



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

**Coinfecção GBV-C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças
Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE**

EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR

RECIFE/PE

2012

EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR

**Coinfecção GBV-C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças
Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre na área de Concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

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

COORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Recife- PE

2012

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

C193c Campelo Júnior, Evônio de Barros.
 Coinfecção GBV-C e HIV em pacientes acompanhados no Serviço de
 Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE / Evônio de Barros
 Campelo Júnior. – Recife: O autor, 2012.
 97 f. : il. tab.; quad.; 30 cm.

 Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho .
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
 Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

 1. HIV. 2. GBV-C. 3. CCR5. 4. CXCR4. I. (Orientadora). II. Coêlho,
 Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora) I. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-087)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR

No dia 27 de dezembro de 2012, às 08h30, na Sala de Aula do PPGMEDTROP/UFPE, os Membros Doutores: **o Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (UFPE – Presidente da Banca), a Profa. Dra. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque (ASCES) e a Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (UFPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o mestrando **EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR** sobre a sua Dissertação intitulada **“CO-INFECÇÃO GBV-C E HIV EM PACIENTES ACOMPANHADOS NO SERVIÇO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DO HC-UFPE”**, o qual foi orientado pela **Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho** e co-orientado pelo **Prof. Dr. Ricardo Arraes Ximenes**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

APROVADO

Profa. Dra. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

APROVADO

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

APROVADO



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

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

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

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Ana Catarina de Souza Lopes

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, pais, irmãos, filhos e esposa, os quais corroboraram significativamente através do amor e da paciência, tão importantes nesse momento.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho por toda paciência, tempo e empenho dedicados para realização deste trabalho e minha formação. Além de seus ensinamentos e conhecimentos compartilhados neste tempo que estive ao seu lado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes, pelas reuniões, disponibilidade e sugestões conferidas para a execução da pesquisa.

Aos pacientes que aceitaram participar do trabalho, cooperando com boa vontade, compreensão e fornecendo inspiração.

Ao Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, que atuou de maneira efetiva no intercâmbio com outra instituição e, dessa forma proporcionou o desfecho da pesquisa.

À doutoranda, Ana Maria Passos, do Programa de Pós-Graduação em Infectologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato (UNIFESP), pela possibilidade da realização da pesquisa do RNA para GBV-C, a qual foi realizada no Laboratório de Virologia Clínica da UNIFESP.

Aos funcionários do ambulatório de Doenças infecciosas e parasitárias do Hospital das Clínicas, Roque Almeida e Rosângela Maria Cavalcanti Silva.

A todos do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA/UFPE) que contribuíram para a realização da pesquisa, Georgea Cahú, Jéfferson Almeida, Viviane Moraes, Mariana Peixoto, grandes colaboradores.

A todos do Laboratório Central do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e do Laboratório de Saúde do Recife, especialmente Silvana de Barros Barreto, Kledoaldo Oliveira de Lima e Maria José Couto de Oliveira, que contribuíram para a realização da pesquisa.

A todos do Serviço de Arquivo Médico e Estatística, especialmente Ana Kelly Alves de Souza e Marinalva Santos e Sena, que contribuíram para a realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr José Tadeu Pinheiro pela colaboração no trabalho.

“Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grito de um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.”

João Cabral de Melo Neto

RESUMO

Desde 1967, momento do seu surgimento no mundo científico, o GB vírus C (GBV-C) permanece conhecido como vírus indolente, todavia não obstante, pesquisas têm revelado a despeito da ausência de vinculação do GBV-C com alguma doença, que a associação entre o GBV-C e HIV promove uma progressão mais lenta na doença pelo HIV em indivíduos coinfectados. Essa interação teria como mecanismo a competição com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) na ligação aos correceptores CCR5 e CXCR4 e dessa forma tem sido objeto de análise com intuito de promover a compreensão da dinâmica imunológica do HIV. Portanto, admitindo a importância do GBV-C na pandemia de HIV/aids, esse trabalho determinou a prevalência da infecção pelo GBV-C em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE, verificou o perfil sócio-demográfico da população, identificou fatores de risco e fez a associação entre a contagem de linfócitos TCD4 e a infecção pelo GBV-C. Representou um estudo de corte transversal, analisado como caso-controle, no qual a presença do GBV-C RNA foi investigada em 249 pessoas vivendo com HIV/aids, de acordo com a demanda espontânea do ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias HC-UFPE, no período de junho a dezembro de 2011 e que preenchiem os critérios de inclusão. Foram coletadas amostras de sangue de cada participante, os quais também assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam questionário elaborado especificamente para a pesquisa. A detecção do RNA do GBV-C foi realizado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O resultado da pesquisa indicou uma prevalência de 24,3%, compatível com outros estudos nacionais e internacionais, indicou o perfil sócio-demográfico, apontou a via parenteral como a mais prevalente na infecção pelo GBV-C e associou a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids na fase inicial da infecção. Também a discussão apontou a necessidade de realização de trabalhos de coorte para melhor compreensão de fatores implicados na transmissão do GBV-C.

Palavras-chave: HIV, GBV-C, CCR5, CXCR4

ABSTRACT

Since 1967, the time of its emergence in the scientific world, the GB virus C (GBV-C) virus remains known as indolent, but nevertheless, research has revealed despite the absence of binding of GBV-C with some disease, the association between GBV-C and HIV promotes a slower progression in HIV disease in coinfecting individuals. This interaction mechanism would compete with the human immunodeficiency virus (HIV) in binding to CCR5 and CXCR4 coreceptors and thus has been the subject of analysis in order to promote understanding of the dynamics of HIV immune. Therefore, admitting the importance of GBV-C in the HIV/AIDS pandemic, this study estimated the prevalence of GBV-C infection in people living with HIV/AIDS followed in the Service of Infectious and Parasitic HC-UFPE, there the socio-demographic profile of the population, identified risk factors and made the association between CD4 count and GBV-C infection. Represented a cross-sectional study, analyzed as case-control study in which the presence of GBV-C RNA was investigated in 249 people living with HIV/AIDS at the outpatient of Infectious and Parasitic Diseases HC-UFPE, between June and December 2011 and who met the inclusion criteria. Blood samples were collected from each participant, who also signed a consent form and a questionnaire developed specifically for research. Detection of GBV-C RNA was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction). The result of the survey indicated a prevalence of 24.3%, consistent with other national and international studies, said the socio-demographic profile, pointed the parenteral route as the most prevalent in the GBV-C infection and associated with CD4 count and GBV-C infection in people living with HIV/AIDS in the early phase of infection. Also the discussion pointed to the need to perform cohort studies to better understand the factors involved in the transmission of GBV-C.

Keywords: HIV, GBV-C, CCR5, CXCR4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação das sequências genômicas do GBV-C e HCV.....	22
Figura 2 - Prevalências do GBV-C em doadores de sangue de diversas localidades mundial.....	23
Figura 3 - Múltiplos mecanismos postulados sobre a ação que o GBV-C exerce nos pacientes coinfectados com HIV.....	26
Figura 4 - Os cinco flavivírus analisados.....	28

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 - Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas e a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.....	45
Tabela 2 - Análise univariada da associação das variáveis ligadas a transmissão sexual e sanguínea com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.....	46
Tabela 3 - Análise univariada da associação das variáveis ligadas a transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.....	47
Tabela 4 - Análise multivariada da associação das variáveis sócio-demográficas e ligadas a transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.....	48
Tabela 5 - Comparação de mediana da contagem de linfócito T CD4 entre indivíduos GBV-C + e GBV-C – de acordo com o diagnóstico do HIV, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpo contra o antígeno do nucleocapsídeo do vírus da hepatite B
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno da superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra o antígeno do vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
cccDNA	DNA circular covalentemente fechado, do inglês <i>covalently closed circular DNA</i>
CCR5	Receptor de quimiocina CC do tipo 5
CD4	Grupamento de diferenciação 4, do inglês <i>cluster of differentiation 4</i>
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC do tipo 4
DIP	Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
GBV-C	GB vírus C
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HC	Hospital das clínicas
HCV	Antígeno de superfície do vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LIKA	Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami
MACS	<i>Multicenter AIDS Cohort Study</i>
MIP-1 α	<i>Proteínas inflamatórias dos macrófagos1α</i>
ORF	Quadros de leitura aberto, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPC	Pneumonia por pneumocistose
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T cell-Expressed and Secrete</i>
RDA	<i>Representation Differential Amplification</i>

RNA	Ácido ribonucleico
SDF-1	Fator Derivado do Estroma
SISPA	<i>Sequence Independent Single Primer Amplification</i>
TARV	Terapia Antirretroviral Combinada
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 DELIMITAÇÃO DO TEMA.....	15
2 REVISAO DA LITERATURA.....	19
2.1 Histórico.....	20
2.2 O GBV-C.....	21
2.3 Epidemiologia.....	22
2.4 Repercussão clínica da coinfeção GBV-C e HIV.....	24
2.5 Aspectos Imunológicos.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Desenho do estudo.....	32
4.2 Local do estudo.....	32
4.3 População do estudo.....	32
4.4 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra.....	32
4.5 Definição das variáveis e coletas de dados.....	33
4.5.1 Operacionalização e categorização das variáveis.....	33
4.5.1.1 Variáveis relacionadas ao diagnóstico.....	33
4.5.1.2 Variáveis Sociodemográficas.....	33
4.5.1.3 Situação de risco para infecção pelo HIV/GBV-C.....	34
4.6 Métodos de coleta e processamento das amostras.....	34
4.6.1 Determinação do CD4	34
4.6.1.1 Pesquisa da contagem dos linfócitos T CD4.....	35
4.7 Caracterização das técnicas.....	35
4.7.1 Extração de GBV-C RNA.....	35
4.7.2 Pesquisa do GBV-C RNA.....	35
4.8 Análise dos dados.....	36
4.8.1 Análise estatística.....	36
4.9 Considerações éticas.....	36

5 RESULTADOS.....	37
5.1 Artigo - Coinfecção GBV-C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011/2012	39
6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES.....	63
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	
Apêndice B – Questionário	
Apêndice C – Versão do artigo em inglês	
ANEXOS.....	88
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE	
Anexo B - Normas para Publicação da revista	

1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

O conhecimento do mecanismo imunológico da interação do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e linfócitos T CD4 proporcionou uma nova linha de pesquisa, tendo como base a ação dos correceptores CCR5 e CXCR4. Dessa forma a compreensão da atuação do GB vírus C (GBV-C) e o HIV com esses correceptores tem sido objeto de estudo com intuito de compreender a dinâmica imunológica da infecção pelo HIV (WILLIAMS et al., 2004; XIANG et al., 2009; GEORGE et al., 2012). Portanto essa curiosidade imunológica a respeito dos vírus, tem promovido criação de pesquisas que buscam descobrir a existência de associação entre os mesmos, desse modo surgem alguns trabalhos apontando que, assim como o HIV, o GBV-C se replica em linfócitos T CD4 (XIANG et al., 2000; NATTERMAN et al., 2003) e que, infecção do linfócito pelo GBV-C anteriores ao do HIV, inibem a replicação do HIV (WILLIAMS et al., 2004).

Diversos trabalhos buscaram demonstrar a associação entre os dois vírus, contudo alguns estudos apresentaram diferenças metodológicas, sobretudo quanto ao tipo de estudo e a população estudada, dificultando a comparação dos resultados. Entretanto, apesar das divergências na metodologia das pesquisas, há também vários trabalhos indicando a associação direta entre a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV-C, sugerindo a hipótese de que o GBV-C promove progressão mais lenta da doença pelo HIV (TILLMANN et al., 2001; XIANG et al., 2004; STAPLETON et al., 2004).

Heringlake et al. (1998), em estudo na Alemanha, referiram ter achado a associação entre a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV-C em pessoas coinfectadas. Sugeriram que o GBV-C pudesse representar um prognóstico favorável para os pacientes HIV.

Sabin et al. (1999), realizaram pesquisa com pacientes ingleses hemofílicos e não encontraram associação, entretanto, nesse estudo havia a quase totalidade dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV).

Estudo de coorte prospectiva, envolvendo cerca de 200 pacientes alemães, trouxe diversas informações sobre a coinfecção GBV-C/HIV (TILLMANN et al., 2001), Uma delas demonstrava haver maior carga viral do GBV-C e menor carga viral do HIV nos pacientes coinfectados. Observou-se também maior tempo para o desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) nos indivíduos GBV-C RNA e, melhor sobrevida dos pacientes com aids e presença de carga viral

do GBV-C. O estudo avaliou ainda os pacientes após a Terapia Antirretroviral Combinada (TARV) e mostrou que a coinfeção GBV-C/HIV, reduziria a mortalidade.

Por outro lado, Brumme et al. (2002), numa coorte retrospectiva em 441 pacientes canadenses, sob a TARV e infectados pelo GBV-C não encontraram associação entre o GBV-C e HIV. Nesse estudo foram usadas como parâmetros clínicos a redução da carga viral do HIV, elevação da contagem de linfócitos T CD4 e mortalidade.

Não obstante as divergências de trabalhos sobre a associação entre o GBV-C e HIV, há também diferenças nas taxas de prevalências do GBV-C em várias regiões do mundo, havendo relação inversa entre as taxas de prevalências e o grau de desenvolvimento da região. Trabalhos realizados nos Estados Unidos e Japão apresentaram valores inferiores a 4%, enquanto na China e África eram superiores a 15% (MOHR, STAPLETON, 2009).

Halasz et al. (2000), relataram distribuição da infecção pelo GBV-C bastante variável em populações saudáveis, apresentando baixa prevalência (1-4%) em nações da América do Norte e Europa e, altas prevalências (10-33%) em países da África e América do Sul.

No Brasil, Levi et al. (2003), estudaram 545 indivíduos doadores de sangue de São Paulo, procurando detectar a prevalência do GBV-C RNA e avaliar sua associação com variáveis sócio-demográficas, encontraram prevalência de 9,7% e a associação com raça/etnia, sendo os doadores pretos e pardos mais frequentemente infectados, bem como relação inversa entre anos de escolaridade e infecção pelo GBV-C, no qual os doadores menos escolarizados apresentaram maiores prevalências.

Ribeiro-dos-Santos et al. (2002), realizaram em São Paulo, Brasil, estudo que avaliou a presença do GBV-C RNA em amostra de 1039 indivíduos da população geral. A prevalência encontrada foi de 5,1% em indivíduos maiores que 5 anos de idade, sendo que a prevalência aumentou para 8,3% em indivíduos de até 39 anos de idade.

Portanto, admitindo a importância do GBV-C na pandemia de HIV/aids, esse trabalho teve como objetivo estimar a prevalência dessa infecção, identificar os fatores associados à coinfeção e verificar a associação entre a contagem de

linfócitos T CD4 e infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Outrora conhecido como vírus da hepatite G, o GB vírus C, é um vírus a procura de um nincho ecológico. O primeiro relato surgiu de estudos experimentais sobre a transmissão de hepatites virais agudas de humanos para macacos, gênero *saguinus* sp, advindo a sigla GB das iniciais de um médico cirurgião que estava em terceiro dia de icterícia e cedeu seu próprio sangue com finalidade de se obter amostras séricas e que as inoculassem nos saguis do experimento, nos quais após a realização de transfusões sequenciais possibilitou a classificação do vírus não A, não B, em agente GB (DEINHARDT et al., 1967).

Aproximadamente após três décadas, um grupo de pesquisa, analisando amostras séricas de macacos saguis infectados com o vírus GB e, dispondo de técnicas de identificação viral mais sensíveis, como a técnica de amplificação de ácido nucléico chamada RDA (Representation Differential Amplification) (LISITSYN et al., 1993), relatou a identificação de dois diferentes tipos de vírus GB, classificando em GB vírus A (GBV-A) e GB vírus B (GBV-B) (SIMONS et al., 1995). E logo depois, o mesmo grupo isolou e denominou dessa vez em seres humanos, o GB vírus C (GBV-C) (SIMONS et al., 1995).

