

GIOVANA LOTICI BAGGIO

Avaliação de parâmetros da resposta imunológica na  
co-infecção pelo HIV-1 e vírus das hepatites C e G  
(HGV/GBV-C)

Tese apresentada à Disciplina de  
Infectologia da Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Básicas em  
Infectologia

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

GIOVANA LOTICI BAGGIO

Avaliação de parâmetros da resposta imunológica na  
co-infecção pelo HIV-1 e vírus das hepatites C e G  
(HGV/GBV-C)

Tese apresentada à Disciplina de  
Infectologia da Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Básicas em  
Infectologia

**Orientador:** Prof. Dr. Celso Francisco Hernandez Granato

**Co-orientador:** Dra. Milena Karina Coló Brunialti

São Paulo  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola  
Chefe da Disciplina: Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 05/57611-5 e recebeu apoio do Programa de Reagentes do NIH - *AIDS Research and Reference Reagent Program* e da Empresa Roche Diagnostics.

GIOVANA LOTICI BAGGIO

Avaliação de parâmetros da resposta imunológica na  
co-infecção pelo HIV-1 e vírus das hepatites C e G  
(HGV/GBV-C)

**Presidente da Banca: Dr. Celso F. H. Granato**

**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares:**

Dr. Edelson Morato – Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Otelo Rigato – Universidade Federal de São Paulo

Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto – Universidade Federal de São Paulo

Dra. Maria Cássia Mendes-Correa – Universidade de São Paulo

**Suplentes:**

Dr. Reinaldo Salomão – Universidade Federal de São Paulo

Dr. Celso Spada – Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves – Universidade Estadual de Campinas

Dr. Gilberto Turcato – Universidade Federal de São Paulo

## DEDICATÓRIA

*Ao meu marido Rafael,  
pelo amor e carinho incondicionais,  
pelo incentivo nos momentos mais difíceis e  
e por sempre apoiar meus projetos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Celso Francisco Hernandez Granato, pela confiança depositada nesses anos de Projeto e pela oportunidade de execução desse trabalho.

À Dra. Milena Karina Coló Brunialti, por toda a ajuda e colaboração na co-orientação desse trabalho, pela amizade e companheirismo, pela paciência e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Professor Dr. Reinaldo Salomão, pelas discussões e conversas científicas que muito contribuíram para a execução desse estudo.

À FAPESP, pela bolsa de estudos concedida durante o Doutorado.

À empresa Roche Diagnostics que gentilmente forneceu os testes de ELISA para o GBV-C, não disponíveis no mercado.

Ao NIH, que, por meio do AIDS Reference Reagent Program, forneceu os reagentes utilizados na estimulação específica.

À colega Aline de Jesus Barbosa, pela amizade, ajuda e parceria desde o início desse Projeto.

À colega Andréia Pelegrini, pelo auxílio na realização desse trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Dalboni e aos colegas do Laboratório de Nefrologia, por permitir o uso de equipamentos e, dessa forma, viabilizar a execução desse Projeto.

Ao Professor Éspere Georges Kallas, por permitir o uso do citômetro de fluxo e, dessa forma, viabilizar o término desse trabalho.

*À colega Marístela Miyamoto, pela troca de experiências com ativação celular.*

*À equipe do CCDI, especialmente às enfermeiras, que sempre que preciso auxiliaram na coleta das amostras, e ao Dr. Paulo Abrão, por toda colaboração oferecida.*

*Aos amigos, pelo apoio e amizade nos momentos mais difíceis.*

*Aos colegas do Laboratório de Virologia e Imunologia: Maria da Luz, Eliana, Michelle Natália, Leandro, Oteló, Sidnéia, Ellen, Aripuanã, Sandra, Marialice, Bianca, Elaine, Elaine Cássia, Viviane... Obrigada pela convivência durante esses anos de trabalho.*

*Ao secretário da Pós-Graduação, Charlys Costa e especialmente aos funcionários do IDIPA, Cássia, Fábio e Celso, sempre dispostos a ajudar.*

*Aos pacientes, que desprendidamente aceitaram participar desse estudo, meu profundo respeito e gratidão.*



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
3.1 Desenho do Estudo .....	40
3.2. Casuística.....	40
3.2.1. Critérios de Inclusão .....	41
3.2.2. Critérios de Exclusão .....	41
3.3. Coleta das amostras de sangue.....	42
3.4. Alocação dos Pacientes nos Grupos.....	42
3.5. Testes laboratoriais.....	43
3.5.1. Detecção e Quantificação do RNA do GBV-C.....	43
3.5.2. Detecção de anticorpos anti-E2 do GBV-C .....	43
3.5.3. Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8.....	45
3.5.4. Quantificação do RNA do HIV .....	45
3.5.5. Quantificação do RNA do HCV.....	46
3.5.6. Genotipagem do HCV.....	47
3.5.7. Avaliação da produção de Citocinas .....	47
3.5.7.1. Separação das CMSPs .....	49
3.5.7.2. Descongelamento das CMSPs .....	51
3.5.7.3. Estimulação das CMSPs <i>in vitro</i> .....	51
3.5.7.4. Detecção da produção de citocinas .....	53
3.5.7.5. Citometria de Fluxo - FACSCanto™ .....	55
3.5.8. Avaliação da Ativação Imune Celular .....	60
3.5.8.1. Sistema QuantiBRITE™ PE .....	61
3.5.8.2. Quantificação do número de moléculas CD38 .....	62
3.5.8.3. Marcação de Superfície para CD38 .....	63
3.5.8.4. Citometria de Fluxo – FACSCalibur™ .....	63

3.5.9. Enzimas Hepáticas .....	65
3.5.10. Análise Estatística.....	67
4. RESULTADOS.....	68
4.1. Perfil geral da Coorte.....	69
4.2. Perfil dos pacientes HIV-HCV .....	70
4.3. Marcadores de Infecção pelo GBV-C.....	71
4.4. Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8.....	72
4.5. Quantificação do RNA do HIV .....	73
4.6. Quantificação do RNA do HCV .....	74
4.7. Avaliação da produção de Citocinas.....	75
4.7.1. Controle Negativo e Estímulo Inespecífico .....	76
4.7.1. Estímulos Específicos: Peptídeos Nef e Lisado Viral .....	81
4.8. Avaliação da Ativação Imune Celular .....	94
4.9. Enzimas Hepáticas .....	95
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONCLUSÕES .....	114
7. REFERÊNCIAS .....	116
8. ANEXOS .....	136

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equivalência entre média geométrica de intensidade de fluorescência e moléculas de PE por partícula .....	62
Tabela 2. Características principais da coorte incluída no estudo .....	69
Tabela 3. Principais características dos pacientes HIV-HCV.....	70
Tabela 4. Resultados da contagem de linfócitos T CD4 .....	73
Tabela 5. Resultados da contagem de linfócitos T CD8 .....	73
Tabela 6. Resultados da quantificação do RNA do HIV, para os casos com níveis plasmáticos detectáveis, de acordo com o perfil de infecção. ...	73
Tabela 7. Resultados da quantificação do RNA do HCV, para os casos com níveis plasmáticos detectáveis, de acordo com o perfil de infecção. ...	74
Tabela 8. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células TCD4, de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico.....	77
Tabela 9. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células TCD8, de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico .....	78
Tabela 10. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico .....	80
Tabela 11. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células TCD4, de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica .....	82
Tabela 12. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células TCD8, de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica .....	83
Tabela 13. Produção de IFN- $\gamma$ e IL-2 na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica .....	86
Tabela 14. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1 na população T CD4, de acordo com o perfil de infecção. ....	89
Tabela 15. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, na população T CD8, de acordo com o perfil de infecção. ....	89
Tabela 16. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, na população T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção. ....	90
Tabela 17. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, na população T CD4, de acordo com o perfil de infecção. ....	92
Tabela 18. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral HIV-1, na população T CD8, de acordo com o perfil de infecção. ....	92
Tabela 19. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, na população T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção. ....	93
Tabela 20. Expressão do marcador de ativação CD38 nas populações celulares T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção. ....	94
Tabela 21. Avaliação das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT, de acordo com o perfil de infecção. ....	96

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de aquisição de linfócitos em CMSPs. ....	56
Figura 2. Estratégia de análise para identificação da população de células $T_{\gamma\delta}$ .....	57
Figura 3. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ na população de células $T_{\gamma\delta}$ .....	58
Figura 4. Estratégia de análise para identificação da população de células T CD4 e T CD8. ....	59
Figura 5. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ na população de células T CD4. ....	59
Figura 6. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , na população $T_{\gamma\delta}$ .....	60
Figura 7. Região de aquisição das partículas QuantiBRITE™PE. ....	61
Figura 8. Histograma das partículas Quantibrite™PE .....	61
Figura 9. Região de aquisição e análise de linfócitos.....	64
Figura 10. Expressão de CD38 na população de linfócitos T CD8 e T CD4. ....	64
Figura 11. Distribuição dos pacientes de acordo com o perfil de infecção ..	72
Figura 12. Porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$ e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico. ....	79
Figura 13. Porcentagem de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$ e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico. ....	79
Figura 14. Porcentagem de células $T_{\gamma\delta}$ produtoras de IFN- $\gamma$ e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico. ....	81
Figura 15. Porcentagem de células TCD4 produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica.....	84
Figura 16. Porcentagem de células TCD4 produtoras de IL-2, após estimulação específica.....	84
Figura 17. Porcentagem de células TCD8 produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica.....	85
Figura 18. Porcentagem de células TCD8 produtoras de IL-2, após estimulação específica.....	85
Figura 19. Porcentagem de células $T_{\gamma\delta}$ produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef. ....	87
Figura 20. Porcentagem de células $T_{\gamma\delta}$ produtoras de IL-2, após estimulação específica.....	87
Figura 21. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$ e IL-2, nas populações de células T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção. ....	90
Figura 22. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$ e IL-2, na população de células $T_{\gamma\delta}$ , de acordo com o perfil de infecção. ....	91
Figura 23. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$ e IL-2, nas populações de células T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção.....	93
Figura 24. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$ , na população de células $T_{\gamma\delta}$ , de acordo com o perfil de infecção. ....	94
Figura 25. Expressão do marcador de ativação CD38, nas populações celulares T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção. ....	95

Figura 26. Avaliação das enzimas ALT, AST e GGT, de acordo com o perfil de infecção..... 97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3TC	lamivudina
ABC	abacavir
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
AZT	zidovudina
d4T	estavudina
ddi	didanosina
DMSO	dimetil sulfóxido
ELISA	ensaio imunoenzimático
EFZ	efavirenz
GBV-C	vírus GB-C (ou HGV)
GGT	gama glutamiltransferase
HCV	vírus da hepatite C
HGV	vírus da hepatite G (ou GBV-C)
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-10	interleucina 10
IP	inibidor da protease
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
ITRN	inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN	inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
MIP-1 $\alpha$	Proteína Inflamatória de Macrófagos- $\alpha$
MIP-1 $\beta$	Proteína Inflamatória de Macrófagos- $\beta$
MSM	<i>Man that has sex with man</i>
mRNA	RNA mensageiro
NVP	nevirapina
ORF	<i>Open Reading frame</i>
PCR	reação em cadeia de polimerase
PMA	forbol miristato acetato ( <i>Phorbol myristate acetate</i> )
qPCR	PCR quantitativo
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RNA	ácido ribonucleico

SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SDF-2	<i>stromal derived factor-2</i>
TARV	terapia anti-retroviral
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TDF	tenofovir
UDI	usuário de drogas injetáveis

## RESUMO

A infecção pelo GBV-C é freqüente em indivíduos saudáveis e pode permanecer por longos períodos sem a manifestação de sinais e sintomas clínicos. O GBV-C é um flavivírus composto por uma única fita de RNA de polaridade positiva, intimamente relacionado ao HCV. Inicialmente, o GBV-C foi associado à casos de hepatite fulminante de etiologia desconhecida. Estudos posteriores, no entanto, falharam em associar o GBV-C a qualquer doença humana conhecida e o vírus foi negligenciado por um longo período até que estudos sugeriram um efeito benéfico da co-infecção em pacientes HIV soropositivos. Os estudos envolvendo a co-infecção HIV-GBV-C apresentam resultados controversos enquanto trabalhos avaliando a tripla infecção HIV-HCV-GBV-C ainda são raros. Com o intuito de avaliar o efeito do GBV-C sobre pacientes HIV e HIV-HCV co-infectados crônicos, incluímos uma coorte de 159 pacientes HIV soropositivos triados a partir do CCDI-UNIFESP. Os pacientes foram testados para a presença de anticorpos anti-E2 e RNA do GBV-C. Dos 107 pacientes HIV, negativos para o HCV, 41 (38,3%) apresentaram marcadores de infecção pelo GBV-C, dos quais 17 (15,8%) eram virêmicos e 24 (22,4%) positivos para anticorpos anti-E2. Dos 52 pacientes HIV-HCV co-infectados, 24 (46,1%) apresentaram marcadores de infecção pelo GBV-C, dos quais 14 (26,9%) apresentaram viremia e 10 (19,2%) foram positivos para anticorpos anti-E2 do GBV-C. Foram coletados dados epidemiológicos e avaliados marcadores virológicos, imunológicos e de função hepática, além da produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 em células T CD4, T CD8 e T $\gamma\delta$  e da avaliação do marcador de ativação celular CD38 em células T CD4 e T CD8. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de CV do HIV e nem na contagem de linfócitos T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção. A resposta imune, avaliada pela produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 e da expressão do marcador de ativação celular CD38 não diferiu entre os grupos avaliados. A análise univariada demonstrou aumento dos níveis de ALT, AST e GGT no grupo de pacientes HIV-HCV co-infectados e no grupo triplo infectado HIV-HCV-GBV-C. A análise multivariada revelou a influência do GBV-C sobre o aumento da ALT nos pacientes com tripla infecção. Os nossos dados demonstram que o GBV-C não exerce influência positiva sobre a infecção pelo HIV e pode causar sobrecarga hepática, como demonstrado pela elevação da ALT, em pacientes com tripla infecção. Dessa forma, esta interação deve ser vista com cautela até que se exclua completamente a possibilidade de patogenicidade do GBV-C nessa situação.



## ABSTRACT

GBV-C co-infection is frequent in humans and could last for years without clinical symptoms. GBV-C is a flavivirus composed by a single positive RNA strain, closely related to HCV. Initially in its discovery GBV-C was associated with non-A-B hepatitis. However, subsequent studies failed to associate GBV-C with any known human disease and the virus became neglected until a series of studies associated the virus with prolonged survival in HIV infected recipients. Studies evaluating the co-infection presents conflicting results whereas triple HIV-HCV-GBV-C infection remains to be clarified. With the aim to evaluate the effect of GBV-C upon HIV and HIV-HCV co-infected patients, we included a cohort of 159 HIV-seropositive patients from CCDI-UNIFESP. The patients were tested for the presence of anti-E2 antibodies and GBV-C RNA. Of the 107 HIV seropositive patients negative to HCV infection, 41 (38,3%) were positive to GBV-C infection markers, of whom 17 (15,8%) were GBV-C viremic and 24 (22,4%) were positive to anti-E2 antibodies. Of the 52 HIV-HCV co-infected patients, 24 (46,1%) were positive to GBV-C infection markers, of whom 14 (26,9%) were viremic and 10 (19,2%) presented anti-E2 antibodies. Epidemiological data were collected; virological and immunological markers and also hepatic function were evaluated. Besides, IFN- $\gamma$  and IL-2 production on CD4, T CD8 and T $\gamma\delta$  cells and CD38 activation marker on T CD4 and T CD8 cells were also evaluated. No significant differences on HIV viral load nor on T CD4 and T CD8 cell counts were observed, according to the infection profile. Immune response, evaluated by the IFN- $\gamma$  and IL-2 production and by the CD38 expression did not differ among the groups studied. Univariate analysis demonstrated higher ALT, AST and GGT levels in the HIV-HCV co-infected and HIV-HCV-GBV-C triple infected patients. The multivariate analysis demonstrated that the GBV-C influences ALT levels on triple infected patients. Our results demonstrate that GBV-C does not exerts beneficial effects upon chronically HIV infected patients, unlike, it can cause hepatic overload, as demonstrated by the higher ALT levels in the HIV-HCV-GBV-C triple infected patients. In the light of these results, is reasonable to prudently consider this interaction until the possible pathological role of GBV-C on this situation is completely excluded.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1967 Deinhardt e colaboradores <sup>(1)</sup> na tentativa de obter animais de experimentação para o estudo de hepatites virais, inocularam em saguis o soro de pacientes com quadro de hepatite aguda, dentre eles o de um cirurgião de 34 anos, cujas iniciais eram GB. O animais apresentaram teste de função hepática e biópsia anormais e o soro foi inoculado em passagens seriadas em outros saguis que, da mesma forma, desenvolveram a doença.

Anos mais tarde, em 1995, o *Virus Discovery Group* da empresa *Abbott Laboratories* <sup>(2)</sup>, utilizando amostras de soro originárias de um *pool* de soros de saguis que continham o então denominado "agente GB", inocularam novamente em saguis que no seguimento desenvolveram hepatite. O grupo identificou dois genomas virais distintos nesses animais, os quais foram denominados GBV-A e GBV-B. A caracterização destes dois vírus revelou 27% de homologia nas sequências de aminoácidos e 28% de semelhança com o vírus da hepatite C do sorotipo 1 nas regiões NS3 e NS5B que codificam a helicase e a RNA polimerase RNA-dependente, respectivamente <sup>(3)</sup>. Esta descoberta levou o grupo a desenvolver testes sorológicos baseados nas proteínas recombinantes do GBV-A e do GBV-B com o intuito de determinar a prevalência desses vírus em populações de risco <sup>(4)</sup>. A população africana incluída nesse estudo apresentou elevada soroprevalência para os vírus GBV-A e GBV-B, pelo teste de ELISA. Essas amostras foram posteriormente testadas pela RT-PCR utilizando *primers* degenerados capazes de amplificar uma sequência da suposta helicase viral dos vírus GBV-A, GBV-B e HCV-1. O produto da PCR obtido a partir de uma amostra dessa população revelou a presença de uma seqüência de nucleotídeos característica dos flavivírus. Análises filogenéticas

demonstraram que esse novo vírus era mais proximamente relacionado ao GBV-A, sendo 48% idêntico na sua seqüência de nucleotídeos, e por isso os autores o denominaram GBV-C <sup>(5)</sup>. Como o GBV-C foi identificado em pacientes com evidência clínica de hepatite, mas sem evidências de infecção pelos vírus das hepatites A, B, C, D ou E, esse vírus foi relacionado como agente causador de hepatite humana de etiologia desconhecida. Esta nomenclatura, no entanto, não parece ser a mais apropriada, uma vez que o vírus identificado não foi derivado de nenhuma das passagens que continham o "agente GB". No mesmo ano, a *Genelabs Technologies* <sup>(6-7)</sup> anunciou a descoberta do HGV (vírus da hepatite G), um novo vírus, intimamente relacionado ao GBV-C, supostamente causador de hepatite em humanos. A posterior análise das seqüências genômicas e a análise filogenética revelaram que se tratava de dois isolados do mesmo vírus, com 82% e 96% de homologia nas seqüências de nucleotídeos e no genoma viral, respectivamente. Desta forma, ambas as nomenclaturas, GBV-C e HGV, são aceitas e utilizadas na literatura. A partir desse momento a primeira será utilizada nesse trabalho.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo GBV-C é definido pela detecção do RNA do vírus no plasma, feita pela amplificação do ácido nucléico viral, por meio de métodos moleculares como RT-PCR e *nested-PCR*, utilizando preferencialmente regiões conservadas do genoma viral, como as regiões 5' UTR, NS3 e NS5. O RNA viral pode ser quantificado por *qPCR* (PCR em tempo real) e ensaio do *bDNA* <sup>(5, 8-10)</sup>. Técnicas como hibridização *in situ* e RT-PCR *in situ* podem ser utilizadas com o intuito de identificar os sítios de replicação do GBV-C <sup>(11)</sup>.

O diagnóstico de resolução da infecção pode ser feito pela presença de anticorpos direcionados à proteína E2 do envelope viral. A porção

hidrofóbica localizada na região N-terminal da proteína E2 contém 2 resíduos de asparagina glicosilados e 4 resíduos de cisteína que formam uma estrutura semelhante a uma alça (*loop*), que fica exposta na superfície do vírus <sup>(12)</sup>. O reconhecimento dessa região antigênica desencadeia a resposta imune humoral com o desenvolvimento de anticorpos anti-E2 que podem ser detectados por imunoenaios <sup>(13-14)</sup>. O desenvolvimento de anticorpos específicos contra a glicoproteína E2 do envelope do GBV-C é responsável pela queda da viremia, eliminação da infecção e imunização contra infecções posteriores, na maioria dos indivíduos infectados (15). Cerca de 50 a 74% dos indivíduos saudáveis eliminam as infecções, enquanto uma pequena minoria permanece infectada por anos sem apresentar sinais ou sintomas clínicos <sup>(16-17)</sup>. Os mecanismos pelos quais o GBV-C evade da resposta imune e desenvolve infecção crônica, assim como as taxas de progressão da infecção para a fase crônica, ainda não são conhecidos, embora estudos relacionem os alelos HLA DQ7, DR15 e DR8 a taxas mais elevadas de *clearance* viral <sup>(18)</sup>. O vírus também pode ser eliminado sem o desenvolvimento de anticorpos <sup>(19)</sup>, além disso, a presença simultânea de RNA viral e anticorpos direcionados à proteína E2 do GBV-C, embora rara e possivelmente um estágio de transição, também pode ocorrer.

A transmissão do GBV-C ocorre pelas vias parenteral, sexual e materno-fetal <sup>(20-25)</sup>. A transmissão sexual parece ser muito eficiente e especula-se que seja a responsável pela transmissão do GBV-C em indivíduos sem risco parenteral, já que a prevalência do GBV-C é semelhante entre pacientes infectados pelo HIV pela via sexual e aqueles que o adquiriram pela via parenteral <sup>(26-27)</sup>. Por outro lado, estudos também relatam maior risco de exposição ao GBV-C em MSM <sup>(28)</sup>.

O GBV-C tem distribuição mundial e a infecção é encontrada em indivíduos saudáveis. Dados epidemiológicos demonstram a elevada prevalência da viremia na América do Norte e Europa, com taxas variando de 0.9 a 4% e da América do Sul, África e Ásia, com taxas que variam de 8 a 15%<sup>(8, 16, 29-33)</sup>. Estudos de seguimento mostram que cerca de 80% das pessoas saudáveis eliminam a viremia com concomitante desenvolvimento de anticorpos dirigidos à proteína E2 do GBV-C<sup>(13, 22)</sup> e dessa forma, cerca de 20% permanecem cronicamente infectados por um longo período. Estudos apontam que a maior prevalência de viremia ocorre entre as populações com histórico de exposição a sangue e hemoderivados<sup>(34)</sup> e usuários de drogas injetáveis, sendo que 70% apresentam anticorpos anti-E2, indicativos de infecção progressiva<sup>(32)</sup>.

No Brasil, a prevalência de viremia pelo GBV-C entre doadores de sangue e voluntários saudáveis está situada entre 5% a 10%. Um estudo publicado em 1998 e realizado no Rio de Janeiro pelo Instituto Osvaldo Cruz<sup>(35)</sup> avaliou a presença de RNA do GBV-C e anticorpos anti-E2 em 268 amostras de indivíduos sem doença hepática, com idade entre 0 e 8 anos. Os autores demonstraram que a soroprevalência é baixa (2,3%) entre crianças abaixo dos 10 anos de idade, aumenta (18%) entre adultos jovens, com idades entre 21 e 30 anos, e diminui nos grupos de maior idade. De acordo, a prevalência de anticorpos anti-E2 foi de 5,6% entre os indivíduos de 18 a 24 anos e aumentou para 35,5% nos indivíduos de 43 a 60 anos.

Em São Paulo, um estudo conduzido pela equipe de Ribeiro dos Santos avaliou a presença de RNA do GBV-C em uma amostra de 1039 indivíduos da população e encontrou uma prevalência de 5,1% de viremia em indivíduos maiores que 5 anos de idade, sendo que a viremia aumentou para 8,3% quando foram avaliados indivíduos de até 39 anos de idade<sup>(36)</sup>.

Outro estudo avaliou a população de doadores de sangue de um hospital de São Paulo e encontrou uma prevalência de 9,7% de RNA do GBV-C nessa população <sup>(37)</sup>.

Dados da região central do Brasil, fornecidos por um estudo de Oliveira e colaboradores <sup>(38)</sup>, demonstram que 7,1% da amostra avaliada naquela região apresentou viremia pelo GBV-C. Este estudo avaliou 241 doadores de sangue e verificou que a maior frequência de viremia ocorreu entre doadores entre 29 e 39 anos.

Filogeneticamente, o GBV-C está classificado como membro da família *Flaviviridae*, sendo intimamente relacionado ao vírus da hepatite C. A comparação da seqüência de aminoácidos revelou que o GBV-C apresenta 30% de homologia com o HCV-1. Análises das seqüências GBV-C e do HCV revelaram que a região de maior homologia é a que codifica a helicase viral <sup>(39-40)</sup>. À exemplo do HCV, o GBV-C é um vírus RNA de fita simples com polaridade positiva. Seu genoma possui aproximadamente 9400 nucleotídeos, contendo uma única região aberta de leitura ou ORF (*open reading frame*) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 2844 aminoácidos que será clivada pelas proteases celulares, dando origem às proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais do GBV-C consistem de duas proteínas do envelope viral: E1 e E2, enquanto as proteínas não estruturais compreendem a NS2 (uma protease), a NS3 (uma serino protease semelhante à tripsina), NS4 (helicase viral), NS5A e NS5B (RNA polimerase RNA-dependente) <sup>(39)</sup>. Experimentos realizados *in vitro* sugerem que o códon AUG imediatamente anterior à região que codifica a proteína E1 é preferencialmente utilizado para iniciar a tradução, atuando como um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) para a iniciação da

tradução da poliproteína, embora existam mais 4 códons AUG com a seqüência codificadora da poliproteína antes deste AUG <sup>(41-42)</sup>.

As proteínas estruturais do GBV-C são consideravelmente diferentes das proteínas E1 e E2 do HCV. Enquanto as proteínas do GBV-C possuem apenas 4 possíveis sítios de glicosilação, a E1 e a E2 do HCV possuem de 5 a 11 sítios <sup>(43)</sup>. Estudos aventam a hipótese de que o reduzido número de glicosilações e a falta de uma região E2 hipervariável podem contribuir para as maiores taxas de *clearance* do GBV-C em relação ao HCV <sup>(40)</sup>.

Enquanto a virologia do HCV já está bem esclarecida, questões como a existência de uma região codificadora da proteína do *core* no genoma do GBV-C permanecem não resolvidas. De acordo com alguns estudos, a existência de uma região codificadora da proteína do *core* tem sido questionada por algumas razões: a) a região aminoterminal próxima à região codificadora da proteína E1 é truncada e muitas vezes ausente; b) diferentes isolados do GBV-C revelaram que a freqüência de polimorfismos nas seqüências de nucleotídeos são quase igualmente distribuídas entre o primeiro, segundo e terceiro códons, sendo que essa distribuição imparcial sugere que esta região é inviável para conter um gene que codifique a proteína do *core*; c) dados de experimentos de tradução *in vitro* demonstraram que somente o AUG na posição 552 é capaz de iniciar a tradução <sup>(8, 17, 44-46)</sup>. Embora a seqüência e a localização da região codificadora do nucleocapsídeo permanecem desconhecidas, o grupo coordenado por Xiang <sup>(47)</sup> demonstrou a presença de uma estrutura semelhante a um capsídeo no interior das partículas virais do GBV-C, à microscopia eletrônica.

Uma vez que ainda não existem dados acerca do ciclo de vida e das estratégias de replicação, presume-se que o GBV-C replica da mesma forma



que os outros flavivirus RNA de fita simples com polaridade positiva, ou seja, por meio de um intermediário de polaridade negativa <sup>(48)</sup>.

O genoma do GBV-C apresenta baixo grau de variação nas seqüências entre os seus genótipos, com cerca de 10% em nível de aminoácidos para a poliproteína inteira, ao contrário do HCV, que possui, por vezes, mais do que 30% de divergência <sup>(5, 49)</sup>. A análise filogenética revela que os isolados GBV-C provenientes de várias regiões do mundo estão distribuídos em 5 genótipos distintos <sup>(50)</sup>. A distribuição geográfica desses subtipos está relacionada à co-evolução dos vírus com o homem, sugerindo que se trata de um vírus antigo que acompanhou as migrações populacionais ao longo da história <sup>(51)</sup>. As informações existentes até o momento sugerem que a maior diversidade é encontrada entre os isolados do GBV-C da África, sugerindo que o vírus surgiu nesse continente <sup>(52)</sup>. Os genótipos 1 e 5 são encontrados na África, enquanto os genótipos 2, 3 e 4 seguiram as rotas de imigração do continente Africano para a Europa e Ásia <sup>(52)</sup>. O genótipo 2 é encontrado na Europa e EUA, enquanto os genótipos 3 e 4 são encontrados no Norte e Sudeste Asiático, respectivamente. O genótipo 2 também é encontrado na América do Sul e América do Norte e inclui isolados provenientes do Japão, Paquistão e Leste da África <sup>(53)</sup>. Além disso, o subtipo 2 pode ser subdividido em dois grupos, 2a e 2b <sup>(54)</sup>. No Brasil, foi descrito predomínio do genótipo 2, responsável por cerca de 80% a 92% das infecções e do genótipo 1, que responde pelas demais 8 a 20% <sup>(38, 55)</sup>.

O GBV-C foi inicialmente considerado o possível agente etiológico dos casos de hepatite não-A-E e o vírus foi intensamente estudado na tentativa de elucidar sua fisiopatologia. Naquele momento, pelo menos dois grupos, um do Brasil <sup>(56)</sup> e outro da China <sup>(57)</sup> demonstraram a presença de RNA do

GBV-C em 10% dos casos de hepatite não-A-E. Além disso, outros estudos associaram a presença de RNA do GBV-C a casos de hepatite fulminante de etiologia desconhecida <sup>(58-60)</sup> e níveis elevados de transaminases <sup>(7, 61)</sup>. Zhao e colaboradores <sup>(62)</sup> seguiram 8 pacientes por um intervalo de 2 anos e detectaram a presença de RNA do GBV-C no plasma e nas amostras de tecido do fígado desses pacientes, utilizando a RT-PCR; os autores concluíram que o GBV-C pode causar hepatite moderada e dessa forma pode ser considerado um agente patogênico moderado. Trabalhos posteriores, no entanto, demonstram que o GBV-C não está associado às hepatites não A-E criptogênicas, nem às hepatites não A-E pós-transfusionais <sup>(17)</sup> e nem mesmo está associado às hepatites fulminantes <sup>(63-68)</sup>. Além disso, estudos relatam que o GBV-C não está associado à doença hepática pós-transplante ou à sobrevida do enxerto <sup>(69-70)</sup> e nem ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular <sup>(71)</sup>. Estudos também demonstraram que não existe associação entre a infecção pelo GBV-C e anemia aplástica <sup>(72)</sup> ou linfoma não-Hodgkin <sup>(73-74)</sup>, no entanto, um estudo recente associa o GBV-C à pleurocardite pós-transfusional <sup>(75)</sup>.

O sítio de replicação do GBV-C tem sido alvo de intensas pesquisas desde a sua descoberta, no entanto, a questão se o GBV-C é capaz de replicar de forma eficiente nos hepatócitos ainda permanece controversa. Dados de estudos *in vitro* demonstram que o GBV-C é capaz de replicar de forma transitória em algumas linhagens celulares de origem hepática como as células HuH-7, PH5GH e HepG2 <sup>(42, 76)</sup> enquanto estudos utilizando hibridização *in situ* foram capazes de demonstrar a presença de RNA genômico do GBV-C em hepatócitos <sup>(11)</sup>. Estudos mais recentes apresentam evidências de que o GBV-C é um vírus linfotrópico e que replica primariamente na medula óssea e no baço <sup>(77)</sup>. RNA de polaridade negativa,

o intermediário necessário na replicação do GBV-C, foi amplificado por PCR a partir de células mononucleares do sangue periférico e de linfócitos T CD4 (42, 48, 78), indicando que o GBV-C pode replicar nessas células (79).

Uma vez que o HBV, o HCV e o GBV-C compartilham as mesmas vias de transmissão, a co-infecção é encontrada em cerca de 10-25% dos pacientes com hepatite B ou C, dependendo da população estudada (80-83). Na maior parte dos estudos, os pacientes co-infectados não diferem clinicamente dos pacientes com infecção apenas pelo HCV. Estes estudos relatam que o GBV-C não influencia a doença hepática, não piora o grau de fibrose e nem tem influência sobre os níveis de enzimas hepáticas (84-89). Em um estudo recente, Claret e colaboradores (90) avaliaram a prevalência da viremia pelo GBV-C em uma coorte de 327 crianças saudáveis que apresentavam níveis normais ou elevados de transaminases, que foram divididas nos grupos A e B e outra coorte, de 38 crianças HCV positivas com transmissão materno-fetal, que constituíram o grupo C. Os autores concluíram que a presença do GBV-C nessas crianças estava relacionada à infecção pelo HCV e que a viremia não estava relacionada aos níveis elevados de transaminases, uma vez que a prevalência não diferiu entre os grupos A e B.

Considerando que vários estudos falharam em associar o GBV-C a qualquer doença humana conhecida e levando em conta a elevada prevalência da infecção entre doadores sadios, a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) não recomenda a triagem de sangue e hemoderivados para este vírus. O interesse pelas pesquisas também diminuiu e o GBV-C ficou esquecido até que os primeiros relatos sobre um possível efeito benéfico no curso da infecção pelo HIV foram publicados, a partir da década de 90.

O primeiro estudo avaliando o efeito do GBV-C sobre o curso da infecção pelo HIV foi publicado em 1998 <sup>(91)</sup>. Outros estudos se seguiram, alguns demonstrando que os pacientes co-infectados evoluem melhor que os pacientes HIV monoinfectados <sup>(46, 92)</sup>, enquanto outros não identificaram qualquer efeito benéfico da infecção pelo GBV-C em pacientes HIV soropositivos <sup>(93-94)</sup>. Entre esses pacientes, a co-infecção HIV-GBV-C é muito freqüente e, em média, 15-39% apresentam viremia, enquanto outros 20-47% são positivos para anticorpos dirigidos à proteína E2 do GBV-C <sup>(61, 95-96)</sup>.

