



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

**EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR**

**ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MIP-1 $\alpha$ /SDF-1 E POLIMORFISMOS  
DA IL-4, IL-10 COM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS COINFECTADAS COM  
O HPgV**

Recife  
2018

**EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR**

**ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MIP-1 $\alpha$ /SDF-1 E POLIMORFISMOS DA IL-4, IL-10 COM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS COINFECTADAS COM O HPgV**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**Coorientador:** Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Recife

2018

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

C193a Campelo Júnior, Evônio de Barros.  
Associação das concentrações de MIP-1 $\alpha$ /SDF-1 e polimorfismos da IL-4, IL-10 com pessoas vivendo com HIV/AIDS coinfectadas com o HPgV / Evônio de Barros Campelo Júnior. – 2018.  
104 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV. 2. CCL5. 3. CXCL12. 4. HPgV. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883            CDD (23.ed.)            UFPE (CCS2018-246)

## **EVÔNIO DE BARROS CAMPELO JÚNIOR**

### **ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MIP-1 $\alpha$ /SDF-1 E POLIMORFISMOS DA IL-4, IL-10 COM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS COINFECTADAS COM O HPgV**

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

**Aprovado em:** 28/02/2018

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. LíbialCristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)  
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Viviane Martha Santos de Moraes (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho ao meu pai, Evônio de Barros Campelo (in memoriam) e a minha mãe Ataíde Menezes Campelo que, além de me ofertarem com a vida, amor e carinho, sempre foram exemplos de honestidade e perseverança.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela oportunidade de poder aprender um pouco mais.

À minha orientadora, Profa. Dra. 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, sugestões conferidas para a execução da pesquisa e parceria para toda vida.

À doutoranda Kláudia Emanuela Ramos Tenório, do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Prof. Dr. Sérgio Paiva e ao Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino (UFPE), pela possibilidade da realização da pesquisa do polimorfismo da IL-4 e IL-10, as quais foram realizadas no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva do Departamento de Genética da UFPE.

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

Aos funcionários do ambulatório de Doenças infecciosas e parasitárias do Hospital das Clínicas, em especial a Roque Almeida, Rosângela Maria Cavalcanti Silva e da residente Marcela Marinho de Andrade.

A todos do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA/UFPE) que contribuíram para a realização da pesquisa, Viviane Moraes, Juliana Gonçalves, Thaisa Lopes, Marcela Silva, Melayne Rocha, Dayvson Mauricio, Luan Araújo, grandes colaboradores.

A todos do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, em especial ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Ilma dos Santos, Vera Lúcia, Rafael Padilha, Jones Albuquerque, Luiz Carlos Alves, Karen Cavalcanti e serviço de vigilância

Aos meus familiares, pais, irmãos, filhos, Bella (minha adorada cadela) e ex-esposa, os quais corroboraram significativamente através do amor e da paciência, tão importantes nesse momento.

Ao Serviço Integrado de Saúde (SIS) pela grande ajuda através de práticas integrativas, como meditação e outras.

“Nada é suficientemente bom.  
Então vamos fazer o que é certo, dedicar o melhor de nossos esforços para atingir o  
inatingível, desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu, e nunca parar  
de aprender.”

