al.* TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol.* 2001; 64:190-4.
- [8] Martinez NM, Garcia F, Garcia-Valdecasas J, Bernal C, Garcia F Jr, Lopez I, *et al.* Prevalence and viral persistence of TT virus in patients on hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19(11):878-80.
- [9] Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* 1999; 30(2):205-12.
- [10] Chen BP, Rumi MG, Colombo M, Lin YH, Ramaswamy L, Luna J, *et al.* TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood.* 1999; 94(12):4333-6.
- [11] Chattopadhyay S, Das BC, Gupta RK, Kar P. Presence of TT virus infection in chronic hepatitis patients from a hospital in New Delhi, India. *Indian J Med Res.* 2005; 122(1):29-33.

- [12] Hu ZJ, Lang ZW, Zhou YS, Yan HP, Huang DZ, Chen WR, *et al.* Clinicopathological study on TTV infection in hepatitis of unknown etiology. *World J Gastroenterol.* 2002; 8(2):288-93.
- [13] Jeon MJ, Shin JH, Suh SP, Lim YC, Ryang DW. TT virus and hepatitis G virus infections in Korean blood donors and patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(4):741-4.
- [14] Nakano T, Park YM, Mizokami M, Choi JY, Orito E, Ohno T, *et al.* TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol.* 1999; 30(3):389-93.
- [15] Barril G, López-Alcorocho JM, Bajo A, Ortiz-Movilla N, Sánchez-Tomero JA, Bartolomé J, *et al.* Prevalence of TT virus in serum and peripheral mononuclear cells from a CAPD population. *Perit Dial Int.* 2000; 20:65-8.
- [16] Irshad M, Sharma Y, Dhar I, Singh J, Joshi YK. Transfusion-transmitted virus in association with hepatitis A-E viral infections in various forms disease in India. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:2432-6.
- [17] Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Saral Y, Ozden M, Kelestimur N, *et al.* Prevalence and genotypic distribution of hepatitis GB-C/HG and TT viruses in blood donors, mentally retarded children and four groups of patients in eastern Anatolia, Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2005; 58(4):222-7.
- [18] Vasconcelos HCF, Gomes SA, Cataldo M, Niel C. Prevalence and genetic diversity of TT virus genotype 21 (yonban virus) in Brazil. *Arch Virol.* 2003; 148:517-29.
- [19] Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, *et al.* Relationship between total plasma load of Torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4807-10.
- [20] Debiaggi M, Zara F, Sacchi P, Bruno R, Mzzucco M, Poma R, *et al.* Transfusion-transmitted virus infection in HIV-1 seropositive patients. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6:246-50.
- [21] Christensen JK, Eugen-Olsen J, SLrensen M, Ullum H, Gjedde B, Pedersen BK, *et al.* Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2000; 81(5):1796-9.
- [22] Shieh B, Chang MJ, Ko WC, Chen EJ, Wu JC, Lee CF, *et al.* Effects of multiple virus coinfections on disease progression in HIV-positive patients. *Intervirology.* 2003; 46(2):105-13.
- [23] Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H. Influence of primers on the detection of TTV virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1999; 180:1750-1.
- [24] Bassitt L, Takei K, Hoshino-Shimizu S, Nishiya A, Sabino EC, Bassitt RP, *et al.* New prevalence estimate of TT virus (TTV) infection in low- and high-risk population from São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2002; 44(4):233-4.

- [25] Hu Y-W, Al-Moslih MI, Ali MTA, Khameneh SR, Perkins H, Diaz-Mitoma F, *et al.* Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3747-54.
- [26] Desai M, Pal R, Deshmukh R, Banker D. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J Med Virol.* 2005; 77:136-43.
- [27] Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin X-R, Ho WM, *et al.* Frequent detection of the replicative forms of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol.* 2002; 66:428-34.
- [28] Sherman KE, Rouster SD, Feinberg J. Prevalence and genotypic variability of TTV in HIV-infected patients. *Dig Dis Sci.* 2001; 46:2401-7.
- [29] Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, *et al.* Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J AIDS.* 2000; 23:89-94.
- [30] Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, *et al.* Inverse relationship between the titer of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Res Commun.* 2000; 279:718-24.