Toyoda e colaboradores <sup>(97)</sup> avaliaram a carga viral (CV) do HIV e as taxas de progressão para AIDS em uma coorte de 41 hemofílicos HIV soropositivos, dos quais, 11 (26,8%) apresentaram viremia pelo GBV-C. Nesse estudo, as taxas de progressão para AIDS e a CV do HIV foram menores no grupo de pacientes co-infectados. Embora não fossem estatisticamente significativos, os resultados obtidos pela equipe de Toyoda certamente atraíram a atenção sobre o GBV-C e inspiraram uma série de outros estudos que tentaram explorar essa possível interação viral. Na seqüência, Heringlake e colaboradores <sup>(98)</sup> também publicaram seus resultados demonstrando que os pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo GBV-C apresentavam contagens de células T CD4 mais elevadas e menor taxa de mortalidade, quando comparados aos indivíduos monoinfectados. No mesmo ano, Sabin e colaboradores <sup>(99)</sup> falharam em demonstrar qualquer efeito positivo do GBV-C em pacientes HIV soropositivos. No entanto, os autores não separaram o grupo de pacientes com viremia pelo HGV/GBV-C dos pacientes positivos para anticorpos anti-E2. Ambos foram classificados como sendo pacientes expostos ao HGV/GBV-C.

Trabalhos posteriores demonstraram diminuição da taxa de mortalidade entre os indivíduos HIV soropositivos com replicação ativa do GBV-C, quando comparados aos indivíduos HIV soropositivos não co-infectados, independente de terapia antirretroviral anterior, profilaxia para infecções oportunistas, contagem de linfócitos T CD4, sexo, idade, raça ou modo de transmissão da infecção <sup>(26, 100-102)</sup>. De acordo com Tillmann e colaboradores <sup>(101)</sup>, a taxa de sobrevivência é mais elevada em pacientes co-infectados pelo GBV-C, mesmo após o desenvolvimento de AIDS.

O grupo de Yeo <sup>(103)</sup> acompanhou pacientes com tripla infecção HIV-HCV-GBV-C por 12 anos e demonstrou que a mortalidade do grupo GBV-C negativo foi aproximadamente 40% maior, mesmo após análise multivariada com ajuste da análise para idade, carga viral do HIV e contagem de células T CD4. A taxa de sobrevivência acumulada foi de 72% nos pacientes com viremia pelo GBV-C, 60% nos pacientes apenas com anticorpos anti-E2 e 40% nos pacientes sem qualquer marcador da infecção pelo GBV-C.

O grupo de Birk <sup>(104)</sup> estudou uma coorte Suíça de 157 pacientes HIV soropositivos, dos quais, 36 (23%) eram GBV-C RNA positivos. Os autores não encontraram diferenças entre os pacientes HIV e os co-infectados pelo GBV-C com relação ao tempo da primeira contagem de células T CD4 abaixo de 200 células/ $\mu$ L, tempo de diagnóstico de AIDS ou mortalidade, independente de fatores prognósticos como idade, sexo, ano de sorocoversão, terapia antirretroviral e profilaxia para PCP.

Estudando outra coorte Suíça, Björkman e colaboradores <sup>(105)</sup> seguiram 230 pacientes HIV soropositivos até o início da instituição da terapia antirretroviral, morte ou última visita, com uma média de 4,3 anos de seguimento. No momento da inclusão, 62 (27%) dos pacientes

apresentaram viremia pelo GBV-C e 69 (30%) tinham anticorpos anti-E2. Os autores concluíram que a presença de viremia pelo GBV-C não está associada à taxa de mortalidade global, nem à taxa de mortalidade decorrente de AIDS e nem mesmo à progressão para AIDS. Em um estudo recente, a equipe de Stapleton <sup>(106)</sup>, avaliando uma coorte de supressores de elite – pacientes que mantêm a carga viral do HIV em níveis indetectáveis, nesse caso, abaixo de 50 cópias/mL, sem o uso de terapia antirretroviral – não verificou qualquer influência do GBV-C no curso da infecção pelo HIV.

Os estudos conduzidos na era pós HAART também apresentam resultados controversos. Alguns desses estudos também demonstraram que pacientes HIV soropositivos com replicação ativa do GBV-C apresentam melhor qualidade de vida, aumento sustentado da contagem de células T CD4 e melhor resposta à terapia antirretroviral, atingindo mais freqüentemente níveis plasmáticos indetectáveis de RNA do HIV <sup>(107-109)</sup>. Em outro estudo, a equipe de Stapleton <sup>(110)</sup> avaliou a interação do GBV-C com a IL-2 no tratamento de pacientes HIV soropositivos que estavam fazendo uso de HAART, participantes do ACTG (*AIDS Clinical Trials Group*). Os autores sugerem que a viremia pelo GBV-C está associada ao bloqueio da expansão das células T CD4, após tratamento com IL-2. Dessa forma, saber se o paciente apresenta replicação ativa pelo GBV-C pode ser um fator importante na resposta ao tratamento com IL-2.

Embora os primeiros estudos relacionando o suposto efeito benéfico do GBV-C sobre a progressão da doença pelo HIV sejam da década de 90, os mecanismos envolvidos no aumento da expectativa de vida e menor taxa de progressão para AIDS nos pacientes co-infectados ainda não estão completamente esclarecidos.

Xiang e colaboradores <sup>(26)</sup> avaliaram o efeito do GBV-C sobre a replicação do HIV *in vitro*. Os autores observaram que o GBV-C foi capaz de reduzir a replicação do HIV, sendo essa inibição mais acentuada quando as células mononucleares foram primeiramente infectadas pelo GBV-C. Estes resultados sugerem que a infecção pelo GBV-C altera as características celulares, tornando essas células menos susceptíveis à infecção e interferindo na replicação do HIV.

Considerando que a infecção pelo GBV-C torna as células menos susceptíveis à infecção pelo HIV *in vitro*, alguns grupos passaram a estudar a hipótese de que este mecanismo de inibição poderia ocorrer via modulação dos receptores e co-receptores para o HIV, sendo este efeito mediado pela indução de quimiocinas.

O HIV infecta as células que expressam o receptor CD4 em sua superfície. Uma vez ancorado, o HIV necessita de um segundo receptor para que ocorra a fusão com as células alvo. Os receptores de quimiocinas CXCR4 presentes em linfócitos e CCR5 em monócitos são os mais importantes no contexto da infecção pelo HIV <sup>(111)</sup>. As  $\beta$ -quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES são ligantes naturais para o CCR5, enquanto as quimiocinas SDF-1 e SDF-2 são ligantes naturais para o CXCR4. A ligação dessas quimiocinas aos seus respectivos receptores provoca a diminuição da expressão dos receptores na superfície celular, diminuindo a disponibilidade de co-receptores para o HIV.

Com o objetivo de avaliar o efeito do GBV-C sobre a replicação do HIV, Xiang e colaboradores <sup>(26)</sup> infectaram células mononucleares com os vírus GBV-C e HIV, *in vitro*. A dosagem do antígeno p24 demonstrou diminuição de 23% da replicação do HIV após 3 dias e 49,4% após seis dias, nas culturas celulares co-infectadas. A expressão de CD4, CXCR4 e

CCR5 foi avaliada por citometria de fluxo, no intuito de verificar se o GBV-C estaria exercendo esse efeito inibidor diminuindo a expressão desses receptores, no entanto, nenhuma alteração foi observada. Em um estudo posterior, a equipe de Xiang <sup>(112)</sup> demonstrou que a expressão do RNAm (RNA mensageiro) para RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e SDF-1, bem como a secreção dessas quimiocinas, estavam aumentados nas células co-infectadas, quando comparadas aos controles. Os autores sugerem que o GBV-C interfere nos mecanismos celulares induzindo a secreção de quimiocinas, o que possivelmente reduziria a expressão dos co-receptores para o HIV. A equipe de Xiang também avaliou o efeito da proteína NS5A do GBV-C *in vitro* e verificou que uma seqüência dessa proteína, contendo 85-aa, foi capaz de diminuir a replicação do HIV em linfócitos por meio da indução de RANTES <sup>(113-114)</sup>.

Considerando que a proteína E2 do HCV, homóloga à proteína E2 do GBV-C, é capaz de interagir com o receptor CD81 <sup>(115)</sup> e alterar a função das células T e NK <sup>(116)</sup>, Nattermann e colaboradores <sup>(117)</sup> também avaliaram a interação entre a proteína E2 do GBV-C com o receptor CD81. Os autores concluíram que esta ligação promove o aumento da secreção de RANTES e a diminuição da expressão do CCR5 e sugerem que este mecanismo pode estar envolvido na diminuição da progressão da infecção pelo HIV nos pacientes co-infectados, uma vez que outros grupos já demonstram que a internalização dos receptores de quimiocinas é um mecanismo capaz de bloquear a entrada do HIV na célula hospedeira <sup>(118-119)</sup>. Em um estudo recente, Jung e colaboradores <sup>(120)</sup> demonstraram que a proteína E2 do GBV-C é capaz de inibir a replicação de cepas X4 e R5 do HIV *in vitro*, sendo que a pré-incubação com anti-E2 anula esse efeito inibitório.



Estudos também sugerem que o GBV-C é capaz de inibir a apoptose das células mononucleares <sup>(121)</sup>. A apoptose, ou morte celular programada, pode ser mediada por receptores, sendo Fas (CD95) e TNFR I os mais bem caracterizados atualmente. Estes receptores se ligam às proteínas sinalizadoras Fas-L e TNF- $\alpha$ , respectivamente, e essa ligação induz a trimerização do receptor e recrutamento dos domínios de morte intracelulares com ativação de uma cascata envolvendo caspases, desencadeando a morte celular <sup>(122)</sup>. A apoptose exerce um papel fundamental no controle das infecções virais, eliminando as células infectadas, sem causar inflamação, no entanto, altos níveis de apoptose podem contribuir para a depleção do sistema imune celular. Na infecção pelo HIV, além de a produção celular estar comprometida, os altos níveis de apoptose são responsáveis pela depleção dos linfócitos T CD4 e comprometimento da resposta imune <sup>(123-126)</sup>. Um estudo recente demonstrou que a infecção pelo GBV-C está associada à diminuição da apoptose via Fas/FasL em indivíduos HIV soropositivos não tratados <sup>(127)</sup>. O efeito antiapoptótico do GBV-C poderia explicar os níveis mais elevados de células T CD4 nos pacientes co-infectados observados em alguns estudos.

Sathar e colaboradores <sup>(128)</sup> verificaram o aumento da contagem de linfócitos T CD3 e T $\gamma\delta$ , e a diminuição da expressão de CD30 em mulheres soropositivas para o HIV co-infectadas pelo GBV-C. Os linfócitos T $\gamma\delta$  apresentam potente atividade citotóxica, são capazes de produzir  $\beta$ -quimiocinas e citocinas, interferindo na replicação do HIV <sup>(129)</sup>. O receptor CD30 é membro da família TNF e está envolvido na regulação dos processos infecciosos virais e é utilizado como marcador que reflete a diminuição da ativação imune e aumento da contagem de células com o perfil Th1 <sup>(130-131)</sup>.

Os autores, no entanto, não avaliaram a produção de citocinas nessa população celular.

Estudos recentes demonstraram aumento da ativação de genes relacionados a cascatas celulares que levam à produção de IFN, em pacientes HIV co-infectados pelo GBV-C. Capobianchi e colaboradores <sup>(132)</sup> avaliaram a expressão dos genes *2-5-OAS*, *MxA*, *interferon AR-1* e *PKR* em pacientes HIV soropositivos com e sem viremia pelo GBV-C e demonstraram que a expressão desses genes estava aumentada nos pacientes co-infectados. Outros estudos também associaram a viremia pelo GBV-C a níveis elevados de mRNA para IFN- $\gamma$  e PKR em pacientes HIV soropositivos, enquanto os níveis de IFN- $\alpha$  não parecem ser afetados nessa situação<sup>(133-134)</sup>. Da mesma forma, Hoseini e colaboradores <sup>(135)</sup> verificaram que os níveis de células produtoras de IFN- $\alpha$  não diferem em função da viremia pelo GBV-C. Estudos também demonstraram que a viremia pelo GBV-C está associada ao aumento da frequência de células dendríticas plasmacitóides (pDCs) expressando CD80, sugerindo que o GBV-C pode promover a maturação das pDCs, o que pode contribuir para o controle da infecção pelo HIV <sup>(133, 136)</sup>. As pDCs são as principais células produtoras de interferons do tipo 1 e estão normalmente diminuídas no paciente HIV soropositivo, no entanto, seus níveis podem ser restabelecidos após a introdução da terapia antirretroviral <sup>(137)</sup>.

Mesmo depois de mais de 10 anos de pesquisas, a questão se a viremia pelo GBV-C está realmente associada a um melhor prognóstico da infecção pelo HIV em pacientes co-infectados ou se é simplesmente marcador de um sistema imune competente, ainda precisa ser esclarecida. Vários fatores, como as diferenças nas populações estudadas, o genótipo do GBV-C, o uso de terapia antirretroviral, podem encobrir o suposto efeito

benéfico da viremia e contribuir para as discrepâncias nos resultados encontrados por diferentes grupos de pesquisa. Além disso, a presença da co-infecção pelo HCV ou HBV, desconsiderada em muitos estudos, também pode mascarar os resultados de estudos avaliando a interação HIV-GBV-C (138).

Sabe-se que a co-infecção pelo HIV acelera o curso da doença pelo HCV, com progressão mais rápida para fibrose e aumento significativo das transaminases (139-140). Estudos relatam ocorrência de carcinoma hepatocelular em idades mais precoces e com menor tempo de evolução em indivíduos co-infetados, além disso, a taxa de *clearance* espontâneo do HCV é menor no paciente co-infetado (141). A terapia antirretroviral parece ser capaz de retardar a progressão para a fibrose, no entanto, também está associada ao desenvolvimento de hepatotoxicidade (142).

Até o momento, poucos trabalhos avaliaram o efeito da replicação ativa pelo GBV-C sobre a doença causada pelo HCV e ainda mais raros são os trabalhos avaliando a tripla infecção HIV-HCV-GBV-C. Dentre eles está um estudo multicêntrico, publicado em 2006, que procurou determinar a distribuição e avaliar o efeito dos genótipos do GBV-C e o efeito do tratamento para o HCV sobre o GBV-C (143). O genótipo 2 foi o mais prevalente, respondendo por 79% das infecções, seguido pelo genótipo 1, com 18% dos casos e pelo genótipo 3, com 3% das infecções restantes. Os autores verificaram que os pacientes infectados pelo genótipo 2 apresentaram maior contagem de CD4, independente do uso de antirretrovirais e CV do HIV. Os autores verificaram, ainda, que o tratamento para hepatite C foi responsável pela perda da viremia pelo GBV-C em 50% dos pacientes e que essa perda não ocasionou piora na evolução da doença pelo HIV.

Em um estudo publicado em 2007, Berzsenyi e colaboradores <sup>(144)</sup> avaliaram o efeito da viremia pelo GBV-C sobre a progressão da doença relacionada à hepatite C em pacientes HIV soropositivos em uso de terapia antirretroviral altamente potente. Em uma coorte de 158 pacientes HIV-HCV co-infectados, 36% apresentavam viremia pelo GBV-C, 23% eliminaram o vírus, enquanto 21% se infectaram durante o seguimento. O grupo HIV-HCV co-infectado pelo GBV-C apresentou menor grau de fibrose e ascite quando comparado ao grupo HIV-HCV. Os autores relatam que não houve diferença nas taxas de mortalidade relacionada à doença hepática entre os grupos avaliados. Curiosamente, os autores observaram que 10 das 25 mortes foram decorrentes de doenças hepáticas e dessas, 9 ocorreram no grupo GBV-C negativo.

Sabe-se que o perfil Th2 está associado ao estabelecimento de infecção crônica pelo HCV, sendo a IL-10 responsável pela indução das citocinas pró-fibróticas IL-4 e IL-13 <sup>(145)</sup>. Além disso, estudos demonstraram que a administração de IL-10 exógena é capaz de elevar os níveis plasmáticos RNA do HCV, além de diminuir a resposta imune celular específica <sup>(146)</sup>. Portanto, as citocinas do perfil Th2 parecem estar envolvidas na patogênese do HCV. Embora esta hipótese ainda não tenha sido suficientemente testada, estudos sugerem que o GBV-C possui efeito imunomodulador *in vivo*. Nunnari e colaboradores <sup>(147)</sup> demonstraram que a infecção pelo GBV-C está associada à manutenção da resposta Th1 em pacientes HIV soropositivos.

Os níveis séricos de IL-4 e IL-10 aumentam progressivamente nos indivíduos soropositivos para o HIV e soronegativos para o GBV-C, enquanto os pacientes co-infectados mantêm intactos os níveis de IL-2 e IL-12. Estudos recentes demonstraram que a produção de citocinas do

fenótipo Th2 está diminuída em linfócitos recentemente infectados pelo GBV-C *in vitro*, sendo esse efeito aparentemente mediado pela proteína NS5A <sup>(148)</sup>. O favorecimento do perfil Th1 em detrimento do perfil Th2 poderia exercer um efeito protetor sobre o curso da infecção pelo HCV e poderia explicar a diminuição da fibrose relacionada ao HCV. Estudos também demonstraram que a progressão para AIDS está relacionada à diminuição da produção de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  e conseqüente aumento da secreção de citocinas como IL-4 e IL-10, que direcionam a resposta Th2 <sup>(149-150)</sup>, ineficiente no controle das infecções virais. O fenótipo Th2 está relacionado ao aumento dos níveis de RNA do HIV, bem como dano ao sistema imune e aumento dos níveis de apoptose, com conseqüente diminuição da contagem de linfócitos T CD4 e progressão acelerada para AIDS. Dessa forma, a viremia pelo GBV-C, favorecendo o fenótipo Th1, poderia exercer um efeito retardador na co-infecção HIV-HCV.

Em um trabalho mais recente, publicado em 2008, Piroth e colaboradores <sup>(151)</sup> avaliaram o efeito da co-infecção pelo GBV-C sobre o curso da infecção e sobre o tratamento para o HCV, em uma coorte de 318 pacientes HIV soropositivos. Além de apresentar contagem de células T CD4 mais elevada, o grupo HIV-HCV-GBV-C não apresentou qualquer diferença nos demais parâmetros avaliados.

Dessa forma, percebe-se que trabalhos que avaliam o possível efeito benéfico do GBV-C sobre a infecção pelo HIV apresentam resultados controversos, enquanto estudos de tripla infecção HIV-HCV-GBV-C ainda são escassos. Além disso, a resposta imune na tripla infecção ainda não foi abordada. Tais constatações abrem novas perspectivas para a investigação do possível papel benéfico da replicação do GBV-C em pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo vírus da hepatite C.

## 2. OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da infecção ativa, traduzida pela presença do RNA viral do GBV-C ou pregressa, definida pela positividade para anticorpos anti-E2 do GBV-C, em pacientes HIV e HIV-HCV co-infectados crônicos.

Para tanto foram investigados:

O efeito da viremia e da presença de anticorpos anti-E2 do GBV-C sobre a produção de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-2 e antiinflamatórias IL-4 e IL-10 nas populações de linfócitos T $\gamma\delta$ , TCD4 e TCD8 em pacientes com viremia pelo GBV-C;

O efeito da viremia e da presença de anticorpos anti-E2 do GBV-C sobre a ativação celular, por meio da quantificação do receptor CD38;

O efeito da viremia pelo GBV-C sobre a carga viral do HIV e do HCV;

O efeito da viremia e da presença de anticorpos anti-E2 sobre as enzimas hepáticas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo transversal de caráter observacional, com inclusão prospectiva de pacientes HIV soropositivos que passaram por entrevista e coleta de sangue para as determinações laboratoriais.

#### **3.2. Casuística**

Participaram deste estudo 159 pacientes HIV soropositivos com diagnóstico comprovado de infecção pelo HIV, segundo a portaria nº59 do Ministério da Saúde. Destes, parte era sabidamente co-infectada pelo HCV.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, conforme consta do processo nº 1296/05, cujo parecer encontra-se em anexo (Anexo I).

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, cada voluntário foi entrevistado individualmente para o preenchimento do questionário CAGE para definição de etilistas e não-etilistas (Anexo III) e de um questionário padronizado (anexo IV) para coleta dos seguintes dados:

##### **1) Identificação**

- a) Nome completo;
- b) RH-HSP;
- c) Data da inclusão

##### **2) Perfil epidemiológico**

- a) Sexo;
- b) Idade;
- c) Forma de exposição para aquisição do HIV: sexual, parenteral, ambos ou não sabe referir (desconhecido).

A análise dos prontuários permitiu a coleta de dados adicionais como:

- a) Tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV;
- b) Diagnóstico: infecção pelo HIV ou co-infecção HIV-HCV;
- c) Tempo de diagnóstico de infecção pelo HCV;
- d) Uso de terapia antirretroviral. Caso positivo:
  - esquema antirretroviral atual;
  - tempo de uso de terapia antirretroviral;
- e) Tratamento para o HCV. Caso positivo:
  - esquema em uso
- f) Ocorrência de infecções oportunistas;
- g) Medicamentos utilizados pelo paciente, além da TARV;

### **3.2.1. Critérios de Inclusão**

1. Ter diagnóstico comprovadamente positivo para o HIV,
2. Estar em acompanhamento regular no CCDI – DIPA,
3. Ter entre 18 e 70 anos,
4. Para diagnóstico de co-infecção HIV-HCV, ter anti-HCV e PCR positivos;
5. Assinar termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II).

### **3.2.2. Critérios de Exclusão**

1. Indivíduos HBsAg positivos;
2. Indivíduos com diagnóstico de hepatopatia de outras etiologias;
3. Indivíduos em uso de medicações hepatotóxicas, exceto ARV;
4. Indivíduos em uso de corticóides;
5. Indivíduos participando de outros protocolos de pesquisa.

### 3.3. Coleta das amostras de sangue

Após a coleta dos dados no prontuário, foi realizada a coleta 80 mL de sangue para os testes laboratoriais, de acordo com a seguinte padronização:

- 5 tubos de heparina sódica, de 10 mL cada para separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) para realização do ensaio de detecção intracelular de citocinas e para avaliação do marcador de ativação CD38;
- 1 tubo seco, de 10 mL para separação do soro para as análises bioquímicas: ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e GGT (gama glutamiltransferase);
- 4 tubos com EDTA de 5 mL cada para contagem de linfócitos T CD4 e CD8, quantificação da carga viral do HIV, carga viral e anti-E2 do GBV-C, carga viral e genotipagem do HCV (para os pacientes co-infectados).

### 3.4. Alocação dos Pacientes nos Grupos

Após os resultados dos testes laboratoriais para GBV-C, cada paciente foi alocado em um dos seguintes grupos:

- **HIV:** HIV soropositivos e negativos para GBV-C e HCV;
- **HIV-HCV:** HIV soropositivos com anti-HCV positivo e GBV-C negativo;
- **HIV-GBV-C:** HIV soropositivos com anti-HCV negativo e GBV-C RNA detectável;
- **HIV-HCV-GBV-C:** HIV soropositivos com anti-HCV positivo e GBV-C RNA detectável;
- **HIV-E2+:** HIV soropositivos com positividade para anticorpos anti-E2 do GBV-C;
- **HIV-HCV-E2+:** HIV soropositivos com anti-HCV e anticorpos anti-E2 do GBV-C detectáveis.

### **3.5. Testes laboratoriais**

#### **3.5.1. Detecção e Quantificação do RNA do GBV-C**

O diagnóstico de infecção ativa, traduzido pela presença de RNA do GBV-C no plasma, foi realizado por meio de uma PCR qualitativa, enquanto a quantificação do RNA do GBV-C nas amostras de plasma foi realizada por técnica de PCR em tempo real. As técnicas foram padronizadas em nosso laboratório <sup>(152)</sup>.

A região 5'UTR do genoma viral foi escolhida para padronização da PCR qualitativa e da PCR em tempo real, pois se trata de uma porção conservada entre todos os isolados do vírus GBV-C. As seqüências genômicas da região 5'UTR depositadas no *GeneBank* foram alinhadas no programa *Sequencher 4.5 (Gene Codes Corporation)*. O total de 119 seqüências de vários países foram alinhadas para que se chegasse ao desenho dos *primers* utilizados na PCR em tempo real.

A PCR qualitativa foi padronizada utilizando os *primers* publicados por Muerhoff e colaboradores <sup>(153)</sup> que amplificam uma porção da região 5'UTR de 452 pares de bases, que compreende a porção onde foram desenhados os *primers* da PCR em tempo real (87 pares de bases). Esses *primers* estão localizados nas seguintes posições e possuem as seguintes seqüências:

Sense: -520 a -499 (21 oligonucleotídeos) 5' CAC TGG GTG CAA GCC CCA GAA 3'

Antisense: -89 a -68 (21 oligonucleotídeos) 5' CGG AGC TGG GTG GCC CCA TGC 3'

O limite de detecção do ensaio para a quantificação do HGV/GBV-C foi estabelecido entre  $10^{10}$  e  $10^2$  genomas equivalentes/ $\mu$ L.

#### **3.5.2. Detecção de anticorpos anti-E2 do GBV-C**

A pesquisa qualitativa de anticorpos anti-E2 contra a proteína E2 do envelope do GBV-C foi feita por meio de ensaio imunoenzimático – ELISA,

utilizando o teste comercial  $\mu$ PLATE Anti-HGenv (lote 1036), doado pela empresa *Roche Diagnostics GmbH*. A presença de anticorpos anti-E2 do GBV-C indica contato anterior com o vírus e resolução da infecção, embora parte dos pacientes infectados elimina a infecção sem produzir anticorpos <sup>(154)</sup>. Dessa forma, a detecção de anticorpos anti-E2, embora a única forma de identificar pacientes que tiveram contato com o GBV-C, não é totalmente eficiente em identificar esses pacientes.

Para esse teste foi utilizado plasma coletado em EDTA estocado a - 80°C. Inicialmente, as amostras foram pré-diluídas em tampão de diluição na relação 1+20 (1 mais 20).

Após homogeneização, 20 $\mu$ L das amostras e controles diluídos foram adicionados nos poços de placas de poliestireno revestidos com antígenos do GBV-C e incubados em agitador de placas, em temperatura ambiente, por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes com solução de fosfato, NaCl e *tween* 20 e as placas foram incubadas com 100 $\mu$ L de tampão conjugado e anticorpo anti-h-Fc $\gamma$  marcado com POD-HRP (*Horseradish peroxidase*), por 1 hora. Os poços, a seguir, foram lavados por mais cinco vezes com a solução de fosfato, NaCl e *tween* 20 e as placas foram incubadas com o substrato-cromógeno (tampão fosfato/citrato e ABTS® cromógeno) por 1 hora, protegidos da luz. A absorbância foi lida em leitor de microplacas (*Labsystems – Multiskan EX*) utilizando o filtro de 405nm.

O *CutOff* do teste foi calculado por meio da fórmula:

$$\text{CUTOFF} = 0,2 \times (\text{MA1} + \text{MA2})$$

Onde 0,2 é o fator dado pelo kit, MA1 é a média da absorbância do controle positivo e MA2 é a média da absorbância do controle negativo.

Os valores abaixo do *CutOff* foram considerados negativos, enquanto os valores acima foram considerados positivos.

### **3.5.3. Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8**

A imunofenotipagem linfocitária foi realizada no Laboratório de Virologia e Imunologia I - UNIFESP por meio de citometria de fluxo, em amostras de sangue total, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/CD3/CD8 (*Becton Dickinson, San Jose, C.A., USA*).

Em resumo, 50  $\mu$ L de sangue total heparinizado foram distribuídos em dois tubos de polipropileno contendo esferas TruCount™ (*Becton Dickinson, San Jose, C.A.,USA*). Foram adicionados 20  $\mu$ L do painel de anticorpos anti-CD3PerCP/CD4FITC/CD8PE. Os tubos foram incubados por 15 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (*Becton Dickinson, San Jose, C.A.,USA*) no programa Multiset™ (*Becton Dickinson, San Jose, C.A.,USA*).

Os valores de referência para a contagem absoluta foram obtidos por meio de uma amostragem realizada pelo Laboratório de Imunologia I, da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias – UNIFESP (dados não mostrados):

- Linfócitos (CD3+): 873 – 2.524 céls/mm<sup>3</sup>
- Linfócitos T helper (CD3+CD4+): 545 – 1.623 céls/mm<sup>3</sup>
- Linfócitos T supressores (CD3+CD8+): 264 – 1.004 céls/mm<sup>3</sup>

### **3.5.4. Quantificação do RNA do HIV**

A quantificação do RNA do HIV (carga viral) foi realizada pelo Laboratório de Retrovirologia do Hospital São Paulo - UNIFESP, utilizando a metodologia *branched DNA HIV-1 RNA 3.0 ASSAY (bDNA – Bayer)*. O *bDNA*

é um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos em fase sólida tipo sanduíche, utilizando moléculas de DNA ramificadas (*bdNA*).

Após o tratamento da amostra com reagente de lise o material nucleico viral é liberado e então hibridizado em solução usando dois conjuntos de sondas de oligonucleotídeos. Uma das sondas serve como captura (localizada na superfície de cada poço da placa) que hibridiza especificamente com o RNA do HIV ligando-o à placa. A segunda sonda serve para fixar o RNA do HIV à placa e também para hibridizar com outro conjunto de sondas: pré-amplificadora e amplificadora (*bdNA*); à essa última se atribui a função de aumentar o nível de sinal da hibridização.

As moléculas de *bdNA* atuam como amplificadoras por se ligarem a uma sonda marcada com fosfatase alcalina. Desta maneira, o sinal gerado pelo complexo HIV RNA-sondas é amplificado para detecção e quantificação do RNA viral. Finalmente, a adição de um substrato quimioluminescente reage com a última sonda e o sinal é lido em um luminômetro. A unidade relativa de luz (RLU) gerada é proporcional à quantidade de RNA do HIV na amostra.

O número de cópias de RNA do HIV é calculado usando uma curva padrão gerada por um conjunto de seis calibradores e três controles HIV externos. A faixa de detecção de 50 a 500.000 cópias/mL apresenta boa linearidade em todo o intervalo.

### **3.5.5. Quantificação do RNA do HCV**

A quantificação do RNA do HCV (carga viral) no plasma ou PCR quantitativo para o HCV foi realizada pelo Centro de Genomas – Laboratório de Biologia molecular especializado em Doenças Infecciosas e Genética

Humana, utilizando a metodologia de *q*PCR (PCR quantitativo – PCR em tempo real) – *TaqMan*<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*).

O limite de detecção é de 200 cópias/mL, sendo que um teste com resultado indetectável não exclui definitivamente a presença da infecção.

### **3.5.6. Genotipagem do HCV**

A genotipagem do HCV foi realizada pelo Centro de Genomas, por meio do seqüenciamento genômico dos produtos de PCR, seguido de Análise Filogenética.

A técnica é utilizada como parâmetro auxiliar no prognóstico e indicação do tratamento. O limite de sensibilidade do teste é de 600 cópias/mL.

### **3.5.7. Avaliação da produção de Citocinas**

A produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 foi avaliada nas populações de células T CD4, TCD8 e T $\gamma\delta$ , após estimulação inespecífica (PMA/ionomicina) e antígeno-específica (peptídeos de Nef do HIV e lisado viral do HIV).

As células T CD4 e T CD8 não reconhecem antígenos não processados. Ao invés disso, essas células reconhecem peptídeos ligados às moléculas MHC de classe I, no caso das CD8 e MHC de classe II, no caso das CD4. Dessa forma, quando se deseja estimular essas células *in vitro*, com a intenção de avaliar a resposta antígeno específica a um determinado patógeno, existe a necessidade de usar peptídeos derivados da proteína de interesse.

Uma questão importante e que deve ser considerada quando se pretende estimular essas populações celulares refere-se ao tamanho dos peptídeos. As células T CD4 respondem a peptídeos de 15 a 20 aminoácidos



de extensão (15-20 *mer*), enquanto as células T CD8 são adequadamente estimuladas com peptídeos menores, de 8 a 12 *mer*. Em um estudo publicado no *Journal of Immunological Methods*, a equipe de Maecker <sup>(155)</sup> demonstrou que ambas as populações celulares podem ser estimuladas de forma eficiente utilizando peptídeos de 15 *mer* e sobreposição (*overlapping*) de 15 aminoácidos.

Em nosso estudo utilizamos um *pool* de 48 peptídeos da proteína Nef, que apresentava exatamente essas características, ou seja, 15*mer* e sobreposição de 11 aminoácidos (*Cat# 5189 - NIH - AIDS Research and Reference Reagent Program - <http://aidsreagent.org>*). Os peptídeos foram recebidos liofilizados e diluídos em DMSO para uso. A concentração de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi utilizada nesse ensaio e escolhida com base no estudo de Maecker e colaboradores <sup>(155)</sup>.

As células  $T\gamma\delta$  são uma população rara no sangue periférico, aproximadamente 3 a 6% das células T expressam o TCR  $\gamma\delta$  <sup>(156)</sup>. Essas células reconhecem antígenos não processados, independente do reconhecimento mediado pelas moléculas MHC <sup>(157-159)</sup>. Neste estudo, o lisado viral do HIV-1 III B (*ABI Advanced Technologies Inc. Columbia, USA*) foi utilizado como estímulo específico para essas células. A dose intermediária de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi definida como a melhor dose nos ensaios prévios de padronização. A dose mínima de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  não foi capaz de induzir resposta demonstrada pela produção das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto a dose máxima de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  provocou alterações na morfologia celular dificultando a análise.

O reconhecimento desses antígenos pelas células T CD4, T CD8 e  $T\gamma\delta$  ativa uma cascata intracelular que culmina com a produção de citocinas.

Neste estudo, brefeldina-A (*Sigma, Saint Louis, MO, EUA*) foi adicionada para inibir a secreção das citocinas produzidas por estas células. As células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos específicos (Anexo IV) para identificação das subpopulações de linfócitos T e das citocinas de interesse, que se acumulam no meio intracelular pelo efeito da brefeldina-A. A citometria de fluxo foi utilizada para medir a produção de citocinas intracelulares antígeno-específicas e identificar a população de células que exibem essa função efetora.

As etapas que envolvem a avaliação da produção de citocinas estão descritas a seguir. Os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica, utilizando técnica asséptica.

#### **3.5.7.1. Separação das CMSPs**

O sangue coletado em tubos contendo heparina sódica foi centrifugado a 2.500 rpm (900 g) por 10 minutos a 22°C. O anel de leucócitos que se forma entre a camada de plasma e de hemácias (papa de leucócitos) foi removido com auxílio de pipeta tipo *Pasteur* e transferido para um tubo contendo 6 mL de solução fisiológica.