Quase um ano depois do primeiro experimento, outro grupo utilizando uma técnica de amplificação de ácido nucléico denominada como SISPA (Sequence Independent Single Primer Amplification), amplificou o RNA do mesmo vírus a partir do soro de um paciente, designando-o inicialmente de PNF 2161, com hepatite crônica não-A, não-B, de acordo com o Conselho Sentinela de Estudos de Hepatites Virais do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e o chamou de vírus da Hepatite G (HGV) (LINNEN et al., 1996). Contudo, estudos posteriores comparando os genomas entre as sequências do GBV-C e HGV, demonstraram uma congruência de cerca 95% na sequência de aminoácidos e de 85,5% na de nucleotídeos, o que representaria serem eles isolados do mesmo vírus, pertencendo à mesma família *Flaviviridae*, ainda que de grupos diferentes (MUERHOFF et al., 1995; ALTER et al., 1996; LEARY et al., 1996).

A denominação, de vírus da hepatite G atribuída ao GBV, é considerada inadequada por pesquisadores desse vírus, pois o mesmo não causa hepatite e não faz parte da triagem em bancos de sangue. Conforme um estudo realizado na Suécia por Halasz et al. (2000), no qual foram selecionadas 1254 pessoas de uma

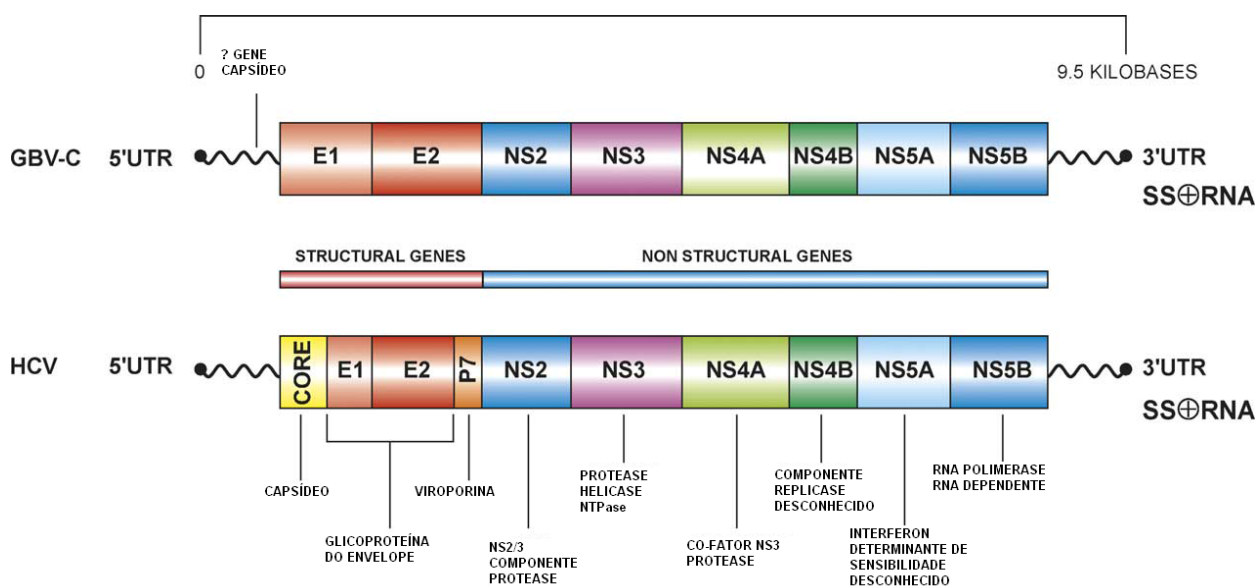
triagem de doadores de sangue, havendo 32 indivíduos GBV-C RNA positivos e, HBV, HCV e HIV negativos, foi observado que havia replicação viral do GBV-C em hepatócitos, porém não houve evidências de lesões em fígado. Nessa pesquisa os participantes tinham acompanhamento clínico, laboratorial e 54% foram submetidos à biópsia de fígado. Há ainda outros estudos anteriores, os quais desvinculam o vírus à epidemiologia das hepatites (BERENGUER et al., 1996; TILLMANN et al, 1998).

2.2 O GBV-C

O GBV-C é um vírus RNA da família *Flaviviridae*, com genoma contendo RNA fita simples, polaridade positiva e aproximadamente 9400 nucleotídeos, os quais apresentam as regiões codificadoras de proteínas estruturais E1 e E2, glicoproteínas do envelope e regiões codificadoras de proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4BB, NS5A e NS5B. Traz ainda uma região não codificadora 5' (NCR). Apesar de sua estrutura genômica similar ao HCV, o GBV-C não apresenta proteínas do core viral (SIMONS et al., 1996).

O GBV-C e o HCV possuem homologia parcial de suas sequências genômicas, conforme figura 1. Uma diferença significativa está na presença de poucas sequências isoladas no GBV-C dos genes que codificam as glicoproteínas de envelope, ao contrário do HCV e HIV, nos quais há uma maior variabilidade, a qual estaria relacionada com a persistência viral (SIMMONDS et al., 2001).

Figura 1 - Comparação das seqüências genômicas do GBV-C e HCV.



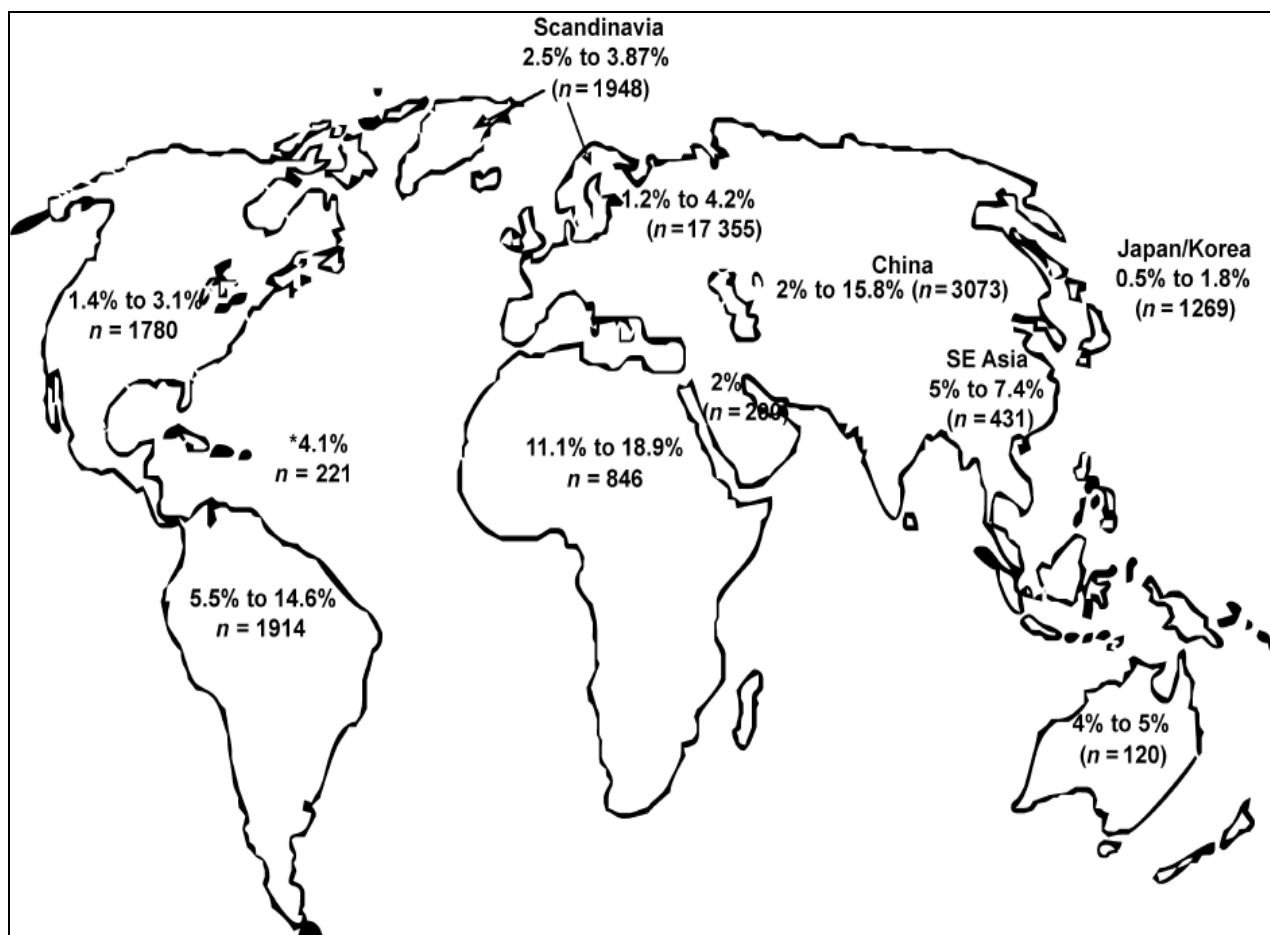
Fonte: Adaptado de BERZSENYI, BOWDEN, ROBERTS, 2005.

2.3 Epidemiologia

Devido ao caráter linfotrópico, o GBV-C utiliza vias de transmissão bastante semelhantes ao HIV, podendo ser transmitido através da relação sexual, pela via parenteral e vertical.

Dentre as vias de transmissão do GBV-C, a relação entre homens que fazem sexos com homens apresenta maior probabilidade de transmissão (FREY et al., 2002). Para identificar o vírus foi usada a reação de cadeia de polimerase (PCR). Na figura 2, um mapa indica os locais de baixas prevalências (nações desenvolvidas) e os lugares de elevada prevalência (países em desenvolvimento).

Figura 2 - Prevalências do GBV-C em doadores de sangue de diversas localidades mundial.



Fonte: MOHR, STAPLETON, 2009.

Estudo de coorte realizado na Tailândia abordando transmissão vertical, o qual envolveu 262 gestantes coinfectadas com o GBV-C e HIV, revelou transmissão do vírus GBV-C para 41% dos recém-nascidos. Nessa pesquisa também houve uma constatação de aumento da transmissão vertical quando a mãe tinha feito uso durante a gestação do antirretroviral zidovudina, diferindo do que aconteceu com o HIV, o qual se apresentou reduzido com o uso da droga (SUPAPOL et al., 2008).

Estudos que abordam a prevalência da coinfecção do GBV-C com outras infecções apresentam taxas muito interessantes.

Gallian et al. (1998), executaram pesquisa em população rural do Nordeste do Brasil com alta taxa de infecção para esquistossomose e relataram prevalências de RNA positivo para GBV-C em 16,4% e anticorpo anti-E₂ de 18,3%. O estudo acrescentou também que as cepas virais do GBV-C pertenciam aos tipos 1 e 2, apenas, as quais seriam predominante na África e Europa, respectivamente,

sugerindo que GBV-C foi introduzido no Novo Mundo pelos conquistadores brancos e escravos negros desde o século XVI.

A prevalência do GBV-C em pessoas vivendo com HIV/aids é muito elevada, aproximando-se de 80% do somatório de GBV-C RNA positivos e anti-E₂ (HERINGLAKE et al., 1998; TILLMANN et al., 2001; VAN DER BIJ et al., 2005), quando comparada com a presença da infecção do GBV-C em doadores de sangue saudáveis, que apresenta taxa de prevalência variando entre 0,5%- 5% nos países desenvolvidos e 5-18,9% nas nações em desenvolvimento (MOHR et al., 2009).

2.4 Repercussão clínica e diagnóstico da coinfecção GBV-C e HIV

A despeito da ausência de vinculação do GBV-C com alguma doença, este vírus é relacionado em vários artigos como associado a progressão mais lenta da doença pelo HIV em indivíduos coinfectados. Vários pesquisadores seguiram esse pensamento, referindo a associação entre o HIV e GBV-C, propondo que as pessoas coinfectadas, apresentariam uma sobrevida maior e uma progressão mais lenta para a imunodeficiência quando comparados com indivíduos infectados apenas pelo HIV (LEFRÈRE et al., 1999; YEO et al., 2000; TILLMANN et al., 2001; XIANG et al., 2001; WILLIAMS et al. 2004).

Heringlake et al. (1998), estudaram prospectivamente, na Alemanha, 197 pacientes HIV positivos, evidenciando nesse estudo que os indivíduos com viremia do GBV-C progrediam lentamente para aids e possuíam sobrevida maior mesmo após a instalação da imunodeficiência. Foi observada também relação inversamente proporcional entre as cargas virais dos dois vírus e que a carga viral de GBV-C aumentou em todos os pacientes que tinham iniciado TARV.

Resultados semelhantes foram obtidos numa coorte retrospectiva com 95 pacientes HIV positivos na França (LEFRÈRE et al., 1999). Nesse estudo 24,2% eram GBV-C RNA positivo e 25% tinham anticorpo anti- E₂.

Uma coorte realizada MACS (Multicenter AIDS Cohort Study), compreendendo vários centros nos Estados Unidos, com amostra de pacientes anterior à TARV, revelou que a infecção pelo GBV-C estava estatisticamente significativa e associada à maior sobrevida entre os indivíduos HIV positivos com 5 a 6 anos após a soroconversão para o HIV e, que a negativação do GBV-C RNA após

5 a 6 anos foi associada com pior prognóstico. Todavia não houve modificação na sobrevida de pacientes entre 12 a 18 meses da conversão sorológica (WILLIAMS et al., 2004).

Contudo em alguns trabalhos, como o estudo de coorte prospectivo sueco, elaborado por Birk et al. (2002), não houve constatação de benefícios na coinfeção, representando essa pesquisa uma coorte com 157 pacientes HIV-1 e tendo controlado fatores prognósticos como idade, sexo, ano de soroconversão, TARV e profilaxia para pneumonia por pneumocistose (PPC).

Brumme et al. (2002), realizando uma coorte retrospectiva com 441 pacientes canadenses, HIV-1 virgens de tratamento e que iniciariam sua primeira terapia antirretroviral, não evidenciou nenhum efeito na terapia antirretroviral inicial e infecção pelo GBV-C. Nesse trabalho mais de 80% dos pacientes iniciaram a terapia antirretroviral com três drogas.

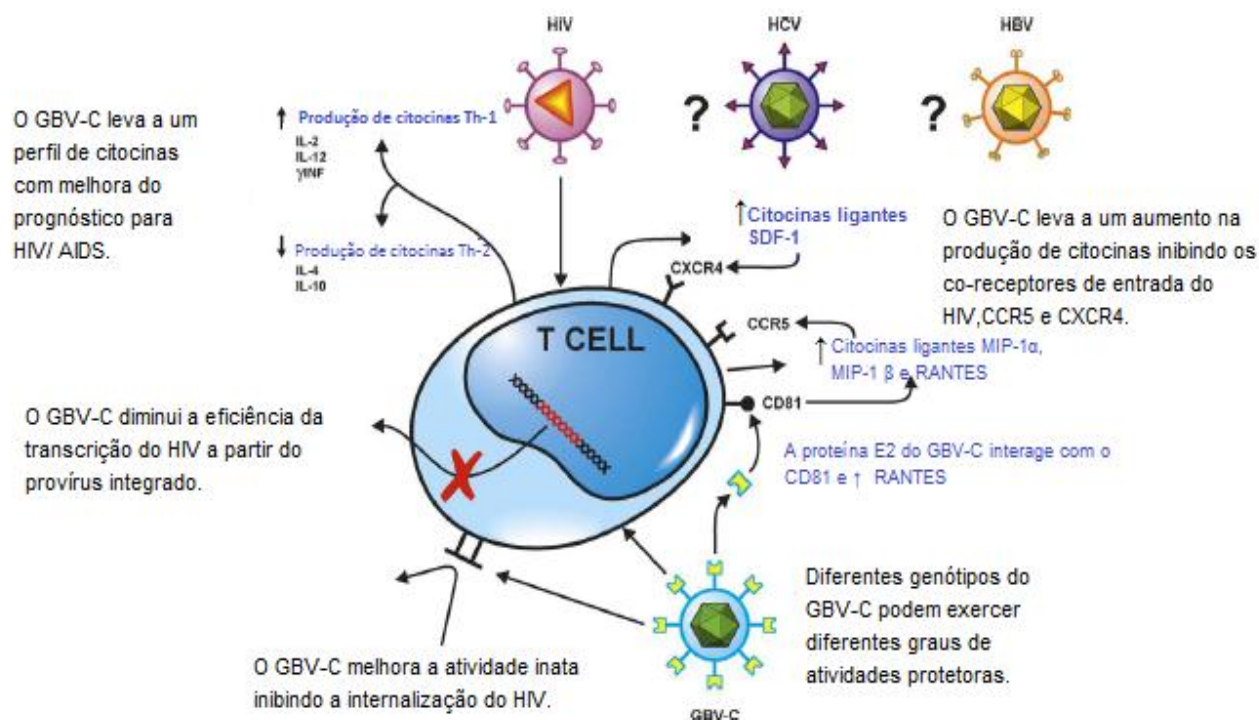
Björkman et al. (2004), realizaram uma coorte prospectiva com 230 pacientes suecos infectados pelo HIV-1, com diagnóstico de no máximo dois anos, sendo os mesmos seguidos até o início da TARV, morte ou sua última visita à clínica do grupo de pesquisa. Esses pesquisadores concluíram que a infecção pelo GBV-C seria um fenômeno secundário à progressão do HIV-1, ao invés de um fator prognóstico.