*Ludwig van Beethoven*

## RESUMO

A coinfeção do pegivírus humano (HPgV) com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode levar a progressão mais lenta da doença causada pelo HIV. Estudos, *in vitro*, demonstraram que a diminuição da replicação do HIV estaria relacionada com redução dos níveis de expressão do CCR5 em decorrência do aumento de quimiocinas, como o MIP-1 $\alpha$  e o SDF-1, bem como da presença do polimorfismo da IL-4 e IL-10 e que, dessa forma, há progressão mais lenta na progressão da doença pelo HIV. Portanto, o objetivo da pesquisa foi verificar, *in vivo*, a associação dos polimorfismos do CCR5, IL-4, IL-10 e as concentrações de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1, com carga viral do HIV e contagem de TCD4 em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) coinfectadas com o HPgV. Para investigar o polimorfismo da CCR5/ $\Delta$ 32 o DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico seguindo o protocolo de *mini-salting out* e a genotipagem dos polimorfismos da IL-4 e IL-10 foram realizados através da qPCR utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) A quantificação do MIP- $\alpha$  e SDF-1 foi realizada por um imunoenensaio enzimático (ELISA) *in house*, utilizando anticorpos e enzima da eBioscience®, (Waltham, MA-USA). Para a análise estatística foi utilizado o *software* Rstudio versão 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A). As variáveis categóricas foram analisadas através do teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) ou pelo teste exato de Fisher, enquanto as variáveis contínuas foram analisadas utilizando o teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O teste de Hardy-Weinberg foi aplicado para verificar se a população estava em equilíbrio. Foram analisadas 98 amostras de pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) sendo 56,1% (55/98) do sexo feminino e a média de idade da população foi de 42 anos. Destas, 22 eram de HPgV-RNA *positivas* e 76 HPgV-RNA negativas. As médias das concentrações de MIP- $\alpha$  e SDF-1 foram elevadas em HPgV RNA positivos do que HPgV RNA negativos (396 vs 105 e 300 vs 117), corroborando os estudos, *in vitro*, o que representa efeito benéfico na progressão da doença. O polimorfismo dos genes mutantes da IL-4 apresentaram maior contagem de TCD4. Assim como o polimorfismo da IL-10 apresentou menor quantidade de carga viral do HIV.

**Palavras-chave:** HIV. CCL5. CXCL12. HPgV.

## ABSTRACT

Coinfection of human pegivirus (HPgV) with human immunodeficiency virus (HIV) may lead to slower progression of the disease caused by HIV. In vitro studies have shown that decreased HIV replication would be related to reduced CCR5 expression levels due to increased chemokines such as MIP-1 $\alpha$  and SDF-1, as well as the presence of IL-4, and IL-10, and that, therefore, there is a slower progression in HIV disease progression. Therefore, the aim of the study was to verify, in vivo, the association of CCR5, IL-4, IL-10 and polymorphisms of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1, with HIV viral load and TCD4 count in people living with HIV / AIDS (HPV) coinfecting with HPGV. To investigate CCR5 /  $\Delta$ 32 polymorphism, genomic DNA was extracted from leukocytes from peripheral blood following the mini-salting out protocol and genotyping of IL-4 and IL-10 polymorphisms were performed through qPCR using the TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) system. Quantification of MIP- $\alpha$  and SDF-1 was performed by an enzyme immunoassay (ELISA) in house, using antibodies and an enzyme from eBioscience® (Waltham, MA-USA). Statistical analysis was performed using the Rstudio software version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A). Categorical variables were analyzed using the chi-square test ( $X^2$ ) or by Fisher's exact test, while continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test. The Hardy-Weinberg test was applied to verify if the population was in equilibrium. A total of 98 samples of people living with HIV / AIDS (PLHA) were analyzed, being 56.1% (55/98) females and the mean age of the population was 42 years. Of these, 22 were HPgV-RNA positive and 76 HPgV-RNA negative. The mean concentrations of MIP- $\alpha$  and SDF-1 were high in HPgV RNA positive than HPGV RNA negative (396 vs 105 and 300 vs 117), corroborating the studies, in vitro, which represents a beneficial effect on disease progression. polymorphism of mutant IL-4 genes showed a higher TCD4 count. Just as the IL-10 polymorphism showed less HIV viral load.