O homogeneizado foi transferido suavemente para um tubo cônico de 15 mL contendo 2 mL de ficoll-paque (*GE Bio-Science, Uppsala, Suécia*), com o auxílio de pipeta tipo *Pasteur*, e centrifugado a 2.000 rpm (500 g) por 20 minutos a 22°C.

A nuvem de CMSPs (células mononucleares do sangue periférico) que se forma após a centrifugação foi removida com auxílio de pipeta tipo *Pasteur* e transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 10 mL de meio R10 (Anexo V) e a suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm (300 g) por 10 minutos a 22°C.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução de lise de hemácias (Anexo V) e a suspensão foi incubada por 2 minutos marcados em cronômetro.

Foram adicionados 10 mL de R10 para neutralização da solução de lise. A suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos a 22°C.

O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas por mais 1 vez em meio R10 a 1.500 rpm por 10 minutos a 22°C.

O botão de células foi suspenso e foram acrescentados exatamente 10 mL de meio R10. Uma alíquota de 10 µL foi transferida para um microtubo contendo 90 µL de corante de viabilidade *trypan blue* (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), na diluição 1:10, e as células foram contadas em hemocítmetro. A média de viabilidade celular obtida no ensaio ficou em torno de 98%.

A suspensão de células em meio R10 foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos a 22°C e o sobrenadante foi descartado. O botão de células foi suspenso em meio de congelamento (Anexo V) no volume necessário para obter a concentração de  $1 \times 10^7$  células por mL.

Os criotubos identificados contendo 1 mL de suspensão foram colocados em uma caixa especial para congelamento celular do tipo "*Strata Cooler*", previamente refrigerada a 2-8°C, que foi transferida para um congelador -80°C.

Após 24 horas, os criotubos contidos na "*Strata Cooler*" foram transferidos para o nitrogênio líquido onde foram armazenados para o uso futuro nos ensaios de estimulação *in vitro* para a produção de citocinas e avaliação de marcador de ativação.

### **3.5.7.2. Descongelamento das CMSPs**

As CMSPs previamente separadas e armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas para a realização do ensaio de estimulação *in vitro* para produção de citocinas e para o ensaio de avaliação do marcador de ativação CD38.

As células foram descongeladas rapidamente por meio de agitação leve em banho-maria a 37°C (+/- 1°C).

A suspensão de células descongeladas foi transferida para um tubo de 15 mL, previamente identificado, por meio de pipeta de 1 mL. Utilizando pipeta de 10 mL, foram gotejados 10 mL de R10 em cada tubo. O procedimento foi repetido para cada amostra.

Os tubos foram centrifugados a 22°C a 1300 rpm (200 g) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspendido em 4 mL de meio R10. As células foram transferidas para uma placa de 24 poços e colocadas em estufa a 37°C (+/- 1°C) 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas.

### **3.5.7.3. Estimulação das CMSPs *in vitro***

As CMSPs previamente mantidas em estufa de a 37°C (+/- 1°C) 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas foram transferidas da placa de cultura para tubos de 15 mL previamente identificados. Cada poço foi lavado com 5 mL de R10 e o lavado foi adicionado ao tubo correspondente contendo a suspensão de células. Os tubos foram centrifugados a 1300 rpm durante 10 minutos a 22°C.

O sobrenadante foi desprezado e as células suspendidas em 10 mL de R10. Uma alíquota de 10 µL foi transferida para um microtubo contendo 90

$\mu\text{L}$  de *trypan blue* (diluição 1:10) e as células foram contadas em hemocítômetro.

A concentração foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células por mL, desprezando as células mortas, coradas em azul.

Para cada paciente, foram marcados 4 tubos de polipropileno com capacidade de 15 mL. Cada tubo recebeu um tratamento:

- 1) Controle (-), sem estímulo;
- 2) Controle (+), estimulado com PMA/ionomicina;
- 3) Lisado Viral HIV-1 IIIB e
- 4) Nef HIV-1 B

Dois tubos adicionais foram utilizados para compensar as fluorescências no citômetro de fluxo.

Cada tubo recebeu um tratamento:

- 1) 1 tubo controle (-), sem estímulo
- 2) 1 tubo controle (+), PMA/ionomicina.

Em cada tubo foi distribuído 1 mL da suspensão de células na concentração de  $1 \times 10^6$ .

O tubo "Controle (+)" foi tratado com 20  $\mu\text{L}$  de PMA na concentração de 20ng/mL e 1  $\mu\text{L}$  de ionomicina na concentração de 1mM.

O tubo "Controle (-)" recebeu apenas 5  $\mu\text{L}$  de DMSO (*Sigma, Saint Louis, MO, EUA*).

O tubo "Lisado viral" foi tratado com 5  $\mu\text{L}$  de lisado viral do HIV IIIB diluído em DMSO, na dose de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

O tubo "Nef" foi tratado com um *pool* de peptídeos consenso da proteína Nef do HIV-1 B, diluído em DMSO, na dose de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Em todos os tubos foi adicionado 1 $\mu$ L de cada anticorpo co-estimulatório - CD28 e CD49d - na concentração de 100  $\mu$ g/mL, conforme esquema a seguir:

<b>Controle (-)</b>	<b>Controle (+)</b>	<b>Lisado Viral</b>	<b>Nef</b>
5 $\mu$ L DMSO	20 $\mu$ L PMA 1 $\mu$ L ionomicina	5 $\mu$ L Lisado Viral	5 $\mu$ L pool de peptídeos de Nef
1 $\mu$ L CD28	1 $\mu$ L CD28	1 $\mu$ L CD28	1 $\mu$ L CD28
1 $\mu$ L CD49d	1 $\mu$ L CD49d	1 $\mu$ L CD49d	1 $\mu$ L CD49d
<i>30 minutos de incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> 37°C</i>			
10 $\mu$ L brefeldina-A	10 $\mu$ L brefeldina-A	10 $\mu$ L brefeldina-A	10 $\mu$ L brefeldina-A
<i>15-16 horas de incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> 37°C</i>			

Após receberem os estímulos, os tubos foram tampados frouxamente, colocados em estante em ângulo de 5 graus e incubados por 30 minutos a 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 30 minutos de incubação, foram adicionados 10  $\mu$ L de brefeldina-A diluída em PBS estéril na concentração de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, em cada tubo. Os tubos foram novamente tampados frouxamente e colocados novamente em ângulo de 5 graus na incubadora por mais 15-16 horas a 37°C (+/-1°C).

#### **3.5.7.4. Detecção da produção de citocinas**

Para cada paciente foram marcados tubos de citometria correspondentes aos tratamentos:

- 1) Controle (-), sem estímulo
- 2) Controle (+), estimulado com PMA/ionomicina
- 3) Lisado Viral HIV-1 IIIB
- 4) Nef HIV B.

Os tubos utilizados na compensação das fluorescências foram marcados de acordo com o painel de anticorpos utilizado no experimento, além de um tubo não marcado, contendo apenas células.

As células anteriormente estimuladas e incubadas por 15-16 horas a 37°C (+/-1°C) em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> foram transferidas para os tubos de citometria previamente marcados.

Foram adicionados 3 mL de solução tamponante e os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e procedeu-se a marcação de superfície para T $\gamma\delta$ , CD3, CD8, conforme esquema a seguir:

<b>Controle (-)</b>	<b>Controle (+)</b>	<b>Lisado Viral</b>	<b>Nef</b>
10 $\mu$ L anti-T $\gamma\delta$ FITC	10 $\mu$ L anti-T $\gamma\delta$ FITC	10 $\mu$ L anti-T $\gamma\delta$ FITC	10 $\mu$ L anti-T $\gamma\delta$ FITC
5 $\mu$ L CD3 APC-Cy7	5 $\mu$ L CD3 APC-Cy7	5 $\mu$ L CD3 APC-Cy7	5 $\mu$ L CD3 APC-Cy7
5 $\mu$ L CD8 PerCP	5 $\mu$ L CD8 PerCP	5 $\mu$ L CD8 PerCP	5 $\mu$ L CD8 PerCP

Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Decorridos os 30 minutos de incubação, foram adicionados 3 mL de solução tamponante e os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado, foram acrescentados 750 $\mu$ L de tampão de permeabilização (Anexo V) em todos os tubos e incubados por 10 minutos ao abrigo da luz.

Após a incubação, foram adicionados 3 mL de solução tamponante e os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e as células suspendidas para a marcação intracelular, conforme segue:

<b>Controle (-)</b>	<b>Controle (+)</b>	<b>Lisado Viral</b>	<b>Nef</b>
3 $\mu$ L IL-2 APC	3 $\mu$ L IL-2 APC	3 $\mu$ L IL-2 APC	3 $\mu$ L IL-2 APC
2,5 $\mu$ L IFN- $\gamma$ PE-Cy7	2,5 $\mu$ L IFN- $\gamma$ PE-Cy7	2,5 $\mu$ L IFN- $\gamma$ PE-Cy7	2,5 $\mu$ L IFN- $\gamma$ PE-Cy7

Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Após a incubação, as células foram lavadas com 3 mL de solução tamponante a 1.300 rpm por 10 minutos a 4°C, para remoção do excesso de anticorpos monoclonais não ligados.

O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 300 µL de PBS contendo 1% de paraformaldeído. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto™ (*BD-Biosciences*).

#### **3.5.7.5. Citometria de Fluxo - FACSCanto™**

A avaliação da resposta imune específica contra antígenos do HIV foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCanto™ por meio da mensuração da produção de citocina intracelular nas populações celulares T CD4, T CD8 e Tγδ.

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto equipado com dois lasers, com emissão de comprimentos de onda de 488nm e 633nm. O primeiro laser possibilita a excitação de quatro fluorocromos, FITC, PE, PerCP ou PerCP-Cy5.5 e PE-Cy7, e o segundo excita dois fluorocromos, APC e APC-Cy7. A detecção das fluorescências foi feita em escala logarítmica, enquanto a detecção de FSC e SSC (dispersão frontal e lateral de luz) foi feita em escala linear. A detecção de cada parâmetro e a compensação entre os canais de fluorescências foram acertados para aperfeiçoar a aquisição dos eventos. O citômetro é acoplado à unidade constituída por um microcomputador *HP Workstation XW4200*, que permite controle sobre o citômetro e armazenamento dos dados em arquivo. A aquisição dos dados foi feita por meio do *Software BD FACSDiva™*,

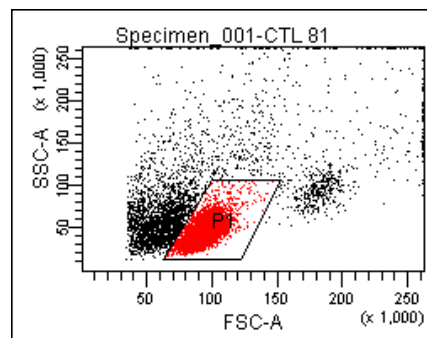


enquanto a análise foi feita utilizando-se o *Software FlowJo™* (*Tree Star, Ashland, OR*).

Enquanto o FACSCallibur™ permite a análise de 4 fluorescências, tamanho (*SSC-Side Scatter*) e complexidade celular (*FSC-Forward Scatter*), o FACSCanto™ permite a análise de até 6 fluorescências ao mesmo tempo, além dos parâmetros de tamanho e complexidade. Esta característica do FACSCanto™ viabiliza a avaliação de mais parâmetros (8 no total) na mesma célula, o que pode significar economia de tempo e de reagentes, além de uma melhor correlação dos resultados.

A Figura 1 mostra a região de aquisição correspondente à região de linfócitos, identificados por apresentarem menor tamanho e baixa complexidade, definidos pela baixa dispersão frontal (*FSC*) e lateral (*SSC*) de luz, respectivamente.

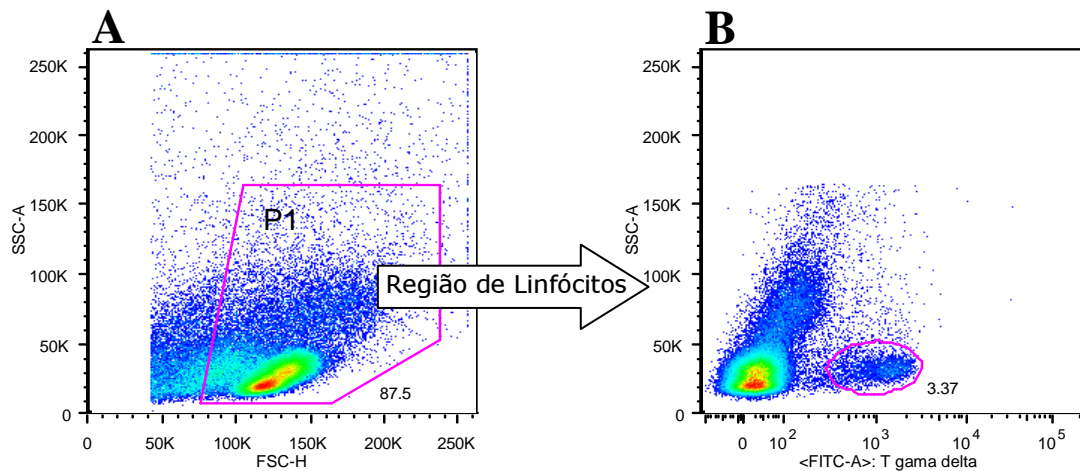
Foram adquiridos 70.000 eventos na região P1. Os dados foram armazenados no computador para análise posterior.



**Figura 1. Estratégia de aquisição de linfócitos em CMSPs. O gráfico mostra a região de aquisição correspondente à região de linfócitos (P1).**

Para análise dos resultados arquivados construiu-se um gráfico de dispersão frontal e lateral de luz onde foi desenhada a região P1, característica da morfologia de linfócitos (Figura 2-A).

Em outro gráfico de dispersão lateral de luz (SSC) *versus* expressão do TCR  $T\gamma\delta$ -FITC foi delimitada a região que separa os eventos positivos para este receptor, com o objetivo de identificar a população de linfócitos  $T\gamma\delta$  (Figura 2-B).



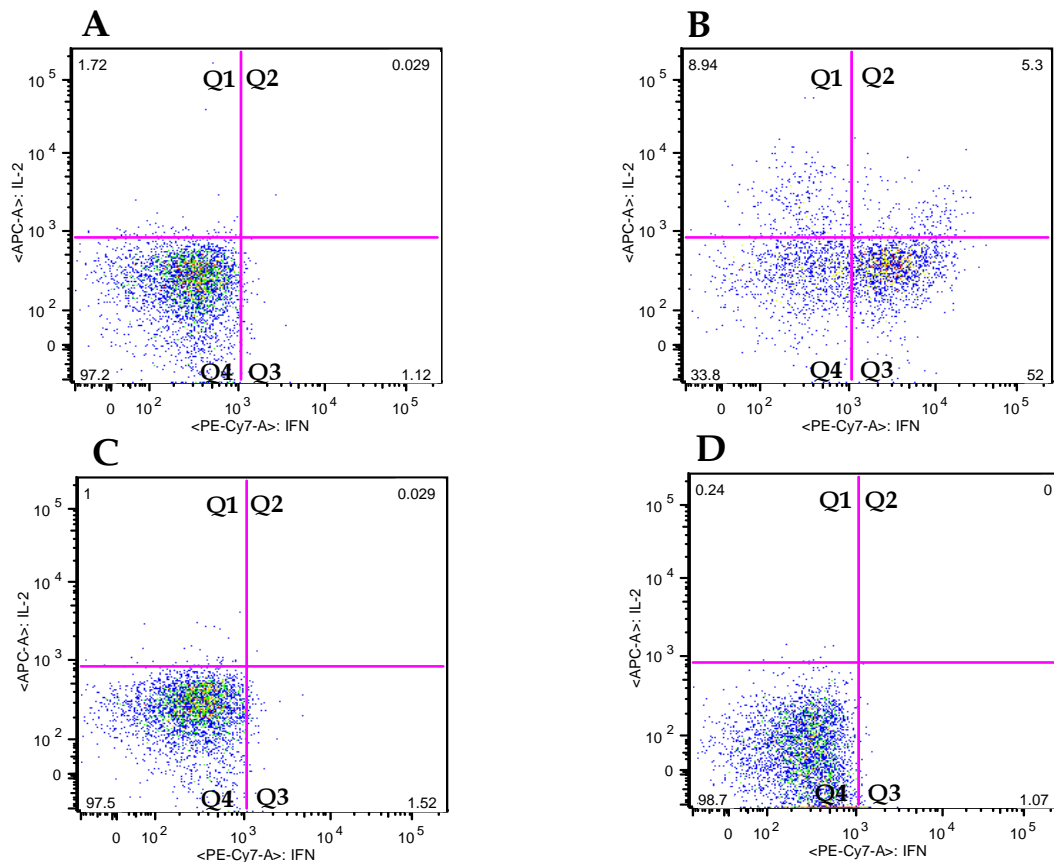
**Figura 2. Estratégia de análise para identificação da população de células  $T\gamma\delta$ .** (A) O gráfico mostra a região de análise correspondente à região de linfócitos, identificados por menor tamanho e baixa complexidade, definidos pela baixa dispersão frontal (FSC) e lateral de luz (SSC), respectivamente. (B) O gráfico mostra a identificação das células positivas para o receptor de superfície  $T\gamma\delta$  (3,37%).

Após a delimitação das células positivas para o TCR  $T\gamma\delta$  conforme descrito na Figura 2 foi possível analisar a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  nessa população (Figura 3).

Observa-se na Figura 3-A que a maior parte dos eventos (97,2%) está contida em Q4, região negativa para os fluoróforos utilizados para marcar as citocinas de interesse, um resultado esperado, uma vez que o controle negativo não recebe estímulo.

Após estimulação com PMA/Ionomicina observa-se intensa produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, enquanto apenas 33,8% das células, localizadas no quadrante negativo (Q4), não estão produzindo citocinas (Figura 3-B). Já na Figura 3-C/D, observam-se os tubos que foram estimulados com lisado viral

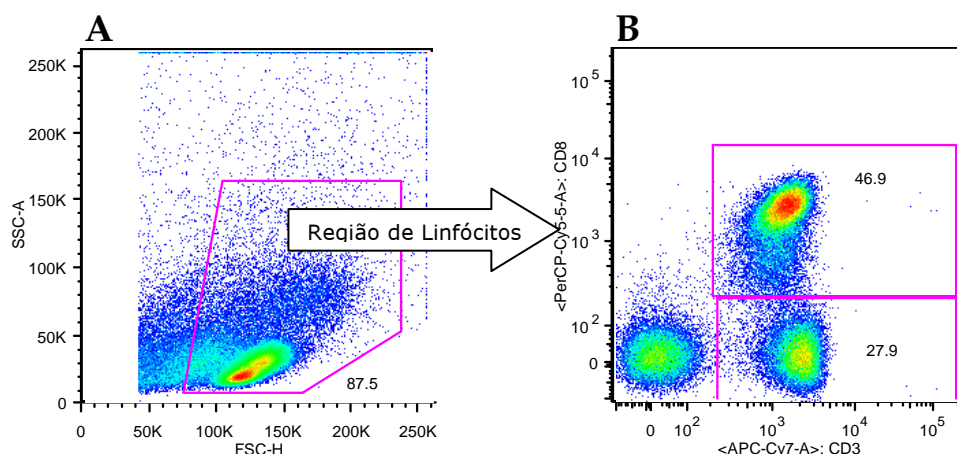
e *pool* de peptídeos de Nef, sendo que a maior parte dos eventos, senão quase que a totalidade, está contida no quadrante negativo (Q4).



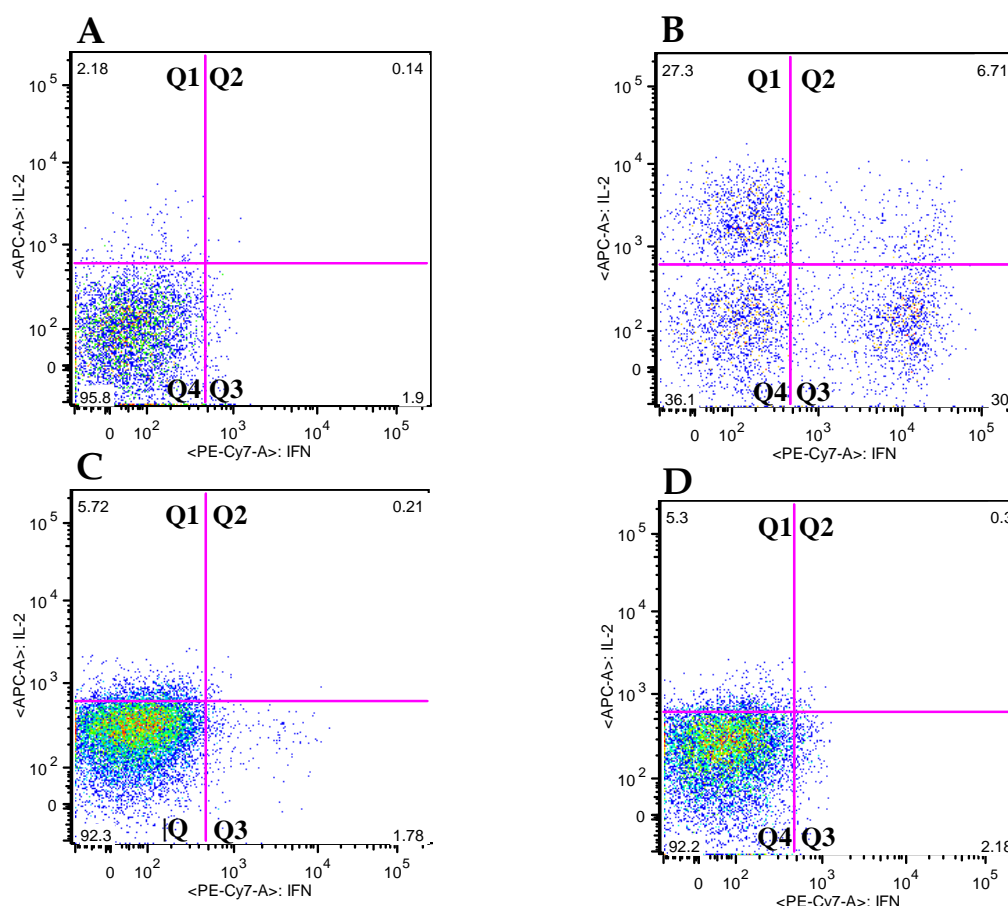
**Figura 3. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  na população de células T $\gamma\delta$ .** (A) Controle Negativo, (B) PMA/Ionomomicina; (C) Lisado Viral, (D) Pool de peptídeos de Nef. Em Q1 observa a porcentagem de células produtoras de IL-2; em Q2 estão contidas as células que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  simultaneamente; em Q3, a porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto as células não produtoras de citocinas estão contidas em Q4.

Outro gráfico foi utilizado para identificar as populações T CD4 e T CD8, a partir do gráfico de dispersão frontal (FSC) versus lateral (SSC) de luz (Figura 4).

A população de células T CD8 foi definida pela dupla positividade CD3-APC-Cy7/CD8-PerCP, enquanto a população T CD4 foi positiva para o receptor de superfície CD3 marcado com o fluoróforo APC-Cy7 e negativa para o fluoróforo PerCP que marca o receptor CD8 (CD3+CD8-). A utilização do PMA diminui a expressão dos receptores CD4, o que impossibilita a marcação direta desta população.

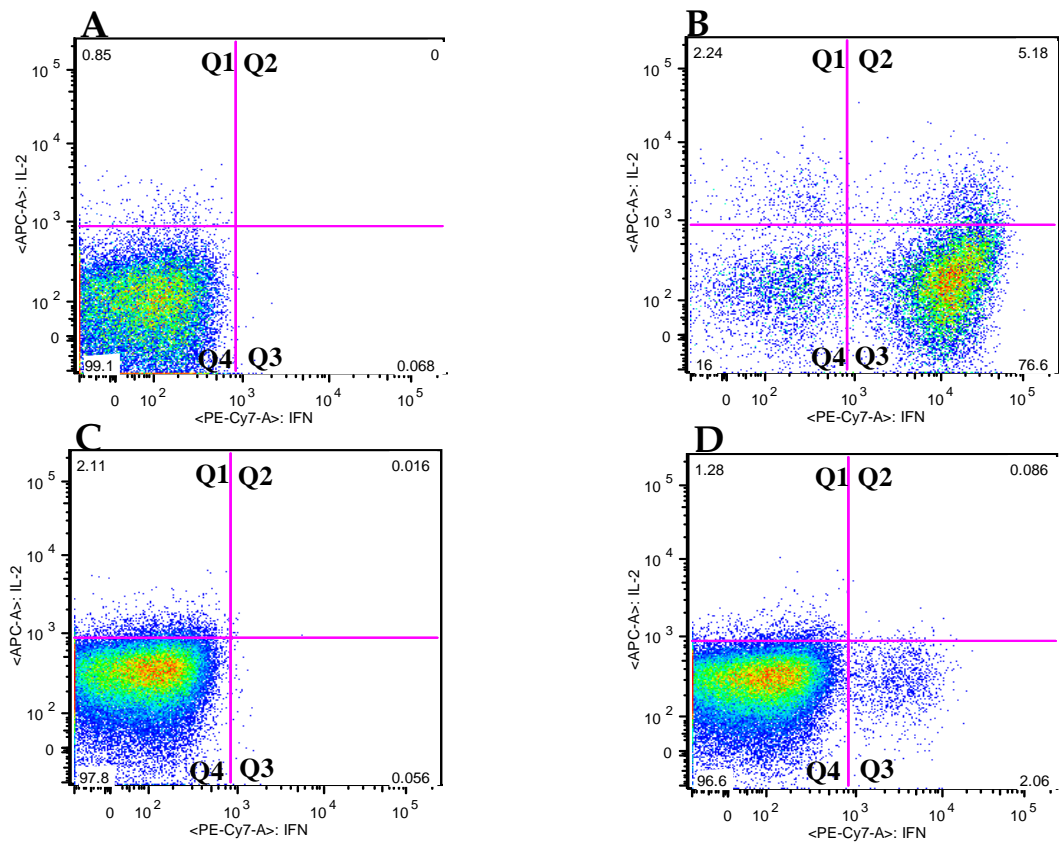


**Figura 4. Estratégia de análise para identificação da população de células T CD4 e T CD8.** (A) O gráfico mostra a região de análise correspondente à região de linfócitos, identificados por menor tamanho e baixa complexidade celular, definidos pela baixa dispersão frontal (FSC) e lateral de luz (SSC), respectivamente. (B) O gráfico mostra a população de células T CD8 (46,9%) e T CD4 (27,9%).



**Figura 5. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  na população de células T CD4.** (A) Controle negativo, (B) PMA/Ionomicina, (C) Lisado Viral, (D) Pool de peptídeos de Nef. Em Q1 observa a porcentagem de células produtoras de IL-2; em Q2 estão contidas as células que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  simultaneamente; em Q3, a porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto as células não produtoras de citocinas estão contidas em Q4.

A estratégia de análise da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  na população de células T CD4 está representada na Figura 5, enquanto a estratégia de análise dessas citocinas na população de células T CD8 pode ser vista na Figura 6.



**Figura 6. Estratégia de análise para avaliação da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  na população de células T CD8.** (A) Controle negativo, (B) PMA/Ionomicina, (C) Lisado Viral, (D) Pool de peptídeos de Nef. Em Q1 observa a porcentagem de células produtoras de IL-2; em Q2 estão contidas as células que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  simultaneamente; em Q3, a porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto as células não produtoras de citocinas estão contidas em Q4.

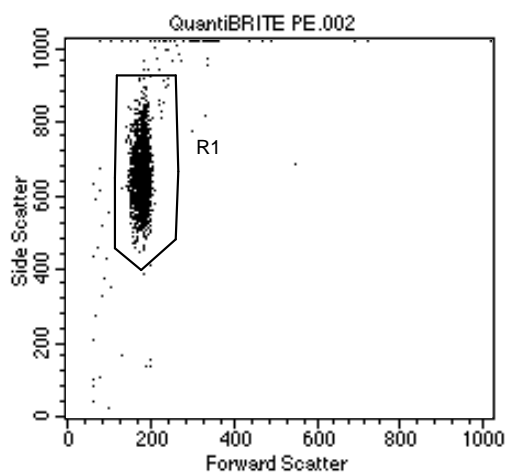
### 3.5.8. Avaliação da Ativação Imune Celular

A avaliação quantitativa da expressão do marcador de ativação celular CD38 em células T CD4 e T CD8 foi realizada por citometria de fluxo em citômetro FACSCallibur<sup>TM</sup>, utilizando o sistema QuantiBRITE<sup>TM</sup> PE.

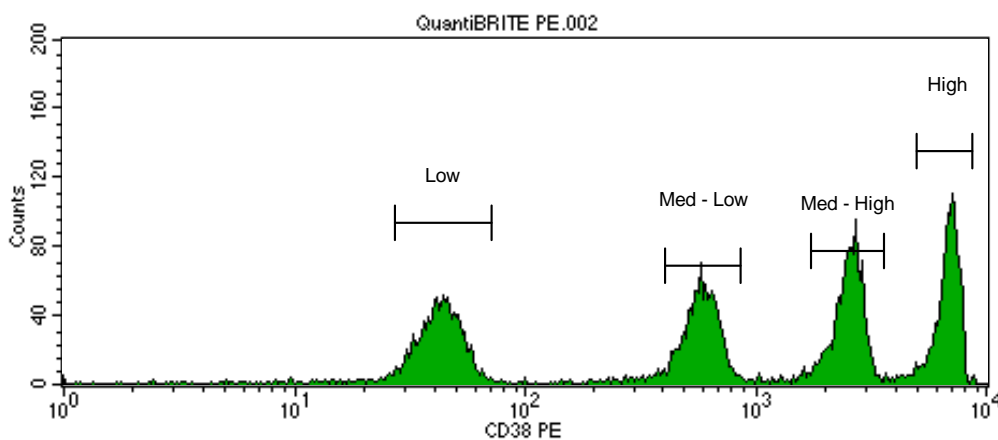
### 3.5.8.1. Sistema QuantiBRITE™ PE

O QuantiBRITE™ PE (BD Biosciences) é um sistema de partículas utilizado no ensaio, para calibrar o eixo FL2, com relação ao número de moléculas de PE ligadas por partícula, por meio do software BD QuantiQuest™.

As partículas são diluídas em 1 mL de tampão PBS contendo 0,1% de azida e 2% de soro bovino fetal inativado. A Figura 7 mostra a região de aquisição das partículas (R1), identificadas por meio do tamanho (FSC) e da complexidade (SSC). Foram armazenados 10.000 eventos em R1.



**Figura 7. Região de aquisição das partículas QuantiBRITE™PE.**



**Figura 8. Histograma das partículas Quantibrite™PE, de acordo com os quatro níveis de intensidade de fluorescência.**

O sistema QuantiBRITE™ (BD Biosciences) utiliza um conjunto de partículas liofilizadas, pré-calibradas e conjugadas com 4 intensidades diferentes de fluorescência de PE: *Low* (baixo); *Med-Low* (intermediário baixo); *Med-High* (intermediário alto); *High* (alto), no FACSCallibur™ (Figura 8).

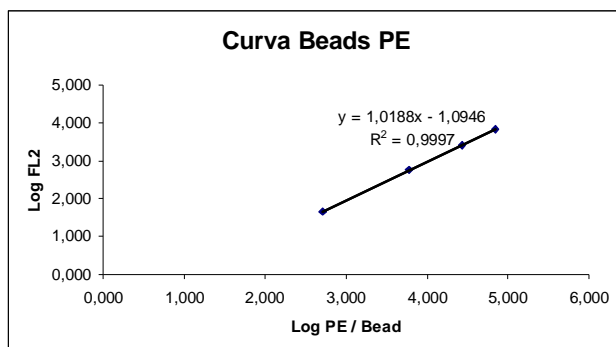
A Tabela 1 apresenta as médias geométricas de intensidade de fluorescência (GMFI) obtidas para cada um dos 4 níveis de intensidade de fluorescência das partículas e sua equivalência em número de moléculas de PE por partícula. O número de moléculas de PE/partícula é fornecido pelo fabricante e varia de acordo com o lote utilizado, enquanto a GMFI é calculada por meio do programa CellQuest™.

**Tabela 1. Equivalência entre média geométrica de intensidade de fluorescência e moléculas de PE por partícula (específico para o lote):**

	<b>Média Geométrica</b>	<b>Moléculas de PE/partícula</b>
<b>Low</b>	<b>45,34</b>	<b>515</b>
<b>Med-Low</b>	<b>595,08</b>	<b>5956</b>
<b>Med-High</b>	<b>2575,64</b>	<b>26653</b>
<b>High</b>	<b>6715,24</b>	<b>69045</b>

### 3.5.8.2. Quantificação do número de moléculas CD38

O cálculo do número de moléculas CD38 por célula foi obtido por meio da equação da reta, calculada no programa Excel. A quantidade de



moléculas de PE por partícula, fornecida na bula do lote em uso *versus* os valores de GMFI obtidos no histograma (Figura 8) é usada para construir o gráfico, que fornece a equação

da reta e o valor de  $R^2$ . A partir dessa equação foi possível projetar os

valores de GMFI da amostra em média do número de moléculas de PE por célula.

### **3.5.8.3. Marcação de Superfície para CD38**

As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) previamente separadas e armazenadas em nitrogênio líquido (conforme descrito no item 3.4.7.1), foram descongeladas de acordo com o item 3.4.7.2.

Após o ajuste da concentração para  $2 \times 10^6$  células/mL, foram acrescentados 3mL de tampão de lavagem (PBS suplementado com 0,1% de azida sódica e 2% de soro bovino fetal inativado) e a suspensão foi centrifugada a 1.300 rpm (200 g) por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 20 $\mu$ L do *pool* de anticorpos monoclonais CD8FITC/CD38PE/CD3PerCP. A suspensão de células foi homogeneizada em vórtex e as células foram incubadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. Após a incubação, foram adicionados 3 mL de tampão de lavagem e as células foram centrifugadas a 1.300 rpm (200 g) por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 300  $\mu$ L de paraformaldeído 1%, para fixar as células.