Van der Bij et al. (2005), realizaram estudo de coorte prospectiva com pacientes homossexuais masculinos HIV-1, na Holanda. Os pesquisadores propuseram que a infecção pelo GBV-C, na infecção pelo HIV-1, estaria vinculada ao número de células T CD4+ circulantes e que, a depuração do GBV-C, seria consequência da redução de células T CD4+ e não, o causador.

2.5 Aspectos Imunológicos

Não obstante a ausência de consenso sobre se há ou não benefícios para os pacientes HIV positivos com a infecção pelo GBV-C, surgem novos trabalhos buscando entender os mecanismos atuantes na coinfeção.

Figura 3 - Múltiplos mecanismos postulados sobre a ação que o GBV-C exerce nos pacientes coinfectados com HIV.



Fonte: Adaptado de BERZSENYI, BOWDEN, ROBERTS, 2005.

Nunnari et al. (2003), realizaram um estudo prospectivo na Itália com 80 pessoas vivendo com HIV/aids e obtiveram uma prevalência de 21% de pacientes GBV-C RNA positivos. Também encontraram uma manutenção de citocinas do perfil TH1, interleucina-2, interleucina-12 e interferon- γ (IL-2, IL-12, interferon- γ) em pacientes coinfectados e redução de citocinas do perfil TH1 em pacientes GBV-C RNA negativos. Nessa pesquisa também foi observado que citocinas do perfil TH2 (IL-4 e IL-10) aumentavam nos pacientes GBV-C RNA negativos e se mantinham estáveis nos pacientes GBV-C RNA positivos.

Vários estudos corroboram a relevância da resposta celular T-helper contra o HIV, demonstrando que a progressão para aids está relacionada com incapacidade das células mononucleares em produzir citocinas do perfil TH1 (IL-2, IL-12, IFN- γ) e promoverem a produção de citocinas da resposta TH2 (IL-4 e IL-10) (SPELLBERG, EDWARDS JR et al., 2001).

Xiang et al. (2001), através estudos in vitro, com cultura de células de medula óssea, observaram que a replicação do HIV seria inibida quando a infecção pelo mesmo precedia à do GBV-C, o qual não apresentaria efeito citopático e seria

incapaz de inibir a síntese de proteínas celulares de HIV. Esse trabalho também propôs que o GBV-C não impede a entrada do HIV na célula e que o mecanismo atuaria após a sua internalização.

Stapleton (2003) escreveu artigo demonstrando alguns aspectos da interação entre o HIV e o GBV-C em vários estudos da época. Nessa pesquisa são referidos trabalhos que demonstravam a relação benéfica da interação dos dois vírus e relatadas observações como resultados de estudos, os quais informavam que indivíduos HIV positivos e GBV-C RNA positivos, sobreviviam mais do que aqueles que se apresentavam GBV-C RNA negativos. Também foram referidos trabalhos relacionados com a imunologia viral, alguns dos quais relatavam haver indivíduos que depuravam o GBV-C sem formar anticorpo E₂, demonstrando que a depuração do vírus não era imunologicamente mediada e que as células linfocitárias críticas seriam importantes para manter a replicação.

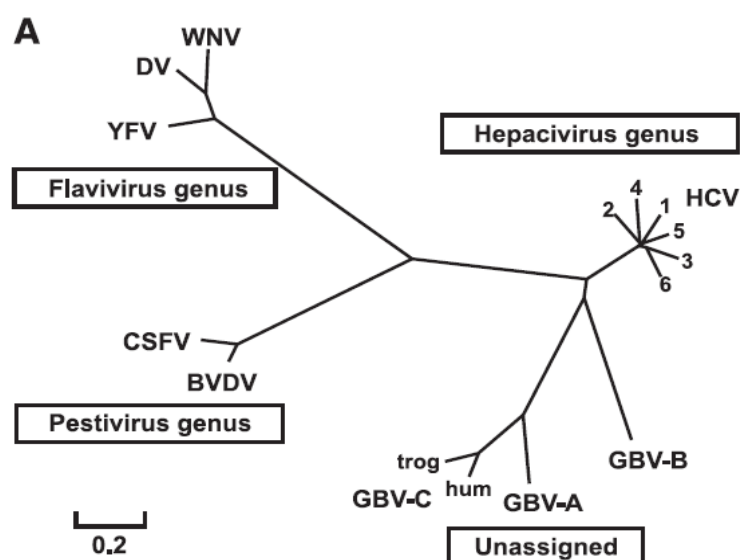
Entretanto muitos pesquisadores estão procurando explicar a associação entre os dois vírus através da interação do vírus do HIV e os correceptores CCR5 e CXCR4, receptores para as cepas de HIV R5 e X4 respectivamente.

Nattermann et al. (2003), relataram em seu estudo com pacientes alemães, homozigóticos para CCR5, que os níveis de CCR5 estavam bastante reduzidos em linfócitos T CD4 e CD8 em indivíduos GBV-C infectados, independentemente de ser coinfestado com o vírus HIV. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a proteína E₂ de pessoas GBV-C RNA positivos inibiriam a expressão dos receptores CCR5 ao se ligarem a molécula CD81.

Xiang et al. (2004), fizeram um estudo in vitro, com células mononucleares do sangue periférico infectadas com cepas do vírus GBV-C e observaram que havia uma redução da replicação de cepas de HIV que usavam os correceptores CCR5 e CXCR4, os quais são receptores de entrada na célula. O GBV-C atuaria indiretamente através da produção de citocinas que agem como ligantes naturais dos correceptores. Essas citocinas seriam o RANTES (Regulated on Activation Normal T cell-Expressed and Secreted), proteínas inflamatórias dos macrófagos 1 α (MIP-1 α), proteínas inflamatórias dos macrófagos 1 β (MIP-1 β), os quais seriam ligantes do CCR5 e o fator Derivado do Estroma (SDF-1), ligante do CXCR4.

Xiang et al. (2009), fizeram um estudo in vitro, porém dessa vez buscou relacionar a proteína não estrutural NS5A do GBV-C com o mecanismo imunológico de interação com o vírus HIV-1. Em sua metodologia usou cinco flavivírus, o GBV-C, o vírus da dengue, da hepatite C, da febre do Oeste do Nilo e da febre amarela (figura 3), os quais possuíam a proteína não estrutural NS5, dessa maneira aproximar-se-ia na homologia da proteína do vírus GBV-C. Nesse trabalho abstraiu-se que o mecanismo agiria em nível transcricional, tendo da proteína NS5 participação na redução nos níveis de mRNA em estado estacionário nos CD4, havendo desse modo atenuação da replicação do HIV-1 e também que a menor expressão de moléculas de CD4 dificultaria o reconhecimento imunológico do vírus pelo hospedeiro.

Figura 4 - Os cinco flavivírus analisados.



Fonte: XIANG et al., 2009.

Dessa forma, esse trabalho buscou elucidar a importância do GBV-C no universo HIV/aids, através da determinação da prevalência da infecção pelos vírus GBV-C e verificar a associação entre a contagem de linfócitos T CD4 e infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/Aids acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência do GBV-C e verificar a associação entre a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhados Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a frequência da infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids, atendidas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE;

Verificar o perfil sócio-demográfico das pessoas coinfectadas;

Caracterizar a situação de risco para coinfecção pelo HIV/GBV-C;

Verificar a associação entre a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV- C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Representou um estudo caso-controle, no qual os casos foram definidos como GBV-C RNA positivos e os controles como GBV-C RNA negativos no período julho a dezembro de 2011.

4.2 Local do estudo

O presente estudo foi realizado no ambulatório do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

4.3 População do estudo

Consistiu em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE, maiores de 18 anos e residentes em Pernambuco.

4.4 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra

Com a finalidade de aperfeiçoar as análises dos resultados obtidos, o tamanho da amostra foi calculado pelo programa de computador EPI-INFO versão 6,04, usando a menor prevalência estabelecida em estudos brasileiro da coinfeção, que é de 18%, erro alfa de 0,5, com confiabilidade de 95%, um power de 80%. Obtendo-se um tamanho amostral de 257 pacientes com HIV/aids para estimar a prevalência da infecção pelo GBV- C. (GALLIAN et al.,1998; HERINGLAKE et al., 1998; TILLMANN et al., 2001; VAN DER BIJ et al., 2005).

4.5 Definição das variáveis e coletas de dados

4.5.1 Operacionalização e categorização das variáveis

4.5.1.1 Variáveis relacionadas ao diagnóstico

Prevalência da coinfeção HIV/GBV-C

Os parâmetros para evidenciar a coinfeção HIV/GBV-C foi a PCR para o GBV-C no plasma expresso em cópias/ml.

Contagem de linfócitos T CD4

- Contagem de células de linfócitos T CD4: Corresponde ao número de linfócitos CD4+ circulantes no sangue, resultado expresso em células/mm³, realizado na mesma amostra da coleta do GBV-C e feito por citometria de fluxo (BRASIL, 2008).

4.5.1.2 Variáveis Sócio-demográficas

- Sexo: 1- Masculino; 2- Feminino.

- Idade: Idade em anos completos. Categorizou-se como: 18-30; 31-40; 41-50 >50 e mais.

- Raça: 1- Branca; 2- Preta; 3- Amarela; 4- Parda; 5- Indígena; (IBGE, 2010).

- Escolaridade: 1. 0- 4 anos de estudo; 2.- 05- 07 anos de estudo; 3.- 8-11 anos de estudo; 4. >11 anos de estudo. 9- Ignorado.

- Renda: 1- Possui; 2- Não possui.

- Renda: 1- Até 03 salários mínimos; 2- > 03 salários mínimos.

4.5.1.3 Situação de risco para infecção pelo HIV/GBV-C

1- Transmissão via sexual; 2- Transmissão via parenteral.

4.6 Métodos de coleta e processamento das amostras

A pesquisa foi apresentada aos pacientes durante a consulta ambulatorial previamente agendada e aqueles que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A). Em seguida, foi realizado o preenchimento do questionário preparado especificamente para a pesquisa (apêndice B) e proceder-se-á a coleta da amostra sanguínea. Objetivando minimizar possíveis transtornos ao paciente, foram acrescentados 04 mL de sangue, em tubo seco durante a coleta sanguínea para determinação do CD4 e carga viral do HIV, hemograma e bioquímica, que são exames de rotina, evitando dessa forma que o paciente se submeta a desconfortos de punções extras.

Essas amostras foram etiquetadas, registradas, acondicionadas em recipiente apropriado e transportadas imediatamente ao Setor de Virologia do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami) pelo pesquisador responsável, onde foram processadas e armazenadas à -80° C para posterior análise.

4.6.1 Determinação do CD4

Foram obtidos através de consulta dos prontuários médicos dos pacientes, participantes da pesquisa, do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

4.6.1.1 Pesquisa da contagem de linfócitos T CD4

A contagem de linfócitos TCD4 foi realizada no Laboratório Municipal do Recife, segundo técnica de Citometria de Fluxo/Facscalibur.

4.7 Caracterização das técnicas

A quantificação da carga viral do GBV-C foi realizada no laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo.

4.7.2 Extração de GBV-C RNA

O RNA foi extraído do plasma utilizando o kit de extração Axygen Miniprep de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.3 Pesquisa do GBV-C RNA

A reação da RT-PCR em tempo real foi realizada em conjunto com o AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) e conforme Alves-Sousa et al. (2012). Utilizando 5µL da amostra extraída, 0,4µM do primer forward (5' CGG CCA AAA GGT GGT GGA 3'), 0,4µM do primer reverse (5' AAG CTT ACC CTA CAC TAG TGG 3'), 0,15µM da sonda (5'-FAM-ATG CCA GGG CGT GGT TGG AAA GTA TC-TAMRA-3'), tampão 1x e mix de enzimas 1x (combinado entre a ArraiyScript™ Reverse Transcriptase e a AmpliTaq Gold® DNA Polymerase).

A ciclagem foi realizada em termociclador ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando as seguintes nas condições: 1 ciclo de 50°C por 10 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos.

4.8 Análise dos dados

Todos os dados foram coletados e conferidos pelo pesquisador e depois repassados pelo digitador ao banco de dados formulado no software STATA versão 12, através de dupla entrada dos dados, comparando os resultados e realizando correções pertinentes, caso necessário, para posteriormente serem analisados.

4.8.1 Análise estatística

A magnitude e a significância estatística da associação entre o GBV-C e coinfeção HIV foram avaliadas através do OR e respectivo intervalo de confiança e do teste de chi quadrado ou de Fisher. Variáveis associadas com a infecção GBV-C na análise univariada e que apresentaram um valor de $P < 0,25$ foram incluídas na análise multivariada inicial. Permaneceram no modelo multivariado final as variáveis com valor de $p < 0.10$.

4.9 Considerações éticas

Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação para obtenção da autorização legal do serviço de referência no qual a pesquisa foi realizada, Serviço de Doenças Infecto-Parasitárias do HC-UFPE, assim como, encaminhou-se o mesmo ao Comitê de Ética e Pesquisa da Instituição envolvida, sendo aprovado sob o registro 301/11 (anexo A). O trabalho utilizou o termo de consentimento livre e esclarecido aos pacientes envolvidos no estudo, obedecendo às diretrizes da resolução CNS 196/96.

5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico que será submetido ao periódico The Journal of Infectious Diseases, qualis A1. Medicina II.

5.1 Artigo

MAJOR ARTICLE

Coinfecção GBV-C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011

Evônio de Barros Campelo Júnior,^{1,3} Ana Maria Passos,² Viviane Martha Santos de Moraes,^{1,3} Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú,³ Edmundo Pessoa de Almeida Lopes,⁴ Celso Francisco Hernandes Granato,² Ricardo de Arraes Alencar Ximenes,¹ e Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,5}

¹Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil; ²Laboratório de Virologia Clínica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil; ³Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ⁴Departamento de Medicina Clínica Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE Brasil; ⁵Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Background. Although there is no connection between GBV-C and any disease, some authors have reported a slower progression in HIV disease in coinfecting individuals. This study aimed to estimate the prevalence of GBV-C infection, to identify the factors associated with co-infection and to analyze the association between CD4 count and GBV-C infection in people living with HIV/AIDS.

Methodology. We conducted a cross-sectional study, analyzed as case-control study in which the presence of GBV-C RNA was investigated in 249 people living with HIV/AIDS at the Outpatient of Infectious and Parasitic Diseases in an University Hospital in 2011.

Results. The prevalence of GBV-C RNA in people living with HIV/AIDS was 23.4% (58/249), with age of 41.2 ± 9.5 years. Having source of income, piercing and age were inversely associated with infection with GBV-C, while the inhaled drugs showed direct association. The not infected group with GBV-C showed higher counts of CD4 T lymphocytes in people over two years of diagnosis of HIV.

Conclusion. There was a high prevalence of GBV-C in people living with HIV/AIDS. The study showed no association between sexual behavior and infection with GBV-C in this population, but it indicated an association between the parenteral route transmission and infection with GBV-C. It emphasizes the necessity of conducting cohort studies to better understand factors involved in the GBV-C transmission in people living with HIV/AIDS.

Introdução

O conhecimento do mecanismo imunológico da interação do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e linfócitos T CD4 proporcionou nova linha de pesquisa tendo como base a ação dos correceptores CCR5 e CXCR4. Dessa forma a associação de vírus como o GBV-C (GB vírus C) e o HIV, os quais fazem uso de mecanismos imunológicos semelhantes, tem sido objeto de análise de várias pesquisas. Não obstante, a compreensão da atuação do HIV/GBV-C com esses correceptores pode facilitar o entendimento da dinâmica imunológica da infecção pelo HIV [1-3]. Por isso, na busca da associação imunológica entre os vírus, surgiram alguns estudos que apontaram aspectos imunológicos importantes, como a replicação do GBV-C em linfócito T CD4 [4, 5] e que, infecções do linfócito pelo

GBV-C anteriores a do HIV, inibem a replicação do HIV [1]. Dessa maneira se estabelece a necessidade de pesquisas que abordem a coinfeção desses vírus, inicialmente, através de estudos de prevalência e fatores ligados à mesma numa determinada região.