**Keywords:** HIV. CCL5. CXCL12. HPgV.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Árvores filogenéticas de membros selecionados da família <i>Flaviviridae</i> .....	18
<b>Figura 2</b> - Comparação das sequências genômicas do HPgV e HCV.....	19
<b>Figura 3</b> - Prevalências do HPgV em doadores de sangue no mundo.....	20
<b>Figura 4</b> - Mecanismos postulados sobre a ação que o HPgV exerce nos pacientes coinfectados com HIV.....	24
<b>Figura 5</b> - Patogênese do HIV e resposta imunológica do hospedeiro.....	26
<b>Quadro 1</b> - Variáveis relacionadas ao estudo.....	33

### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> - Médias dos níveis séricos de MIP-1 $\alpha$ e SDF-1 em pessoas HPgV RNA negativos e positivos nos anos 2011 e 2015.	40
<b>Figura 2.</b> Níveis séricos de MIP-1 $\alpha$ e SDF-1 por indivíduos HPgV RNA negativos e positivos nos anos de 2011 e 2015.....	41
<b>Figura 3.</b> Média da contagem de TCD4 em indivíduos RNA HPgV negativos e positivos de 2011 a 2015.....	42

### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b> - Associação do polimorfismo da IL-4 com a contagem de TCD4 em HPgV RNA negativos e positivos em 2011.....	51
<b>Figura 2.</b> Associação da IL-10 com a carga viral do HIV em HPgV RNA negativos e positivos.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Frequência dos alelos e genótipos da IL-4 e IL-10 em HPgV RNA negativos e positivos.....	50
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIDS</b>	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> , síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Centros de Controle e Prevenção de Doenças
<b>CNS</b>	Conselho nacional de saúde
<b>DIP</b>	Ambulatório de doenças infecciosas e parasitárias
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>GBV-A</b>	GB vírus A
<b>GBV-B</b>	GB vírus B
<b>GBV-C</b>	GB vírus C
<b>GBV-D</b>	GB vírus D
<b>HC</b>	Hospital das clínicas
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis cvirus</i> , vírus da hepatite C
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> , vírus da imunodeficiência humana
<b>HPgV</b>	<i>Human Pegivirus</i> , Pegivirus humano
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LIKA</b>	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , Proteína inflamatória de macrófagos MIP-1 $\alpha$
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , Proteína inflamatória de macrófagos MIP-1 $\beta$
<b>NCR</b>	non-coding region, região não codificadora
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
<b>PVHA</b>	Pessoas vivendo com HIV/aids
<b>RANTES</b>	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, Quimiocina expressa e secretada por célula T normal e regulada por ativação
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
<b>SAME</b>	Serviço de arquivo médico e estatística