### **3.5.8.4. Citometria de Fluxo – FACSCalibur™**

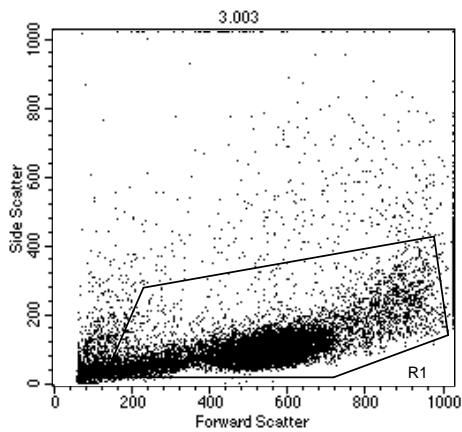
A análise da expressão de CD38 na população de linfócitos T CD4 e T CD8 foi realizada em citômetro de fluxo, modelo FACSCalibur™ (BD Biosciences), por meio do software BD CellQuest™.

A detecção de cada parâmetro e compensação entre os canais de fluorescência foram acertadas para aperfeiçoar a aquisição dos eventos por



meio do software BD FACSComp™, utilizando partículas CaliBRITE (BD Biosciences) nas cores: FITC, PE, PerCP e não marcadas.

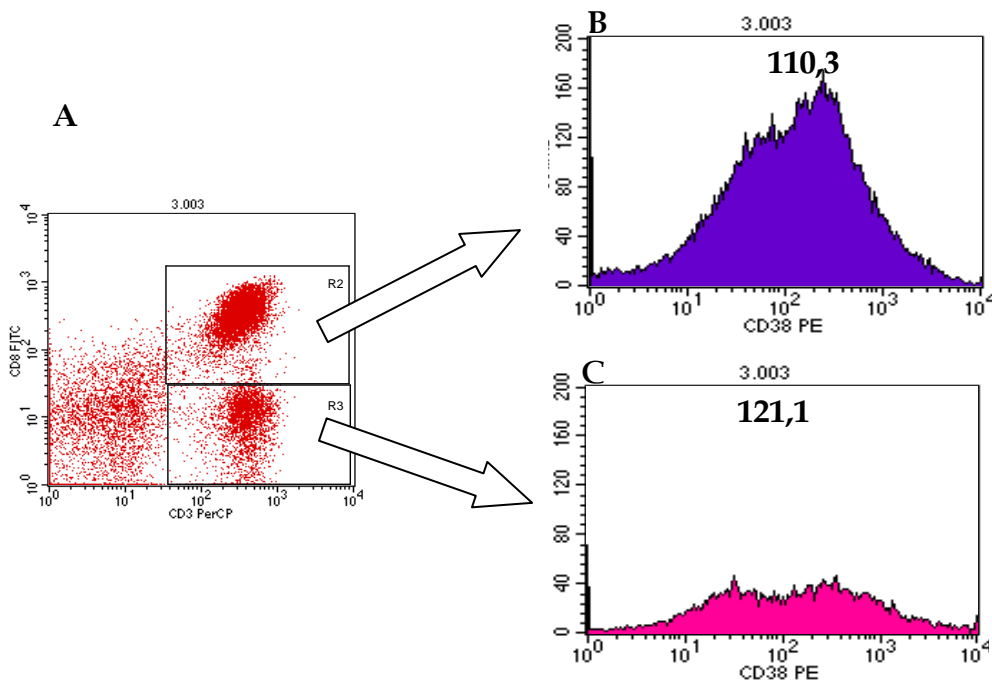
Uma vez calibrado o citômetro e salvas as configurações, as amostras são adquiridas para posterior análise. Foram armazenados 70.000 eventos



na região de linfócitos (R1) (Figura 9).

**Figura 9. Região de aquisição e análise de linfócitos.**

A partir das células adquiridas em R1 (Figura 9) foi construído um gráfico separando as células CD3+CD8+ e CD3+CD8-, contidas em R2 e R3, respectivamente (Figura 10-A).



**Figura 10. (A) Separação das populações de células CD8 (CD3+CD8+) e CD4 (CD3+CD8-); (B) Expressão de CD38 na população de linfócitos T CD8; (C) Expressão de CD38 na população de linfócitos T CD4.**

A população T CD4 foi definida por exclusão, ou seja, pela positividade do marcador CD3, sendo negativa para o marcador CD8.

A figura 10-B mostra a intensidade de fluorescência do marcador CD38 na população T CD8. A GMFI é utilizada para calcular a média do número de moléculas CD38 expressas na superfície dessa população celular. A média geométrica de CD38 nessa amostra foi de 110,31.

A figura 10-C apresenta a intensidade de fluorescência do marcador CD38 na população T CD4. A GMFI é utilizada para calcular a média do número de moléculas CD38 expressas na superfície dessa população celular. A média geométrica de CD38 nessa amostra foi de 121,14.

A média do número de moléculas expressas na população T CD4 e T CD8 é calculada conforme detalhado no item 3.4.9.2.

### **3.5.9. Enzimas Hepáticas**

As transaminases de interesse clínico e mais frequentemente associadas ao dano hepatocelular são as enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), que constituem um grupo de enzimas que catalisam a transferência reversível de um grupamento amina entre um aminoácidos e um  $\alpha$ -cetoácido. Já a GGT ( $\gamma$ -glutamil transferase) está frequentemente aumentada nas doenças hepatocelulares e hepatobiliares.

O sangue coletado em tubo seco foi encaminhado ao Laboratório Central do Hospital São Paulo e analisado no AU640™ (*Chemistry Immuno Analyzer - OLYMPUS®*). Segue abaixo as metodologias e valores de referência dos testes.

O procedimento AST da OLYMPUS utiliza uma modificação da metodologia recomendada pela Federação Internacional da Química Clínica.

Nesse método, a AST catalisa a transaminação do aspartato e  $\alpha$ -oxoglutarato, formando L-glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é então reduzido a L-malato pela desidrogenase de malato, ao passo que o NADH é simultaneamente convertido em NAD<sup>+</sup>. A diminuição na absorção devida ao consumo do NADH é medida em 340/380nm e é proporcional à atividade da AST na amostra. Valores até 32 U/L são considerados normais, para os testes realizados no Laboratório Central do Hospital São Paulo - UNIFESP.

O procedimento ALT da OLYMPUS é baseado na metodologia recomendada pela IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). A ALT transfere o grupo amino da alanina para o  $\alpha$ -oxoglutarato para formar piruvato e glutamato. O piruvato entra em uma reação catalisada de desidrogenase lactato com NADH para produzir lactato e NAD<sup>+</sup>. A diminuição na absorção devida ao consumo do NADH é medida em 340/380nm e é proporcional à atividade dessa enzima na amostra. Valores até 31 U/L são considerados normais, para os testes realizados no Laboratório Central do Hospital São Paulo - UNIFESP.

O procedimento GGT da OLYMPUS é baseado na modificação do procedimento de Szasz. A enzima GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, para glicilglicina, resultando em 5-amino-2-nitrobenzoato. A mudança na absorção em 410/480nm é devida à formação de 5-amino-2-nitrobenzoato e é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra. Valores entre 1 – 24 U/L estão dentro da faixa de normalidade, para os testes realizados no Laboratório Central do Hospital São Paulo - UNIFESP.

### **3.5.10. Análise Estatística**

Todas as variáveis foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão quando as variáveis apresentaram distribuição normal e como mediana quando apresentaram distribuição não-normal. A diferença entre as médias foi testada pela ANOVA, nos casos em que as variáveis apresentaram distribuição normal. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi aplicado quando as variáveis apresentaram distribuição não-normal. As diferenças entre as proporções foram testadas pelo teste  $\chi^2$ . O grau de associação entre as variáveis contínuas foi avaliado aplicando-se Correlação de Pearson, quando as duas variáveis apresentaram distribuição normal e Correlação de Spearman, quando pelo menos uma das variáveis apresentou distribuição não-normal. A análise de Regressão Linear foi utilizada para verificar a influência de múltiplos fatores sobre uma determinada variável. O valor de  $P < 0,05$  foi adotado como nível de significância estatística.

#### 4. RESULTADOS

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil geral da Coorte

Foram incluídos 159 pacientes HIV soropositivos no estudo; destes, 98 (61,6%) são do gênero masculino, com média de idade de  $43 \pm 9$  (com idade mínima de 23 e máxima de 67 anos) e tempo de infecção pelo HIV de  $9,7 \pm 4,8$  anos (com tempo mínimo de 2 e máximo de 22 anos). Do total de pacientes incluídos, 15 (9,4%) faziam uso de drogas injetáveis e 38 (23,8%) eram etilistas (definição feita por meio do questionário CAGE – Anexo III). Dos 159 pacientes, 136 (85,5%) estavam em uso de terapia antirretroviral, com uma média de  $7 \pm 3$  anos. A média de anos entre o diagnóstico de infecção pelo HIV e o início da terapia antirretroviral foi de  $2 \pm 2,41$  anos, sendo que a duração média do esquema antirretroviral em uso no momento da inclusão foi de  $2,8 \pm 1$  anos. Do total da coorte, 52 (32,7%) apresentavam co-infecção pelo HCV. Os dados gerais da coorte estão resumidos na tabela 2.

**Tabela 2. Características principais da coorte incluída no estudo:**

<b>N = 159</b>	
<b>Variável</b>	
Idade (Média±DP)	43±9
Tempo de Infecção pelo HIV (Média±DP)	9,7±4,8
Gênero (N [%])	
Masculino	98 (61,6)
Feminino	61 (38,4)
Fatores de Risco (N [%])	
UDI	15 (9,4)
MSM	40 (25,1)
Heterossexual	116 (72,9)
Bissexual	3 (2,0)
Etilismo (N [%])	38 (23,8)
Doença definidora de AIDS (N [%])	10 (6,2)
Infecção pelo HCV (N [%])	52 (32,7)
Terapia Antirretroviral (N [%])	136 (85,5)
Tempo de uso de ARV (Média±DP)	7±3
Tempo de uso do esquema ARV em uso (Média±DP)	2,8±1

## 4.2. Perfil dos pacientes HIV-HCV

Dos 52 pacientes HIV-HCV incluídos no estudo, 44 (84,6%) estavam em uso de terapia antirretroviral e 9 (17,3%) estavam em uso de interferon e ribavirina. Os indivíduos HIV-HCV apresentaram média de idade de  $43,7 \pm 7,5$  anos, 38 (73%) eram do gênero masculino, 15 (29%) eram usuários de drogas injetáveis e 13 (25%) eram etilistas. O tempo de infecção pelo HIV nesses pacientes variou de 3 a 22 anos ( $11,2 \pm 5,1$ ), enquanto o tempo de diagnóstico de infecção pelo HCV foi de  $4,8 \pm 4,06$  anos. As principais características dos pacientes HIV-HCV co-infectados incluídos no estudo estão resumidamente apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3. Principais características dos pacientes HIV-HCV.**

N = 52	
Variável	
Idade (Média±DP)	43,7±7,5
Tempo de Infecção pelo HIV (Média±DP)	11±5,1
Tempo de Diagnóstico da Infecção pelo HCV (Média±DP)	4,8±4,06
Doença crônica (N [%])	50 (96)
Cirrose (N [%])	4 (7,7)
Gênero (N [%])	
Masculino	38 (73)
Feminino	14 (27)
Fatores de Risco (N [%])	
UDI	15 (28,8)
MSM	18 (34,6)
Heterossexual	34 (65,4)
Etilismo (N [%])	13 (25)
Doença definidora de AIDS (N [%])	3 (5,7)
Terapia Antirretroviral	41 (78,8)
Interferon e Ribavirina	9 (17,3)
Genótipo do HCV (N [%])	
1a	14 (26,9)
1b	9 (17,3)
2b	3 (5,7)
3a	1 (1,9)
4a	1 (1,9)
1a/1b	1 (1,9)
Ignorado	23 (44,2)

### **4.3. Marcadores de Infecção pelo GBV-C**

Os 159 pacientes incluídos no estudo foram testados para a presença de RNA do GBV-C, que indica infecção viral ativa, e para a presença de anticorpos anti-E2 do GBV-C, indicativos de infecção prévia.

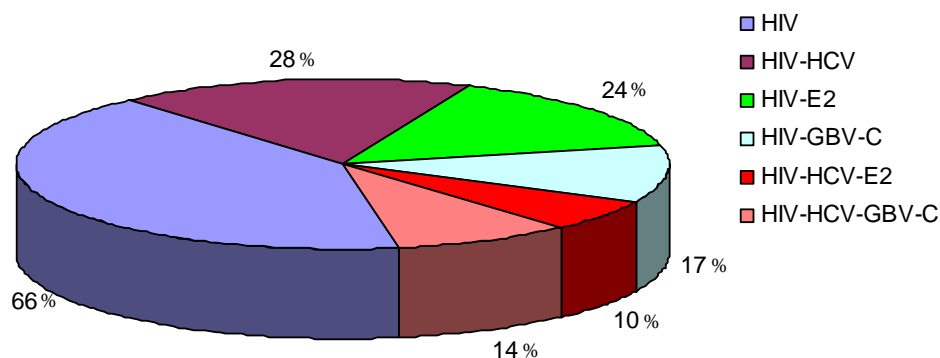
A detecção da infecção ativa pelo GBV-C foi realizada para todos os indivíduos por meio da PCR qualitativa, enquanto a quantificação da carga viral do GBV-C foi feita utilizando a PCR em tempo real, ambas as técnicas padronizadas em nosso laboratório <sup>(152)</sup>. A detecção de anticorpos anti-E2 foi realizada em todas as amostras, por meio da técnica de ELISA, conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

Dos 107 pacientes HIV soropositivos, negativos para o HCV, 41 (38,3%) apresentaram marcadores de infecção pelo GBV-C, sendo 17 (15,8%) virêmicos, com média de CV em Log<sup>10</sup> do GBV-C de 3,55±0,63 cópias/mL (mínimo de 1,64 e máximo de 4,28) e 24 (22,4%) positivos para anticorpos anti-E2.

Dos 52 pacientes HIV-HCV co-infectados, 24 (46,1%) apresentaram marcadores de infecção pelo GBV-C, dos quais 14 (26,9%) apresentaram viremia, com média de 3,81±0,63 cópias/mL (mínimo de 2,65 e máximo de 5,00) e 10 (19,2%) foram positivos para anticorpos anti-E2 do GBV-C. Após a realização destes testes, os 159 pacientes incluídos no estudo foram alocados em 6 grupos, conforme Figura 11.

Dessa forma os pacientes foram comparados dentro desses grupos para os marcadores imunológicos (contagem de linfócitos T CD4 e T CD8, produção de citocinas e marcador de ativação CD38), virológicos (Carga viral do HIV) e perfil de enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT).





**Figura 11. Distribuição dos pacientes de acordo com o perfil de infecção**

#### **4.4. Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8**

A contagem de linfócitos T CD4 e T CD8 foi realizada para todos os pacientes no momento da inclusão no estudo.

A média da contagem de linfócitos T CD4 foi elevada ( $489 \pm 267$ ) e variável (4 a  $1.280 \text{ células/mm}^3$ ), produzindo um intervalo de confiança [CI: 95% 447,37; 531,81], quando a coorte completa foi avaliada.

A exemplo da média da contagem de linfócitos T CD4, a média da contagem de linfócitos T CD8 para a coorte completa também foi elevada ( $862 \pm 442$ ) e variável (117 a  $2.507 \text{ células/mm}^3$ ), com intervalo de confiança [CI: 95% 788; 937].

Não foi observada diferença estatística entre as médias da contagem de linfócitos T CD4 e T CD8 quando os grupos foram avaliados de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,089$  e  $P=0,210$ ).

Os resultados de contagem de células T CD4 e T CD8 para os diferentes grupos são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 4. Resultados da contagem de linfócitos T CD4 de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Linfócitos T CD4 (células/mm<sup>3</sup>) (N=159)</b>					
<b>Perfil de Infecção (N)</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
HIV (66)	441	255	15	946	377; 504
HIV-E2 (24)	544	329	17	1.116	405; 683
HIV-GBV-C (17)	610	247	295	1.043	483; 738
HIV-HCV (28)	514	251	182	1.280	417; 612
HIV-HCV-E2 (10)	543	256	4	841	360; 726
HIV-HCV-GBV-C (14)	382	220	101	893	254; 509

**Tabela 5. Resultados da contagem de linfócitos T CD8 de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Linfócitos T CD8 (células/mm<sup>3</sup>) (N=159)</b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
HIV (66)	802	425	130	1.980	677; 926
HIV-E2 (24)	905	434	227	1.727	721; 1.088
HIV-GBV-C (17)	893	377	428	1.668	684; 1.101
HIV-HCV (28)	798	481	121	2.507	611; 985
HIV-HCV-E2 (10)	1.011	529	117	1.867	632; 1.390
HIV-HCV-GBV-C (14)	983	446	189	1.786	725; 1.241

#### **4.5. Quantificação do RNA do HIV**

A quantificação do RNA do HIV (carga viral - CV) foi realizada para todas as amostras, no momento da coleta. Dos 136 pacientes em uso de terapia antirretroviral, 106 (77,9%) apresentaram CV indetectável, sendo que a média da CV em Log<sup>10</sup> dos indivíduos com RNA plasmático detectável foi de 3,9±1,19 cópias/mL (variando entre 1,83 e 5,84 cópias/mL).

**Tabela 6. Resultados da quantificação do RNA do HIV, para os casos com níveis plasmáticos detectáveis, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>RNA do HIV (Log<sup>10</sup> cópias/mL) (N=53)</b>					
<b>Perfil de Infecção (N)</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
HIV (25)	4,01	1,16	2,06	5,84	3,53; 4,49
HIV-E2 (10)	4,38	0,62	2,5	4,92	3,38; 5,38
HIV-GBV-C (5)	4,30	1,09	2,09	5,72	3,57; 5,14
HIV-HCV (4)	3,90	0,39	3,45	4,20	2,91; 4,89
HIV-HCV-E2 (4)	4,30	0,74	3,60	5,03	3,15; 5,52
HIV-HCV-GBV-C (4)	2,89	1,15	1,83	4,20	1,05; 4,73

A Tabela 6 apresenta os resultados dos 53 indivíduos que apresentaram CV detectável, assumindo o limite mínimo de detecção de 80 cópias/mL. Os pacientes com CV indetectável não estão representados nessa tabela.

Não houve diferença estatística quando as médias de CV do HIV foram avaliadas nos diferentes grupos, de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,075$ ).

Não houve correlação entre a CV do HIV e a CV do GBV-C ( $P=0,709$ ).

Também não houve diferença estatística na proporção de pacientes com CV do HIV indetectável nos diferentes grupos, de acordo com o perfil de infecção ( $\chi^2=8,11$ ;  $P=0,150$ ). A proporção de pacientes com CV indetectável distribuída entre os grupos permaneceu inalterada quando os pacientes sem terapia antirretroviral foram incluídos na análise ( $\chi^2=8,71$ ;  $P=0,121$ ).

#### 4.6. Quantificação do RNA do HCV

A quantificação do RNA do HCV (CV) foi realizada para todas as amostras provenientes dos indivíduos HIV-HCV co-infectados incluídos no protocolo. Dentre os 52 pacientes HCV positivos, apenas 4 apresentaram níveis indetectáveis de RNA do HCV. Todos os pacientes que estavam em tratamento com interferon e ribavirina apresentaram níveis detectáveis de RNA do HCV.

**Tabela 7. Resultados da quantificação do RNA do HCV, para os casos com níveis plasmáticos detectáveis, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>RNA do HCV (Log<sup>10</sup> cópias/mL) (N=48)</b>					
<b>Perfil de Infecção (N)</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>HIV-HCV (26)</b>	5,23	1,02	2,38	6,49	4,72; 5,74
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	4,65	0,34	4,17	5,07	4,21; 5,08
<b>HIV-HCV-GBV-C (13)</b>	5,60	1,08	4,31	7,20	4,60; 6,60

A Tabela 7 apresenta apenas os resultados dos 48 indivíduos com CV do HCV detectável, assumindo o limite mínimo de detecção de 200 cópias/mL. Os pacientes com CV indetectável não estão representados nessa tabela.

As médias de CV do HCV em Log<sup>10</sup> não apresentaram diferença estatística quando se procedeu a análise após a estratificação dos pacientes de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,260$ ).

Não houve correlação entre a CV do HCV e a CV do GBV-C ( $P=0,238$ ).

#### **4.7. Avaliação da produção de Citocinas**

Foram realizados testes preliminares com o intuito de padronizar o ensaio de detecção de citocina intracelular. O estímulo inespecífico produziu os resultados esperados, com intensa produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  nas três populações avaliadas.

A produção de IL-4 e IL-10 não foi satisfatoriamente detectada, confirmando as dificuldades encontradas anteriormente em outros experimentos do nosso grupo (dados não publicados), assim como de outras equipes de pesquisa <sup>(160)</sup>. Discute-se o motivo pelo qual essas citocinas não produzem resultados satisfatórios em citometria de fluxo, sendo que a grande maioria dos pesquisadores atribui esse problema à má qualidade dos anticorpos anti-IL-4 e anti-IL-10 disponíveis no mercado.

Os resultados da produção de IL-4 e IL-10 não foram incluídos na análise. Uma Figura representativa está disponível na seção de Anexos.

Dos 159 pacientes incluídos no estudo, 135 foram desafiados com peptídeos de Nef e seus respectivos controles, enquanto a resposta imune específica ao lisado viral foi avaliada em 80 desses pacientes.

Não foi possível incluir o total da coorte devido ao limite de reagentes doados pelo NIH no período de um ano, para o mesmo pesquisador, no caso dos peptídeos de Nef e devido ao elevado custo para aquisição de mais um frasco de reagente, no caso do lisado viral.

Considerando que inicialmente, em nosso Projeto pretendíamos incluir um total de 100 pacientes para todas as análises, e incluímos 159, acreditamos que a impossibilidade de fechar pelo menos 100 pacientes para a avaliação da resposta imune específica com lisado viral não tenha sido prejudicada.

#### **4.7.1. Controle Negativo e Estímulo Inespecífico**

A porcentagem de células TCD4, TCD8 e T $\gamma\delta$  produtoras de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aumentou significativamente após a estimulação inespecífica com PMA/ionomicina ( $36,83\pm 16,78$ ;  $65,75\pm 16,09$ ;  $67,93\pm 18,22$ ) quando comparada aos controles negativos ( $0,58\pm 0,69$ ;  $0,77\pm 0,86$ ;  $0,89\pm 1,01$ ), que receberam apenas DMSO ( $P=0,0001$ ;  $P=0,0001$  e  $P=0,0001$ ).

A exemplo da produção de IFN- $\gamma$ , a produção de interleucina-2 (IL-2) também foi significativamente superior após a estimulação com PMA/ionomicina ( $46,32\pm 15,5$ ;  $22,7\pm 12,47$ ;  $13,61\pm 10,94$ ), quando comparada à produção nos controles negativos ( $1,05\pm 1,13$ ;  $0,78\pm 0,74$ ;  $1,52\pm 1,21$ ) ( $P=0,0001$ ;  $P=0,0001$  e  $P=0,001$ ), nas populações de células T CD4, T CD8 e T $\gamma\delta$ , respectivamente.

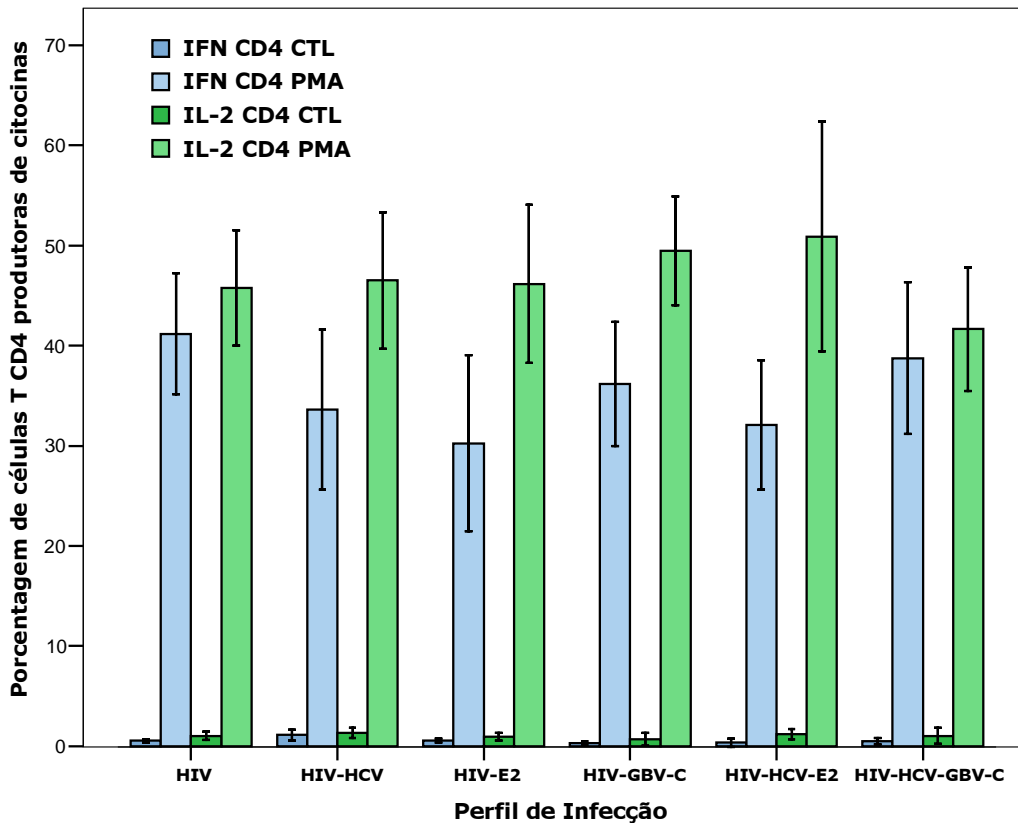
Quando a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 foi avaliada nas diferentes populações celulares, considerando-se o perfil de infecção, não se verificou diferença estatística entre os grupos ( $P=0,524$ ;  $P=0,684$ ;  $P=0,228$  e  $P=0,683$ ;  $P=0,983$ ;  $P=0,227$ , para IFN- $\gamma$  e IL-2) nas populações T CD4, T CD8 e T $\gamma\delta$ , respectivamente (Tabelas 8, 9 e 10; Figuras 12, 13 e 14).

**Tabela 8. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células TCD4, de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico PMA/ionomicina.**

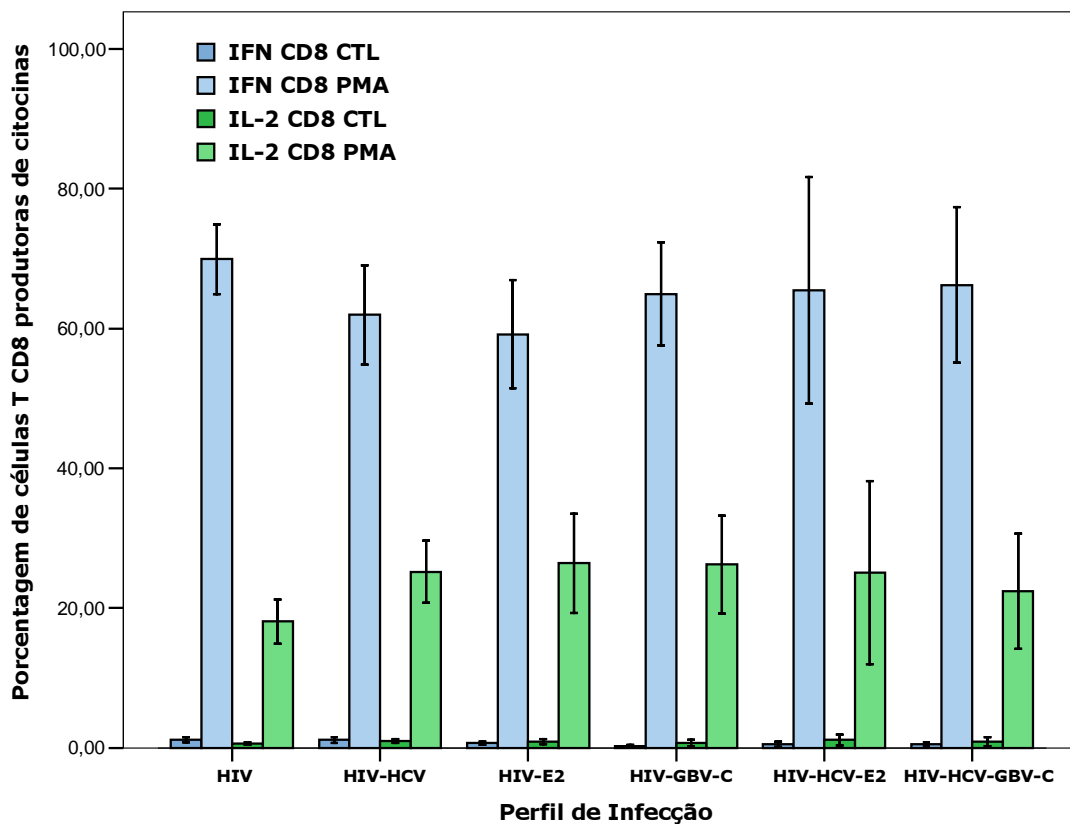
<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD4</b>					
<b>N = 135</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,52	0,48	0,04	2,04	0,37; 0,66
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,03	1,16	0,07	4,84	0,56; 1,50
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,50	0,40	0,01	1,87	0,33; 0,68
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,30	0,34	0,01	1,11	0,11; 0,48
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,35	0,50	0,00	1,29	0,02; 0,73
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,51	0,56	0,00	2,38	0,18; 0,84
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	41,94	19,20	5,46	80,00	36,23; 47,64
<b>HIV-E2 (24)</b>	33,88	16,54	9,39	86,63	27,20; 40,56
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	31,22	17,84	5,21	79,10	23,51; 38,94
<b>HIV-HCV (27)</b>	35,95	10,87	18,74	53,20	30,15; 41,75
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	32,10	8,39	23,37	45,80	25,65; 38,56
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	38,75	13,15	23,04	60,40	31,15; 46,35
<b>IL-2</b>					
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	1,04	1,26	0,13	6,74	0,64; 1,43
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,31	1,10	0,15	4,29	0,82; 1,78
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,98	0,77	0,12	2,98	0,59; 1,36
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,71	1,15	0,04	4,79	0,06; 1,35
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	1,20	0,68	0,36	2,50	0,67; 1,73
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	1,05	1,35	0,04	4,29	0,26; 1,83
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	45,75	18,50	5,70	76,70	39,98; 51,52
<b>HIV-E2 (24)</b>	46,50	15,39	11,6	72,70	38,25; 54,06
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	46,15	15,89	22,00	72,70	38,25; 54,91
<b>HIV-HCV (27)</b>	49,47	9,83	35,00	71,70	44,02; 54,91
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	50,90	14,91	27,80	75,60	39,43; 62,36
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	41,65	10,69	15,00	57,80	35,48; 47,82

**Tabela 9. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células TCD8, de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico PMA/ionomicina.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>(N=135)</b>					
<b>População T CD8</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	1,03	1,12	0,01	3,86	0,70; 1,36
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,01	0,89	0,05	3,17	0,66; 1,37
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,58	0,44	0,06	1,93	0,38; 0,77
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,26	0,27	0,03	0,94	0,11; 0,40
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,52	0,47	0,02	1,39	0,16; 0,88
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,49	0,44	0,05	1,73	0,24; 0,75
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	70,71	15,18	32,79	95,70	66,20; 75,22
<b>HIV-E2 (24)</b>	62,39	15,05	26,60	85,45	56,31; 68,47
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	60,37	15,64	28,87	87,78	53,61; 67,13
<b>HIV-HCV (27)</b>	64,43	12,98	45,29	87,80	57,51; 71,35
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	65,43	21,09	29,42	86,10	49,22; 81,65
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	66,22	19,28	34,90	88,97	55,08; 77,35
<b>IL-2</b>					
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,58	0,56	0,02	2,61	0,40; 0,76
<b>HIV-E2 (24)</b>	0,95	0,66	0,12	2,50	0,66; 1,25
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,87	0,66	0,21	2,69	0,55; 1,20
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,69	0,75	0,10	3,04	0,28; 1,11
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	1,11	1,01	0,19	3,31	0,33; 1,89
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,84	1,12	0,02	3,9	0,65; 0,91
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	18,06	10,09	5,76	39,70	14,87; 21,24
<b>HIV-E2 (24)</b>	25,17	9,98	8,78	45,93	20,74; 29,59
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	26,40	14,30	9,57	58,58	19,29; 33,51
<b>HIV-HCV (27)</b>	26,22	12,64	13,15	60,70	19,22; 33,22
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	25,05	17,06	4,23	57,40	11,93; 38,17
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	22,38	14,29	6,23	51,20	14,12; 30,63



**Figura 12. Porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico.** Observa-se a que a média da porcentagem de células está aumentada na condição PMA (estímulo inespecífico PMA/ionomicina), quando comparada à condição Controle Negativo (CTL), sem estímulo.  $P < 0,05$ .



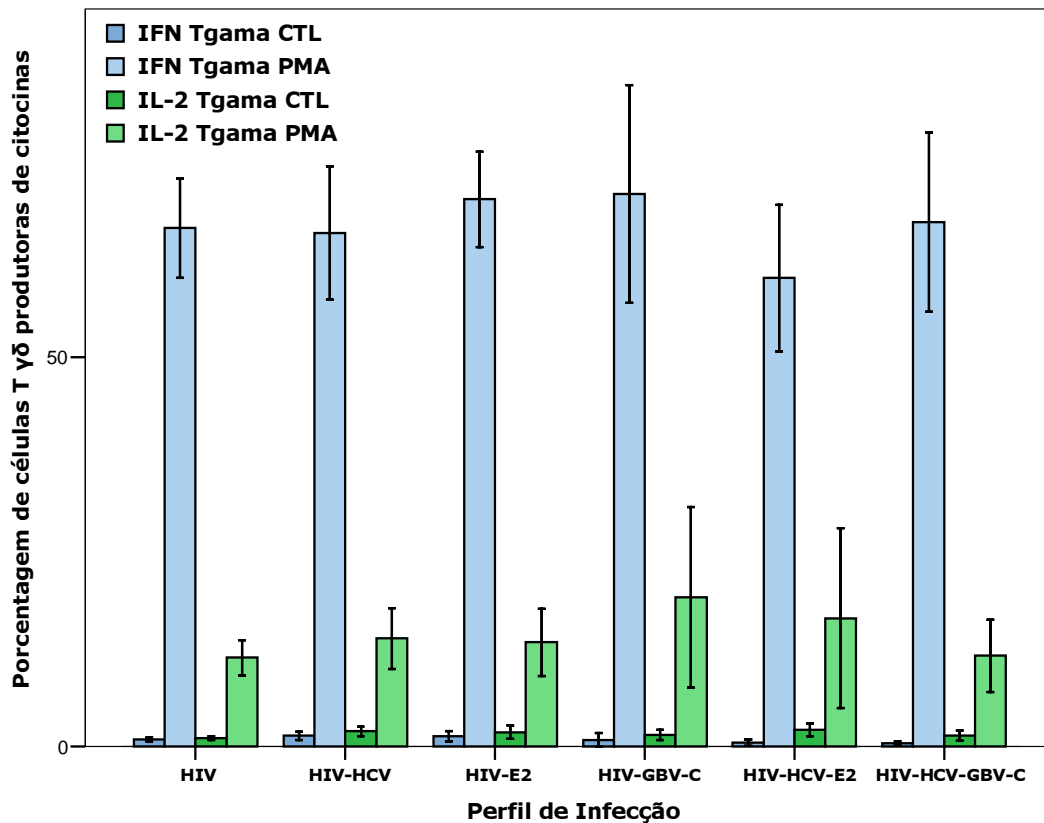
**Figura 13. Porcentagem de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico.** Observa-se a que a média da porcentagem de células está aumentada na condição PMA (estímulo inespecífico PMA/ionomicina), quando comparada à condição Controle Negativo (CTL), sem estímulo.  $P < 0,05$ .