A taxa de prevalência do GBV C varia nas diferentes populações e regiões do mundo, havendo relação inversa entre a taxa de prevalência e o grau de desenvolvimento da região [6]. No Brasil, a prevalência reportada variou de 5,1% na população geral da cidade de São Paulo, até 9,75% em doadores de sangue de São Paulo, em pesquisa com GBV-C RNA [7-8]. O perfil sócio-demográfico dos indivíduos com infecção pelo GBV-C indica maior prevalência na raça preta, distribuição uniforme nos gêneros e variação com a escolaridade [8-10].

Os fatores de risco do GBV-C e HIV são semelhantes, uma vez que esses vírus compartilham as mesmas vias de transmissão, sexual e parenteral [8-10].

Diversos trabalhos buscaram demonstrar a associação entre os dois vírus, contudo alguns estudos apresentaram diferenças metodológicas, sobretudo quanto ao tipo de estudo e a população estudada, dificultando a comparação dos resultados. Entretanto, apesar das divergências na metodologia das pesquisas, há também vários trabalhos indicando a associação direta entre a contagem de linfócitos T CD4 e a infecção pelo GBV-C, levantando a hipótese de que o GBV-C propicia progressão mais lenta da doença pelo HIV [10-13].

Portanto, admitindo a importância do GBV-C na pandemia HIV/aids, esse trabalho teve como objetivo estimar a prevalência dessa infecção, identificar os fatores associados à coinfeção e verificar a associação entre os contagem de linfócitos T CD4 e infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Metodologia

Desenho e população de estudo. No período de julho a dezembro de 2011, foram avaliadas 249 pessoas vivendo com HIV/aids atendidas no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE. Foi realizado estudo de corte transversal avaliado como caso-controle. Os casos foram definidos como sendo os indivíduos coinfectados HIV/GBV-C e os controles aqueles apenas com HIV, segundo critérios sorológicos do Ministério da Saúde [14]. Os indivíduos foram selecionados no momento da consulta ambulatorial de rotina e aqueles que concordaram em participar do estudo e apresentavam maioridade, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida, responderam questionário padronizado, o qual foi elaborado especificamente para a pesquisa, no qual constavam perguntas sobre características sócio-demográficas, comportamento sexual e fatores ligados à via de transmissão parenteral. As amostras de sangue foram coletadas em EDTA e obtidas na ocasião em que as pessoas realizavam seus exames de rotina no laboratório do HC-UFPE. Em seguida foram imediatamente encaminhadas para o Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami(LIKA) da UFPE, separadas em plasma para ser feita pesquisa do GBV-C RNA e estocadas a -80°C.

Pesquisa dos linfócitos T CD4. A contagem de linfócitos TCD4 foi realizada no Laboratório Municipal do Recife, segundo técnica de Citometria de Fluxo/Facscalibur.

Pesquisa do GBV-C RNA. A pesquisa do GBV-C foi realizada no Laboratório de Virologia Clínica da Universidade de São Paulo. O RNA foi extraído do plasma utilizando o kit de extração Axygen Miniprep de acordo com as instruções do fabricante. A reação da RT-PCR em tempo real foi realizada em conjunto com o AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) e conforme a referência 15. Utilizando 5µL da amostra extraída, 0,4µM do primer forward, 0,4µM do primer reverse, 0,15µM da sonda. A ciclagem foi realizada em termociclador ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 1 ciclo de 50°C por 10 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos.

Análise dos dados. Todos os dados foram coletados e revisados pelo pesquisador para depois serem digitados através do software EPI-INFO versão 6.04. A digitação foi realizada através de dupla entrada dos dados, comparado os mesmos através do módulo “validate” e quando necessário, foram realizadas correções pertinentes. O banco de dados foi construído no software EPI-INFO versão 6.04 e a análise de dados foi executada pelo STATA versão 12.

Análise estatística. A magnitude e a significância estatística da associação entre o GBV-C e infecção pelo HIV foram avaliadas através do OR e respectivo intervalo de confiança e do teste de chi quadrado ou de Fisher. Variáveis associadas com a infecção GBV-C na análise univariada e que apresentaram um valor de $P < 0,25$ foram incluídas na análise multivariada inicial. Permaneceram no modelo multivariado final as variáveis com valor de $p < 0.10$.

Resultados

Entre as 249 pessoas vivendo com HIV/aids avaliadas, 144(57.8%) eram do sexo masculino e 105(42.2%) do sexo feminino. A média de idade foi de 41,2 anos (SD 9.5 anos) anos, variando de 31.7 a 50.7 anos.

A prevalência da positividade para GBV-C RNA em pessoas vivendo com HIV/aids foi de 23,4% (58/249).

A tabela 1 apresenta a associação entre as variáveis sócio-demográficas e a infecção pelo GBV-C. Os indivíduos que referiram pertencer à raça preta apresentaram maior chance em adquirir a infecção pelo GBV-C, porém a associação não foi estatisticamente significativa.

Escolaridade correspondente a mais de 11 anos de estudo e possuir renda, apresentaram valor de p limítrofe na associação com GBV-C.

A associação entre idade e infecção pelo GBV-C foi inversa.

Tabela 1. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas e a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Variável	GBVC + n %	GBVC – n %	Odds Ratio	IC 95%	P
Sexo					
Feminino	23 (21.9%)	82 (78.1%)	1.0		
Masculino	35 (24.3%)	109 (75.7%)	1.145	0.629-2.084	0.658
Idade					
18-30	10 (34%)	19(66%)	1.0		
31-40	28 (29%)	69(71%)	0.771	0.319-1.863	0.564
41-50	15(18%)	69(82%)	0.413	0.160-1.066	0.067
> 50	5(13%)	34(87%)	0.279	0.832-0.938	0.039
Raça					
Parda	30 (20.8%)	114 (79.2%)	1.0		
Preta	11 (30.6%)	25 (69.4%)	1.687	0.747-3.811	0.209
Branca	16 (26.7%)	44 (73.4%)	1.394	0.693-2.805	0.352
Amarela/Indígena	01(12.5%)	07(87.5%)	0.548	0.065-4.624	0.580
Anos de Estudos					
< 4 anos	11 (19.6%)	45 (80.4%)	1.0		
5-7 anos	20 (25.3%)	59 (74.7%)	1.387	0.604-3.186	0.441
8-11anos	16 (19.0%)	68 (81.0%)	0.963	0.409-2.264	0.930
>11anos	11 (36.7%)	19 (63.3%)	2.368	0.877-6.393	0.089
Possui renda					
Não	09 (37.5%)	15 (62.5%)	1.0		
Sim	35 (23.5%)	114 (76.5%)	0.512	0.163-1.162	0.149
Renda					
≤ R\$ 1635,00	51 (23.2%)	169 (76.8%)	1.0		
> R\$ 1635,00	05(26.3%)	14 (73.7%)	1.183	0.407-3.444	0.757

Nota. 1 U\$ = 1,80 R\$ em dezembro de 2011.

Tabela 2. Análise univariada da associação das variáveis ligadas a transmissão sexual com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Variável	GBVC +	GBVC –	Odds Ratio	IC 95%	P
<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>		
Primeira relação sexual					
< 18 anos	44 (23.8%)	141 (76.2%)	1.0		
≥ 18 anos	14 (21.9%)	50 (78.1%)	1.114	0.563-2.205	0.756
DST					
Não	36 (23.2%)	119 (76.8%)	1.0		
Sim	22 (23.7%)	71 (76.8%)	1.024	0.559-1.878	0.938
Uso de preservativo na vida					
Regularmente	41 (26.8%)	112 (73.2%)	1.0		
Às vezes	06 (16.7%)	30 (83.3%)	0.546	0.212-1.408	0.211
Não	04 (15.4%)	22 (84.6%)	0.497	0.161-1.528	0.222
Preservativo com parceiros heterossexuais nos últimos 06 meses					
Regularmente	29 (25.2%)	86 (74.8%)	1.0		
Às vezes	06 (13.6%)	38 (86.4%)	0.468	0.180-1.221	0.121
Muitas vezes	02 (33.3%)	04 (67.7%)	1.483	0.258-8.522	0.659
Parceiros na vida					
0-2	01 (6.7%)	14 (93.3%)	1.0		
>2	57 (24.7%)	174 (75.3%)	4.586	0.590-35.650	0.145
Parceiros heterossexuais nos últimos 06 meses					
0-2	52 (22.9%)	175 (77.1%)	1.0		
>2	06 (28.6%)	15 (71.4%)	3.429	0.779-15.086	0.103
Sexo oral					
Frequente	10 (27.8%)	26 (72.2%)	1.317	0.586-2.961	0.505
Não Frequente	40 (22.6%)	137 (77.4%)	1.0		
Homem que faz sexo com homem					
Não	14 (19.2%)	59 (80.8%)	1.0		
Sim	20 (26.0%)	57 (74.0%)	1.479	0.682-3.206	0.322

A tabela 3 apresenta associação das variáveis ligadas a transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C. A variável, cirurgias durante a vida apresentou valor de p limítrofe na associação infecção pelo GBV-C.

Tabela 3. Análise univariada da associação das variáveis ligadas a transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Variável	GBVC +		GBVC –		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
Tratamento dentário nos últimos 12 meses							
Não	27	(25.2%)	80	(74.8%)	1.0		
Sim	31	(21.8%)	111	(78.2%)	0.827	0.458-1.494	0.530
Cirurgia nos últimos 12 meses							
Não	53	(24.1%)	167	(75.9%)	1.0		
Sim	05	(17.2%)	24	(82.8%)	0.656	0.239-1.806	0.415
Cirurgia na vida							
Não	20	(28.7%)	72	(71.3%)	1.0		
Sim	28	(19.3%)	117	(80.7%)	0.594	0.327-1.079	0.087
Transfusão nos últimos 12 meses							
Não	55	(23.6%)	178	(76.4%)	1.0		
Sim	03	(18.8%)	13	(81.2%)	0.747	0.205-2.717	0.658
Transfusão na vida							
Não	48	(24.9%)	145	(75.1%)	1.0		
Sim	10	(18.2%)	45	(81.8%)	0.671	0.314-1.434	0.303
Tatuagem							
Não	48	(22.3%)	167	(77.7%)	1.0		
Sim	10	(29.4%)	24	(70.6%)	1.45	0.648-3.241	0.366
Piercing							
Não	57	(24.4%)	177	(75.6%)	1.0		
Sim	01	(6.7%)	14	(93.3%)	0.222	0.285-1.724	0.150
Escova de dente compartilhada							
Não	45	(22.8%)	152	(77.2%)	1.0		
Sim	13	(25.0%)	39	(75.0%)	1.126	0.553-2.291	0.743
Alicate							
Não	21	(20.4%)	82	(79.6%)	1.0		
Sim	37	(25.3%)	109	(74.7%)	1.325	0.722-2.433	0.363
Drogas fumadas							
Não	46	(22.3%)	160	(77.7%)	1.0		
Sim	12	(27.9%)	31	(72.1%)	1.346	0.641-2.830	0.432
Drogas cheiradas							
Não	53	(22.2%)	186	(77.8%)	1.0		
Sim	05	(50.0%)	05	(50.0%)	3.509	0.979 -12.579	0.054

A tabela 4 apresenta o modelo final da análise multivariada da associação das variáveis sócio-demográficas e ligadas à transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C. Houve associação das variáveis, idade, possuir renda, uso de piercing e uso de drogas cheiradas, com a infecção pelo GBV-C após a análise multivariada.

Tabela 4. Análise multivariada da associação das variáveis sócio-demográficas e ligadas a transmissão parenteral com a infecção pelo GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Variável	GBVC + n %	GBVC – n %	Odds Ratio Ajustada	IC 95%	P
Possui renda					
Não	09 (37.5%)	15 (62.5%)	1.0		
Sim	35 (23.5%)	114 (76.5%)	0.420	0.160-1.103	0.078
Idade					
18-30	10 (34%)	19(66%)	1.0		
31-40	28 (29%)	69(71%)	0.771	0.319-1.863	0.564
41-50	15(18%)	69(82%)	0.413	0.160-1.066	0.067
> 50	5(13%)	34(87%)	0.279	0.083-0.938	0.039
Piercing					
Não	57(24.4%)	177(75.6%)	1.0		
Sim	01(6.7%)	14(93.3%)	0.072	0.008-0.664	0.020
Drogas cheiradas					
Não	53(22.2%)	186(77.8%)	1.0		
Sim	05(50.0%)	05(50.0%)	6.790	1.496-30.791	0.013

A tabela 5 mostra as contagens de linfócitos T CD4 nos casos e controles, em dois momentos de diagnóstico do HIV. Ressalta-se que após dois anos de diagnóstico do HIV, a contagem de linfócitos T CD4 foi significativamente maior no grupo que não tinha o GBV-C RNA.

Tabela 5. Comparação de mediana da contagem de linfócito T CD4 atual entre indivíduos GBV-C + e GBV-C - de acordo com o diagnóstico do HIV, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Variável	Mediana CD4(cels / μ l)		P
	GBV-C +	GBV-C -	
Até dois anos após o diagnóstico do HIV	529	394	0.74
Mais de dois anos após o diagnóstico do HIV	485	645	0.01

Discussão

Desde o momento do seu aparecimento no mundo científico, o GBV-C continua sendo conhecido como vírus de caráter indolente, não fazendo parte das triagens de bancos de sangue. Seria um vírus a procura de um nicho ecológico. É um vírus cosmopolita e com taxas de prevalência bastante divergente, variando de 1 a 5% nos doadores de sangue de países desenvolvidos e mais elevadas nas nações em desenvolvimento [6]. Contudo, trabalhos mais recentes já o colocam em contexto interativo com o HIV.

Discutiu-se nesse trabalho aspectos relacionados à prevalência do GBV-C em pessoas vivendo com HIV/aids. A taxa de 23,4% de prevalência encontrada na pesquisa assemelha-se com as reportadas [6, 16], que se situam entre 20% a 30% quando o vírus é adquirido por via sexual ou parenteral.

A pesquisa mostrou que houve associação entre a variável sócio-demográfico idade e a infecção pelo GBV C, que indicou uma associação inversa (a partir dos 30 anos), o que foi observado em outros estudos [7, 8, 17, 18]. A questão étnica em nosso estudo apontou associação entre a raça preta e a infecção pelo GBV-C, entretanto, há informações divergentes na literatura consultada, a qual aponta

associação da raça preta com a infecção pelo GBV-C [19] em um trabalho e a associação de brancos com a infecção pelo GBV-C em outro [9]. Anos de estudo e renda familiar apresentaram associação com o GBV- C (valor de p limítrofe), porém a relação com renda foi em sentido inverso. Devido à inexistência de trabalhos na literatura consultada que analisassem essas variáveis em população coinfectada pelo HIVGBV-C, as comparações dos nossos resultados foram realizadas, com doadores de sangue. Alguns trabalhos mostraram associação entre pessoas com maior escolaridade e infecção pelo GBV- C [7], enquanto outros mostraram associação inversa [8]. Não ficando clara a influência dos fatores socioeconômicos no risco de transmissão desse vírus.

Os resultados das variáveis ligadas ao uso de preservativos não foram condizentes com outros estudos, diferentemente do esperado, todavia não se dispõe de informações sobre o uso de preservativos na época da viragem virológica.

Também não houve associação estatisticamente significativa das variáveis homens que fazem sexo com homens e multiplicidade de parceiros, com a infecção pelo GBV-C, diferindo dos trabalhos que encontraram associação [20,21].

O presente estudo indicou associação entre as variáveis relacionadas à transmissão através da via parenteral e a infecção pelo GBV-C. A variável uso de drogas cheiradas apresentou forte associação com a infecção pelo GBV-C e devido à ausência de estudos que abordem a mesma na população GBV-C/HIV, a comparação foi realizada com trabalhos sobre infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) na população geral. Nesse trabalho brasileiro houve associação entre drogas cheiradas e a infecção pelo HBV [22]. Trabalhos em populações de hemofílicos e doadores de sangue também indicam associação entre via parenteral e infecção pelo GBV-C [16, 19, 23, 24].