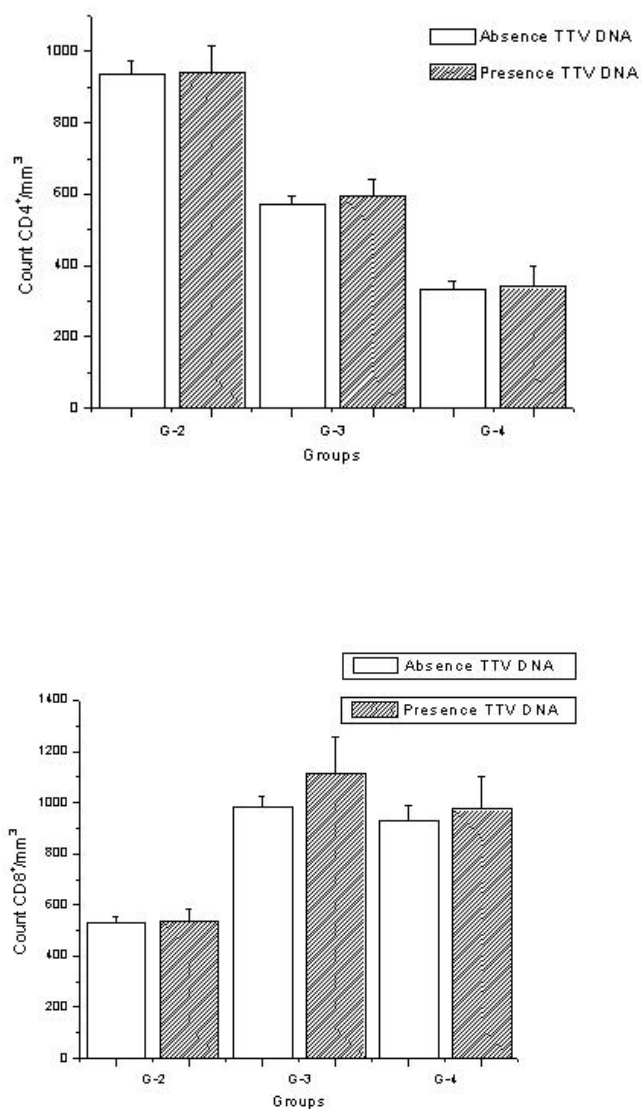


Figure 2. CD4⁺ T cell and T cell counts of HIV-exposed individuals (G2), asymptomatic patients (G3) and symptomatic patients (G4). Cell associated immunofluorescence was measured using a FACS Count Flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Baseline and follow-up CD4⁺T and CD8⁺T cell counts were evaluated by flow cytofluorimetry (FACSCount™, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) and the results were recorded as number of cells/mm³. No statistical differences were found between the groups with and without TTV by the Student t test (Microcal Origin 6.1 Program).

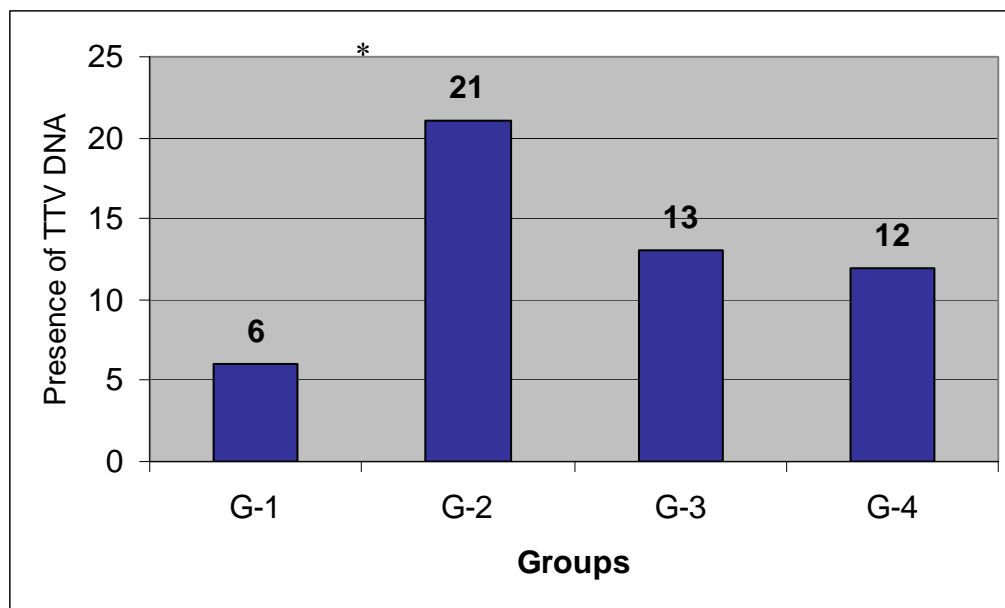


Figure 1. Distribution of TTV in the groups. In this study the individuals were divided into 100 normal healthy blood donors (G1), 100 HIV-1 exposed but uninfected individuals (G2), 100 asymptomatic patients infected with HIV-1 (G3) and 100 symptomatic patients with AIDS (G4). * (ODDS RATIO: 4.16; 95%CI: 1.60-10.83).

Table 1. Detection of TTV, CD4 and CD8 counts and viral load.

Grupos	TTV	
	Positive	Negative
G-2	6	94
G-2	21	79
CD4 (cels/mm ³)	941(±347)	939(±331)
CD8 (cels/mm ³)	538(±215)	528(±210)
G-3	13	87
CD4 (cels/mm ³)	597(±158)	572(±217)
CD8 (cels/mm ³)	1114(±507)	982(±400)
Viral load (Copies/mL)	40710(±31537)	28770(±51930)
G-4	12	88
CD4 (cels/mm ³)	341(±199)	332(±224)
CD8 (cels/mm ³)	974(±432)	932(±512)
Viral load (Copies/mL)	12330(±28938)	38687(±92000)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)