**Tabela 10. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção, para o Controle Negativo e após estímulo inespecífico PMA/ionomicina.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>(N=135)</b>					
<b>População T <math>\gamma\delta</math></b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,83	0,71	0,00	0,30	0,62; 1,05
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,24	1,64	0,00	5,00	0,77; 1,71
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	1,05	1,18	0,00	5,00	1,52; 1,57
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,81	1,52	0,00	6,00	0,00; 1,62
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,48	0,49	0,00	2,00	0,07; 0,89
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,43	1,01	0,00	6,00	0,71; 1,07
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	67,11	19,31	3,00	89,00	61,17; 73,06
<b>HIV-E2 (24)</b>	67,34	19,07	16,00	90,00	59,64; 75,05
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	71,43	11,34	44,00	93,00	66,40; 76,46
<b>HIV-HCV (27)</b>	70,54	24,49	9,00	90,00	57,49; 83,60
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	60,18	11,27	46,00	82,00	50,75; 69,61
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	67,38	18,10	33,00	87,00	55,88; 78,88
<b>IL-2</b>					
<b>Controle Negativo</b>					
<b>HIV (45)</b>	1,07	0,81	0,00	4,00	0,80; 1,34
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,95	1,43	1,00	5,00	1,31; 2,58
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	1,85	1,62	0,00	7,00	1,01; 2,68
<b>HIV-HCV (27)</b>	1,50	1,20	0,00	5,00	0,83; 2,16
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	2,12	0,97	1,00	4,00	1,30; 2,93
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	1,38	1,01	0,00	3,00	0,73; 2,02
<b>PMA/Ionomicina</b>					
<b>HIV (45)</b>	11,40	6,78	2,00	33,00	9,17; 13,63
<b>HIV-E2 (24)</b>	13,88	8,77	3,00	30,00	9,99; 17,76
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	13,38	8,39	6,00	38,00	9,06; 17,69
<b>HIV-HCV (27)</b>	19,14	20,96	4,00	69,00	7,53; 30,76
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	16,48	13,85	2,00	45,00	4,90; 28,06
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	11,64	7,35	3,00	31,00	6,96; 16,32

Quando os 9 pacientes co-infetados pelo HCV que estavam em uso de Interferon e ribavirina foram excluídos da análise, também não foram observadas diferenças significativas na produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 nas diferentes populações celulares, de acordo com o perfil de infecção (dados não mostrados).



**Figura 14. Porcentagem de células T  $\gamma\delta$  produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2, nas condições Controle Negativo e Estímulo Inespecífico.** Observa-se a que a média da porcentagem de células está aumentada na condição PMA (estímulo inespecífico PMA/ionomicina), quando comparada à condição Controle, sem estímulo.  $P < 0,05$ .

#### 4.7.1. Estímulos Específicos: Peptídeos Nef e Lisado Viral

Conforme esperado, a produção de citocinas antígeno-específicas foi menos exuberante quando comparada à produção após estimulação inespecífica. Além disso, a produção basal, obtida no respectivo controle negativo foi descontada para cada indivíduo e, dessa forma, as médias refletem apenas a produção real de citocinas após estimulação específica.

Não houve diferença estatística entre as médias da porcentagem de células produtoras de IFN- $\gamma$  ( $P=0,209$ ;  $P=0,117$  e  $P=0,531$ ) e IL-2 ( $P=0,090$ ;  $P=0,080$  e  $P=0,511$ ) após a estimulação com peptídeos de Nef nas populações celulares T CD4, TCD8 e T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção. Da mesma forma, não houve diferença significativa na produção

de IFN- $\gamma$  ( $P=0,857$ ;  $P=0,826$  e  $P=0,658$ ) e IL-2 ( $P=0,330$ ;  $P=0,136$  e  $P=0,541$ ) nos diferentes perfis de infecção, após a estimulação com lisado viral do HIV-1, nas populações celulares T CD4, TCD8 e T $\gamma\delta$  (Tabelas 11, 12 e 13; Figuras 15 a 20).

**Tabela 11. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células TCD4, de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD4</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N=80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,33 $\pm$ 0,76	0,07	0,00	3,00	-0,02; 0,67
<b>HIV-E2 (14)</b>	0,35 $\pm$ 0,47	0,15	0,00	2,00	0,14-0,56
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,30 $\pm$ 0,55	0,11	0,00	2,00	-0,04; 0,63
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,11 $\pm$ 0,17	0,00	0,00	0,00	-0,11; 0,33
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	0,15 $\pm$ 0,14	0,09	0,00	0,00	0,01; 0,28
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	0,27 $\pm$ 0,43	0,02	0,00	1,00	-0,04; 0,59
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N=135</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,34 $\pm$ 1,12	0,1	0,00	7,61	0,001; 0,67
<b>HIV-E2 (24)</b>	0,17 $\pm$ 0,29	0,04	0,00	1,12	0,058; 0,29
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,43 $\pm$ 0,61	0,06	0,00	2,19	0,16; 0,69
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,13 $\pm$ 0,13	0,09	0,00	0,38	0,06; 0,20
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,03 $\pm$ 0,036	0,04	0,00	0,09	0,006; 0,06
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,29 $\pm$ 0,31	0,22	0,00	1,21	0,11; 0,47
<b>IL-2</b>					
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N=80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,72 $\pm$ 1,25	0,00	0,00	4,00	0,16; 1,27
<b>HIV-E2 (14)</b>	1,80 $\pm$ 4,03	0,21	0,00	16,00	0,01; 3,59
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,63 $\pm$ 1,29	0,03	0,00	5,00	-0,15; 1,41
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,04 $\pm$ 0,074	0,00	0,00	0,00	0,05; 0,14
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	2,08 $\pm$ 2,31	0,90	0,00	6,00	0,06; 4,22
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	1,35 $\pm$ 4,2	0,00	0,00	13,00	-1,66; 4,36
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N=135</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,82 $\pm$ 1,60	0,26	0,00	9,00	0,32; 1,33
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,51 $\pm$ 2,75	0,34	0,00	12,00	0,29; 2,73
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	2,01 $\pm$ 4,96	0,01	0,00	22,00	0,19; 4,22
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,71 $\pm$ 0,75	0,54	0,00	3,00	0,29; 1,13
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,55 $\pm$ 0,57	0,33	0,00	2,00	0,11; 0,99
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,03 $\pm$ 0,04	0,00	0,00	0,50	0,00; 0,05

**Tabela 12. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células TCD8, de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD8</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média<math>\pm</math> DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N= 80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,03 $\pm$ 0,81	0,00	0,00	0,36	0,00; 0,067
<b>HIV-E2 (14)</b>	0,09 $\pm$ 0,33	0,00	0,00	1,59	-0,058; 0,24
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,08 $\pm$ 0,21	0,00	0,00	0,77	-0,04; 0,21
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,05 $\pm$ 0,07	0,00	0,00	0,17	-0,04; 0,15
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	0,07 $\pm$ 0,11	0,00	0,00	0,32	-0,03; 0,18
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	0,04 $\pm$ 0,05	0,01	0,00	0,15	0,00; 0,08
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N=135</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,45 $\pm$ 0,82	0,07	0,00	4,00	0,21; 0,70
<b>HIV-E2 (24)</b>	0,32 $\pm$ 0,56	0,09	0,00	2,00	0,09; 0,55
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,79 $\pm$ 1,12	0,32	0,00	5,00	0,31; 1,27
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,32 $\pm$ 0,41	0,15	0,00	1,00	0,10; 0,54
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,37 $\pm$ 0,59	0,10	0,00	2,00	-0,09; 0,83
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,43 $\pm$ 0,39	0,27	0,00	1,00	0,20; 0,66
<b>IL-2</b>					
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N=80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,54 $\pm$ 0,92	0,00	0,00	3,00	0,13; 0,95
<b>HIV-E2 (14)</b>	1,68 $\pm$ 3,48	0,29	0,00	14,00	0,13; 3,32
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,63 $\pm$ 0,90	0,00	0,00	3,00	0,08; 1,17
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,03 $\pm$ 0,05	0,00	0,00	0,50	0,05; 0,10
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	1,44 $\pm$ 2,83	0,01	0,00	8,00	-0,74; 3,62
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	0,68 $\pm$ 2,45	0,00	0,00	9,00	2,31; 0,25
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N=135</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,45 $\pm$ 1,53	0,00	0,00	10,00	-0,04; 0,93
<b>HIV-E2 (24)</b>	1,41 $\pm$ 2,11	0,45	0,00	9,00	0,47; 2,35
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	2,49 $\pm$ 5,69	0,12	0,00	24,00	-0,34; 5,33
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,63 $\pm$ 1,23	0,10	0,00	4,00	-0,06; 1,31
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,59 $\pm$ 1,08	0,10	0,00	3,00	-0,24; 1,43
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,04 $\pm$ 0,06	0,00	0,00	0,50	0,00; 0,08

Não houve correlação entre a CV do HIV e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células T CD4 ( $P=0,269$ ;  $P=0,079$ ) e T CD8 ( $P=0,292$ ;  $P=0,995$ ) após estimulação com lisado viral. Foi observada correlação positiva entre a CV do HIV e a produção de IFN- $\gamma$  na população de células T

CD4 e T CD8, após estimulação com peptídeos de Nef do HIV (P=0,007; P=0,002).

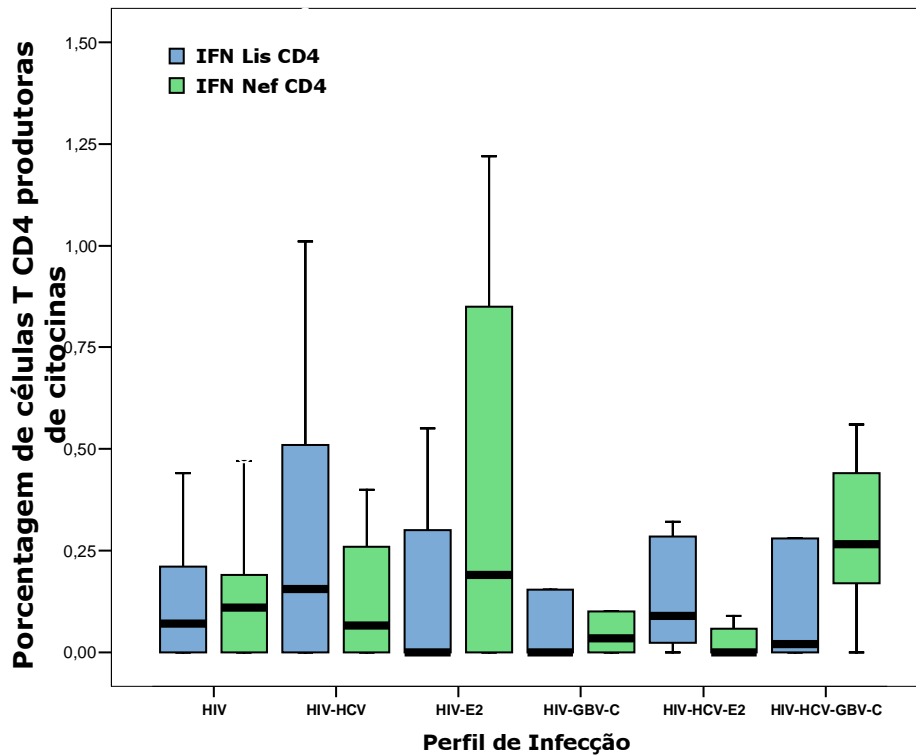


Figura 15. Porcentagem de células TCD4 produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.

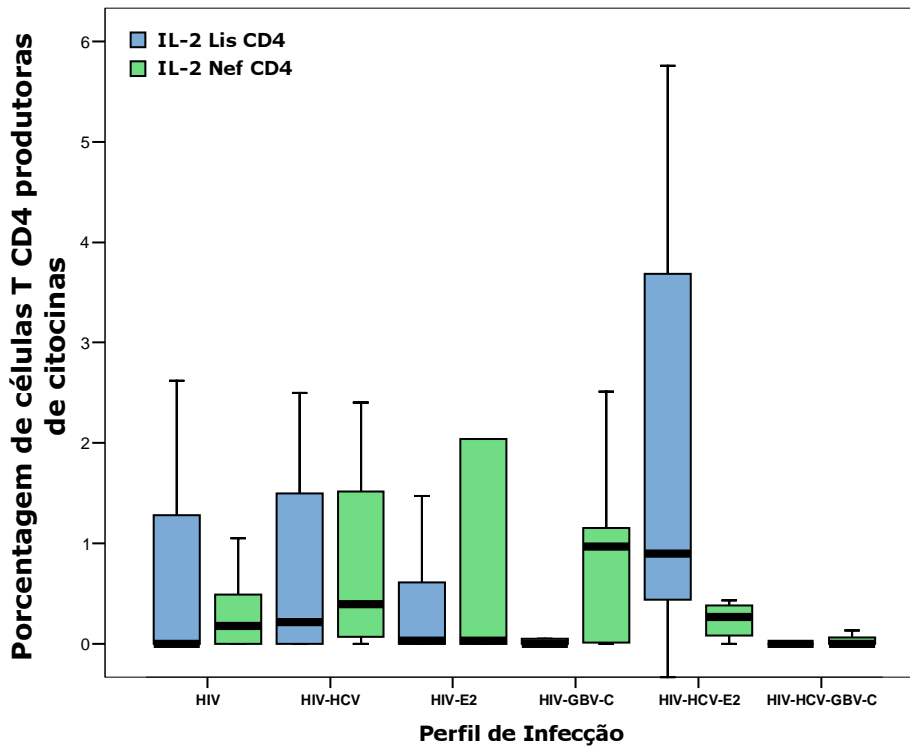
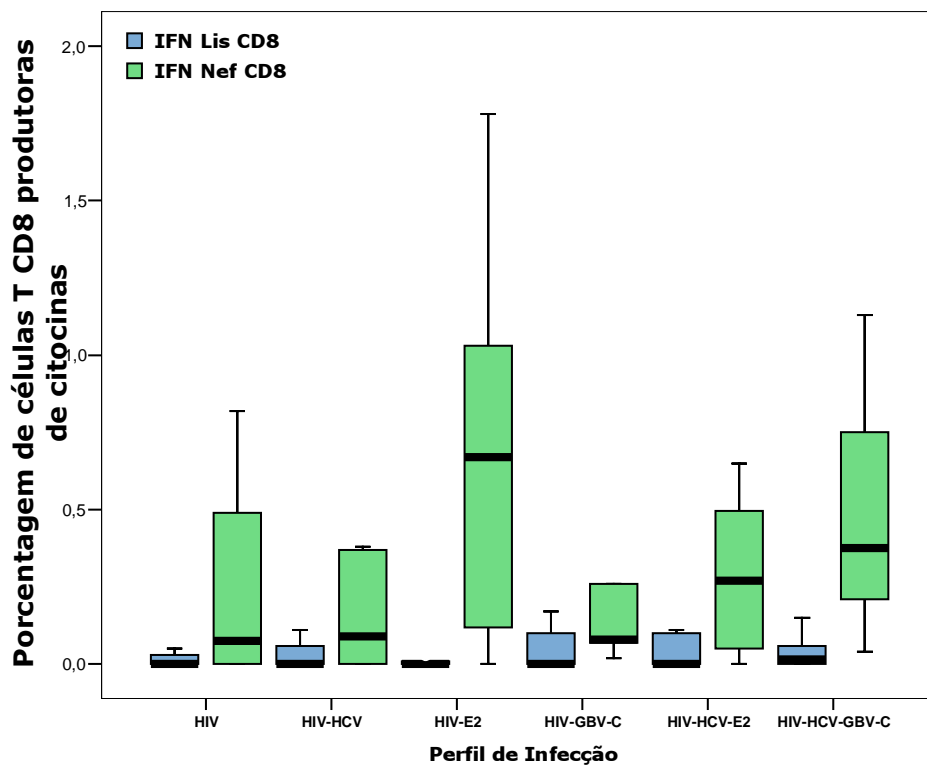
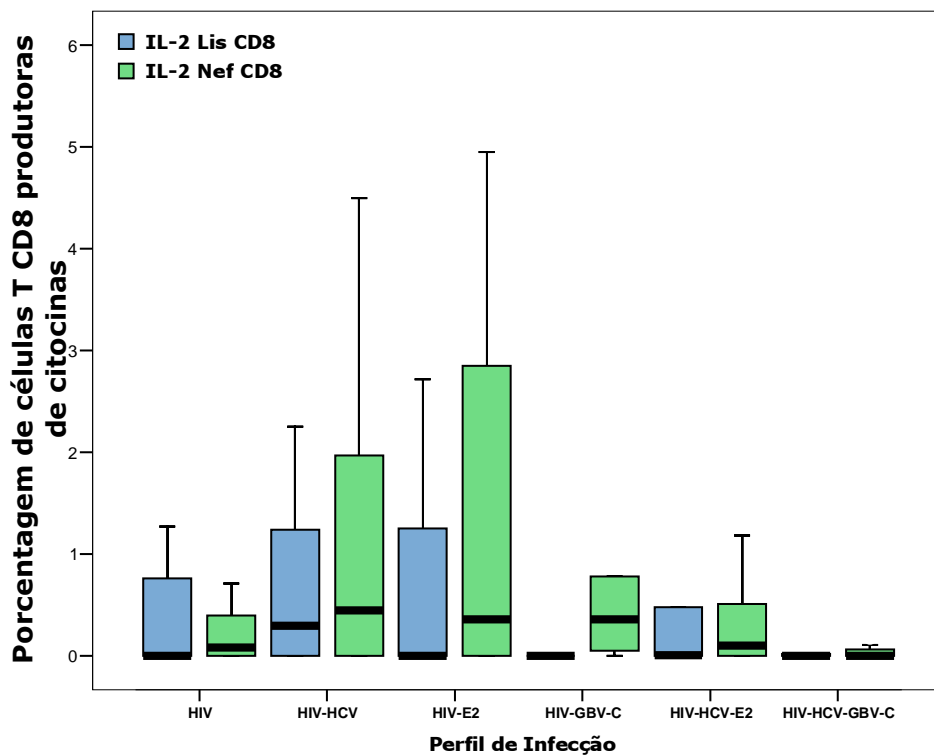


Figura 16. Porcentagem de células TCD4 produtoras de IL-2, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.



**Figura 17. Porcentagem de células TCD8 produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.**



**Figura 18. Porcentagem de células TCD8 produtoras de IL-2, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.**

**Tabela 13. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T<math>\gamma\delta</math></b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math> DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N=80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,06 $\pm$ 0,15	0,00	0,00	1,00	-0,01; 0,14
<b>HIV-E2 (14)</b>	0,33 $\pm$ 0,54	0,00	0,00	2,00	0,09; 0,57
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,31 $\pm$ 0,64	0,00	0,00	2,00	-0,10; 0,72
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,32 $\pm$ 0,63	0,05	0,00	2,00	-0,47; 1,11
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N = 135</b>					
<b>HIV (45)</b>	0,26 $\pm$ 0,41	0,08	0,00	1,73	0,13; 0,39
<b>HIV-E2 (24)</b>	0,46 $\pm$ 1,12	0,18	0,00	5,80	0,01; 0,92
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	0,19 $\pm$ 0,54	0,00	0,00	2,60	-0,047; 0,43
<b>HIV-HCV (27)</b>	0,16 $\pm$ 0,21	0,09	0,00	0,65	0,04; 0,43
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,37 $\pm$ 0,63	0,19	0,00	1,90	-0,15; 0,90
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,70 $\pm$ 1,86	0,10	0,00	6,59	-0,47; 1,89
<b>IL-2</b>					
<b>Lisado Viral</b>					
<b>N=80</b>					
<b>HIV (21)</b>	0,83 $\pm$ 1,83	0,00	0,00	7,00	-0,06; 1,71
<b>HIV-E2 (14)</b>	1,87 $\pm$ 4,23	0,00	0,00	16,00	-0,01; 3,74
<b>HIV-GBV-C (6)</b>	0,44 $\pm$ 1,04	0,00	0,00	4,00	-0,22; 1,10
<b>HIV-HCV (22)</b>	0,15 $\pm$ 0,32	0,00	0,00	1,00	0,26; 0,55
<b>HIV-HCV-E2 (7)</b>	0,88 $\pm$ 0,75	0,84	0,00	2,00	-0,32; 2,09
<b>HIV-HCV-GBV-C (10)</b>	6,53 $\pm$ 15,96	0,00	0,00	39,00	-10,23; 23,28
<b>Peptídeos de Nef</b>					
<b>N=135</b>					
<b>HIV (45)</b>	1,15 $\pm$ 2,39	0,29	0,00	13,00	0,36; 1,94
<b>HIV-E2 (24)</b>	2,09 $\pm$ 3,66	0,61	0,00	16,00	0,46; 3,71
<b>HIV-GBV-C (16)</b>	3,19 $\pm$ 7,46	0,39	0,00	26,00	-1,56; 7,93
<b>HIV-HCV (27)</b>	1,61 $\pm$ 1,63	1,57	0,00	4,00	-0,42; 3,63
<b>HIV-HCV-E2 (9)</b>	0,52 $\pm$ 0,60	0,46	0,00	1,00	-0,44; 1,48
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	0,23 $\pm$ 0,46	0,00	0,00	1,00	-0,20; 0,66

Não houve correlação entre a CV do HIV e a produção de IFN- $\gamma$  ( $P=0,057$ ;  $P=0,523$ ) e IL-2 ( $P=0,259$ ;  $P=0,123$ ) na população de células T $\gamma\delta$  após estimulação com lisado viral ou peptídeos de Nef.

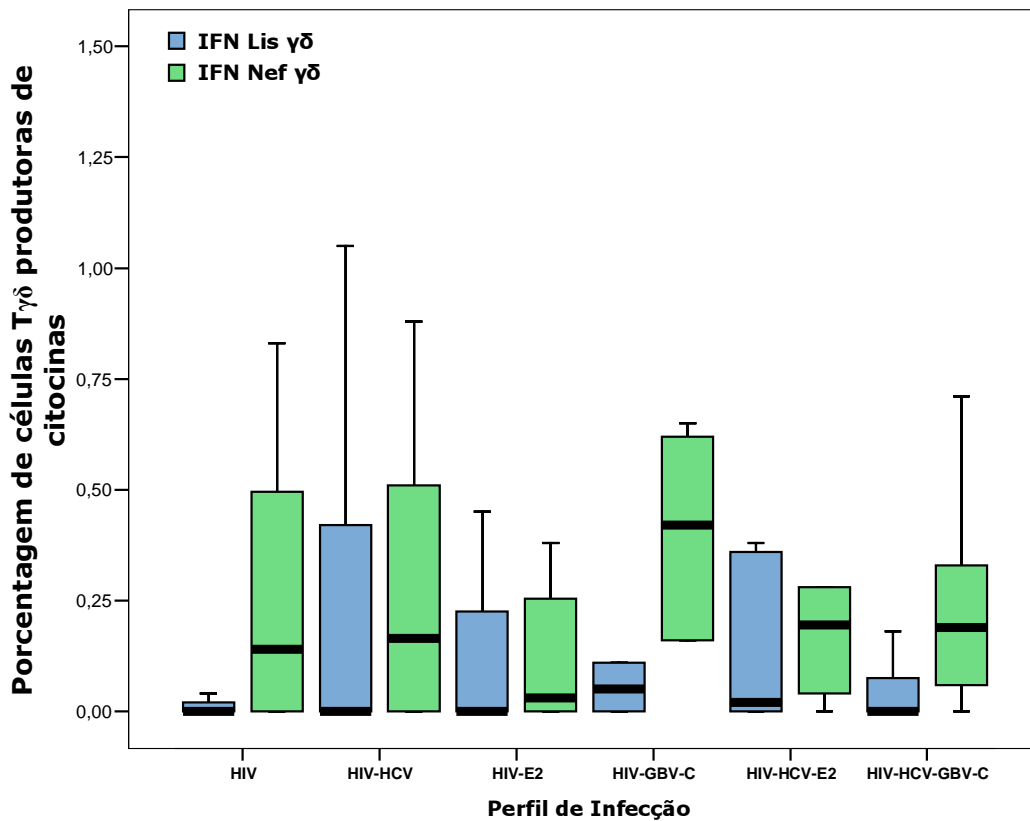


Figura 19. Porcentagem de células T $\gamma\delta$  produtoras de IFN- $\gamma$ , após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.

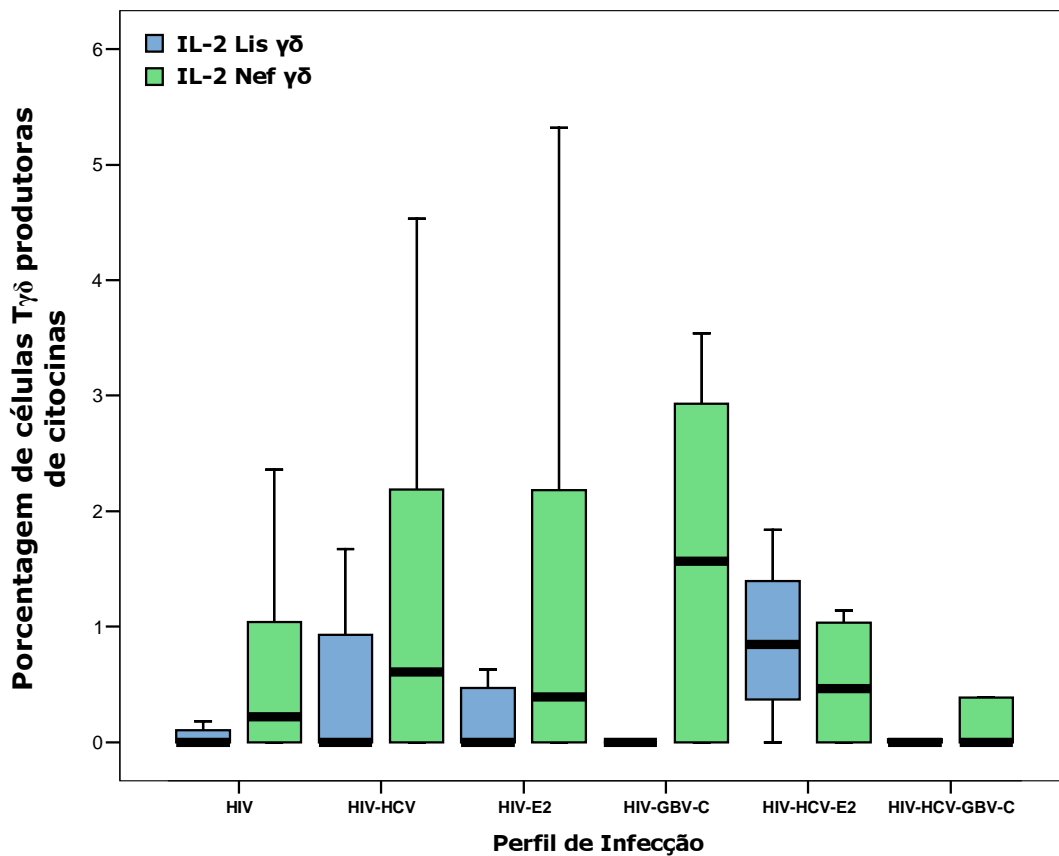


Figura 20. Porcentagem de células T $\gamma\delta$  produtoras de IL-2, após estimulação específica com Lisado Viral e Peptídeos de Nef.



À exemplo dos resultados obtidos com estimulação inespecífica, quando os 9 pacientes co-infectados pelo HCV que estavam em uso de interferon e ribavirina foram excluídos da análise, também não foram observadas diferenças significativas na produção de citocinas nas diferentes populações celulares, de acordo com o perfil de infecção (dados não mostrados).

Os resultados obtidos após a estimulação com lisado viral e peptídeos de Nef confirmam a dificuldade de detectar as respostas antígeno-específicas, que dependem de memória imunológica preservada e variam de indivíduo para indivíduo. Indivíduos com resposta antígeno-específica superior ou igual a 1% (descontada a produção basal do controle negativo) foram considerados bons respondedores e analisados como um grupo diferenciado, dentro de cada perfil de infecção.

Dos 135 indivíduos testados para Nef, 66 (48,8%) apresentaram resposta antígeno específica para pelo menos uma das populações celulares (CD4, CD8,  $T\gamma\delta$ ), sendo 24 (17,7%) indivíduos HIV monoinfectados, 14 (10,3%) HIV-HCV, 13 (9,6%) HIV-E2 – positivos para anticorpos anti-E2 do GBV-C, 8 (5,9%) HIV co-infectados pelo GBV-C, 5 (3,8%) HIV-HCV-E2 e 2 (1,5%) com tripla infecção HIV-HCV-GBV-C.

Não houve diferença estatística entre as médias da produção de IFN- $\gamma$  ( $P=0,141$ ;  $P=0,161$  e  $P=0,234$ ) e IL-2 ( $P=0,138$ ;  $P=0,406$  e  $P=0,447$ ), nas populações celulares T CD4, T CD8 e  $T\gamma\delta$ , quando a estatística não paramétrica foi aplicada.

Não houve diferença significativa nas proporções de indivíduos respondedores aos peptídeos de Nef, de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,765$ ).

Os resultados dos bons respondedores ao desafio com peptídeos da proteína Nef do HIV-1 são apresentados nas Tabelas 14 a 16 e nas Figuras 21 e 22.

**Tabela 14. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1 na população T CD4, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD4</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Bons respondedores (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>HIV</b>	1	-	-	-	7,61
<b>HIV-HCV</b>	2	1,07 $\pm$ 0,06	1,07	1,03	1,12
<b>HIV-E2</b>	4	1,52 $\pm$ 0,48	1,38	1,13	2,19
<b>HIV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-E2</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	1	-	-	-	1,21
<b>IL-2</b>					
<b>HIV</b>	10	2,7 $\pm$ 2,39	1,86	1,03	8,91
<b>HIV-HCV</b>	6	4,49 $\pm$ 4,01	3,45	1,34	11,87
<b>HIV-E2</b>	6	6,95 $\pm$ 7,93	3,79	1,37	22,07
<b>HIV-GBV-C</b>	4	1,72 $\pm$ 0,61	1,62	1,15	2,51
<b>HIV-HCV-E2</b>	3	1,25 $\pm$ 0,33	1,09	1,04	1,64
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-

**Tabela 15. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, na população T CD8, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD8</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Bons respondedores (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>HIV</b>	8	1,97 $\pm$ 0,92	1,51	1,27	3,67
<b>HIV-HCV</b>	3	1,77 $\pm$ 0,40	1,69	1,42	2,21
<b>HIV-E2</b>	7	1,93 $\pm$ 5,23	1,52	1,03	5,23
<b>HIV-GBV-C</b>	2	1,24 $\pm$ 0,07	1,24	1,19	1,29
<b>HIV-HCV-E2</b>	1	-	-	-	1,85
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	2	1,08 $\pm$ 0,06	1,08	1,04	1,13
<b>IL-2</b>					
<b>HIV</b>	3	4,57 $\pm$ 4,31	2,27	1,9	9,56
<b>HIV-HCV</b>	9	3,18 $\pm$ 2,38	2,22	1,16	8,78
<b>HIV-E2</b>	5	7,72 $\pm$ 9,23	4,56	2,15	24,11
<b>HIV-GBV-C</b>	2	3,52 $\pm$ 1,22	3,52	2,66	4,39
<b>HIV-HCV-E2</b>	2	2,24 $\pm$ 1,49	2,24	1,18	3,30
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-

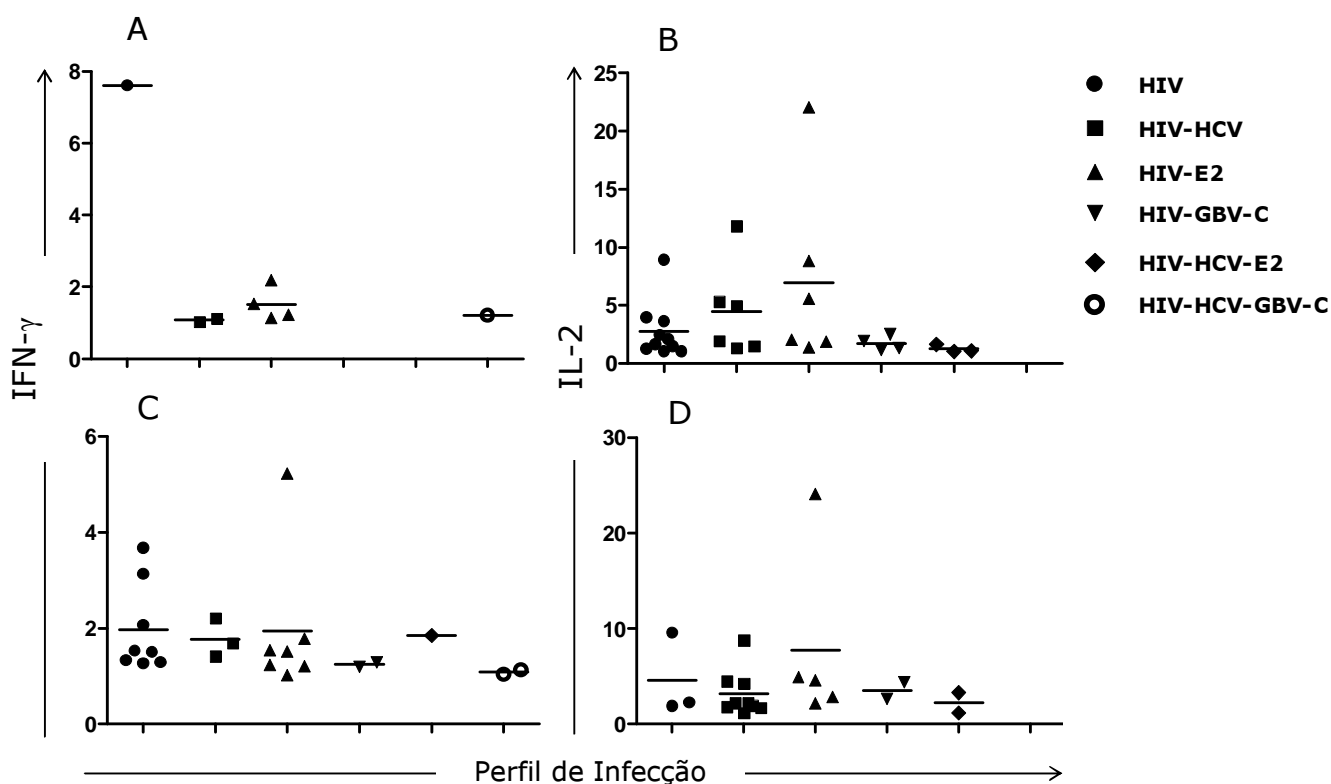
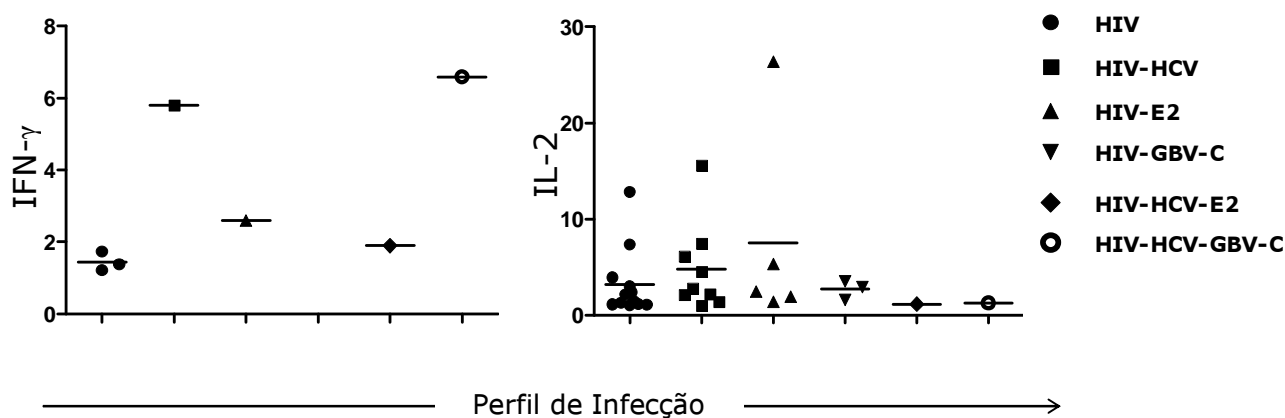


Figura 21. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (% de células produtoras), nas populações de células T CD4 (A e B) e T CD8 (C e D), de acordo com o perfil de infecção.