Constatou-se nesta pesquisa que, em pessoas com diagnóstico do HIV após dois anos, houve aumento da contagem de linfócitos CD4 atual no grupo sem infecção pelo GBV-C, entretanto, em pessoas com diagnóstico do HIV há mais de dois anos, houve aumento da contagem de linfócitos CD4 atual no grupo com infecção pelo GBV-C, contrariando os achados de alguns autores [9,11, 23-25, 26], porém corroborando o que outros autores afirmaram [27,28].

Nosso estudo apresenta algumas vantagens e limitações. Tem a vantagem em somar à restrita literatura brasileira sobre esse tópico e abordar um espectro amplo de variáveis.

Limitações decorreram do tipo de estudo realizado (corte transversal), o qual não possibilita verificar a sequência temporal, limitando a interpretação dos nossos resultados. No entanto, trata-se de uma abordagem inicial do estudo do GBV-C em pessoas coinfectadas, o qual pode ser mais bem investigado através do acompanhamento das pessoas ao longo do tempo em um estudo de coorte.

Outra limitação consiste em que a positividade para o GBV-C RNA indica infecção atual, não fornecendo informações sobre o clearance do vírus. Assim algumas pessoas que estão sendo consideradas negativas para o GBV-C podem ter apresentado infecção anterior.

Em conclusão, o trabalho mostrou prevalência elevada do GBV-C em pessoas vivendo com HIV/aids. Não evidenciou associação entre o comportamento sexual e a infecção pelo GBV-C na população estudada, porém indicou associação entre a via de transmissão parenteral e a infecção pelo GBV-C na mesma população. Apontou a necessidade de realização de trabalhos de coorte para melhor compreensão de fatores implicados na transmissão do GBV-C, em pessoas vivendo

com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

Referências

1. Williams CF, Donna Klinzman BA, Yamashita ET, et al. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. *N Engl J Med* **2004**; 350: 981-90.
2. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, et al. Viruses within the *Flaviridae* Decrease CD4 Expression and Inhibiti HIV Replication in HumanCD4 Cells. *J Immunol* **2009**; 183: 7860-9.
3. George SL, Varmaz D, Tavis JE, Chowdhury A. The GB Virus C (GBV-C) NS3 Serine Protease Inhibits HIV-1 Replication in a CD4+ T Lymphocyte Cell Line without Decreasing HIV Receptor Expression. *Plos One* **2012**; 7: 1-9.
4. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt WN, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C(hepatitis G virus) RNA transcripts are infectiousin primary CD4-positive T cells. *J Virol* **2000**; 74: 9125-33.
5. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in Hepatitis G virus infection. *AIDS* **2003** ; 17 : 1457-62.
6. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepatitis* **2009**; 16: 757-68.
7. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CMR, et al. Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in São Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**; 21:438-43.
8. Levi JE, Contri DG, Lima LP, et al. High prevalence of GB vírus C/hepatitis G virus RNA among Braziliam blood donors. *Rev Inst Med Trop* **2003**; 45:75-8.

9. Giret MTM, Miraglia JL, Sucupira MCA, et al. Prevalence, Incidence Density, and Genotype Distribution of GB Virus C Infection in a Cohort of Recently HIV-1-Infected Subjects in Sao Paulo, Brazil. *Plos One* **2011**; 6: 1-9.
10. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito HH. 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**; 17: 209-13.
11. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor a. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIVinfected patients. *N Engl J Med* **2001**; 345: 715-24.
12. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB Virus Type C: a Beneficial Infection? *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 3915–19.
13. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, et al. No association between GB vírus C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS* **2002**; 16: 1929-33.
14. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV 2008. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/491.pdf>. Acessado em 22 de dezembro de 2012.
15. Alves-Sousa VK, Komninakis SCV, Baggio-Zappia GL et al. Short Communication Evaluation of GB Virus C/Hepatitis G Viral Load Among HIV Type 1-Coinfected Patients in São Paulo, Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses* **2012**; 28:1301-04.

- 16.Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* **1997**; 336: 747-54.
- 17.Li C, Collini P, Danso K, et al. GB virus C and HIV-1 RNA load in single virus and co-infected West African individuals. *AIDS* **2006**; 20:379–86.
- 18.Björkman P, Naucmér A, Winqvist N, Mushahwar I, Widell A. A case-control study of transmission routes for GB virus C/hepatitis G virus in Swedish blood donors lacking markers for hepatitis C virus infection. *Vox Sanguinis* **2001**; 81: 148–53.
- 19.Smith SM, Donio MJ, Singh M, et al. Prevalence of GB virus type C in urban Americans infected with human immunodeficiency virus type 1. *Retrovirology* **2005**; 2: 1-5.
- 20.Frey SE, Homan SM, Sokol-Anderson M, et al. Evidence for Probable Sexual Transmission of the Hepatitis G Virus. *Clin Infect Dis* **2002**; 34:1033–8.
- 21.Baral S, Burrell E, Scheibe A, Brown B, Beyrer C, Bekker LG. HIV Risk and Associations of HIV Infection among men who have sex with men in Peri-Urban Cape Town, South Africa. *BMC Public Health* **2011**, 11: 2-8.
- 22.Pereira LMMB, Martelli CMT, Merchán-Hamann E. et al. Population-Based Multicentric Survey of Hepatitis B Infection and Risk Factor Differences among Three Regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81; 240-7.
- 23.Linnen J, Wages Jr J, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* **1996**; 271: 505-8.

24. Yeo AET, Matsumoto A, Hisada M, et al. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia: Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med* **2000**; 132: 959-63.
25. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, et al. Slower Progression of HIV-1 Infection in Persons with GB Virus C Co-Infection Correlates with an Intact T-Helper 1 Cytokine Profile. *Ann Intern Med* **2003**; 139: 26-30.
26. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med* **2006**; 7: 173–80.
27. Björkman P, Flamholc L, Naucmér 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**; 18: 877–86.
28. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, et al. GB Virus C Coinfection and HIV-1 Disease Progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* **2005**; 191: 678–85.

6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

O trabalho mostrou uma prevalência elevada do GBV-C em pessoas vivendo com HIV/aids. Não evidenciou associação entre o comportamento sexual e a infecção pelo GBV-C na população estudada, porém indicou associação entre a via de transmissão parental e a infecção pelo GBV-C na mesma população. Apontou a necessidade de realização de trabalhos de coorte para melhor compreensão de fatores implicados na transmissão do GBV-C, em pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE.

REFERÊNCIAS

ALTER, H. J. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. **N Engl J Med**, v.334, p.1536-7, 1996.

ALVES-SOUSA, V. K. et al. Short Communication Evaluation of GB Virus C/Hepatitis G Viral Load Among HIV Type 1-Coinfected Patients in São Paulo, Brazil. **Aids Res Hum Retroviruses**, v. 28, p. 1301-04, 2012.

BERENGUER, M. et al. Hepatitis G Virus Infection in Patients With Hepatitis C Virus Infection Undergoing Liver Transplantation. **Gastroenterology**, v.111, p.1569–75, 1996.

BERZSENYI, M. D.; BOWDEN, D. S.; ROBERTS, S. R. GB virus C: Insights into co-infection. **J Clin Virol**, v. 33, p. 257–266, 2005.

BIRK, M. et al. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. **Aids**, v.16, n.18, p. 2482-85, 2002.

BJÖRKMAN, P. et al. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection:viremia at diagnosis does not predict mortality. **Aids**, v. 18, p. 877–886, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV 2008. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.129p.

BRUMME, Z. L. et al. No association between GB vírus C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. **Aids**, v.16, p. 1929-33, 2002.

DEINHARDT, F. et al. 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**, v.125, n.4, p.673-88, 1967.

GALLIAN, P. et al. High Prevalence of GB-C/Hepatitis G Virus in a Brazilian Population With Helminth Infection. **J Med Virol**, v.56, p.310–315, 1998.

GEORGE, S. L. et al. The GB Virus C (GBV-C) NS3 Serine Protease Inhibits HIV-1 Replication in a CD4+ T Lymphocyte Cell Line without Decreasing HIV Receptor Expression. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

HALASZ, R. et al. The GB virus C/hepatitis G virus replicates in hepatocytes without causing liver disease in healthy blood donors. **J Infect Dis**, v.182, p.1756-60, 2000.

HERINGLAKE, S. et al. GB virus C/ hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? **J Infect Dis**, v.177, p.1723-6, 1998.

LEARY, T. P. et al. The sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the *Flaviviridae* associated with human non-A-E hepatitis. **J Med Virol**, v.48, p.60–67, 1996.

LEFRÈRE, J. J. 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 Coinfected Persons. **J Infect Dis**, v.179, n.4, p.783–9, 1999.

LEVI, J. E. et al. High prevalence of GB vírus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. **Rev Inst Med Trop**, v. 45, n.2, p75-8, 2003.

LINNEN, J. et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. **Science**, v. 271, p.505-8, 1996.

LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**. v. 259, p. 946-51, 1993.

MOHR, E. L.; STAPLETON, J. T. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. **J. Viral Hepatitis**, v.16, p. 757-68, 2009.

MUERHOFF, A. S. et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the *Flaviviridae* associated with GB agent hepatitis. **J Virol**, v.69, n.9, p.5621-30, 1995.

NATTERMANN, J. et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in Hepatitis G virus infection. **AIDS**, v. 17, p. 1457-62, 2003.

NUNNARI, G. et al. Slower Progression of HIV-1 Infection in Persons with GB Virus C Co-Infection Correlates with an Intact T-Helper 1 Cytokine Profile. **Ann Intern Med**, v.139, p.26-30, 2003.

RIBEIRO-DOS-SANTOS G. 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**, v.21, n.6, p.438-43, 2002.

SABIN, C. A. et al. Effect of co-infection with hepatitis G virus on HIV disease progression in hemophilic men. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.19, p.546-7, 1999.

SIMMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. **J Gen Virol**, v. 82, p. 693–712, 2001.

SIMONS, J. N. et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. **Nat Med**, v.1, p.564-9.1995.

SIMONS, J. N. et al. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genomic organization. **J Virol**, v.70, n.61, p.26-35, 1996.

SPELLBERG, B.; EDWARDS JR, J. E. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. **Clin Infect Dis**, v.32, p.76–102, 2001.

STAPLETON, J. T. GB virus type C/ Hepatitis G virus. **Semin Liver Dis**, v.23, n.2, p.137-48, 2003.

STAPLETON, J. T. et al. GB Virus Type C: a Beneficial Infection? **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 3915–19, 2004.

SUPAPOL, W. B. et al. Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but not maternal GB virus C infection. **J Infect Dis**, v.197, p.1369 –77, 2008.

TILLMANN, H. L. et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. **Hepatology**, v.28, p. 379-84, 1998.

TILLMANN, H. L. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIVinfected patients. **N Engl J Med**, v.345, p.715-24, 2001.

VAN DER BIJ, A. K. et al. GB Virus C Coinfection and HIV-1 Disease Progression: The Amsterdam Cohort Study. **J Infect Dis**, v. 191, p.678–85, 2005.

WILLIAMS, C. F. et al. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV Infected Men. **N Engl J Med**, v.350, n.10, p.981-90, 2004.

XIANG, J. et al. FulllengthGB virus C (hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. **J Virol**, v.74, n.91, p.25-33, 2000.

XIANG, J. I. et al. Effect of coinfection with GB virus on survival among patients with HIV infection. **N Engl J Med**, v.345, n.10, p.707-14, 2001.

XIANG, J. I. et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta and SDF-1. **Lancet**, v.363, n.9426, p. 2040-6. 2004.

XIANG, J. I. et al. Viruses within the *Flaviridae* Decrease CD4 Expression and Inhibit HIV Replication in Human CD4 Cells. **J Immunol**, v.183, p. 7860-9. 2009.

YEO, A. E. T. et al. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia: Multicenter Hemophilia Cohort Study. **Ann Intern Med**, v.132, p.959-63, 2000.

Referências elaboradas de acordo com
as normas da ABNT (NBR 6023).

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Título da Pesquisa: Coinfecção GB vírus C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011

Você, paciente de código....., está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo **“Coinfecção GB vírus C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011”**, que será realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, recebendo do médico infectologista Evônio de Barros Campelo Júnior, responsável por sua execução, as seguintes informações que o faça entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a investigar a ocorrência de um vírus (micróbio), chamado GBV-C, em meu sangue, que possa estar ajudando no combate a minha doença;
- Que a importância deste estudo é a de obtenção de dados que confirmem a presença deste vírus em Pernambuco, para ajudar outras investigações que possam identificar possíveis melhoras no sistema de defesa de pacientes como eu, que também apresente este vírus e assim ajudar em novos conhecimentos no combate à doença que sou portador;
- Que os resultados que se deseja alcançar é conhecer a prevalência do vírus GBVC na população HIV positivo de Pernambuco;
- Que esse estudo iniciará em julho de 2011 e terminará em fevereiro de 2012.

Que será agendada uma consulta ao médico responsável por este Estudo, quando será tratada, além de minha rotina clínica, algumas perguntas a mais, devido a minha participação voluntária no estudo, como por exemplo, idade, de que maneira peguei o vírus do HIV, se faço sexo apenas com 01 parceiro, se uso drogas, quantos anos estudei, através de questionário, o qual ficará sob guarda do pesquisador responsável.

- Que a pesquisa será feita pela coleta do meu sangue e análise para verificação da carga de CD4 (célula imunológica importante para combater o microorganismo pelo qual sou portador), da quantidade de HIV, e para verificação da presença do vírus GBV-C, HBV e HCV. A coleta e análise será no laboratório de rotina clínica do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Que os riscos e desconfortos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: incômodo na coleta do sangue, que será minimizado pelo fato da ação ser efetuada por técnico bem treinado e experiente; constrangimento em todas as etapas do estudo pelo fato de ser soropositivo para o HIV, sendo minimizado pelo atendimento ocorrer em sala individualizada e, possibilidade de minha identificação, sendo minimizada pelo compromisso do responsável pelo estudo de manter sigilo sobre meus dados, garantindo-me o direito a privacidade e confidencialidade, sendo excluído meu nome dos formulários da pesquisa, substituído por códigos.
- Que os benefícios diretos que deverei esperar com a minha participação são: o diagnóstico negativo ou positivo da presença deste vírus que pode ajudar o meu sistema imunológico (sistema de defesa), o conhecimento da presença deste vírus na população HIV positiva de Pernambuco, o diagnóstico negativo ou positivo de hepatites B e C.
- Que, sempre que desejar será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão minha identificação, exceto ao responsável pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu deverei ser indenizado por qualquer despesa que venha a ter com a minha participação nesse estudo e, também, por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para essas despesas, foi-me garantida à existência de recursos.
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Endereço dos responsáveis pela pesquisa
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Medicina Topical
 – Hospital das Clínicas - UFPE
 A/C: Evônio de Barros Campelo Júnior(Médico Infectologista)
 Endereço: Avenida Profº Moraes Rego, s/n
 Bairro: Cidade Universitária
 Telefones p/contato: 81- 21263902.
 e-mail: **evoniojunior@ig.com.br**

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco:
 Avenida da Engenharia s/n, 1º andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600.Tel.: 2126 8588. E-mail do CEP: **cepccs@ufpe.br**

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo

_____ (Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) Rubricar as demais folhas). 1ªtestemunha:_____ 2ªtestemunha:_____ _____	_____ Evônio de Barros Campelo Júnior CRM – PE: 16398, responsável pelo estudo (Rubricar as demais páginas).
---	--

Recife, ____ de ____ de _____

APÊNDICE B

Questionário

Dados Individuais	
1. Data da entrevista 	2. Registro do paciente
3. Identificação do paciente na pesquisa 	4. Data de nascimento
5. Nome do paciente na pesquisa 	6. Sexo 1. Masculino 2. Feminino
Dados Sócio-Demográficos	
7. Qual a sua Raça/etnia? 01. Branca 02. Preta 03. Amarela 04. Parda 05. Indígena	8. Em que você trabalha ou trabalhou nos últimos 6 meses?
9. Qual é a espécie do curso mais elevado concluído por você? 01. Alfabetização de adultos 02. Antigo primário 03. Antigo ginásio 04. Antigo Clássico, Científico, ETC. 05. Ensino Fundamental ou 1º Grau	06. Ensino médio ou 2º Grau 07. Pré-vestibular 08. Superior – Graduação 09. Mestrado ou Doutorado 10. Não concluiu nenhum curso
10. Qual o seu rendimento em Reais no mês passado? 1- Tem 0- Não tem 8- Não sabe informar 9- Beneficiário do INSS	