Tabela 16. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, na população T  $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção.

Produção de Citocinas (% de células produtoras)					
População T $\gamma\delta$					
IFN- $\gamma$					
Perfil de Infecção	Bons respondedores (N)	Média $\pm$ DP	Mediana	Mínimo	Máximo
HIV	3	1,44 $\pm$ 0,26	1,38	1,21	1,73
HIV-HCV	1	-	-	-	5,8
HIV-E2	1	-	-	-	2,6
HIV-GBV-C	-	-	-	-	-
HIV-HCV-E2	1	-	-	-	1,90
HIV-HCV-GBV-C	1	-	-	-	6,59
IL-2					
HIV	12	3,20 $\pm$ 3,52	1,77	1,00	12,8
HIV-HCV	9	4,79 $\pm$ 4,59	2,79	1,00	15,57
HIV-E2	5	7,48 $\pm$ 10,6	2,46	1,38	26,36
HIV-GBV-C	3	2,68 $\pm$ 1,00	2,93	1,57	3,54
HIV-HCV-E2	1	-	-	-	1,14
HIV-HCV-GBV-C	1	-	-	-	1,23



**Figura 22. Resposta antígeno específica ao desafio com peptídeos de Nef do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (% de células produtoras), na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção.**

Dos 80 pacientes desafiados com lisado viral, 35 (43,7%) apresentaram pelo menos uma resposta antígeno específica para uma das populações celulares avaliadas. Desses 35 indivíduos respondedores, 8 (10%) pertenciam ao grupo de pacientes infectados apenas pelo HIV, 14 (17,5%) eram HIV-HCV co-infectados, 6 (7,5%) eram HIV-E2, 1 (1,25%) era HIV-GBV-C co-infectado, 4 (5%) eram HIV-HCV-E2 e 2 (2,5%) apresentavam tripla infecção.

Não houve diferença estatística entre as médias da porcentagem de células T CD4 e T $\gamma\delta$  produtoras de IFN- $\gamma$  ( $P=0,345$ ;  $P=0,361$ , respectivamente). O teste estatístico não pode ser aplicado para essa citocina na população T CD8, devido ao número insuficiente de indivíduos respondedores. Também não foi observada diferença estatística para a média de células produtoras de IL-2 ( $P=0,345$ ;  $P=0,297$  e  $P=0,498$ ) nas populações celulares T CD4, T CD8 e T $\gamma\delta$ .

Não houve diferença significativa nas proporções de indivíduos respondedores ao lisado viral, de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,456$ ). Os resultados dos bons respondedores ao desafio com lisado viral do HIV-1 são apresentados nas Tabelas 17 a 19 e nas Figuras 23 e 24.

**Tabela 17. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, na população T CD4, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD4</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Bons respondedores (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>HIV</b>	2	2,37 $\pm$ 1,43	2,37	1,36	3,39
<b>HIV-HCV</b>	3	1,30 $\pm$ 0,28	1,33	1,01	1,57
<b>HIV-E2</b>	1	-	-	-	2,01
<b>HIV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-E2</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	1	-	-	-	1,17
<b>IL-2</b>					
<b>HIV</b>	6	2,51 $\pm$ 1,13	2,20	1,28	4,32
<b>HIV-HCV</b>	7	5,51 $\pm$ 2,17	3,46	1,30	15,94
<b>HIV-E2</b>	3	2,39 $\pm$ 1,95	1,47	1,07	4,63
<b>HIV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-E2</b>	3	4,37 $\pm$ 1,30	4,19	3,18	5,76
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	1	-	-	-	13,32

**Tabela 18. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral HIV-1, na população T CD8, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Produção de Citocinas (% de células produtoras)</b>					
<b>População T CD8</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Bons respondedores (N)</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>HIV</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV</b>	1	-	-	-	1,59
<b>HIV-E2</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-E2</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>IL-2</b>					
<b>HIV</b>	5	2,05 $\pm$ 0,79	2,43	1,13	2,9
<b>HIV-HCV</b>	7	4,89 $\pm$ 4,95	2,25	1,02	14,03
<b>HIV-E2</b>	4	1,81 $\pm$ 0,64	1,64	1,25	2,72
<b>HIV-GBV-C</b>	-	-	-	-	-
<b>HIV-HCV-E2</b>	2	6,1 $\pm$ 2,55	6,17	4,37	7,98
<b>HIV-HCV-GBV-C</b>	1	-	-	-	9,19

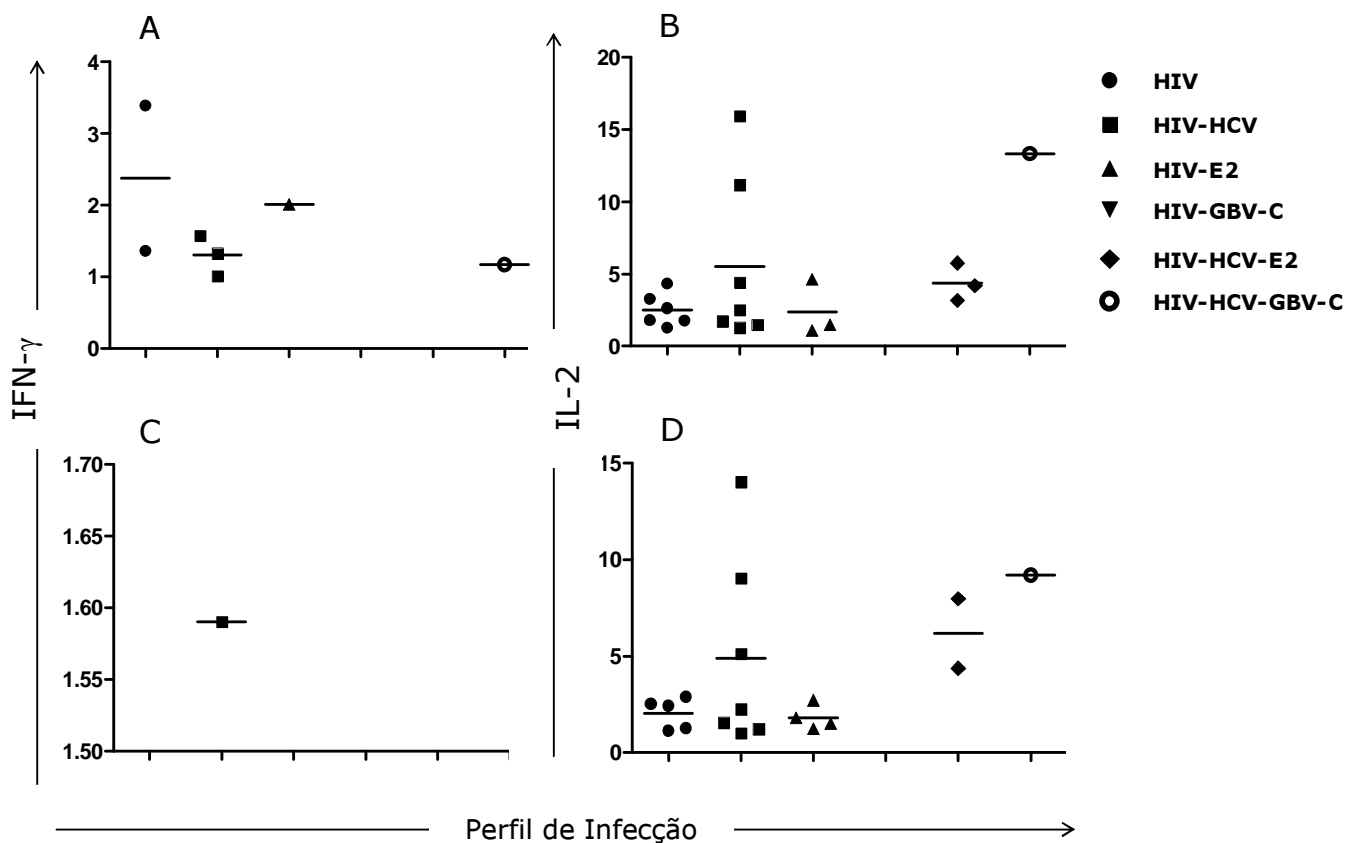
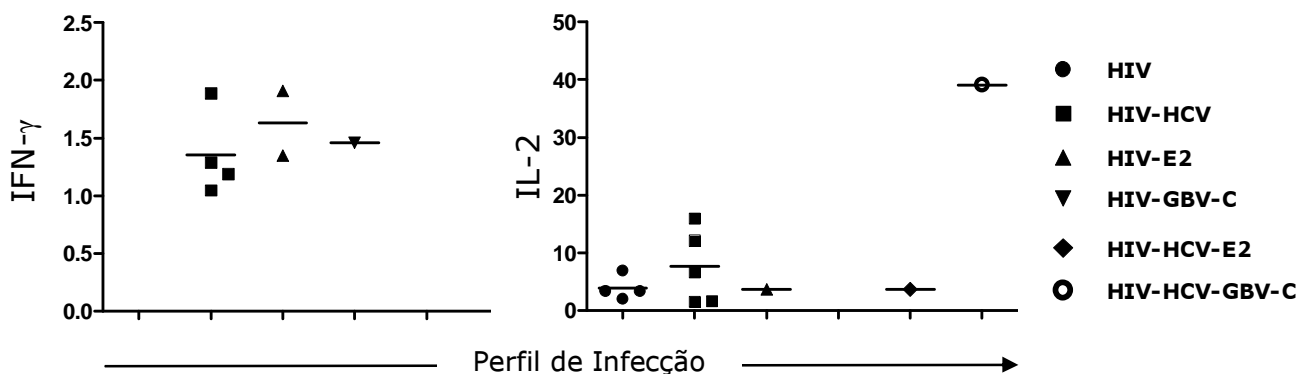


Figura 23. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (% de células produtoras), nas populações de células T CD4 (A e B) e T CD8 (C e D), de acordo com o perfil de infecção.

Tabela 19. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, na população T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção.

Produção de Citocinas (% de células produtoras)					
População T $\gamma\delta$					
IFN- $\gamma$					
Perfil de Infecção	Bons respondedores (N)	Média $\pm$ DP	Mediana	Mínimo	Máximo
HIV	-	-	-	-	-
HIV-HCV	4	1,35 $\pm$ 0,37	1,24	1,05	1,89
HIV-E2	2	1,63 $\pm$ 0,39	1,46	1,35	1,91
HIV-GBV-C	-	-	-	-	-
HIV-HCV-E2	-	-	-	-	-
HIV-HCV-GBV-C	-	-	-	-	-
IL-2					
HIV	4	3,38 $\pm$ 2,09	3,34	1,98	6,88
HIV-HCV	5	7,58 $\pm$ 6,38	6,66	1,54	15,94
HIV-E2	1	-	-	-	3,65
HIV-GBV-C	-	-	-	-	1,84
HIV-HCV-E2	1	-	-	-	1,84
HIV-HCV-GBV-C	1	-	-	-	39,12



**Figura 24. Resposta antígeno específica ao desafio com lisado viral do HIV-1, com produção de IFN- $\gamma$ , na população de células T $\gamma\delta$ , de acordo com o perfil de infecção.**

#### 4.8. Avaliação da Ativação Imune Celular

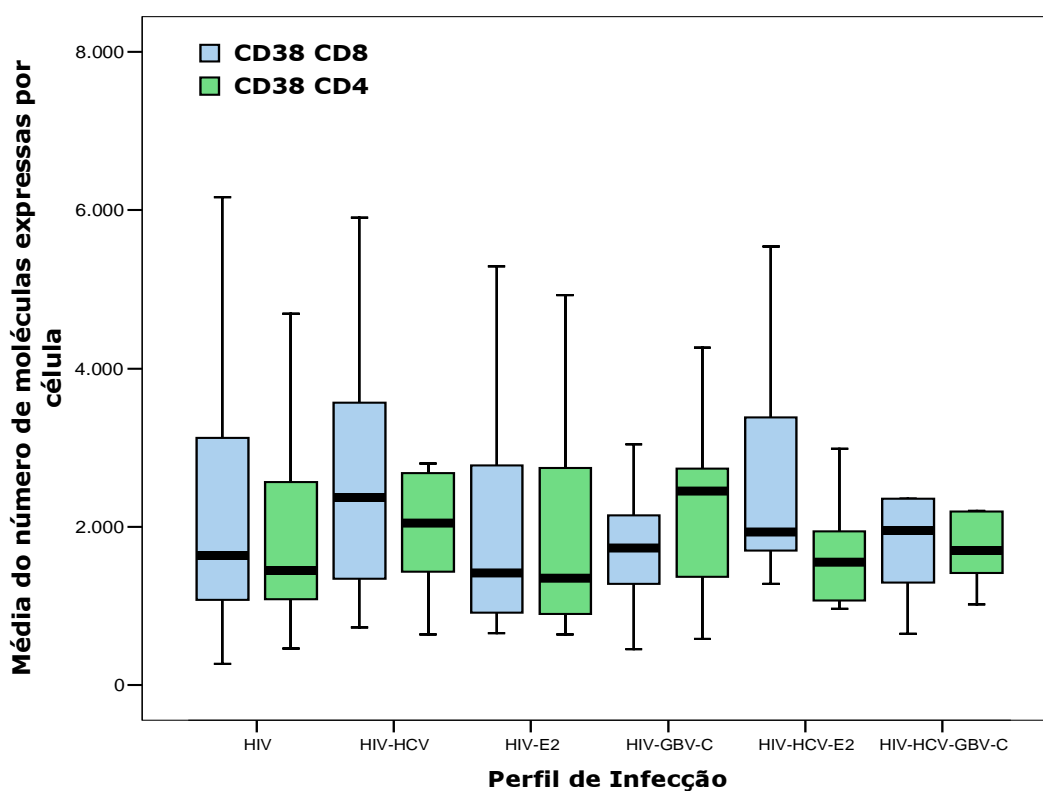
De acordo com o esperado, a expressão do marcador de ativação CD38 na população de células T CD8 apresentou correlação positiva com a CV do HIV ( $r=391$ ;  $P=0,001$ ). Da mesma forma, houve correlação positiva entre a CV do HIV e a expressão de CD38 na população de células T CD4 ( $r=0,197$ ;  $P=0,017$ ).

**Tabela 20. Expressão do marcador de ativação CD38 nas populações celulares T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção.**

<b>Marcador de ativação CD38</b>				
<b>(Média do número de moléculas expressas por célula)</b>				
<b>N=159</b>				
<b>T CD4</b>				
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média±DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>HIV (66)</b>	2.054±1.704	467	11.330	1.625; 2.483
<b>HIV-HCV (28)</b>	2.610±2.365	641	11.460	1.674; 3.546
<b>HIV-E2 (24)</b>	2.225±1.705	638	6.748	1.505; 2.945
<b>HIV-GBV-C (17)</b>	2.200±1.045	584	4.265	1.663; 2.737
<b>HIV-HCV-E2 (10)</b>	2.467±2.867	962	10.448	416; 4.518
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	2.147±1.360	1.021	5.212	1.325; 2.970
<b>T CD8</b>				
<b>HIV (66)</b>	2.704±2.903	270	17.624	1.973; 3.435
<b>HIV-HCV (28)</b>	3.190±3.340	731	17.010	1.869; 4.512
<b>HIV-E2 (24)</b>	3.053±3.719	655	13.478	1.404; 4.702
<b>HIV-GBV-C (17)</b>	2.112±1.470	456	6.280	1.356; 2.868
<b>HIV-HCV-E2 (10)</b>	3.583±4.079	1.284	14.628	665; 6.502
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	2.854±3.063	650	11.586	1.129; 4.783

A expressão de CD38, tanto na população de células T CD8, quanto na população de células T CD4, não apresentou correlação com a CV do GBV-C ( $r=-133$ ;  $P=0,588$  e  $r=-0,77$ ;  $P=0,753$ ).

Não houve diferença estatística entre as médias da expressão de CD38 nas populações celulares T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,833$ ;  $P=0,861$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 20 e na Figura 25.



**Figura 25. Expressão do marcador de ativação CD38, nas populações celulares T CD4 e T CD8, de acordo com o perfil de infecção.**

#### 4.9. Enzimas Hepáticas

Os níveis séricos de ALT, AST e GGT foram avaliados em todos os pacientes incluídos no estudo, na data da coleta.

Em uma primeira análise, considerando todos os pacientes incluídos no estudo, a análise estatística revelou diferenças significativas nas médias



das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT, de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,0001$ ;  $P=0,001$  e  $P=0,022$ , respectivamente).

Os resultados dessa primeira análise para todos os pacientes estão compilados na Tabela 21 e na Figura 26.

**Tabela 21. Avaliação das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT, de acordo com o perfil de infecção.**

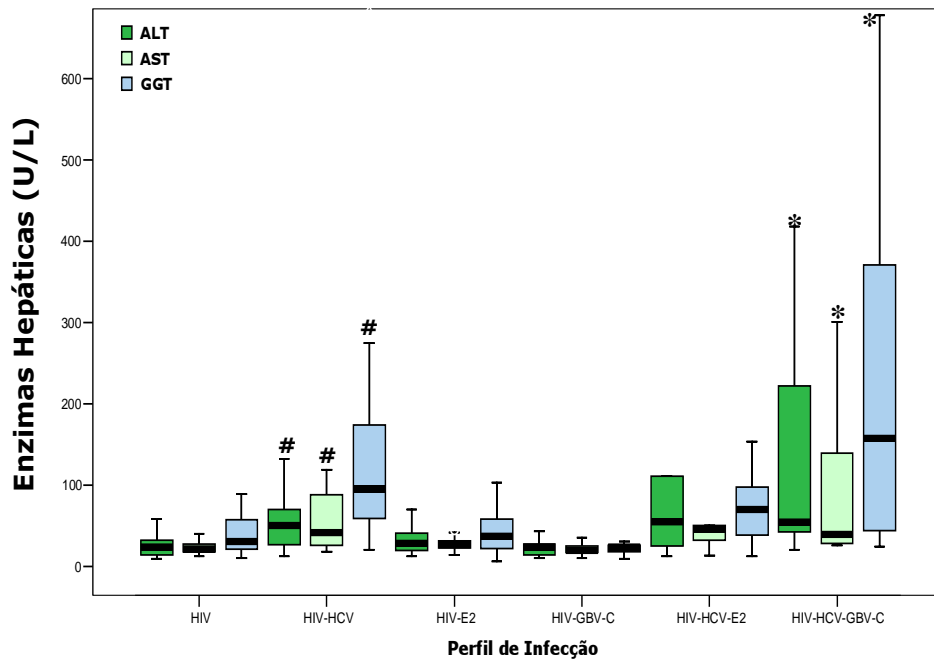
<b>Enzimas Hepáticas</b>					
<b>N=157*</b>					
<b>ALT (U/L)</b>					
<b>Perfil de Infecção</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>C.I. (95%)</b>
<b>HIV (64)</b>	25,68	16	9	87	21,7; 29,66
<b>HIV-HCV (28)</b>	67,37	58	12	258	44,4; 90,37
<b>HIV-E2 (24)</b>	32,67	18	12	84	24,88; 40,45
<b>HIV-GBV-C (17)</b>	21,88	9	10	43	17; 26,77
<b>HIV-HCV-E2 (10)</b>	87,10	96	12	344	17,7; 156
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	152	173	20	593	52,85; 253
<b>AST (U/L)</b>					
<b>HIV (64)</b>	25,45	13,7	12	93	22,04; 28,85
<b>HIV-HCV (28)</b>	62,93	56,87	18	242	40,43; 85,42
<b>HIV-E2 (24)</b>	31	21	14	125	22,16; 40
<b>HIV-GBV-C (17)</b>	20,41	6,63	10	35	17; 23
<b>HIV-HCV-E2 (10)</b>	60	58	13	215	18,66; 101,74
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	175	364	26	1.410	34; 385
<b>GGT (U/L)</b>					
<b>HIV (64)</b>	97	232	10	1.362	39,9; 155
<b>HIV-HCV (28)</b>	212	293	20	1.200	95,82; 328
<b>HIV-E2 (24)</b>	65	118	6	611	14,8; 46,9
<b>HIV-GBV-C (17)</b>	32,47	28	9	109	17,98; 46,96
<b>HIV-HCV-E2 (10)</b>	128	189	12	656	7,01; 264
<b>HIV-HCV-GBV-C (14)</b>	227	215	6	1.362	83,98; 153,55

\* as amostras de dois pacientes não foram processadas por motivos técnicos.

Em um segundo momento, os pacientes HIV-HCV co-infectados em uso de interferon e ribavirina foram excluídos da análise, uma vez que o tratamento para o HCV poderia interferir na avaliação da função hepática.

A análise univariada demonstrou que existe diferença significativa entre as médias das enzimas hepáticas AST e ALT ( $P=0,0001$ ;  $P=0,001$ ,

respectivamente), enquanto a diferença entre as médias da GGT se transformou em tendência estatística ( $P=0,056$ ).



**Figura 26. Avaliação das enzimas ALT, AST e GGT, de acordo com o perfil de infecção.** (ANOVA) \*  $P<0,05$  quando comparado aos grupos HIV, HIV-HCV e HIV-E2. #  $P<0,05$  comparado ao grupo HIV.

A análise multivariada, considerando idade, sexo dos pacientes, uso de terapia antirretroviral, etilismo, tratamento para tuberculose, contagem de células T CD4 e T CD8 e CV do HIV e o perfil de infecção, demonstrou que existe associação entre a ALT e a presença de co-infecção pelo HCV e pelo GBV-C ( $P=0,0001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

---

## 5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos conduzidos a partir da década de 90 associaram a presença de RNA do GBV-C à progressão mais lenta para AIDS, diminuição das taxas de mortalidade e maior sobrevida do paciente HIV soropositivo após o desenvolvimento da AIDS <sup>(46, 98, 101, 161)</sup>. Para ilustrar, Williams e colaboradores <sup>(92)</sup> avaliaram uma coorte de 271 homens que faziam parte de um estudo multicêntrico (*Multicenter Acquired Immunodeficiency Syndrome Cohort Study-MACS*) e demonstraram que pacientes HIV-GBV-C co-infectados apresentaram aumento significativo da sobrevida, com relação aos indivíduos HIV mono-infectados. Os autores sugerem que esse incremento é dependente do tempo e da manutenção da replicação do GBV-C, uma vez que os pacientes que perderam a viremia apresentaram pior prognóstico. Nesse estudo, a presença de anti-E2 também parece ter conferido certo grau de proteção, uma vez que pacientes HIV com positividade para esses anticorpos também apresentaram melhores resultados, embora sem significância estatística, quando comparados aos pacientes HIV mono-infectados ou àqueles que eliminaram a infecção sem o desenvolvimento de resposta específica.

Os fatores pelos quais os pacientes HIV soropositivos eliminam a infecção e a razão pela qual a perda da viremia está relacionada a um pior prognóstico nesses pacientes ainda não estão esclarecidos. Alguns autores especulam que a eliminação do GBV-C está relacionada à progressão da infecção pelo HIV e à diminuição do número de células T CD4, alvos da replicação tanto do HIV, quanto do GBV-C <sup>(162)</sup>. Dessa forma, o GBV-C não seria necessariamente um fator protetor e sim o indício de um sistema imune mais competente.

Estudos desenvolvidos por outras equipes apresentam resultados contraditórios e relatam que nenhum efeito protetor do GBV-C sobre a infecção pelo HIV foi observado <sup>(104, 163-164)</sup>. Como exemplo, Brust e colaboradores <sup>(165)</sup> concluíram que a infecção pelo GBV-C parecia piorar, ao invés de melhorar, a sobrevida dos pacientes HIV soropositivos.

De acordo com os estudos publicados, percebe-se que desde o desenvolvimento dos primeiros trabalhos até o presente momento, existem controvérsias sobre o papel do GBV-C sobre o curso da infecção pelo HIV e o possível efeito benéfico dessa interação viral ainda é amplamente discutido.

Nossos resultados demonstraram que nem a viremia pelo GBV-C e nem a presença de anticorpos anti-E2 exercem influência sobre os parâmetros imunológicos e virológicos avaliados, tanto em pacientes HIV soropositivos, quanto nos pacientes HIV-HCV co-infectados crônicos.

Devido às vias comuns de transmissão, a infecção pelo GBV-C em pacientes HIV soropositivos é comum, ocorrendo entre 15-40% dos indivíduos soropositivos, dependendo da população avaliada <sup>(166-170)</sup>. Neste estudo, 28,9% dos pacientes HIV, negativos para o HCV, apresentaram replicação ativa pelo GBV-C e 22,4% foram positivos para anticorpos anti-E2, corroborando os dados da literatura.

A infecção pelo GBV-C também ocorre com frequência entre indivíduos HIV-HCV co-infectados e também varia de acordo com a coorte avaliada <sup>(171-173)</sup>. Em nosso estudo, 46,1% dos pacientes HIV-HCV co-infectados apresentavam também co-infecção pelo GBV-C, enquanto 26,9% apresentavam anticorpos anti-E2 circulantes. Pelo menos um estudo relata que o tratamento com interferon em pacientes HCV é capaz de eliminar a infecção pelo GBV-C sem o desenvolvimento de anticorpos <sup>(174)</sup>.

Considerando que a eliminação da infecção em indivíduos imunocomprometidos ou que fizeram uso de tratamento com interferon pode ocorrer sem o desenvolvimento de anticorpos <sup>(92)</sup>, a validade da pesquisa de anticorpos anti-E2 do GBV-C para identificar pacientes que já tiveram contato com o vírus em pacientes HIV e HIV-HCV co-infectados é questionável.

Estudos anteriores demonstraram contagens superiores de linfócitos T CD4 e menores níveis plasmáticos de RNA do HIV em indivíduos HIV com replicação ativa pelo GBV-C, quando comparados aos indivíduos infectados somente pelo HIV <sup>(26, 92, 101, 175)</sup>. Os nossos resultados, no entanto, contrariam esses achados, pois não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação à contagem de células T CD4, T CD8 e níveis plasmáticos de RNA do HIV, quando os grupos foram comparados considerando o perfil de infecção. Outros estudos, porém, apresentam resultados semelhantes aos encontrados no nosso estudo, demonstrando que o GBV-C não está relacionado a níveis mais elevados de células T CD4 ou mesmo menor CV do HIV <sup>(104, 176)</sup>.

Diferente da grande maioria dos estudos anteriores, que incluíram pacientes com pouco tempo de infecção pelo HIV, o nosso estudo se propôs a avaliar pacientes cronicamente infectados. A média de tempo de diagnóstico de infecção na nossa coorte foi de 9,7 (4,8) anos para o HIV e de 4,8 (4,06) para o HCV. Em uma avaliação mais cuidadosa percebe-se que os estudos que verificaram o efeito do GBV-C sobre o curso da infecção pelo HIV incluíram populações consideravelmente diferentes. Alguns estudos não reportam o tempo de infecção pelo HIV, enquanto outros avaliaram coortes de indivíduos recém infectados ou em vários estágios da

infecção. Dessa forma, se existe um efeito protetor da viremia, esse pode não se estender a todos os pacientes, em todos os estágios de infecção.

O uso de antirretrovirais interfere diretamente nos parâmetros avaliados e poderia ser um fator gerador de confusão caso fosse ignorado. No entanto, no nosso estudo, a grande maioria (85,5%) dos pacientes incluídos estava em uso de terapia antirretroviral, sendo que a proporção de pacientes em tratamento não foi significativamente diferente entre os grupos, quando estratificados para análise de acordo com o perfil de infecção ( $P=0,568$ ). O perfil de prescrição de antirretrovirais também não foi diferente entre os pacientes incluídos. Resultados de estudos observacionais sugerem que o GBV-C influencia a resposta à terapia antirretroviral. A equipe de Rodriguez <sup>(177)</sup> demonstrou que os pacientes HIV soropositivos com viremia pelo GBV-C atingem mais frequentemente níveis plasmáticos indetectáveis de RNA do HIV. A equipe de Brumme <sup>(178)</sup> também avaliou o efeito do GBV-C sobre a terapia antirretroviral em uma coorte de 441 indivíduos HIV soropositivos iniciando a terapia antirretroviral, dos quais 90 (20%) eram co-infectados pelo GBV-C. Os autores verificaram níveis diminuídos de RNA do HIV no início do seguimento nos pacientes que apresentavam replicação pelo GBV-C, no entanto, não observaram influência da viremia sobre o tempo em que os pacientes atingiram sucesso virológico e nem mesmo no tempo em que ocorreu falência imunológica e virológica após o início do tratamento. Em um trabalho posterior, a equipe de Antonucci <sup>(109)</sup> avaliou o efeito da viremia pelo GBV-C na resposta à terapia antirretroviral altamente potente em indivíduos HIV co-infectados pelo HCV. Corroborando, pelo menos em parte, os resultados obtidos pela equipe de Brumme <sup>(178)</sup>, os autores demonstraram que o GBV-C não interfere no tempo em que os pacientes

atingem o sucesso virológico, traduzido pelos níveis indetectáveis de RNA do HIV no plasma, entretanto, sugerem que os pacientes co-infectados pelo GBV-C apresentam taxas reduzidas de rebote viral. Neste estudo não encontramos diferença significativa nas proporções de pacientes com CV do HIV indetectável, de acordo com o perfil de infecção, e, dessa forma, sugerimos que o GBV-C não exerceu influência sobre a resposta à terapia antirretroviral nessa coorte.

A questão central desse estudo foi avaliar o efeito da viremia do GBV-C e da presença de anticorpos anti-E2 sobre a resposta imune em pacientes HIV e em pacientes HIV-HCV. Para tanto, avaliamos a produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  nas populações celulares T CD4, T CD8 e, de forma inédita nesse perfil de co-infecção, nas células T $\gamma\delta$ .

Não observamos diferenças significativas na produção das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  de acordo com o perfil de infecção, tanto após estimulação inespecífica, quanto após a estimulação com peptídeos de Nef e lisado viral, nas três populações avaliadas.

Em meados da década de 80 vimos surgir um novo paradigma referente à produção de citocinas pelas células Th, que exibiriam dois padrões exclusivos de resposta, Th1 e Th2, sendo citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  produzidas pelas células do tipo Th1 e IL-4 e IL-10 produzidas pelas células Th2, *in vitro* <sup>(179-181)</sup>. Embora atraente, esse paradigma foi mais dificilmente aplicável às células humanas, uma vez que as células de indivíduos saudáveis, quando submetidas à estimulação antigênica, produziam tanto citocinas do perfil Th1, quanto do perfil Th2 <sup>(182)</sup>. No entanto, outros estudos conduzidos nessa época demonstraram a diminuição da produção de citocinas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-2, em detrimento da resposta Th2 em pacientes HIV soropositivos, acompanhando



a progressão da doença para AIDS <sup>(183-187)</sup>. De fato, citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2 são citocinas pró-inflamatórias e direcionam a resposta imune celular <sup>(188)</sup>, enquanto citocinas antiinflamatórias como IL-4 e IL-10 direcionam a resposta imune humoral, ineficiente no controle da infecção pelo HIV <sup>(189)</sup>. Consistente com essas afirmações, estudos demonstraram que a produção de IL-2 está diminuída nos estágios mais avançados da infecção e que a administração de IL-2 exógena em pacientes HIV soropositivos melhora a resposta imune, aumentando os níveis circulantes das células T CD4 <sup>(190-191)</sup>. Da mesma forma, a IL-2 exógena aumenta a proliferação de células T CD4 HIV específicas, *in vitro* <sup>(192)</sup>. No entanto, os estudos avaliando os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  demonstram que não ocorre uma definição tão clara no perfil Th1 ou Th2 na infecção pelo HIV. Ullum e colaboradores <sup>(193)</sup> demonstraram que os níveis de IFN- $\gamma$ , avaliados por ELISA, estavam aumentados naqueles indivíduos com contagens de células T CD4 superiores a 200 células/mm<sup>3</sup> e diminuía de acordo com a progressão da doença. Já a equipe de Akerele <sup>(160)</sup> demonstrou que mesmo em estágios avançados da infecção, a produção dessa citocina não está diminuída. Estes dois estudos, no entanto, utilizaram metodologias distintas para avaliar a produção de citocinas. Enquanto Ullum e colaboradores <sup>(193)</sup> avaliaram a produção de IFN- $\gamma$  por ELISA, técnica que não permite a identificação da população celular envolvida na resposta, a equipe de Akerele <sup>(160)</sup> avaliou a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 por citometria de fluxo, em células T CD4.

Em nosso estudo verificamos intensa produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 após a estimulação inespecífica com PMA/ionomicina, demonstrando que esses pacientes, mesmo crônicos, estavam com sua atividade responsiva preservada, independente do perfil de infecção, ou seja, independente da presença de co-infecção pelo HCV, GBV-C ou mesmo de anticorpos anti-E2.

A equipe de Nunnari <sup>(147)</sup> avaliou o perfil Th1 e Th2 em pacientes HIV co-infectados pelo GBV-C. Os autores sugerem que neste contexto o GBV-C retarda a progressão para AIDS preservando o perfil Th1. Contrariando os resultados de Nunnari e colaboradores <sup>(147)</sup>, Gimenez-Barcons e colaboradores <sup>(194)</sup> avaliaram os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas em uma coorte de 161 indivíduos HIV soropositivos (13,6±3,55 anos de tempo de diagnóstico), dos quais 44 (27%) eram co-infectados pelo GBV-C e 18 (21%) apresentavam anticorpos anti-E2 do GBV-C e não encontraram diferenças nos níveis plasmáticos de citocinas entre os diferentes grupos avaliados. Os autores sugerem que o GBV-C não influencia a resposta imune de maneira clinicamente significativa.

Mesmo que não se possa fazer uma comparação direta entre o nosso estudo e os trabalhos de Nunnari <sup>(147)</sup> e Gimenez-Barconz <sup>(194)</sup>, devido às diferenças metodológicas, nossos resultados são discordantes dos obtidos pela primeira equipe, enquanto são consonantes com os obtidos pela segunda.

A resposta imune mediada pelas células T desempenha um papel importante no controle da infecção pelo HIV e, quando eficiente, pode retardar a progressão para AIDS. Estudos demonstram que o repertório de células T antígeno-específicas sofre modificações ao longo do curso da infecção pelo HIV <sup>(195)</sup>, sendo mais drásticas no repertório de células T CD8 <sup>(196)</sup>. Existem evidências de que a constante estimulação antigênica e a ativação imune crônica favorecem a disfunção das células T, o que pode ser corrigido com a introdução de terapia antirretroviral, nos estágios iniciais da infecção <sup>(197)</sup>. Além disso, dados obtidos de estudos com coortes de indivíduos cronicamente infectados demonstram que as respostas específicas contra antígenos do HIV declinam com a progressão da doença e

estão diretamente relacionadas aos níveis de replicação viral <sup>(198)</sup>. Os nossos dados demonstram que existe correlação positiva entre a CV do HIV e a produção de IFN- $\gamma$  após a estimulação com peptídeos de Nef, nas populações T CD4 e T CD8, demonstrando certo grau de preservação da resposta imune específica aos antígenos do HIV. Essa preservação, no entanto, foi independente da viremia pelo GBV-C ou da presença de anticorpos anti-E2, uma vez que não houve diferença no padrão de resposta entre os grupos quando se considerou o perfil de infecção. Também não houve diferença entre as proporções de indivíduos respondedores de acordo com o perfil de infecção, o que demonstra que o GBV-C não influencia a produção das citocinas avaliadas.

As respostas imunes específicas são geralmente de menor magnitude, quando comparadas às respostas obtidas com estimulação inespecífica <sup>(199)</sup>. A resposta das células T $\gamma\delta$ , a exemplo da resposta das células T CD4 e T CD8, demonstrou que parte dos pacientes respondeu de forma eficiente ao estímulo específico lisado viral, embora respostas específicas também tenham sido observadas após estimulação dessas células com peptídeos de Nef. À exceção do estudo conduzido pela equipe de Sathar <sup>(128)</sup>, que avaliou a frequência dessas células em indivíduos HIV co-infectados pelo GBV-C, nenhum outro trabalho publicado até o momento avaliou a população T $\gamma\delta$  no contexto da co-infecção HIV-GBV-C ou mesmo da tripla infecção HIV-HCV-GBV-C. Neste estudo, verificamos que estas células também podem ser eficientes produtoras de IL-2, tanto após a estimulação com mitógenos, quanto após a estimulação antígeno-específica. Não observamos, no entanto, a influência do GBV-C sobre a resposta dessas células.

Ainda como parte da avaliação da resposta imune, avaliamos o efeito da viremia do GBV-C e da presença de anticorpos anti-E2 sobre a expressão do marcador de ativação celular CD38 nas populações T CD4 e T CD8.

O CD38 é uma glicoproteína transmembrana de 45kDa, composta por uma única alfa hélice. O CD38 foi identificado em 1980 por Reinherz e colaboradores <sup>(200)</sup> e inicialmente utilizado como marcador na caracterização de leucemias de células T, B e da linhagem mielóide. Estudos posteriores demonstraram que o CD38 é um marcador de superfície encontrado na maior parte das células do sangue periférico, incluindo células T, B, NK e monócitos e em menor nível de expressão, em plaquetas e eritrócitos (201-203). A molécula CD38 também é expressa nas células imaturas da linhagem hematopoiética e sua expressão diminui com o processo de maturação celular <sup>(204)</sup>. Existem evidências de que essa molécula desempenha funções distintas em diferentes tipos celulares, sendo que nas células T a sinalização via CD38 desencadeia a produção de citocinas inflamatórias como IL-2 e GM-CSF, este último, um fator estimulador do crescimento de colônias, importante na proliferação celular <sup>(205-208)</sup>. Esse marcador pode ser fracamente expresso em células T *naive* e não é expresso em células T de memória (CD45RA), no entanto, a expressão do CD38 aumenta drasticamente quando essas células são ativadas <sup>(209)</sup>. Na infecção pelo HIV, os elevados níveis de expressão do marcador de ativação CD38 estão correlacionados com a CV do HIV, diminuição da contagem de células T CD4 e aumento dos níveis de apoptose <sup>(210-211)</sup>. A expressão do CD38 está elevada desde os estágios iniciais da infecção pelo HIV e aumenta com a progressão da doença (212). Estudos sugerem que a expressão de CD38 pelas células T CD8 pode ser utilizado como marcador

prognóstico da infecção, independente da contagem de células T CD4 e da CV do HIV (213).

Em um estudo recente, Maidana e colaboradores <sup>(214)</sup>, avaliando uma coorte brasileira de pacientes HIV com infecção recente, demonstraram que a expressão de CD38 estava diminuída naqueles co-infectados pelo GBV-C. Em nosso estudo, contudo, não encontramos associação entre a viremia pelo GBV-C e a diminuição da ativação celular, independente do perfil de infecção. Da mesma forma, a presença de anticorpos anti-E2 não foi importante no contexto da ativação imune celular em pacientes HIV ou HIV-HCV co-infectados. Esses resultados discordantes podem ser justificados pela diferença na população avaliada, pois, enquanto Maidana e colaboradores <sup>(214)</sup> avaliaram indivíduos com infecção recente pelo HIV, o nosso estudo avaliou pacientes com infecção crônica pelo HIV. Os nossos dados, quando avaliados em conjunto com os dados da equipe de Maidana <sup>(214)</sup>, sugerem que essa proteção encontrada no início da infecção não se mantém ao longo do curso da doença e por isso pacientes crônicos co-infectados pelo GBV-C não diferem significativamente dos pacientes sem viremia. Corroborando os dados da literatura <sup>(215)</sup>, o nosso estudo demonstrou que existe correlação positiva entre a expressão do marcador de ativação CD38, tanto em células T CD4, quanto em células T CD8, com a CV do HIV. Complementando os nossos achados, não observamos correlação entre a CV do GBV-C e a expressão desse marcador. Outra diferença importante diz respeito à metodologia empregada nos dois estudos. Enquanto a equipe de Maidana avaliou a porcentagem de células expressando o marcador CD38, ou seja, realizou uma análise qualitativa, o nosso estudo apresenta dados quantitativos, ou seja, a média do número de moléculas de CD38 expressas em cada célula, para cada indivíduo. Essa

análise, mais sensível, demonstra que a ativação celular não diminui em pacientes co-infectados pelo GBV-C. De acordo com Hultin e colaboradores <sup>(216)</sup>, a quantificação da expressão de CD38, ao invés da avaliação da porcentagem de células positivas para CD38, aumenta o valor preditivo dessa análise. Da mesma forma, Soriano e colaboradores <sup>(215)</sup> pontuam que a avaliação quantitativa da expressão de CD38 elimina a subjetividade e a variabilidade das análises.

A interação viral HIV-HCV-GBV-C, a exemplo da co-infecção HIV-GBV-C, também permanece controversa. Estudos relatam que não existe associação entre os marcadores prognósticos da infecção pelo HCV na tripla infecção <sup>(93, 151)</sup>, enquanto outros sugerem que existe um efeito protetor do GBV-C nessa situação <sup>(108, 144)</sup>.

Estudos demonstram que a presença do HCV está associada à progressão acelerada para AIDS e morte, principalmente devido à diminuição da contagem de células T CD4 e conseqüente deterioração imunológica <sup>(217-218)</sup>. Da mesma forma, a presença de co-infecção pelo HIV acelera o curso da doença pelo HCV <sup>(219)</sup>.

Neste estudo, a média da CV do HCV foi de  $4,29 \pm 2,17$  em  $\text{Log}^{10}$  e, dos 52 pacientes HCV positivos incluídos, apenas 6 apresentaram níveis indetectáveis. Do total da coorte HIV-HCV, 9 pacientes estavam em recebendo interferon peguilado e ribavirina e nenhum deles apresentou níveis indetectáveis de CV do HCV. Os resultados obtidos quando os pacientes HIV-HCV foram avaliados considerando a presença de RNA (HIV-HCV-GBV-C) e anticorpos anti-E2 do GBV-C (HIV-HCV-E2) ou ausência de marcadores (HIV-HCV), não demonstraram qualquer influência do GBV-C sobre a replicação do HCV, uma vez que não houve diferença significativa entre as médias de CV do HCV nos três grupos. Não houve correlação entre

a CV do GBV-C e a CV do HCV, demonstrando que o GBV-C não interferiu na replicação do HCV ( $P=0,238$ ).

Em um estudo publicado em 1997, a equipe de Bralet <sup>(220)</sup> avaliou as características histopatológicas de pacientes HCV mono infectados e co infectados pelo GBV-C e concluiu que a interação entre os dois vírus não afetou a gravidade da doença causada pelo HCV.

Em um estudo mais recente, Berzsenyi e colaboradores <sup>(144)</sup> verificaram redução da doença avançada relacionada ao HCV, mas não na mortalidade, em pacientes HIV soropositivos co infectados pelo GBV-C, em vigência de terapia antirretroviral altamente potente. Em nosso estudo, quando avaliamos o perfil das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT por meio da análise univariada (ANOVA), observamos níveis plasmáticos mais elevados no grupo de pacientes com tripla infecção, quando comparados ao grupo de pacientes HIV-HCV e ao grupo de pacientes infectados somente pelo HIV. De forma interessante, observa-se um incremento na produção e liberação dessas enzimas a cada "acréscimo" viral. Assim, o grupo infectado apenas pelo HIV apresenta valores próximos aos limites normais, o grupo HIV-HCV, conforme esperado, duplica esses valores, enquanto no grupo com tripla infecção esses níveis estão triplicados. Avaliando as características demográficas, observamos que os grupos são muito semelhantes no que se refere à idade, etilismo, uso de drogas injetáveis, tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV, sendo todos os pacientes incluídos no estudo classificados como crônicos. Também não houve diferença estatística entre a contagem de células T CD4 e níveis plasmáticos de RNA do HIV entre esses grupos, demonstrando que não existe maior deterioração imunológica ou maior frequência de falha terapêutica entre os grupos. Em concordância, a ocorrência de doença definidora de AIDS não

diferiu entre os grupos. Dessa forma, o único fator que parece influenciar na elevação das enzimas hepáticas parece ser a presença da replicação pelo GBV-C, uma vez que a presença de anticorpos anti-E2 não interferiu nesses resultados.

Existem evidências de que a terapia antirretroviral é um fator de risco adicional nos pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo HCV. Estudos sugerem que inibidores de protease como o ritonavir <sup>(221-222)</sup> e o inibidor da transcriptase reversa não nucleosídico nevirapina <sup>(223-224)</sup>, assim como os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos didanosina e estavudina <sup>(225-226)</sup> estão relacionados à maior toxicidade hepática, quando comparados aos demais antirretrovirais. Nossos resultados, no entanto, parecem ser independentes do perfil e tempo de prescrição de antirretrovirais, uma vez que não houve variação significativa de tratamento entre os grupos. Para eliminar outras possíveis interferências na avaliação das enzimas hepáticas, os 9 (17,3%) pacientes HIV-HCV que estavam em uso de interferon e ribavirina foram excluídos para que se procedesse a uma segunda análise dos resultados. Essa exclusão teve como objetivo deixar os grupos mais homogêneos, já que este seria o único fator de heterogeneidade entre os grupos. Quando se procedeu a análise estatística, excluindo esses pacientes, observamos que os níveis de ALT e AST permaneceram significativamente mais elevados no grupo HIV-HCV e no grupo HIV-HCV-GBV-C, enquanto a significância da GGT se transformou em tendência estatística. Procedendo a análise multivariada, considerando o possível efeito de fatores como idade, sexo, tratamento para tuberculose e uso de estatinas, terapia antirretroviral, etilismo, contagem de células T CD4 e T CD8, CV do HIV, CV do HCV e o perfil de infecção, foi possível identificar a influência do perfil de infecção sobre os níveis séricos de ALT.



Avaliando os resultados da dosagem de enzimas hepáticas, observa-se um aumento gradativo a partir do grupo HIV mono infectado, seguido imediatamente pelo grupo HIV-HCV e com níveis ainda mais elevados, no grupo com tripla infecção HIV-HCV-GBV-C ( $25,68 \pm 16$ ;  $67,37 \pm 58$ ;  $152 \pm 173$ ). A análise multivariada associou o RNA do GBV-C como o único fator responsável pelo aumento da enzima ALT nessa coorte de pacientes co-infectados, sendo que a AST perdeu sua significância nessa análise. Ainda que AST e ALT sejam ambas consideradas enzimas hepáticas em razão de suas elevadas concentrações nos hepatócitos, somente a ALT é específica para o fígado, sendo a AST abundantemente presente no miocárdio, músculo esquelético, cérebro e rins. A AST é liberada em maior grau nos distúrbios de caráter crônico, onde ocorre dano progressivo, enquanto a ALT é liberada mais rapidamente pelos hepatócitos nas condições agudas. Uma vez que a questão se o GBV-C replica nos hepatócitos permanece por ser respondida, esse aumento pode estar refletindo uma sobrecarga dos hepatócitos e poderia ser considerado indicativo de dano hepático. Para melhor avaliar essa questão, um estudo de seguimento, que avaliasse outros marcadores de função hepática, como por exemplo, a produção de proteínas, além da avaliação das biópsias hepáticas desses pacientes, poderia esclarecer essa questão. Recentemente nosso grupo estudou 20 pacientes HIV-HCV com indicação de biópsia hepática, dos quais 15% eram triplo infectados (227). Não foram observadas alterações significativas nos resultados de biópsia hepática de acordo com o perfil de infecção (HIV-HCV *versus* HIV-HCV-GBVC) e nem a presença de RNA do GBV-C foi detectada nessas amostras, seja nos hepatócitos ou mesmo nos leucócitos do infiltrado. No entanto, o estudo sugere que o número limitado de amostras tenha interferido na comparação

entre os grupos, já que apenas 3 pacientes apresentaram RNA do GBV-C no plasma. Os resultados de PCR *in situ*, técnica que foi utilizada para detectar a presença de RNA do GBV-C nas amostras de biópsia, talvez tenham sido influenciados pela preservação inadequada dessas amostras, para esse tipo de estudo, uma vez que não foi utilizado formol tamponado e isso tenha favorecido a degradação do RNA viral. Dessa forma, o estudo não permitiu excluir a presença de RNA do GBV-C no fígado dos pacientes com RNA plasmático. Considerando que inicialmente em sua descoberta, o GBV-C foi associado a casos de hepatite fulminante não-A-E <sup>(56-57)</sup> e que pelo menos dois estudos identificaram a presença do RNA do GBV-C em hepatócitos humanos <sup>(11, 228)</sup>, a possibilidade de causar dano hepático não deve ser ignorada antes que se afastem todas as evidências nesse sentido.

## 6. CONCLUSÕES

---

## 6. Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos nesse estudo, concluímos que o GBV-C não exerce qualquer efeito benéfico sobre o curso da infecção pelo HIV ou em pacientes HIV-HCV co-infectados crônicos. Pontuando nossos achados, podemos afirmar que:

- A presença de RNA ou anticorpos anti-E2 do GBV-C não interfere nos parâmetros virológicos como CV do HIV e CV do HCV ou imunológicos como contagem de células T CD4 e T CD8, em pacientes HIV co-infectados ou na tripla infecção;
- A presença de RNA ou anticorpos anti-E2 do GBV-C não influenciam a resposta imune no que se refere à produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  pelas células T CD4, T CD8 e T $\gamma\delta$  em pacientes HIV monoinfectados ou co-infectados pelo HCV crônicos;
- A expressão do marcador de ativação CD38 pelas células T CD4 e T CD8 não é influenciada pela presença de RNA ou de anticorpos anti-E2 do GBV-C;
- A replicação do GBV-C pode causar sobrecarga hepática, como demonstrado pela elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas, em pacientes com tripla infecção e esta interação deve ser vista com cautela até que se exclua completamente a possibilidade de patogenicidade do GBV-C nessa situação.

## 7. REFERÊNCIAS

---

## 7. REFERÊNCIAS

1. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med*. 1967 Apr 1;125(4):673-88.
2. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3401-5.
3. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol*. 1995 Sep;69(9):5621-30.
4. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*. 1995 Jun;1(6):564-9.
5. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Consensus oligonucleotide primers for the detection of GB virus C in human cryptogenic hepatitis. *J Virol Methods*. 1996 Jan;56(1):119-21.
6. Kim J, Linnen J, Wages J. Hepatitis G virus (HGV), a new hepatitis virus associated with human hepatitis. *Journal of Hepatology*. [Abstract]. 1995;23 (suppl. 1):78.
7. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 1996 Jan 26;271(5248):505-8.
8. Dawson GJ, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Thiele D, Leary TP, Murphy P, et al. Prevalence studies of GB virus-C infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1996 Sep;50(1):97-103.
9. Forns X, Tan D, Alter HJ, Purcell RH, Bukh J. Evaluation of commercially available and in-house reverse transcription-PCR assays for detection of hepatitis G virus or GB virus C. *J Clin Microbiol*. 1997 Oct;35(10):2698-702.
10. Ruiz V, Espinola L, Mathet VL, Perandones CE, Oubina JR. Design, development and evaluation of a competitive RT-PCR for quantitation of GBV-C RNA. *J Virol Methods*. 2006 Sep;136(1-2):58-64.
11. Seipp S, Scheidel M, Hofmann WJ, Tox U, Theilmann L, Goeser T, et al. Hepatotropism of GB virus C (GBV-C): GBV-C replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. *J Hepatol*. 1999 Apr;30(4):570-9.

12. Kato T, Mizokami M, Nakano T, Orito E, Ohba K, Kondo Y, et al. Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1998 Jun;55(2):109-17.
13. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborski J, et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis*. 1998 Mar;177(3):539-42.
14. Gutierrez RA, Dawson GJ, Mushahwar IK. ELISA for detection of antibody to the E2 protein of GB virus C. *J Virol Methods*. 1997 Dec;69(1-2):1-6.
15. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*. 1998 Aug;28(2):379-84.
16. Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Sauleda S, Esteban JI, Tanaka E, et al. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology*. 1997 Dec;26(6):1626-33.
17. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med*. 1997 Mar 13;336(11):747-54.
18. Toyoda H, Takahashi I, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J. Comparison of characteristics between patients with GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) RNA and those with GBV-C/HGV E2-antibody in patients with hemophilia. *J Med Virol*. 2000 Jan;60(1):34-8.
19. Orii K, Tanaka E, Rokuhara A, Maruyama A, Ichijo T, Yoshizawa K, et al. Persistent infection mechanism of GB virus C/hepatitis G virus differs from that of hepatitis C virus. *Intervirology*. 2000;43(3):139-45.
20. Feucht HH, Fischer L, Sterneck M, Knodler B, Broelsch CE, Laufs R. GB virus C infection and liver transplantation: increased risk of transfusion-transmitted infection. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2223-4.
21. Feucht HH, Fischer L, Sterneck M, Broelsch CE, Laufs R. GB virus C transmission by blood products. *Lancet*. 1997 Feb 8;349(9049):435.
22. Gutierrez RA, Dawson GJ, Knigge MF, Melvin SL, Heynen CA, Kyrk CR, et al. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J Med Virol*. 1997 Oct;53(2):167-73.
23. Dal Molin G, D'Agaro P, Biagi C, Petronio F, Comar M, Campello C. [Vertical transmission of HGV and outcome of the infected babies]. *Ann Ig*. 2004 Jan-Apr;16(1-2):109-14.
24. Yao ZC, Chen MC, Chen YL, Zhang RH, Qiu JW, Cheng HQ, et al. [Studies on mother-to-infant transmission of hepatitis C virus (HCV) and

hepatitis G virus (HGV) co-infection]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2004 Jul;39(7):439-41.

25. Ramia S, Mokhbat J, Sibai A, Klayme S, Naman R. Exposure rates to hepatitis C and G virus infections among HIV-infected patients: evidence of efficient transmission of HGV by the sexual route. *Int J STD AIDS*. 2004 Jul;15(7):463-6.

26. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2001 Sep 6;345(10):707-14.

27. Ramezani A, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Banifazl M, Eslamifar A, et al. Frequency of hepatitis G virus infection among HIV positive subjects with parenteral and sexual exposure. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2008 Sep;17(3):269-72.

28. Berzsenyi MD, Bowden DS, Bailey MJ, White C, Coghlan P, Dudley FJ, et al. Male to male sex is associated with a high prevalence of exposure to GB virus C. *J Clin Virol*. 2005 Jul;33(3):243-6.

29. Halasz R, Weiland O, Sallberg M. GB virus C/hepatitis G virus. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(8):572-80.

30. Abe K. GB virus-C/hepatitis G virus. *Jpn J Infect Dis*. 2001 Apr;54(2):55-63.

31. Nakai K, Win KM, Oo SS, Arakawa Y, Abe K. Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1536-9.

32. Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Knodler B, Schroter M, Nolte H, et al. Distribution of hepatitis G viremia and antibody response to recombinant proteins with special regard to risk factors in 709 patients. *Hepatology*. 1997 Aug;26(2):491-4.

33. Hanci SY, Cevahir N, Kaleli I, Hanci V. [Investigation of hepatitis G virus prevalence in hemodialysis patients and blood donors in Denizli, Turkey]. *Mikrobiyol Bul*. 2008 Oct;42(4):617-25.

34. Seifried C, Weber M, Bialleck H, Seifried E, Schrezenmeier H, Roth WK. High prevalence of GBV-C/HGV among relatives of GBV-C/HGV-positive blood donors in blood recipients and in patients with aplastic anemia. *Transfusion*. 2004 Feb;44(2):268-74.

35. Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M, Niel C. Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/hepatitis G virus in Brazil. *J Med Virol*. 1998 Sep;56(1):39-43.

36. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CM, Bassit L, Chamone DF, Focaccia R, et al. Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in Sao Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Jun;21(6):438-43.



37. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Mar-Apr;45(2):75-8.
38. Oliveira LA, Martins RM, Carneiro MA, Teles SA, Silva SA, Cardoso DD, et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Oct;97(7):953-7.
39. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*. 1996 Jan;48(1):60-7.
40. Smith DB, Basaras M, Frost S, Haydon D, Cuceanu N, Prescott L, et al. Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol*. 2000 Mar;81(Pt 3):769-80.
41. Simons JN, Desai SM, Schultz DE, Lemon SM, Mushahwar IK. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J Virol*. 1996 Sep;70(9):6126-35.
42. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol*. 2000 Oct;74(19):9125-33.
43. Okamoto H, Nakao H, Inoue T, Fukuda M, Kishimoto J, Iizuka H, et al. The entire nucleotide sequences of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *J Gen Virol*. 1997 Apr;78 ( Pt 4):737-45.
44. Alter HJ. G-pers creepers, where'd you get those papers? A reassessment of the literature on the hepatitis G virus. *Transfusion*. 1997 Jun;37(6):569-72.
45. Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Buijk SL, Chalmers ML, et al. Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B, and GBV-C. *J Med Virol*. 1996 Apr;48(4):329-38.
46. Polgreen PM, Xiang J, Chang Q, Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(13):1255-61.
47. Xiang J, Klinzman D, McLinden J, Schmidt WN, LaBrecque DR, Gish R, et al. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol*. 1998 Apr;72(4):2738-44.
48. Fogeda M, Navas S, Martin J, Casqueiro M, Rodriguez E, Arocena C, et al. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus. *J Virol*. 1999 May;73(5):4052-61.

49. Leary TP, Desai SM, Yamaguchi J, Chalmers ML, Schlauder GG, Dawson GJ, et al. Species-specific variants of GB virus A in captive monkeys. *J Virol*. 1996 Dec;70(12):9028-30.
50. Smith DB, Cuceanu N, Davidson F, Jarvis LM, Mokili JL, Hamid S, et al. Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5' non-coding region. *J Gen Virol*. 1997 Jul;78 ( Pt 7):1533-42.
51. Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J Virol Methods*. 2001 Jan;91(1):3-9.
52. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Kato T, Kondo Y, et al. African origin of GB virus C/hepatitis G virus. *FEBS Lett*. 1998 Feb 20;423(2):143-8.
53. Sathar MA, Soni PN, Pegoraro R, Simmonds P, Smith DB, Dhillon AP, et al. A new variant of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) from South Africa. *Virus Res*. 1999 Nov;64(2):151-60.
54. Muerhoff AS, Smith DB, Leary TP, Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol*. 1997 Sep;71(9):6501-8.
55. Nishiya AS, Ribeiro-dos-Santos G, Bassit L, Focaccia R, Chamone DF, Sabino EC. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 Jul-Aug;45(4):213-6.
56. Pinho JR, Capacci ML, da Silva LC, Carrilho FJ, Santos CA, Pugliese V, et al. Hepatitis G virus/GB virus C in Brazil. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 May-Jun;38(3):243-6.
57. Wu RR, Mizokami M, Cao K, Nakano T, Ge XM, Wang SS, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection in southern China. *J Infect Dis*. 1997 Jan;175(1):168-71.
58. Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C, Tillmann HL, Boker K, Muerhoff S, et al. Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV virus C. *Lancet*. 1996 Dec 14;348(9042):1626-9.
59. Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet*. 1995 Oct 28;346(8983):1131-2.
60. Kao JH, Chen PJ, Chen DS. GBV-C in the aetiology of fulminant hepatitis. *Lancet*. 1996 Jan 13;347(8994):120-1.
61. Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Feb;16(2):124-31.
62. Zhao J, Wang S, Xin S. [Serological and pathological follow-up studies of the patients with single GBV-C/HGV RNA infection]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2001 Mar;15(1):16-9.

63. Kuroki T, Nishiguchi S, Tanaka M, Enomoto M, Kobayashi K. Does GBV-C cause fulminant hepatitis in Japan? *Lancet*. 1996 Mar 30;347(9005):908.
64. Saiz JC, Sans M, Mas A, Olmedo E, Fornis X, Lopez-Labrador FX, et al. Hepatitis G virus infection in fulminant hepatic failure. *Gut*. 1997 Nov;41(5):696-9.
65. Kanda T, Yokosuka O, Ehata T, Maru Y, Imazeki F, Saisho H, et al. Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*. 1997 May;25(5):1261-5.
66. Sallie R, Shaw J, Mutimer D. GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet*. 1996 Jun 1;347(9014):1552.
67. Theodore D, Lemon SM. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology*. 1997 May;25(5):1285-6.
68. Kumar D, Gupta RK, Anand R, Pasha ST, Rai A, Das BC, et al. Occurrence & nucleotide sequence analysis of hepatitis G virus in patients with acute viral hepatitis & fulminant hepatitis. *Indian J Med Res*. 2007 Jun;125(6):752-5.
69. Moaven LD, Locarnini SA, Bowden DS, Kim JP, Breschkin A, McCaw R, et al. Hepatitis G virus and fulminant hepatic failure: evidence for transfusion-related infection. *J Hepatol*. 1997 Oct;27(4):613-9.
70. Vogt M, Klostermann B, Braun S, Busch R, Hess J, Frosner G, et al. Prevalence and clinical role of GBV-C infection after cardiac surgery in childhood: a study on 414 patients. *J Infect*. 2006 Jul;53(1):43-8.
71. Leao-Filho GC, Lopes EP, Ferraz AA, Moura I, Pernambuco JR, Reis C, et al. Hepatitis G virus infection in patients with hepatocellular carcinoma in Recife, Brazil. *Jpn J Clin Oncol*. 2007 Aug;37(8):632-6.
72. Moriyama K, Okamura T, Nakano S. Hepatitis GB virus C genome in the serum of aplastic anaemia patients receiving frequent blood transfusions. *Br J Haematol*. 1997 Mar;96(4):864-7.
73. Zignego AL, Giannini C, Gentilini P, Bellesi G, Hadziyannis S, Ferri C. Could HGV infection be implicated in lymphomagenesis? *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(3):778-9.
74. Michaelis S, Kazakov DV, Schmid M, Dummer R, Burg G, Kempf W. Hepatitis C and G viruses in B-cell lymphomas of the skin. *J Cutan Pathol*. 2003 Jul;30(6):369-72.
75. Blanc PL, Boumrazne R, Sarzier JM, Forel C. [Extrahepatic symptoms in the course of GBV-C/HGV infection.]. *Med Mal Infect*. 2008 Nov 14.
76. Cao MM, Ren H, Zhao P, Pan W, Chen QL, Qi ZT. Persistent replication of the GBV-C subgenomic replicons in Huh7 cells. *J Virol Methods*. 2009 Jan 20.

77. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis.* 2006 Feb 1;193(3):451-4.
78. Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, Furuwatari C, Katsuyama T, Kawasaki S, et al. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol.* 1999 Feb;57(2):114-21.
79. Baggio-Zappia GL, Hernandez Granato CF. HIV-GB virus C co-infection: an overview. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(1):12-9.
80. Saitoh H, Moriyama M, Matsumura H, Goto I, Tanaka N, Aarakawa Y. The clinical significance of GBV-C/HGV exposure in C-viral chronic liver disease and blood donors. *Hepatol Res.* 2002 Apr;22(4):288-96.
81. Barusruk S, Urwijitaroon Y. High prevalence of HGV coinfection with HBV or HCV among northeastern Thai blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006 Mar;37(2):289-93.
82. Sarrazin C, Herrmann G, Roth WK, Lee JH, Marx S, Zeuzem S. Prevalence and clinical and histological manifestation of hepatitis G/GBV-C infections in patients with elevated aminotransferases of unknown etiology. *J Hepatol.* 1997 Aug;27(2):276-83.
83. Berg T, Naumann U, Fukumoto T, Bechstein WO, Neuhaus P, Lobeck H, et al. GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. *Transplantation.* 1996 Sep 27;62(6):711-4.
84. Petrik J, Guella L, Wight DG, Pearson GM, Hinton J, Parker H, et al. Hepatic histology in hepatitis C virus carriers coinfecting with hepatitis G virus. *Gut.* 1998 Jan;42(1):103-6.
85. Stapleton J. A new variable influencing HCV-related liver disease in HIV-HCV coinfecting individuals? *Gastroenterology.* 2007 Dec;133(6):2042-5.
86. Berg T, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Kuther S, Lobeck H, et al. Responsiveness to interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *J Hepatol.* 1996 Nov;25(5):763-8.
87. Grassi M, Mammarella A, Sagliaschi G, Granati L, Musca A, Traditi F, et al. Persistent hepatitis G virus (HGV) infection in chronic hemodialysis patients and non-B, non-C chronic hepatitis. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Oct;39(10):956-60.
88. Chu C, Hwang S, Luo J, Wang Y, Lu R, Lai C, et al. Clinical, virological, immunological, and pathological significance of GB virus C/hepatitis G infection in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2001 Mar 26;19(3):225-36.

89. Los-Rycharska E, Szaflarska-Poplawska A, Chrobot A, Czerwionka-Szaflarska M. [The influence of hepatitis G virus infection on the course of chronic virus hepatitis B or C in children]. *Wiad Lek.* 2004;57(9-10):421-6.
90. Claret G, Noguera A, Gonzalez-Cuevas A, Garcia-Garcia JJ, Fortuny C, Munoz-Almagro C. The prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among healthy and HCV-infected Catalan children. *Eur J Pediatr.* 2008 Sep;167(9):991-4.
91. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H, Okamoto H. GB virus C/hepatitis G virus isolates in Japanese haemophiliacs and their origins. *Thromb Haemost.* 1998 Aug;80(2):242-5.
92. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med.* 2004 Mar 4;350(10):981-90.
93. Lopez Calvo S, Vela A, Castro A, Cid A, Aguilera A, Vega P, et al. [GB virus C: lack of association with transaminases levels, CD4 and HIV viral load in aids patients]. *An Med Interna.* 2003 Apr;20(4):175-8.
94. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, Boeser-Nunnink B, Geskus RB, Lange JM, et al. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):678-85.
95. Mohsen AH, Easterbrook P, Taylor CB, Norris S. Hepatitis C and HIV-1 coinfection. *Gut.* 2002 Oct;51(4):601-8.
96. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology.* 1999 Oct;30(4):1054-8.
97. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Mar 1;17(3):209-13.
98. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis.* 1998 Jun;177(6):1723-6.
99. Sabin CA, Devereux H, Kinson Z, Griffioen A, Brown D, Dusheiko G, et al. Effect of coinfection with hepatitis G virus on HIV disease progression in hemophilic men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Dec 15;19(5):546-8.
100. Tillmann HL, Manns MP. GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Antiviral Res.* 2001 Nov;52(2):83-90.
101. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6;345(10):715-24.