Formas de Transmissão	
11. Você já iniciou sua vida sexual (transou)? 1. Sim ☐ 2. Não →Seguir para questão 30 8. Não informou →Seguir para questão 30	12. Quantos anos você tinha quando teve a primeira relação sexual?
13. Você ou o seu (sua) parceiro (a) tem o hábito de usar camisinha? 1. Sim, usa regularmente 2. Sim, usa às vezes ☐ 3. Não usa 8. Não informou 9. Não se aplica	14. Você já teve outro (a) parceiro (a) sexual além do seu parceiro atual? 1. Sim 2. Não ☐ 8. Não informou 9. Não se aplica
15. Quantos parceiros (as) sexuais você teve nos últimos 12 meses? 	16. Você já manteve relações sexuais com parceiro (a) sabidamente portador de Hepatite? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não informou 9. Não se aplica
17. Você já teve alguma doença venérea (sífilis, gonorréia)? 1. Sim 2. Não ☐ 8. Não informou 9. Não se aplica	18. Quantas vezes você teve relações sexuais (anais, vaginais ou orais) com alguém do sexo oposto nos últimos 6 meses? 1. 0 2. < 1 no mês 3. 1-3 no mês ☐ 4. 1 vez por semana 5. 2-3 vezes por semana 6. 4-6 vezes por semana 7. 1 vez ao dia 8. > 1 vez ao dia 9. Não se aplica
19. Quantos parceiros (as) do sexo oposto você teve relações sexuais (anais, vaginais ou orais) nos últimos 6 meses? 	20. Nos últimos 6 meses com que frequência você ou seus parceiros (as) do sexo oposto usou nas relações sexuais (anais, vaginais ou orais) preservativo (camisinha) masculino ou feminino? 1. 0 2. Ocasionalmente (< metade das relações) 3. Cerca de metade das vezes ☐ 4. Na maioria das vezes(> metade das vezes) 5. Sempre 9. Não se aplica

21. Você teve relações sexuais (anais, vaginais ou orais) em troca de dinheiro, drogas ou mercadorias com parceiros (as)-clientes do sexo oposto nos últimos 6 meses? 1. Sim 2. Não	22. Nos últimos 6 meses com que frequência você ou seus parceiros (as)-clientes do sexo oposto usou nas relações sexuais (anais ou vaginais) preservativo (camisinha) masculino ou feminino? 1. 0 2. Ocasionalmente (< metade das relações) 3. Cerca de metade das vezes 4. Na maioria das vezes(> metade das vezes) 5. Sempre 9. Não se aplica
23. Nos últimos 6 meses com que frequência você fez sexo oral? 1. 0 2. Ocasionalmente (< metade das relações) 3. Cerca de metade das vezes 4. Na maioria das vezes(> metade das vezes) 5. Sempre 9. Não se aplica	24. (Pergunta para o sexo masculino). Você já fez sexo anal ou oral com homem? 1. Sim 2. Não
25. Com quantos parceiros masculinos você teve relações sexuais (anais ou orais) nos últimos 6 meses?	26. Nas relações sexuais com outro homem com que frequência você usou preservativo (camisinha)? 1. 0 2. Ocasionalmente (< metade das relações) 3. Cerca de metade das vezes 4. Na maioria das vezes(> metade das vezes) 5. Sempre 9. Não se aplica
27. (Pergunta para o sexo feminino). Você já fez sexo com mulher? 1. Sim 2. Não	28. Com quantos parceiros do sexo feminino você teve relações sexuais últimos 6 meses?
29. Nas relações sexuais com outra mulher com que frequência você usou preservativo (camisinha)? 1. 0 2. Ocasionalmente (< metade das relações) 3. Cerca de metade das vezes 4. Na maioria das vezes(> metade das vezes) 5. Sempre 9. Não se aplica	30. Você já recebeu vacina contra hepatite B? 1. Sim 2. Não →Seguir para questão 32 8. Não sabe informar →Seguir para questão 32
31. Quantas doses de vacina contra hepatite B recebeu? 1. Uma dose 2. Duas doses 3. Três doses ou mais 8. Não sabe informar 9. Não se aplica	32. Você já fez tratamento dentário nos últimos 12 meses? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar

33. Você fez cirurgia nos últimos 12 meses? 1. Sim →Seguir para questão 35 ☐ 2. Não 8. Não sabe informar	34. Você fez cirurgia alguma vez na sua vida? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não sabe informar 9. Não se aplica
35. Você fez transfusão de sangue, derivados ou uso de imunoglobulina nos últimos 12 meses? 1. Sim →Seguir para questão 37 ☐ 2. Não 8. Não sabe informar	36. Você fez transfusão de sangue, derivados ou uso de imunoglobulina alguma vez na sua vida? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não sabe informar 9. Não se aplica
37. Você tem tatuagem? 1. Sim 2. Não ☐	38. Você tem ou teve piercing? 1. Sim 2. Não ☐
39. Você compartilha (ou) escova de dente com outras pessoas? 1. Sim 2. Não ☐	40. Compartilha (ou) objetos cortantes (tesoura, lâmina de barbear, navalha, alicate) com outras pessoas em casa ou em salões de beleza (manicure, pedicure, etc)? 1. Sim ☐ 2. Não
41. Você já fez uso de drogas fumadas? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não informou	42. Você já fez uso de drogas cheiradas? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não informou
43. Você já fez uso de drogas injetáveis? 1. Sim ☐ 2. Não 8. Não informou	44. Você já tomou injeção com seringa de vidro ou compartilhou seringa? 1. Sim ☐ 2. Não (Encerrar entrevista) 8. Não informou
45. Qual o motivo de ter tomado injeção com seringa de vidro ou ter compartilhado seringa? 1. Estimulante para prática de esportes 2. Vitaminas e/ou glicose em farmácia 3. Orientação médica 4. Outros (especificar: _____) 8. Não sabe informar 9. Não se aplica <input style="margin-left: auto; margin-right: 0;" type="checkbox"/>	

Resultado de Diagnósticos e Exames	
46. Qual a data do diagnóstico de HIV? / /	47. Você faz uso da HAART? 1. Sim 2. Não →Seguir para questão 49
48. Qual a data do início da HAART? / / →Seguir para questão 50	49. Você já fez uso da HAART anteriormente? 1. Sim 2. Não →Seguir para questão 52 3. Sim por até 6 meses 4. Sim de 6 meses até 1 ano 5. Sim de 1 ano até 2 anos 6. Irregularmente 9. Não se aplica →Seguir para questão 56
Quais os Medicamentos em uso? 50. IRTN 53. IF 51. IRTNN 54. II 52. IP 55. IE →Seguir para questão 49	Quais os Medicamentos fez uso? 56. IRTN 59. IF 57. IRTNN 60. II 58. IP 61. IE
62. Qual a quantidade do primeiro CD4? 63. Data: / /	64. Qual a quantidade do último CD4? 65. Data: / /
66. Qual o resultado da sorologia Anti-HBc total? 1. Positivo 2. Negativo 3. Indeterminado 4. Material danificado 5. Extravio 9. Não se aplica 67. Data: / /	68. Qual o resultado da sorologia HBsAg? 1. Positivo 2. Negativo 3. Indeterminado 4. Material danificado 5. Extravio 9. Não se aplica 69. Data: / /

APÊNDICE C
VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

MAJOR ARTICLE

**GBV-C co-infection and HIV in Patients followed in the Department
of Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE in 2011**

Evônio de Barros Campelo Júnior,^{1,3} Ana Maria Passos,² Viviane Martha Santos de Moraes,^{1,3} Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú,³ Edmundo Pessoa de Almeida Lopes,⁴ Celso Francisco Hernandez Granato,² Ricardo de Arraes Alencar Ximenes,¹ e Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,5}

¹Department of Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil; ²Laboratório of Clinical Virology, Federal University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil; ³Setor Virology Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife-PE Brazil; ⁴Departamento Clinical Medicine Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife-PE Brazil; ⁵Departamento of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Background. Although there is no connection between GBV-C and any disease, some authors have reported the slower progression in HIV disease in coinfecting Individuals. This study Aimed to estimate the prevalence of GBV-C infection, to identify the factors associated with co-infection and to analyze the association between CD4 count and GBV-C infection in people living with HIV/AIDS.

Methodology. We conducted a cross-sectional study, case-control analyzed the study in the presence of which GBV-C RNA was investigated in 249 people living with HIV/AIDS at the outpatient of Infectious Diseases and Parasitic in an University Hospital in 2011.

Results. The prevalence of GBV-C RNA in people living with HIV/AIDS was 23.4%

(58/249), with age of 41.2 ± 9.5 years. Having source of income, piercing and age were inversely associated with infection with GBV-C, while the inhaled drugs showed direct association. The group not infected with GBV-C showed higher counts of CD4 T lymphocytes in people over two years of diagnosis of HIV.

Conclusion. There was a high prevalence of GBV-C in people living with HIV/AIDS. The study on the association between showed sexual behavior and infection with GBV-C in this population, but it indicated an association between the parenteral route transmission and infection with GBV-C. It emphasizes the necessity of conducting cohort studies to better understand factors involved in the GBV-C transmission in people living with HIV/AIDS.

Introduction

The knowledge of the immunological mechanism of the interaction of HIV (Human Immunodeficiency Virus) and CD4 provided new line of research based on the action of correceptores CCR5 and CXCR4. Thus the association of the virus as GBV-C (GB virus C) and HIV, which make use of similar immune mechanisms, have been subject to analysis of several studies. However, understanding the role of HIV/GBV-C correceptores these can facilitate the understanding of the immunological dynamics of HIV infection [1-3]. Therefore, the search for immunological association between viruses, there were some studies that showed significant immunological aspects, such as GBV-C replication in CD4 T lymphocytes [4, 5] and that lymphocyte infection by GBV-C before the HIV, to inhibit HIV replication [1]. Thus is established the need for research that addresses the co-infection of these viruses initially through studies of prevalence and factors related to it in a particular region.

The prevalence of GBV C varies in different populations and regions of the world, with an inverse relationship between the prevalence and degree of development of the region. [6] In Brazil, the prevalence ranged from 5.1% reported in the general population of the city of São Paulo, to 9.75% in blood donors from Sao Paulo in research with GBV-C RNA [7-8]. The socio-demographic profile of individuals infected with GBV-C indicates greater prevalence in the black race, uniform distribution and variation in gender with education [8-10]. Risk factors of GBV-C and HIV are similar, since these viruses share the same transmission routes, sexual and parenteral [8-10]. Several studies attempted to demonstrate the association between the two viruses, however some studies had methodological differences, especially regarding the type of study and population, making it difficult to compare results. However, despite differences in methodology of research, there are also several studies indicating a direct association between CD4 count and infection with GBV-C, raising the hypothesis that GBV-C provides slower progression of HIV disease [10-13]. Therefore, admitting the importance of GBV-C in the pandemic HIV/AIDS, this study aimed to estimate the prevalence of this infection, identify the factors associated with co-infection and the association between CD4 count and infection with GBV-C, in people living with HIV/AIDS followed in the Service of Infectious and Parasitic HC-UFPE.

Methodology

Design and study population. We studied 249 people living with HIV/AIDS attended the Service of Infectious and Parasitic HC-UFPE. We conducted cross-sectional study evaluated as case-control. Cases were defined as individuals with

HIV/GBV-C RNA positive and controls only those HIV positive. People were considered positive for HIV serological criteria of the Ministry of Health [14]. Individuals were selected at the time of routine outpatient visit. Those who agreed to participate in the study and followed the inclusion criteria of age, signed a consent form and answered a standardized questionnaire, which was developed specifically for the research. The questionnaire included questions on sociodemographic characteristics, sexual behavior and factors related to transmission via blood. Blood samples were obtained at the time that people performed their routine examinations in the laboratory of HC-UFPE. They were then immediately forwarded to the Department of Virology Laboratory of Immunopathology Keizo Asami-(LIKA) UFPE, separated into plasma and serum and stored at -80 ° C.

Search of CD4. The CD4 count was held at the Municipal Laboratory of Recife, the second technique Flow Cytometry / FACSCalibur.

Research of HIV RNA. The HIV viral load was held at the Municipal Laboratory of Recife, the second technique branched DNA (b-DNA).

Search GBV-C RNA. The RNA was extracted from plasma using the extraction Axygen Miniprep kit according to manufacturer's instructions. The reaction of RT-real time PCR was performed in conjunction with AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) and according to reference 15. Using 5µL sample extracted, 0.4 µM forward primer, 0.4 µM reverse primer, 0.15 µM of the probe. The cycling was performed in a thermocycler ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using the following conditions: 1 cycle of 50 ° C for 10 minutes, 1 cycle of 95 ° C for 10 minutes, and 45 cycles of 95 ° C for 15 seconds and 60 ° C for 40 seconds.

Data analysis. All data were collected and reviewed by the researcher to then be entered via the software EPI-INFO version 6.04. The typing was performed using

double data entry, comparing the same using module "validate" and when necessary, appropriate corrections were made. The database was built using EPI-INFO version 6.04 and analysis was performed by STATA version 12.

Statistical analysis. The magnitude and statistical significance of the association between GBV-C and HIV infection were evaluated using the OR and confidence intervals and chi-square test or Fisher. Variables associated with GBV-C infection in the univariate analysis and showed a value of $P \leq 0.25$ were included in the initial multivariate analysis. Remained in the final multivariate model variables with $p < 0.10$.

Results

The prevalence of positive for GBV-C RNA in people living with HIV/AIDS was 23.4% (58/249). The mean age was 41.2 years (SD 9.5 years) years.

Table 1 shows the association between socio-demographic variables to GBV-C infection. Individuals who reported to belong to the black race were more likely to acquire infection with GBV-C, but the association was not statistically significant.

Schooling corresponding to more than 11 years and have income, showed p borderline in association with GBV-C.

The association between age and infection with GBV-C were inverse.

Table 1. Univariate analysis of the association between socio-demographic variables and GBV-C infection in people living with HIV / AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

Variável	GBVC + n %	GBVC – n %	Odds Ratio	IC 95%	P
Sex					
Female	23 (21.9%)	82 (78.1%)	1.0		
Male	35 (24.3%)	109 (75.7%)	1.145	0.629-2.084	0.658
Age					
18-30	10 (34%)	19(66%)	1.0		
31-40	28 (29%)	69(71%)	0.771	0.319-1.863	0.564
41-50	15(18%)	69(82%)	0.413	0.160-1.066	0.067
> 50	5(13%)	34(87%)	0.279	0.832-0.938	0.039
Race					
Parda	30 (20.8%)	114 (79.2%)	1.0		
Black	11 (30.6%)	25 (69.4%)	1.687	0.747-3.811	0.209
White	16 (26.7%)	44 (73.4%)	1.394	0.693-2.805	0.352
Yellow/Indigenous	01(12.5%)	07(87.5%)	0.548	0.065-4.624	0.580
Years of study					
< 4 anos	11 (19.6%)	45 (80.4%)	1.0		
5-7 anos	20 (25.3%)	59 (74.7%)	1.387	0.604-3.186	0.441
8-11anos	16 (19.0%)	68 (81.0%)	0.963	0.409-2.264	0.930
>11anos	11 (36.7%)	19 (63.3%)	2.368	0.877-6.393	0.089
Has income					
No	09 (37.5%)	15 (62.5%)	1.0		
Yes	35 (23.5%)	114 (76.5%)	0.420	0.160-1.103	0.078
Income					
≤ R\$ 1635,00	51 (23.2%)	169 (76.8%)	1.0		
> R\$ 1635,00	05(26.3%)	14 (73.7%)	1.183	0.407-3.444	0.757

Note. U \$ 1 = R \$ 1.80 in December 2011.

Table 2. Univariate analysis of the association of the variables related to sexually transmitted infection with GBV-C in people living with HIV / AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

Variable	GBVC +		GBVC –		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
First sexual intercourse							
< 18 anos	44	(23.8%)	141	(76.2%)	1.0		
≥ 18 anos	14	(21.9%)	50	(78.1%)	1.114	0.563-2.205	0.756
STD							
No	36	(23.2%)	119	(76.8%)	1.0		
Yes	22	(23.7%)	71	(76.8%)	1.024	0.559-1.878	0.938
Condom use in life							
Regularly	41	(26.8%)	112	(73.2%)	1.0		
Sometimes	06	(16.7%)	30	(83.3%)	0.546	0.212-1.408	0.211
No	04	(15.4%)	22	(84.6%)	0.497	0.161-1.528	0.222
Condom with heterosexual partners in the last 06 months							
Regularly	29	(25.2%)	86	(74.8%)	1.0		
Sometimes	06	(13.6%)	38	(86.4%)	0.468	0.180-1.221	0.121
Oftentimes	02	(33.3%)	04	(67.7%)	1.483	0.258-8.522	0.659
Partners in life							
0-2	01	(6.7%)	14	(93.3%)	1.0		
>2	57	(24.7%)	174	(75.3%)	4.586	0.590-35.650	0.145
Heterosexual partners in the last 06 months							
0-2	52	(22.9%)	175	(77.1%)	1.0		
>2	06	(28.6%)	15	(71.4%)	3.429	0.779-15.086	0.103
Oral sex							
Frequent	10	(27.8%)	26	(72.2%)	1.317	0.586-2.961	0.505
Not Frequent	40	(22.6%)	137	(77.4%)	1.0		
Man has sex with man							
No	14	(19.2%)	59	(80.8%)	1.0		
Yes	20	(26.0%)	57	(74.0%)	1.479	0.682-3.206	0.322

Table 3 shows the association of variables linked transmission parenteral infection with GBV-C. The variable surgeries during life had value p borderline association in GBV-C infection.

Table 3. Univariate analysis of the association of the variables related to parenteral transmission with GBV-C infection in people living with HIV / AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

Variable	GBVC +		GBVC –		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
Dental treatment in last 12 months							
No	27	(25.2%)	80	(74.8%)	1.0		
Yes	31	(21.8%)	111	(78.2%)	0.827	0.458-1.494	0.530
Surgery in last 12 months							
No	53	(24.1%)	167	(75.9%)	1.0		
Yes	05	(17.2%)	24	(82.8%)	0.656	0.239-1.806	0.415
Surgery in life							
No	20	(28.7%)	72	(71.3%)	1.0		
Yes	28	(19.3%)	117	(80.7%)	0.594	0.327-1.079	0.087
Transfusion in last 12 months							
No	55	(23.6%)	178	(76.4%)	1.0		
Yes	03	(18.8%)	13	(81.2%)	0.747	0.205-2.717	0.658
Transfusion in life							
No	48	(24.9%)	145	(75.1%)	1.0		
Yes	10	(18.2%)	45	(81.8%)	0.671	0.314-1.434	0.303
Tattoo							
No	48	(22.3%)	167	(77.7%)	1.0		
Yes	10	(29.4%)	24	(70.6%)	1.45	0.648-3.241	0.366
Piercing							
No	57	(24.4%)	177	(75.6%)	1.0		
Yes	01	(6.7%)	14	(93.3%)	0.072	0.008-0.664	0.020
Toothbrush shared							
No	45	(22.8%)	152	(77.2%)	1.0		
Yes	13	(25.0%)	39	(75.0%)	1.126	0.553-2.291	0.743
Pliers							
No	21	(20.4%)	82	(79.6%)	1.0		
Yes	37	(25.3%)	109	(74.7%)	1.325	0.722-2.433	0.363
Drugs smoked							
No	46	(22.3%)	160	(77.7%)	1.0		
Yes	12	(27.9%)	31	(72.1%)	1.346	0.641-2.830	0.432
Drugs smelled							
No	53	(22.2%)	186	(77.8%)	1.0		
Yes	05	(50.0%)	05	(50.0%)	6.790	1.496-30.791	0.013

Table 4 presents the final model of the multivariate analysis of the association between socio-demographic variables and linked to bloodborne infection with GBV-C. An association of age, possess income, piercing and drug use nosed, with GBV-C infection after multivariate analysis.

Table 4. Multivariate analysis of the association between socio-demographic variables and blood transmission linked with GBV-C infection in people living with HIV/AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

Variable	GBVC +		GBVC –		Odds Ratio	IC 95%	P
	n	%	n	%			
Has income							
No	09	(37.5%)	15	(62.5%)	1.0		
Yes	35	(23.5%)	114	(76.5%)	0.420	0.160-1.103	0.078
Age							
18-30	10	(34%)	19	(66%)	1.0		
31-40	28	(29%)	69	(71%)	0.771	0.319-1.863	0.564
41-50	15	(18%)	69	(82%)	0.413	0.160-1.066	0.067
> 50	5	(13%)	34	(87%)	0.279	0.083-0.938	0.039
Piercing							
No	57	(24.4%)	177	(75.6%)	1.0		
Yes	01	(6.7%)	14	(93.3%)	0.072	0.008-0.664	0.020
Drugs smelled							
No	53	(22.2%)	186	(77.8%)	1.0		
Yes	05	(50.0%)	05	(50.0%)	6.790	1.496-30.791	0.013

Table 5 shows the CD4 counts in cases and controls, in two stages of HIV diagnosis. It is noteworthy that after two years of diagnosis of HIV, CD4 T lymphocyte count was higher in the control group.

Table 5. Comparison of median CD4 T lymphocyte counts between individuals current GBV-C and GBV-C + - according to the diagnosis of HIV in people living with HIV/AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

Variable	Median CD4(cels / μ l)		P
	GBV-C +	GBV-C -	
≤ 2 years after diagnosis of HIV	529	394	0.74
> 2 years after diagnosis of HIV	485	645	0.01

Discussion

From the moment of its appearance in the scientific world, GBV-C virus is still known as indolent character, not part of the screening of blood banks. Would a virus in search of an ecological niche. It is a virus and cosmopolitan with prevalence rates quite divergent, ranging from 1 to 5% of blood donors in developed countries and higher in developing countries [6]. However, more recent work has put him in an interactive context with HIV.

We discuss aspects related to this work prevalence of GBV-C in people living with HIV/AIDS. The rate of 23.4% prevalence found in the search is similar to those reported [6, 16] that are between 20% and 30% when the virus is acquired by sexual or parenteral.

The research showed that there was an association between age and sociodemographic indicator GBV C infection, which indicated an inverse association (from 30 years), which was observed in other studies [7, 8, 17, 18]. The ethnic question in our study showed an association between black race and GBV-C infection, however, there is conflicting information in the literature, which shows association of black race with GBV-C infection [19] and membership in a labor white

with GBV-C infection (p not statistically significant) [9] in another. Years of education and household income were associated with GBV-C (p value borderline), but the income was in reverse. Due to lack of work in the literature, analyzing these variables in GBV-C/HIV population, comparisons of our results were performed only with blood donors. Some studies showed an association between people with higher education and GBV-C infection [7], while others showed an inverse association [8]. Not getting a clear influence of socioeconomic factors on the risk of transmission of this virus.

The results of the variables related to condom use was not consistent with other studies differently than expected, but no information is available about the use of condoms at the time of serological conversion.

There was also no statistically significant association of the variables men who have sex with men and multiple partners, infection with GBV-C, differing from studies that found an association [20, 21].

Our work indicated an association between the variables related to the transmission via the parenteral and GBV-C infection. The variable, drug smelled, was strongly associated with infection with GBV-C and due to a lack of studies addressing the same population GBV-C/HIV, comparison was made with work on infection with hepatitis B virus (HBV) in the general population. In this Brazilian study found no association between drugs and smelled HBV infection [22]. Studies in populations of hemophiliacs and blood donors also indicate an association between infection with parenteral and GBV-C [16, 19, 23, 24].

We found in our research that in people diagnosed with HIV after two years, an increase in CD4 count in the group without current infection with GBV-C, however, in people diagnosed with HIV for more than two years, there has been increased

current CD4 count in the group infected with GBV-C, contrary to the findings of other authors [9, 11, 23-25, 26], but corroborating what other authors reported [27, 28].

Our study has some advantages and limitations. It has the advantage of adding restricted to Brazilian literature on this topic and address a broad spectrum of variables.

Limitations on the type of study (cross), which does not allow checking the time sequence, limiting the interpretation of our results. However, this is an initial approach to the study of GBV-C in coinfecting individuals, which can be further investigated by tracking people over time in a cohort study.

Another limitation is that the positive for GBV-C RNA indicates current infection, providing no information about the clearance of the virus. So some people who are being considered negative for GBV-C infection may have presented before.

In conclusion, the study showed a high prevalence of GBV-C in people living with HIV/AIDS. Showed no association between sexual behavior and infection with GBV-C in this population, but indicated an association between the parenteral route of transmission and infection with GBV-C in the same population. He pointed to and need to perform cohort studies to better understand factors involved in transmission of GBV-C in people living with HIV/AIDS in the service accompanied Infectious and Parasitic Diseases of the HC-UFPE.

References

1. Williams CF, Donna Klinzman BA, Yamashita ET, et al. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. *N Engl J Med* **2004**; 350: 981-90.

2. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, et al. Viruses within the *Flaviridae* Decrease CD4 Expression and Inhibit HIV Replication in Human CD4 Cells. *J Immunol* **2009**; 183: 7860-9.
3. George SL, Varmaz D, Tavis JE, Chowdhury A. The GB Virus C (GBV-C) NS3 Serine Protease Inhibits HIV-1 Replication in a CD4+ T Lymphocyte Cell Line without Decreasing HIV Receptor Expression. *Plos One* **2012**; 7: 1-9.
4. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt WN, 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**; 74: 9125-33.
5. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, et al. Regulation of CXCR5 chemokine receptor 5 in Hepatitis G virus infection. *AIDS* **2003** ; 17 : 1457-62.
6. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepatitis* **2009**; 16: 757-68.
7. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CMR, et al. Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in São Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**; 21:438-43.
8. Levi JE, Contri DG, Lima LP, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop* **2003**; 45:75-8.
9. Giret MTM, Miraglia JL, Sucupira MCA, et al. Prevalence, Incidence Density, and Genotype Distribution of GB Virus C Infection in a Cohort of Recently HIV-1-Infected Subjects in Sao Paulo, Brazil. *Plos One* **2011**; 6: 1-9.
10. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito HH. 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**; 17: 209-13.

11. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor a. et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIVinfected patients. *N Engl J Med* **2001**; 345: 715-24.
12. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB Virus Type C: a Beneficial Infection? *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 3915–19.
13. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, et al. No association between GB vírus C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS* **2002**; 16: 1929-33.
14. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV 2008. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/491.pdf>. Acessado em 22 de dezembro de 2012.
15. Alves-Sousa VK, Komninakis SCV, Baggio-Zappia GL et al. Short Communication Evaluation of GB Virus C/Hepatitis G Viral Load Among HIV Type 1-Coinfected Patients in São Paulo, Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses* **2012**; 28:1301-04.
16. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* **1997**; 336: 747-54.
17. Li C, Collini P, Danso K, et al. GB virus C and HIV-1 RNA load in single virus and co-infected West African individuals. *AIDS* **2006**; 20:379–86.
18. Björkman P, Naucclér A, Winqvist N, Mushahwar I, Widell A. A case-control study of transmission routes for GB virus C/hepatitis G virus in Swedish blood donors lacking markers for hepatitis C virus infection. *Vox Sanguinis* **2001**; 81: 148–53.

19. Smith SM, Donio MJ, Singh M, et al. Prevalence of GB virus type C in urban Americans infected with human immunodeficiency virus type 1. *Retrovirology* **2005**; 2: 1-5.
20. Frey SE, Homan SM, Sokol-Anderson M, et al. Evidence for Probable Sexual Transmission of the Hepatitis G Virus. *Clin Infect Dis* **2002**; 34:1033–8.
21. Baral S, Burrell E, Scheibe A, Brown B, Beyrer C, Bekker LG. HIV Risk and Associations of HIV Infection among men who have sex with men in Peri-Urban Cape Town, South Africa. *BMC Public Health* **2011**, 11: 2-8.
22. Pereira LMMB, Martelli CMT, Merchán-Hamann E. et al. Population-Based Multicentric Survey of Hepatitis B Infection and Risk Factor Differences among Three Regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81; 240-7.
23. Linnen J, Wages Jr J, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* **1996**; 271: 505-8.
24. Yeo AET, Matsumoto A, Hisada M, et al. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia: Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med* **2000**; 132: 959-63.
25. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, et al. Slower Progression of HIV-1 Infection in Persons with GB Virus C Co-Infection Correlates with an Intact T-Helper 1 Cytokine Profile. *Ann Intern Med* **2003**; 139: 26-30.
26. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med* **2006**; 7: 173–80.

27. Björkman P, Flamholc L, Naucmér 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**; 18: 877–86.
28. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, et al. GB Virus C Coinfection and HIV-1 Disease Progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* **2005**; 191: 678–85.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 232/2011 - CEP/CCS

Recife, 02 de junho de 2011

Registro do SISNEP FR – 426529

CAAE – 0276.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 301/11

Título: Co-infecção GB vírus C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011.

Pesquisador Responsável: Evônio de Barros Campelo Júnior

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 01 de junho de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Dr. Evônio de Barros Campelo Júnior
Programa de Pós- Graduação em Medicina Tropical

ANEXO B

Normas para Publicação da revista



Manuscript Format

New for 2010 – Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright license to publish form online

Submission

Please read these instructions carefully and follow them closely to ensure that the review and publication of your paper is as efficient and quick as possible. The Editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. All material to be considered for publication in the *Journal of Infectious Diseases (JID)* should be submitted in electronic form via the journal's online submission system. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, instructions on how to submit your manuscript online can be found by clicking [here](#).

Language Editing Pre-Submission

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers, is available but optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please see http://www.oxfordjournals.org/for_authors/language_services.html. Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Your manuscript will be returned if you do not do the following:

1. Specify the type of article and adhere to the following limits:
 - Major Article: 3500 words, 50 references, 7 figures or tables in print, 3 figures or tables online
 - Brief Report: 2000 words, 15 references, 2 figures or tables in print, 3 figures or tables online
2. Include a cover letter with the following information:
 - A statement that the manuscript has not been submitted or accepted elsewhere
 - A statement that all authors fulfill the criteria given in the Authorship paragraph (see below)
 - A statement indicating whether any writing assistance other than copy editing was provided in the preparation of the manuscript
 - A list of 5 potential reviewers, with their e-mail addresses
3. All file names—for manuscript, cover letter, figures, tables—should contain no spaces between numbers or letters. File names may be run together (eg, authornamearticletitleversion1) or contain punctuation such as underscores, hyphens, or both (eg, author-name-article-title-version-1 or author_name_article_title_version_1).
4. Ensure that the references are appropriately formatted in JID style
5. Ensure that all text, including tables and references, is double spaced

6. Use a title of no more than 160 characters and spaces and a running title of no more than 40 characters and spaces

7. Include the word count of the abstract and of the text

8. Include a footnote page with the following items:

- A conflict of interest statement
- A funding statement
- Mention of any meeting(s) where the information has previously been presented
- Corresponding author contact information

9. Include 3–10 key words at the end of the abstract

10. Include, in the Methods section, a statement regarding informed consent and human and/or animal experimentation guidelines, when indicated

11. Include the registry number for a report of a clinical trial

12. Provide written permission for all personal communications

13. Provide accession numbers for nucleotide sequences

14. Use only approved human genetic nomenclature and notation (see the relevant subsections of the "Manuscript Preparation" section, below)

15. Submit newly identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to the appropriate database; include previously recognized or recently submitted SNP numbers

JID complies with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (for the complete text, see <http://www.icmje.org>), except that reference citations should appear in the text in square brackets (not parentheses). Text, tables, references, and legends must be double spaced. Italics should be used for genus and species names and for genes, but not for *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, *et al.*, or other Latin-derived expressions listed in Webster's Collegiate Dictionary; see a recent issue of *JID* for appropriate style.

All manuscripts—Major Articles, Brief Reports, Correspondence, Perspectives, Editorials, Reviews, and Supplement Articles—must have conflict of interest and funding statements (see the below sections for further details).

Major Articles describe original investigations that are an important advance in the field and that have been brought to an acceptable degree of completion. Major Articles must be no longer than 3500 words of text (from the beginning of the introduction to the end of the discussion; do not count the abstract or the references), and illustrations must be limited to the minimum necessary for clear and concise presentation. For Major Articles describing results of clinical trials (see "Clinical trials registration," below), the abstract must be structured with the headings *Background*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions* and must be no more than 200 words; for other Major Article manuscripts, the abstract may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined) in print, plus 3 online, and 50 references.