102. Aronoff DM. Using live pathogens to treat infectious diseases: a historical perspective on the relationship between GB virus C and HIV. *Antivir Ther.* 2002 Jun;7(2):73-80.
103. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2000 Jun 20;132(12):959-63.
104. Birk M, Lindback S, Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *Aids.* 2002 Dec 6;16(18):2482-5.
105. Bjorkman P, Flamholz L, Naucler A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *Aids.* 2004 Apr 9;18(6):877-86.
106. Blankson JN, Klinzman D, Astemborski J, Thomas DL, Kirk GD, Stapleton JT. Low frequency of GB virus C viremia in a cohort of HIV-1-infected elite suppressors. *Aids.* 2008 Nov 12;22(17):2398-400.
107. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med.* 2006 Jan;7(1):25-31.
108. Voirin N, Trepo C, Esteve J, Chevallier P, Ritter J, Fabry J, et al. Effects of co-infection with hepatitis C virus and GB virus C on CD4 cell count and HIV-RNA level among HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Aids.* 2002 Jul 26;16(11):1556-9.
109. Antonucci G, Girardi E, Cozzi-Lepri A, Capobianchi MR, Morsica G, Pizzaferrri P, et al. Response to HAART and GB virus type C coinfection in a cohort of antiretroviral-naive HIV-infected individuals. *Antivir Ther.* 2005;10(1):109-17.
110. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, et al. GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *Aids.* 2009 Jan 31.
111. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):289-95.
112. Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet.* 2004 Jun 19;363(9426):2040-6.
113. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15570-5.

114. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Jordan EL, Stapleton JT. Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2580.
115. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998 Oct 30;282(5390):938-41.
116. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med*. 2002 Jan 7;195(1):43-9.
117. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *Aids*. 2003 Jul 4;17(10):1457-62.
118. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology*. 1997 Aug 4;234(2):340-8.
119. Brandt SM, Mariani R, Holland AU, Hope TJ, Landau NR. Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17291-9.
120. Jung S, Eichenmuller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *Aids*. 2007 Mar 12;21(5):645-7.
121. George S, Varmaz D, Stapleton J, editors. GB virus C inhibits apoptosis in PBMCs. 11th International Conference on Hepatitis C and Related Flaviviruses; 2004; Heidelberg, Germany.
122. Roumier T, Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Metivier D, Zamzami N, et al. Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1321-9.
123. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T, De Bels F. Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;200:195-211.
124. Gougeon ML. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):392-404.
125. Ledru E, Fevrier M, Lecoecur H, Garcia S, Boullier S, Gougeon ML. A nonsecreted variant of interleukin-4 is associated with apoptosis: implication for the T helper-2 polarization in HIV infection. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3102-5.
126. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*. 1992 Jul 10;257(5067):217-9.

127. Moenkemeyer M, Schmidt RE, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heiken H. GBV-C coinfection is negatively correlated to Fas expression and Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infected patients. *J Med Virol.* 2008 Nov;80(11):1933-40.
128. Sathar MA, York DF, Gouws E, Coutsooudis A, Coovadia HM. GB virus type C coinfection in HIV-infected African mothers and their infants, KwaZulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis.* 2004 Feb 1;38(3):405-9.
129. Kabelitz D, Wesch D. Role of gamma delta T-lymphocytes in HIV infection. *Eur J Med Res.* 2001 Apr 20;6(4):169-74.
130. Rizzardi GP, Tambussi G, Barcellini W, Capiluppi B, Clerici E, Maestra LL, et al. Soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, and TNF receptors in primary HIV-1 infection: relationship with HIV-1, RNA, clinical outcome and early antiviral therapy. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1997 Jan-Jun;11(1-2):43-9.
131. Biswas P, Galli A, Capiluppi B, Ciuffreda D, Lazzarin A, Tambussi G. Selective enrichment of CD30-expressing cells within the blast region of lymphocytes from patients with primary HIV infection (PHI). *J Biol Regul Homeost Agents.* 2002 Jan-Mar;16(1):33-6.
132. Capobianchi MR, Lalle E, Martini F, Poccia F, D'Offizi G, Antonucci G, et al. Influence of GBV-C infection on the endogenous activation of the IFN system in HIV-1 co-infected patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2006;52(1):3-8.
133. Lalle E, Sacchi A, Abbate I, Vitale A, Martini F, D'Offizi G, et al. Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008 Jan-Mar;21(1):161-71.
134. Sacchi A, Lalle E, Martini F, Abbate I, Castilletti C, D'Offizi G, et al. GB-virus type C effect on HIV infection, interferon system, and dendritic cells. *Arch Med Res.* 2008 Apr;39(3):362-3.
135. Haji Molla Hoseini M, Pourfathollah AA, Mohraz M, Soheili Z, Amini S, Aghaiepour M, et al. Evaluation of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV/GBV-C and HIV/HCV coinfecting patients: a preliminary study. *Arch Med Res.* 2007 Nov;38(8):868-75.
136. Bhatnagar N, Moenkemeyer M, Hong H, Schimidt R, Heiken H, editors. Plasmacytoid dendritic cells expressing CD40+ and CD83+ are increased in HIV-1 patients with GBV-C coinfection. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI); 25 - 28 February 2007; Los Angeles, CA.
137. Arrode G, Finke JS, Zebroski H, Siegal FP, Steinman RM. CD8+ T cells from most HIV-1-infected patients, even when challenged with mature dendritic cells, lack functional recall memory to HIV gag but not other viruses. *Eur J Immunol.* 2005 Jan;35(1):159-70.



138. Haydon GH, Mutimer DJ. Hepatitis B and C virus infections in the immune compromised. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct;16(5):473-9.
139. Soriano V, Martin-Carbonero L, Garcia-Samaniego J, Puoti M. Mortality due to chronic viral liver disease among patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 15;33(10):1793-5.
140. Garcia-Samaniego J, Rodriguez M, Berenguer J, Rodriguez-Rosado R, Carbo J, Asensi V, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jan;96(1):179-83.
141. Daar ES, Lynn H, Donfield S, Gomperts E, O'Brien SJ, Hilgartner MW, et al. Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs. *J Infect Dis*. 2001 Feb 15;183(4):589-95.
142. Qurishi N, Kreuzberg C, Luchters G, Effenberger W, Kupfer B, Sauerbruch T, et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1708-13.
143. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Zheng H, Addo MM, Lin W, Robbins GK, et al. GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfected patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype. *J Infect Dis*. 2006 Aug 15;194(4):410-9.
144. Berzsenyi MD, Bowden DS, Kelly HA, Watson KM, Mijch AM, Hammond RA, et al. Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection. *Gastroenterology*. 2007 Dec;133(6):1821-30.
145. Flynn J, Dore G, Hellard M, editors. Early predominant IL-10 production without IFN-gamma in individuals with acute HCV that progress to chronic infection. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2007.
146. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology*. 2003 Oct;38(4):859-68.
147. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C coinfection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med*. 2003 Jul 1;139(1):26-30.
148. Xiang J, Rydze R, Chang Q, editors. GB virus C infection and NS5A protein promote a Th1 cytokine profile in lymphocytes. . General 107th Meeting of the American Society of Microbiology 2007.
149. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2001 Jan;32(1):76-102.

150. Breen EC. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther.* 2002 Sep;95(3):295-304.
151. Piroth L, Carrat F, Larrat S, Goderel I, Martha B, Payan C, et al. Prevalence and impact of GBV-C, SEN-V and HBV occult infections in HIV-HCV co-infected patients on HCV therapy. *J Hepatol.* 2008 Dec;49(6):892-8.
152. Alves Souza V. Development of a molecular technique to evaluate HGV/GBV-C viral load in HIV-1 co-infected patients. [Mestrado]. São Paulo, SP: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP; 2008.
153. Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol.* 1996 Sep;25(3):379-84.
154. George SL, Varmaz D. What you need to know about GB virus C. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005 Feb;7(1):54-62.
155. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2001 Sep 1;255(1-2):27-40.
156. Lanier LL, Ruitenberg J, Bolhuis RL, Borst J, Phillips JH, Testi R. Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur J Immunol.* 1988 Dec;18(12):1985-92.
157. Poccia F, Agrati C, Ippolito G, Colizzi V, Malkovsky M. Natural T cell immunity to intracellular pathogens and nonpeptidic immunoregulatory drugs. *Curr Mol Med.* 2001 Mar;1(1):137-51.
158. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):155-8.
159. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* 1994 Apr 8;264(5156):267-70.
160. Akerele T, Galatowicz G, Bunce C, Calder V, Lynn WA, Lightman S. Normalized CD8+ but not CD4+ lymphocyte IL-2 expression is associated with early treatment with highly active antiretroviral therapy. *Clin Immunol.* 2006 Nov;121(2):191-7.
161. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):783-9.

162. Bjorkman P, Widell A. HIV and GB virus C infections seen from the perspective of the vertically coexposed infant. *J Infect Dis.* 2008 May 15;197(10):1358-60.
163. Kaye S, Howard M, Alabi A, Hansmann A, Whittle H, Schim van der Loeff M. No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 15;40(6):876-8.
164. Ryt-Hansen R, Katzenstein TL, Gerstoft J, Eugen-Olsen J. No influence of GB virus C on disease progression in a Danish cohort of HIV-infected men. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006 Jun;22(6):496-8.
165. Brust D, Jagannatha S, Herpin B, Miller K, Metcalf J, Lau D, et al., editors. Hepatitis G virus (HGV) infection does not prolong survival of patients with early-stage HIV disease: importance of baseline HIV viral load as a predictor of mortality. International Conference on AIDS 2002.
166. Kato T, Mizokami M, Nakano T, Kondo Y, Ohba K, Orito E, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection among the Jewish population in Uzbekistan. *Virus Res.* 1997 Apr;48(1):81-7.
167. Hwang SJ, Chu CW, Lu RH, Lan KH, Wu JC, Wang YJ, et al. Seroprevalence of GB virus C/hepatitis G virus-RNA and anti-envelope antibody in high-risk populations in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Oct;15(10):1171-5.
168. Nordbo SA, Krokstad S, Winge P, Skjeldestad FE, Dalen AB. Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2584-90.
169. Smith SM, Donio MJ, Singh M, Fallon JP, Jitendranath L, Chkrebti N, et al. Prevalence of GB virus type C in urban Americans infected with human immunodeficiency virus type 1. *Retrovirology.* 2005;2:38.
170. Asim M, Potukuchi SK, Arora A, Singh B, Kar P. Hepatitis-G virus infection in multi-transfused patients and intravenous drug abusers: New Delhi experience. *Dig Dis Sci.* 2008 May;53(5):1383-9.
171. Rendina D, Vigorita E, Bonavolta R, D'Onofrio M, Iura A, Pietronigro MT, et al. HCV and GBV-c/HGV infection in HIV positive patients in southern Italy. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(9):801-7.
172. Thiers V, Pol S, Persico T, Carnot F, Zylberberg H, Berthelot P, et al. Hepatitis G virus infection in hepatitis C virus-positive patients co-infected or not with hepatitis B virus and/or human immunodeficiency virus. *J Viral Hepat.* 1998 Mar;5(2):123-30.
173. Ibanez A, Gimenez-Barcons M, Tajahuerce A, Tural C, Sirera G, Clotet B, et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) and hepatitis C virus among patients infected with human immunodeficiency virus: evidence of GBV-C/HGV sexual transmission. *J Med Virol.* 1998 Aug;55(4):293-9.

174. Berzsenyi MD, Roberts SK. What is the role of GB virus C infection in hepatitis C virus/HIV coinfection? *J Infect Dis.* 2006 Aug 15;194(4):407-9.
175. Li C, Collini P, Danso K, Owusu-Ofori S, Dompok A, Candotti D, et al. GB virus C and HIV-1 RNA load in single virus and co-infected West African individuals. *Aids.* 2006 Feb 14;20(3):379-86.
176. Goubau P, Liu HF, Goderniaux E, Burtonboy G. Influence of CD4+ lymphocyte counts on GB virus C/hepatitis G virus carriership in HIV-positive individuals. *J Med Virol.* 1999 Apr;57(4):367-9.
177. Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 2003 Feb 1;187(3):504-7.
178. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, Mo T, Wynhoven B, Hogg RS, et al. No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *Aids.* 2002 Sep 27;16(14):1929-33.
179. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
180. Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 1989;46:111-47.
181. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
182. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Jul;85(1):9-18; quiz , 21.
183. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):107-11.
184. Barcova M, Kacani L, Speth C, Dierich MP. gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production. *J Infect Dis.* 1998 Apr;177(4):905-13.
185. Sarih M, Maataoui WE, Benslimane A. Analysis of apoptosis and a Th1/Th2 phenotype in HIV-infected patients. *Immunol Lett.* 1996 May;50(3):125-9.
186. Klein SA, Dobbmeyer JM, Dobbmeyer TS, Pape M, Ottmann OG, Helm EB, et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *Aids.* 1997 Jul 15;11(9):1111-8.

187. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1909-22.
188. Clerici M, Villa ML, Shearer GM. The role of cytokines in immune response to HIV. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1994;41 Suppl:5-10.
189. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, et al. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):768-75.
190. Simonelli C, Zanussi S, Sandri S, Comar M, Lucenti A, Talamini R, et al. Concomitant therapy with subcutaneous interleukin-2 and zidovudine plus didanosine in patients with early stage HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999 Jan 1;20(1):20-7.
191. Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RT, Jr., Walker RE, et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1996 Oct 31;335(18):1350-6.
192. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, et al. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol*. 2003 Oct;77(20):10900-9.
193. Ullum H, Cozzi Lepri A, Bendtzen K, Victor J, Gotzsche PC, Phillips AN, et al. Low production of interferon gamma is related to disease progression in HIV infection: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997 Aug 10;13(12):1039-46.
194. Gimenez-Barcons M, Ribera M, Llano A, Clotet B, Este JA, Martinez MA. Analysis of chemokine and cytokine expression in patients with HIV and GB virus type C coinfection. *Clin Infect Dis*. 2005 May 1;40(9):1342-9.
195. Alter G, Tsoukas CM, Rouleau D, Cote P, Routy JP, Sekaly RP, et al. Assessment of longitudinal changes in HIV-specific effector activity in subjects undergoing untreated primary HIV infection. *Aids*. 2004 Oct 21;18(15):1979-89.
196. Alter G, Merchant A, Tsoukas CM, Rouleau D, LeBlanc RP, Cote P, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific effector CD8 T cell activity in patients with primary HIV infection. *J Infect Dis*. 2002 Mar 15;185(6):755-65.
197. Kelleher P. Immune activation and viraemia: reciprocal interactions in disease pathogenesis. *J HIV Ther*. 2008 Dec;13(4):76-8.
198. Kousignian I, Autran B, Chouquet C, Calvez V, Gomard E, Katlama C, et al. Markov modelling of changes in HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte responses with time in untreated HIV-1 infected patients. *Stat Med*. 2003 May 30;22(10):1675-90.

199. Buseyne F, Scott-Algara D, Corre B, Porrot F, Monchatre E, Bellal N, et al. Poor recognition of HIV-1 Nef protein by CD8 T cells from HIV-1-infected children: impact of age. *Virology*. 2006 Oct 25;354(2):271-9.
200. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1588-92.
201. Malavasi F, Caligaris-Cappio F, Milanese C, Dellabona P, Richiardi P, Carbonara AO. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for human early lymphohemopoietic cells. *Hum Immunol*. 1984 Jan;9(1):9-20.
202. Ramaschi G, Torti M, Festetics ET, Sinigaglia F, Malavasi F, Balduini C. Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2308-13.
203. Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, Malavasi F, et al. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Nov 15;196(3):1459-65.
204. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Justica B, Orfao A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 Mar-Apr;28(2):181-90.
205. Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LB, Peruzzi L, Geuna M, et al. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. *J Immunol*. 1990 Aug 1;145(3):878-84.
206. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993 Nov 12;262(5136):1056-9.
207. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *Aids*. 2000 Jun 16;14(9):1079-89.
208. Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med*. 2008 May;14(5):210-8.
209. Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Alessio M, Roggero S, Delia D, et al. Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol*. 1990 Oct 15;145(8):2390-6.

210. Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989 Jul;52(1):10-8.
211. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3509-20.
212. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, et al. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997 Feb 1;14(2):128-35.
213. Carbone J, Gil J, Benito JM, Navarro J, Munoz-Fernandez A, Bartolome J, et al. Increased levels of activated subsets of CD4 T cells add to the prognostic value of low CD4 T cell counts in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS.* 2000 Dec 22;14(18):2823-9.
214. Maidana Giret M, Silva T, Levi J, Bassichetto K, Ana N, Sabino E, et al., editors. GBV-C infection is associated with less T cell activation in recently HIV-1-infected subjects and is independent of HIV-1 viral load. 4th IAS Conference; 2007; Australia.
215. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Ballesteros C, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, et al. Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Apr 1;38(4):373-81.
216. Hultin LE, Matud JL, Giorgi JV. Quantitation of CD38 activation antigen expression on CD8+ T cells in HIV-1 infection using CD4 expression on CD4+ T lymphocytes as a biological calibrator. *Cytometry.* 1998 Oct 1;33(2):123-32.
217. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet.* 2000 Nov 25;356(9244):1800-5.
218. Korner C, Kramer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fatkenheuer G, et al. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. *Clin Sci (Lond).* 2009 Jul;116(12):861-70.
219. Deng LP, Gui XE, Zhang YX, Gao SC, Yang RR. Impact of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2009 Feb 28;15(8):996-1003.
220. Bralet MP, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Bastie A, Tran Van Nhieu J, Duval J, et al. Histopathologic impact of GB virus C infection on chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 1997 Jan;112(1):188-92.

221. Pineda JA, Santos J, Rivero A, Abdel-Kader L, Palacios R, Camacho A, et al. Liver toxicity of antiretroviral combinations including atazanavir/ritonavir in patients co-infected with HIV and hepatitis viruses: impact of pre-existing liver fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Apr;61(4):925-32.
222. Rivero A, Camacho A, Perez-Camacho I, Torre-Cisneros J. [Darunavir in HIV/HVC/HVB coinfection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Oct;26 Suppl 10:37-42.
223. Li T, Dai Y, Kuang J, Jiang J, Han Y, Qiu Z, et al. Three generic nevirapine-based antiretroviral treatments in Chinese HIV/AIDS patients: multicentric observation cohort. *PLoS ONE.* 2008;3(12):e3918.
224. Torti C, Costarelli S, De Silvestri A, Quiros-Roldan E, Lapadula G, Cologni G, et al. Analysis of severe hepatic events associated with nevirapine-containing regimens: CD4+ T-cell count and gender in hepatitis C seropositive and seronegative patients. *Drug Saf.* 2007;30(12):1161-9.
225. Moreno A, Quereda C, Moreno L, Perez-Elias MJ, Muriel A, Casado JL, et al. High rate of didanosine-related mitochondrial toxicity in HIV/HCV-coinfected patients receiving ribavirin. *Antivir Ther.* 2004 Feb;9(1):133-8.
226. Borghi V, Puoti M, Mussini C, Bellelli S, Angeletti C, Sabbatini F, et al. HIV coinfection and antiretroviral therapy enhances liver steatosis in patients with hepatitis C, but only in those infected by HCV genotype other than 3. *Antivir Ther.* 2008;13(8):1057-65.
227. Barbosa A. Identificação do GBV-C nos compartimentos hepático e linfocitário em pacientes HIV-1 soropositivos co-infectados pelo vírus da hepatite C. [Mestrado]. São Paulo, SP: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP; 2008.
228. Halasz R, Sallberg M, Lundholm S, Andersson G, Lager B, Glaumann H, et al. The GB virus C/hepatitis G virus replicates in hepatocytes without causing liver disease in healthy blood donors. *J Infect Dis.* 2000 Dec;182(6):1756-60.



8. ANEXOS

---

**ANEXO I. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**



São Paulo, 14 de outubro de 2005.  
**CEP 1296/05**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) CELSO FRANCISCO H GRANATO

Co-Investigadores: Graziela de Almeida Lanzara, Viviane Kelly Alves, Giovana Lótici Baggio, Aline de Jesus Barbosa

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Importância clínica e impactos imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV"**.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Intervenção diagnóstica.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** risco maior do que médio, desconforto intenso, envolvendo coleta de sangue e biópsia hepática.

**OBJETIVOS:** Estabelecer metodologias para identificação do estado infeccioso de pacientes infectados pelo HIV-1, com relação ao GBV-C/HGV e o HCV. Avaliar o impacto da co-infecção pelos vírus GBV-C/HGV, HCV e HIV-1 em um mesmo paciente, em relação a combinações de co-infecções distintas, em seus aspectos clínicos, bioquímicos, imunológicos, virológicos e histo-patológicos.

**RESUMO:** Envolvem agentes patogênicos. O estudo será desenvolvido na Unidade Ambulatorial da DIPA/UNIFESP, com colaboração do laboratório de Patologia e de Ginecologia Molecular da UNIFESP. A amostra será constituída de 100 pacientes com infecção pelo HIV e 100 pacientes com co-infecção HIV-HCV entre 18 e 70 anos. Será realizada uma entrevista e coleta de sangue para pesquisa de GBV-C/HGV RNA no plasma, pesquisa de anticorpos anti-E2, contagem de linfócitos T CD4+, população celulares T, níveis séricos de ALT e bioquímica geral. Os pacientes com anti-HCV positivo deverão colher sangue também para pesquisa de HCV RNA e determinação do genótipo do HCV através da análise da região genômica codificadora da proteína do envoltório E1, da proteína core e da proteína não estrutural NS5B. Os participantes com potencial indicação de tratamento anti-HCV serão submetidos à biópsia hepática percutânea guiada por ultra-sonografia.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo fundamentado, multidisciplinar, analisando aspectos clínicos, imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos, envolvendo laboratórios especializados com domínio das técnicas empregadas.

**TCLE:** Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** FAPESP - R\$ 67 823 + US\$ 17 342,00.

**CRONOGRAMA:** 18 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** mestrado/doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 9/10/2006 e 4/10/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

**ANEXO II. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa "Importância Clínica e Impacto Clínico e Imunológico da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV". O vírus da hepatite G foi descoberto em 1995 e acredita-se que não cause doenças. Porém, recentemente alguns pesquisadores descobriram que nas pessoas com infecção pelo HIV, o vírus da hepatite G poderia atrasar a evolução para AIDS.

Logo, os objetivos desta pesquisa são:

1. Estimar quantos pacientes tem hepatite G entre os pacientes com infecção pelo HIV e co-infecção pelo HIV e pelo vírus da hepatite C atendidos na Unidade Ambulatorial da DIPA (CCDI) do Hospital São Paulo.
2. Estudar a relação da hepatite G com a imunidade, com a carga viral do HIV, com o estado do fígado e com as características do vírus da hepatite C nas pessoas que tenham também esta infecção.

Caso você participe, será entrevistado (a) para conhecermos seus hábitos de vida e seu histórico médico. A entrevista é individual, com privacidade e sigilo das informações.

Será necessário colher sangue para pesquisarmos o vírus da hepatite G, a carga viral do HIV, a contagem de CD4 e de exame para sabermos se o fígado está inflamado (ALT). Também faremos exame de triagem para hepatite B. A coleta de sangue será feita por punção de veia do antebraço, o que pode causar um pouco de dor, ficar roxo (hematoma) no local ou até causar tontura passageira. No total serão precisos 100 mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 10 colheres de sopa de sangue.

Se você tem hepatite C, será necessário colher sangue adicional para exames que vão estudar o vírus da hepatite C. Será necessário mais 20mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 2 colheres de sopa de sangue. Caso os resultados destes exames mostrem que você é um (a) candidato (a) potencial ao tratamento da hepatite C, será necessário fazer uma biópsia do fígado. Este exame consiste em retirar um pequeno pedaço do fígado por punção com uma agulha especial, com auxílio de ultrassom e anestesia local. Pode haver dor durante ou depois do exame e pode acontecer sangramento no fígado que, se for grande, pode levar à necessidade de operação (isto acontece em cerca de 1% das biópsias). Outra complicação possível é a agulha atingir outros órgãos como o pulmão, a vesícula biliar, o intestino ou rim. Se isto acontecer pode ser necessário operar também. Por causa destes riscos você ficará em observação por pelo menos 6h após a biópsia. Caso você já tenha feito biópsia do fígado a um ano da data de hoje, usaremos os resultados desta biópsia na pesquisa.

Em caso de dúvida você pode procurar o investigador principal, Dr. Celso F. H. Granato, na Rua Loefgreen 1588 ou no tel. 55735081. Você também pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP: Rua Botucatu, 572, 1º andar/cj 14, tel.: 11 5571-1062. Fax: 11 5539-7162. e-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br)

Sua participação não é obrigatória e se você não quiser participar não haverá nenhum prejuízo no seu acompanhamento e na sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Caso decida participar, está garantido que o (a) Senhor (a) poderá desistir a qualquer momento, sem motivo ou aviso prévio, também sem prejuízo no seu acompanhamento.

Os dados referentes ao (à) Senhor (a) serão sigilosos e privados, sendo que o (a) Senhor (a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

Não haverá nenhum gasto e você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Após ter sido esclarecido (a) sobre a pesquisa, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Importância Clínica e Impacto Clínico e Imunológico da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV". Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_  
Nome Legível e assinatura do  
Pesquisador que obteve o TCLE

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_.

**ANEXO III. QUESTIONÁRIO *CAGE***

### **Questionário CAGE:**

O CAGE é composto por quatro questões que admitem respostas do tipo sim ou não:

A - Alguma vez o Senhor(a) sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber?

B - As pessoas o (a) aborrecem porque criticam o seu modo de beber?

C - O Senhor(a) se sente culpado pela maneira com que costuma beber?

D - O Senhor(a) costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca?



**ANEXO IV. PAINEL DE MONOCLONAIS PARA CITOMETRIA  
DE FLUXO - FACScanto™**

## Painel de monoclonais para citometria de fluxo - FACSCanto™:

Descrição dos Monoclonais
Reagente imunológico anti IL-2 humano, marcado com APC, clone 5344.111, IgG1 de camundongo, RR-001-14997.
Reagente imunológico anti IL-10 humano, marcado com PE, clone JES3-19F1, IgG2a de rato, RR-002-00605.
Reagente Imunológico anti-TCR1 $\gamma\delta$ humano, marcado com FITC, clone 11F2, IgG1, RR-001-07347.
Reagente imunológico anti CD3 humano, marcado com APC-Cy7, clone SK7, IgG1 kappa de camundongo, RR-001-11963.
Reagente imunológico anti-CD8 humano, marcado com PerCP, clone SK1, RR-001-00375.
Reagente imunológico anti IFN- $\gamma$ humano, marcado com PE-Cy7, clone B27, IgG1 de camundongo, RR-002-11723.
Reagente imunológico anti-CD28 humano purificado, clone L293, IgG1 de camundongo, RR-001-04195.
Reagente Imunológico anti CD49d humano, purificado, clone L25, IgG2b de camundongo, RR-001-04194.
Pool de anticorpos (Sistema quantibrite PE) anti-CD8 humano, marcado com FITC (CD8 FITC clone SK1), anti-CD38 humano, marcado com PE (CD38 PE, clone HB7) anti-CD3 humano, marcado com PerCP (CD3 PerCP, cloneSK7)

**ANEXO V. APÊNDICES:  
REAGENTES UTILIZADOS NO PROJETO**

## Reagentes

### 1. Solução corante *trypan blue* 0,1%

- 50mL de PBS
- 0,05g de *trypan blue*
- Diluir o *trypan blue* no PBS e deixar descansar por 3 horas.
- Filtrar em papel de filtro
- Identificar com o nome do reagente e a data de preparo.
- Armazenar em geladeira.

### 2. Cloreto de Amônio pH 7,4 10x concentrado (solução de lise)

#### Solução estoque:

- 8,29 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1,00 g de  $\text{KHCO}_3$
- 0,0379g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- Diluir em 100mL de água destilada e guardar em geladeira, identificar com o nome do reagente e a data de preparo. Válido por um mês.

#### Solução de uso:

- Diluir a solução estoque 1:10 em água destilada.
- Filtrar com seringa e filtro 0,22. Identificar com o nome do reagente e a data de preparo.
- Armazenar em geladeira.

### 3. Meio de Congelamento (FCS 10% DMSO)

- 45mL de soro fetal bovino (FCS - Soralis)
- 5mL de dimetilssulfóxido (DMSO)
- Acrescentar o DMSO ao FCS. Homogeneizar
- Identificar com o nome do reagente e a data de preparo
- Armazenar em freezer  $-20^\circ\text{C}$

### 4. Solução de Permeabilização

- 2 ml de solução de lise (BD Biosciences)
- 8 ml de água destilada
- 5  $\mu\text{l}$  de Tween 20 (0,05%)

- Identificar com o nome do reagente e a data de preparo
- Armazenar em temperatura ambiente.

## **5. Solução de Fixação 4% (Fixation buffer)**

### **Solução estoque**

- 500 ml de PBS
- 20 g de paraformaldeído
- Aquecer a 56°C overnight
- pH 7,4 – 7,6
- Armazenar a 4°C embrulhado em papel alumínio, protegido da luz, identificado com o nome do reagente e a data de preparo.

### **Solução de Fixação uso**

- A partir do paraformaldeído 4%
- 1 parte de formaldeído em 3 partes de PBS
- Armazenar em geladeira a 4°C por 6 meses, embrulhado em papel alumínio, protegido da luz, identificado com o nome do reagente e a data de preparo.

## **6. FACS Buffer**

- 500 ml de PBS
- 10 ml de SBF
- 0,05 g de azida sódica

Armazenar em geladeira 4°C por no máximo 3 meses, identificado com o nome do reagente e a data de preparo.

## **7. Meio R10**

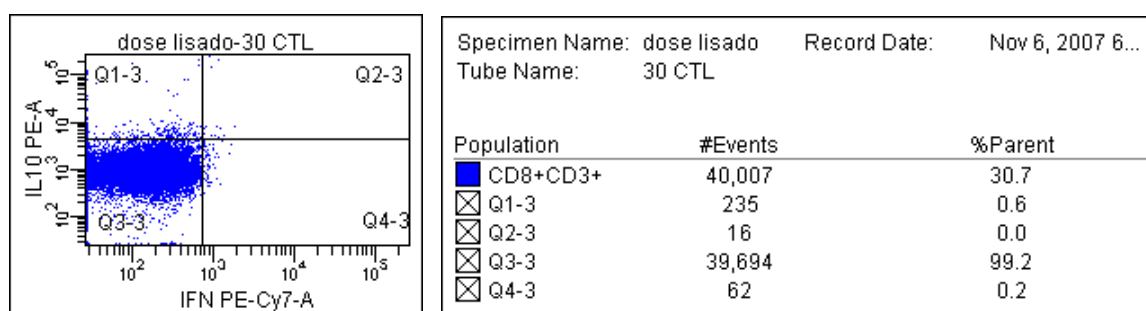
- 500 mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO 11875-093)
- 50 ml de soro bovino fetal inativado (45 minutos no banho-maria à 56 °C) (Soralis)
- 5 mL de tampão HEPES (GIBCO 15630-080)
- 5 mL de L-glutamine 200 mM (GIBCO 25030-081)
- 5 mL de piruvato de sódio 100 mM (GIBCO 11360-070)
- 5 mL de penicilina/estreptomicina 100X (GIBCO 5140-122)
- 0,5 mL de 2 mercaptoetanol 55 mM (GIBCO 21985-023)

- Homogeneizar os reagentes no frasco e identificar com o nome do reagente e a data de preparo. Válido por dois meses a partir da data de preparo.

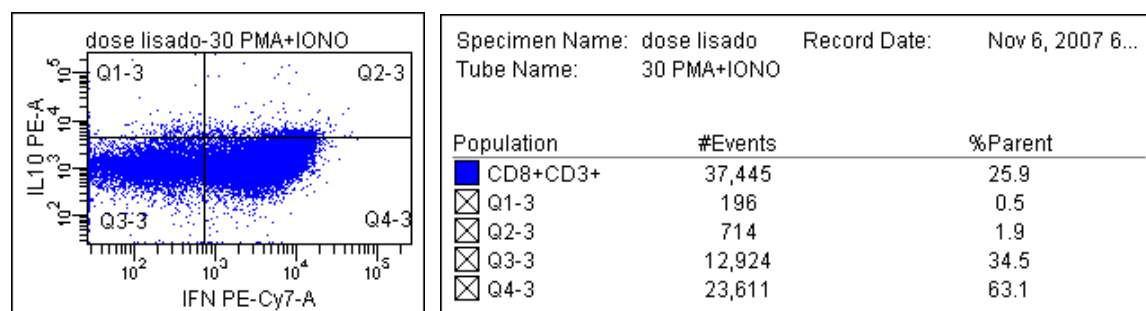
**ANEXO VI.**  
**Resultados IL-10**  
**Figura Demonstrativa**

## Produção de IL-10

As Figuras A-1 e A-2 mostram a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 na população T CD8, definidas pela positividade aos marcadores de superfície CD3 e CD8. Na Figura 35, observa-se que a maior parte dos eventos (99,2%) está contida em Q3-3, a região duplo-negativa, ou seja, células que não produzem citocinas. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que se trata do Controle Negativo.



**Figura A-1. Avaliação da produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  na população T CD8 (CD8+CD3+), na condição controle negativo (paciente 30 - Figura representativa).**



**Figura A-2. Avaliação da produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  na população T CD8 (CD8+CD3+), na condição PMA/ionomicina (paciente 30 - Figura representativa).**

A Figura 36 mostra a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 na população T CD8 após o estímulo inespecífico PMA/ionomicina. Observa-se que 34,5% das células são negativas para ambos marcadores (IL-10 PE e IFN- $\gamma$  PE-Cy7) e, portanto, não são produtoras dessas citocinas. Conforme esperado, em Q4-3, observam-se as células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  (63,1% do total de eventos adquiridos em P1 - Figura 1 e Figura 4 da Seção Materiais e Métodos). Já em Q1-3, onde se espera a positividade para IL-10, não se



observam células positivas para esta citocina, quando comparado com o mesmo quadrante na condição Controle Negativo. Conforme relatado anteriormente, esses resultados são decorrentes da qualidade inadequada dos anticorpos monoclonais para detecção de IL-10 e não à ausência de produção. Os resultados foram semelhantes nas populações celulares TCD $\delta$  e T $\gamma$  $\delta$ . Dessa forma, os experimentos avaliando a produção de IL-10 por citometria de fluxo foram descontinuados no início do projeto, uma vez que poderiam conduzir a conclusões equivocadas. A análise desses experimentos foi feita por meio do programa FACSDiva<sup>TM</sup> (BD Biosciences).

# 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](#)