Brief Reports present complete studies that are narrower in scope than those described in Major Articles or that represent new developments. Manuscripts that are descriptive or primarily methodologic in nature, that report results of phase I and II vaccine trials (see "Clinical trials registration," below), or that describe *in vitro* chemotherapeutic studies should, in general, be submitted as Brief Reports. Brief Reports include an abstract (no more than 100 words) and are limited to no more than 2000 words of text, a total of 2 inserts (tables or figures) in print, plus 3 online, and 15 references.

Correspondence (letters) must be submitted in reference to a previous publication in *JID* (within the preceding 12 months); otherwise they will not be considered. Please prepare the letter in manuscript format, including a title page. The letter cannot exceed 750 words of text, 1 insert (table or figure), and 10 references.

Editorials are invited by the Editor and are overviews or critiques of articles appearing in *JID*.

Perspectives are brief (<1500 words, limit 2 inserts, 25 references) individual viewpoints on controversial topics in infectious diseases. Unsolicited perspectives are considered, and authors should contact the Editor in advance of submission to determine whether the topic is deemed appropriate.

Reviews that are research oriented will be considered. They should be no longer than 3500 words (from the beginning of the introduction to the end of the discussion) and have no more than 7 inserts (tables and figures combined) in print, 3 online, and 50 references. Authors should contact the Editor in advance of submission to determine whether a specific topic is deemed appropriate and timely.

Supplements

Supplements are published by *JID*. Requirements for supplement manuscripts follow those for *JID* manuscripts (e.g., cover letter, conflict of interest, and funding statements). Inquiries related to suitability of topic, program organization, and production should be made in writing to the Editor.

Cover Letter

All manuscripts submitted to *JID*, online or otherwise, must be accompanied by a letter declaring that the manuscript has not been submitted or accepted for publication elsewhere. This letter must warrant that all authors have seen and approved the content and have contributed significantly to the work. Authors should suggest five potential unbiased reviewers who are qualified to review their manuscript. A cover letter must also accompany a revised submission and must address, point by point, issues raised in the review process.

Related Manuscripts

If there appears to be significant overlap between a manuscript submitted to *JID* and another manuscript submitted (to *JID* or another journal) by the same authors or if there is an overlap between a manuscript submitted to *JID* and one published by *JID* or another journal, the editors will ask the corresponding author to respond to the question of overlap. On the basis of the response, the editors may choose to consider the manuscript further, ask for modification of the manuscript, or reject the manuscript; in the case of a rejected manuscript, the editors will provide the author(s) with a detailed explanation. The editors may also choose to take further action, which could include contacting the appropriate superior at the home institution and/or suspending publishing privileges in *JID* for a designated period of time. If it is found that the authors of an article published in *JID* had published an overlapping or identical manuscript in another journal, the editors will publish an announcement to that effect in *JID*.

Title Page

The title should be short, specific, and informative. The first name, initial(s), and surname of each author should be followed by his or her department, institution, city with postcode, and country. The fax, telephone number, and e-mail address of the corresponding author should also be provided. It is editorial policy to list only one author for correspondence. Any changes of address may be given next to the affiliations or acknowledgments. On the title page, please supply a running head of not more than 40 characters and spaces, a title of not more than 160 characters and spaces, the names and affiliations of all of the authors, and word counts of the abstract and the text. Each author's full name must be used. If there is potential confusion with respect to whether the first name presented is actually the last name of the author, please identify the last name.

Footnote Page

Footnotes must include (1) a statement that the authors either have or do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest (e.g., pharmaceutical stock ownership, consultancy, advisory board membership, relevant patents, or research funding); (2) a statement naming sources of financial support (including grant numbers); (3) the name, date (month and year), and location (city, state, and, if not USA, country) of a meeting at which all or part of the information has been presented (include an abstract number if possible); (4) the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the person to whom correspondence and requests for reprints should be addressed; and (5) current affiliations and addresses for authors whose affiliations have changed since completion of the study.

Abstract

The abstract for a Major Article describing results of a clinical trial must be no more than 200 words and must be structured with the headings *Background*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions*. The trial must be registered (see "Clinical trials registration"), and the abstract must include the registry's URL and the trial's registration number. Abstracts of other Major Articles may be structured (200-word limit) or unstructured (150-word limit). Abstracts of Brief Reports should be no more than 100 words. Whether structured or unstructured, the abstract must state the purpose of the research, the methods used, the results, and the conclusions. Do not cite references in the abstract. Include 3-10 key words, separate from the abstract. Authors are reminded that the abstract is of particular value to producers and users of online literature retrieval systems such as MEDLINE.

Text

The text of Major Articles must be no longer than 3500 words, and that of Brief Reports no longer than 2000 words. The Methods section must include a statement that informed consent was obtained from patients or their parents or guardians and that human experimentation guidelines of the United States

Department of Health and Human Services and/or those of the authors' institution(s) were followed in the conduct of clinical research, or that animal experimentation guidelines were followed in animal studies.

Products

For commercially obtained products mentioned in the text, list full names of manufacturers. Generic names of drugs and other chemical compounds should be used.

Abbreviations

Non-standard abbreviations should be defined at the first occurrence and introduced only where multiple use is made. Authors should not use abbreviations in headings. Abbreviations do not need to be defined, even at first mention, if they are the standard abbreviations within AMA 10th edition (see pages 502–525).

Statistical Analysis

The statistical analyses used should be identified both in the text and in all tables and figures where the results of statistical comparison are shown.

Units of Measure

All data should be expressed in metric units; use of SI units is encouraged. Use °C for temperature.

Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled "Funding." This should appear before the "Acknowledgment" section. The following rules should be followed:

- The sentence should begin: "This work was supported by ..."
- The full official funding agency name should be given, i.e., "the National Cancer Institute at the National Institutes of Health" or simply "National Institutes of Health" not "NCI" (one of the 27 subinstitutions) or "NCI at NIH." [Please go to this Web site for a full RIN-approved list of UK funding agencies.](#)
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: "[grant number ABX CDXXXXXX]"
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: "[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]"
- Agencies should be separated by a semicolon (plus "and" before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number "to [author initials]."

An example is given here: "This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789]."

Acknowledgments

Acknowledgments and details of non-financial support must be included at the end of the text before references and not in footnotes. Personal Acknowledgment should precede those of institutions or agencies. Please note that acknowledgment of funding bodies and declarations regarding conflict of interest should be given in separate "Funding" and "Conflict of Interests" sections, respectively.

Conflict of Interests

Further guidance on Conflict of Interests is available [here](#).

References

Full references should be provided in accordance with the style of *JID*.

EndNote and Reference Manager are software programs for publishing and managing references/bibliographies, which are available from Thomson Reuters. If you use EndNote or Reference Manager to facilitate referencing citations, this journal's style is available for use. The EndNote program and relevant information can be found here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Please follow the instructions on this page regarding purchasing, downloading, and using the software.

Major Articles are limited to 50 references, and Brief Reports are limited to 15 references. Only works that have been published or accepted for publication can be included in the reference list. Unpublished observations by the authors (authors' unpublished data), personal communications (J. L. Searle, personal communication), and manuscripts submitted for publication (H. Chapin and G. Miller, submitted) should be mentioned parenthetically in the text. Please note that all personal communication

must be confirmed in writing by the person mentioned. Please number references in order of appearance; those cited only or first in tables or figures are numbered according to the order in which the table or figure is cited in the text. Example: If table 2 is cited in the text after reference 25, a new reference cited in table 2 will be reference 26.

References must follow the National Library of Medicine format as used in [MEDLINE](#) and [Uniform Requirements](#). Provide all authors' (or editors') names when there are fewer than 7; for 7 or more, list the first 3 and add "et al." Titles of journals not listed in MEDLINE should be spelled out in full. Reference to a doctoral dissertation should include the author, title, institution, location, year, and publication information, if published. For online resources, include a URL and date accessed. Accuracy of references is the responsibility of the authors.

Examples of the proper format are as follows:

Journal Article

Uherova P, Connick E, MaWhinney S, Schlichtemeier R, Schooley RT, Kuritzkes DR. In vitro effect of interleukin-12 on antigen-specific lymphocyte proliferative responses from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **1996**; 174:483-9.

Book chapter

McIntosh K. Diagnostic virology. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, et al., eds. *Fields virology*. 2nd ed. Vol 1. New York: Raven Press, **1990**:411-40.

Conference program

Lyon DJ, Cheng AFB, Norrby SR. Mechanisms of cefotaxime resistance in blood culture isolates of *Enterobacter* high prevalence of extended-spectrum β -lactamases [abstract C43]. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: American Society for Microbiology, **1995**:47.

Internet site

Public Health Service Task Force. Recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1 infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States. Available at: <http://www.hivatis.org>. Accessed 24 April 2002.

For further information about medical references, see the [PubMed Link Help Page](#).

Tables

Major Articles are limited to a maximum of 7 inserts (tables and figures combined) in print and 3 online; Brief Reports are limited to a maximum of 2 inserts in print and 3 online. A single insert should not contain both tables and figures; possible exceptions are survival plots of time-to-event outcomes and pooled data in meta-analyses or other analyses that combine data from individual studies.

Data should not be repeated in both a table and a figure. Abbreviations and acronyms used in tables and figures must be explained in the table footnotes and figure legends, respectively, even if they were already defined in the text.

Tables should be numbered in the order of mention in the text. Tables should be typed double spaced throughout, with no vertical or internal rules. Footnotes and accompanying explanatory material should be kept to a minimum. Footnotes should be placed below the table and designated by superscript lowercase letters (listed in order of location when the table is read horizontally). Each column must have an appropriate heading describing the data in the column below, and units of measure must be clearly indicated. For further instructions on the preparation of tables in Word or WordPerfect, consult the [Guidelines for Tables](#).

Figures

and

Illustrations

Please be aware that the requirements for online submission and for reproduction in *JID* are different: (i) for online submission and peer review, please upload your figures either embedded in the word processing file or separately as low-resolution images (.jpg, .tif, .gif, or .eps); (ii) for reproduction in *JID*, you will be required after acceptance to supply high-resolution .tif files. Minimum resolutions are 300 d.p.i. for color or half-tone images, and 600 d.p.i. for line drawings. We advise that you create your high-resolution images first as these can be easily converted into low-resolution images for online submission.

Figures will not be relettered by the publisher. *JID* reserves the right to reduce the size of illustrative

material. Any photomicrographs, electron micrographs, or radiographs must be of high quality. Wherever possible, photographs should fit within the print area or within a column width. Photomicrographs should provide details of staining technique and a scale bar. Patients shown in photographs should have their identity concealed or should have given their written consent to publication.

When creating figures, please make sure any embedded text is large enough to read. Many figures contain miniscule characters such as numbers on a chart or graph. If these characters are not easily readable, they will most likely be illegible in the final version. Certain image formats such as .jpg and .gif do not have high resolutions, so you may elect to save your figures and insert them as .tif instead.

For useful information on preparing your figures for publication, go to <http://cpc.cadmus.com/da>.

Figures should be also numbered in the order of mention in the text. Please prepare your figures in accordance with the [Guidelines for Submission of Artwork](#).

Falsified data or images. Should it be determined that data or images in a manuscript have been deliberately falsified, the manuscript will be rejected and the corresponding authors' superior(s) will be notified.

Color Illustrations

Authors are required to pay the full cost of reproduction of color figures. For details see [Journal Charges](#).

PERMISSION TO REPRODUCE FIGURES AND EXTRACTS

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this includes applications and payments to DACS, ARS, and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the editors. It is also the author's responsibility to include Acknowledgment as stipulated by the particular institutions. Please note that obtaining copyright permission could take some time. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please see the Guidelines for Authors section at http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/rights_permissions.html. Should you require copies of this, please contact the editorial office of *JID* in question or the [Oxford Journals Rights department](#).

For a copyright prose work, it is recommended that permission is obtained for the use of extracts longer than 400 words; a series of extracts totaling more than 800 words, of which any one extract is more than 300 words; or an extract or series of extracts comprising one-quarter of the work or more.

Written permission must be obtained from all investigators cited in a personal communication who are not coauthors of the present manuscript and from the copyright owner if a previously published table or figure is to be reproduced. Additionally, authors should include a copy of "in press" references and articles by the same authors on the same subject that were submitted elsewhere. All letters of permission and references/articles should be mailed to the *JID* editorial office at 225 Friend Street, 7th Floor, Boston, MA 02114-1812.

JOURNAL COPYEDITING STYLE

Authors are referred to the *AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors* (10th ed., Oxford University Press, 2007) and the *Chicago Manual of Style* (15th ed., University of Chicago Press, 2003).

SUPPLEMENTARY DATA

Supporting material that is not essential for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher as online-only content, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but it should contain data that are additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures.

It is standard practice for appendices to be made available online-only as supplementary data. All text and figures must be provided in suitable electronic formats. All material to be considered as supplementary data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the manuscript has been accepted for publication, and it will not be edited. Please indicate clearly all material intended as supplementary data upon submission and name the files (e.g., "Supplementary Figure 1," "Supplementary Data," etc.). Also ensure that the supplementary data are referred to in the main manuscript where necessary, for example as "(see Supplementary data)" or "(see Supplementary Figure 1)."

ONLINE-ONLY SUPPLEMENTAL CONTENT

Designation of supplemental content as online only is reserved for content that cannot be printed because of space or technical limitations, such as large data sets that cannot easily be displayed in printed form. The editors reserve the right to limit the size and content of file submissions.

Content that has been published previously (print or online) is not appropriate for online-only posting and should instead be referenced in the manuscript text. Other reasons that are insufficient for designating content as online only are to avoid paying charges for color figures (\$500 for the first color page, \$400 for each subsequent page) or to circumvent journal limits for inserts (a maximum of 7 print and 3 online inserts for Major Articles and 2 print and 3 online for Brief Reports) by providing additional figures or tables and designating them as online only.

Any material that is intended for publication only online must be submitted for review, along with the manuscript, via the *JID* Editorial Manager system. Software required to view or use the material should be embedded in the file or easily accessible.

The editor will make the final decision whether to publish (i.e., post online) the online-only material with the article. Acceptance of the article for publication does not necessitate acceptance of the online-only material. Accepted online-only material will remain associated with the full article and will not be modified after publication.

COPYRIGHT AND LICENCE

It is a condition of publication for all Oxford Journals that authors either assign copyright or grant an exclusive license to Oxford University Press or the sponsoring Society. This ensures that all of the necessary rights needed for publication of the article are in place including provision for any requests from third parties to reproduce content from the journals are handled efficiently and consistently by OUP, enabling the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the license has been received in the system at Oxford Journals. Any queries about the license form should be sent as soon as possible to [Rights and Permissions](#) so that any issues can be resolved quickly and so any delay in publication is avoided.

As part of the terms of the license agreement, authors may use their own material in other publications written or edited by themselves provided that *JID* is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press as the publisher. As the author(s), copyright of the article remains yours (or your employer's if your employer claims copyright in your work). See [here](#) for full details of Oxford Journals' copyright policy and the rights retained by you/your institution under the terms of the license.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult [Rights and Permissions](#).

PROOFS

Authors are sent page proofs by email. These should be checked immediately and corrections, as well as answers to any queries, returned to the publishers as an annotated PDF via email or fax within 2 working days (further details are supplied with the proof). It is the author's responsibility to check proofs thoroughly.

OFFPRINTS

Authors will receive electronic access to their article free of charge. Printed offprints may be purchased in multiples of 50, using the Oxford Journals Author Services site

ADVANCE ACCESS

Advance Access articles are published online soon after they have been accepted for publication, in advance of their appearance in a printed journal. Articles posted for Advance Access have been copyedited and typeset and any corrections included. This is before they are paginated for inclusion in a specific issue of *JID*. Once an article appears in an issue, both versions of the article continue to be accessible and citable. Appearance in Advance Access constitutes official publication, and the Advance Access version can be cited by a unique [DOI \(Digital Object Identifier\)](#). When an article appears in an issue, it is removed from the Advance Access page.

OPEN ACCESS OPTION

Journal of Infectious Diseases authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

If you choose the open access option, you will be asked to complete an [open access charge form](#) online. Open access charges can be viewed [here](#) in detail; discounted rates are available for authors based in some developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries).

Open Access charges are in addition to any page charges and color charges that might apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.