<b>SDF-1</b>	stromal cell-derived factor 1, Fator derivado do estroma-1
<b>SI</b>	Indutores de sincícios
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral
<b>TCD4</b>	Linfócitos T CD4
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	Histórico e características gerais do HPgV.....	17
2.2	Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HPgV e da coinfeção HIV/HPgV .....	19
2.3	Aspectos imunológicos e genéticos da coinfeção HIV/HPgV.....	23
2.3.1	Interleucina 4.....	27
2.3.2	Interleucina 10.....	28
2.3.4	MIP-1 $\alpha$ e SDF-1.....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
4.1	Desenho e população de estudo.....	32
4.2	Local do estudo.....	32
4.3	Critérios de inclusão.....	32
4.4	Critérios de exclusão.....	32
4.5	Definição das variáveis e coletas de dados.....	33
4.5.1	Variáveis relacionadas ao estudo.....	33
4.5.2	Coleta e processamento de dados.....	34
4.6	Dosagem do MIP- $\alpha$ (CCL-3) e SDF-1 $\alpha$ (CXCL-12).....	34
4.7	Extração de DNA.....	35
4.8	Genotipagem do IL-4 e IL-10.....	35
4.9	Análise estatística.....	35
4.10	Considerações éticas.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
5.1	Artigo 1 - <b>AUMENTO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE QUIMIOCINAS MIP-1<math>\alpha</math> E SDF-1 EM COINFECTADOS HIV/HPgV</b> .....	<b>37</b>
5.2	Artigo 2 - <b>ASPECTOS CLÍNICOS DO POLIMORFISMO DA IL-4 E IL-10 EM PVHA COINFECTADAS COM HPgV</b> .....	<b>47</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES DA TESE.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>Apêndice A- Formulário da pesquisa.....</b>	<b>68</b>
	<b>Apêndice B- Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>76</b>
	<b>Apêndice C- Artigo 1 em inglês.....</b>	<b>79</b>
	<b>Apêndice D- Artigo 2 em inglês.....</b>	<b>92</b>
	<b>Anexo A- Parecer do comitê de ética.....</b>	<b>103</b>
	<b>Anexo B- Normas das revistas.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos têm mostrado que o pegivírus humano (HPgV) (ICTV. 2016), podem estar associados com progressão mais lenta da infecção pelo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em pessoas coinfectadas. A interação entre os dois vírus decorreria em nível dos correceptores *CCR5* e *CXCR4* e seus ligantes naturais como MIP-1 $\alpha$  e o SDF-1 e, de citocinas *IL-4* e *IL-10*, as quais são alteradas pela presença do polimorfismo dos genes *IL-4* e *IL-10*. Dessa maneira alguns pesquisadores têm realizado estudos avaliando os níveis de concentrações do MIP-1 $\alpha$  e SDF-1, enquanto outros os polimorfismos dos genes *IL-4* e *IL-10*, (TILLMANN et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004; NAICKER et al., 2009; MAHAJAN et al., 2010; VAHIDNIA et al., 2012).

Schwarze-Zander et al., (2010), demonstraram associação do HPgV com a redução da expressão do correceptor CCR5 em pacientes coinfectados HIV/HPgV e, como consequência um prognóstico favorável na coinfeção, pois alterações dos níveis de expressão do CCR5 têm uma correlação direta com a progressão da doença.

Para Nattermann et., (2003) e Xiang et al., (2006), que fizeram estudos *in vitro* em indivíduos HIV/HPgV abordando concentrações das quimiocinas, a diminuição da replicação do HIV estaria relacionada com aumento da concentração MIP-1 $\alpha$  e o SDF-1, que são ligantes naturais dos correceptores, CCR5/CXR4.

Mahajan et al., 2010, mostraram que o alelo -589T no *IL-4*, pode diminuir a expressão do CCR5 e inibir a replicação viral do HIV e consequentemente promover prognóstico favorável em pacientes mono infectados com HIV. Em relação ao alelo-1082G no *IL-10*, outros estudos afirmaram que este polimorfismo seria responsável pela diminuição da ativação imune e inibição da replicação viral do HIV (NAICKER et al., 2009; MAHAJAN et al., 2010).

Algumas pesquisas, *in vivo*, com linfócitos T CD4 (TCD4), como marcadores de progressão da doença pelo HIV, relataram a associação entre a infecção pelo HPgV eo aumento da contagem de TCD4, o que representaria bom prognóstico para os pacientes coinfectados (HERINGLAKE et al., 1998; TILLMANN et al., 2001; ZHANG et al., 2006).

Todavia Bjorkman et al., (2004); Van Der Bij et al., (2005), também usando TCD4 como marcadores de progressão da doença pelo HIV, não demonstraram haver associação da coinfeção HIV/HPgV com prognóstico favorável da doença pelo HIV. Para esses pesquisadores o HPgV seria a consequência da elevação do TCD4 e não a causa.

Vahidnia et al., (2012), demonstraram associação inversa entre carga viral do HIV em pacientes coinfectados HIV/HPgV e mostraram que a presença da viremia do HPgV reduziria a mortalidade em pacientes coinfectados.

Dessa maneira, buscando ratificar através de informações *in vivo em momentos diferentes* que mostrem a associação dos polimorfismos do *IL-4*, *IL-10*, concentrações de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 com carga viral do HIV e contagem de T CD4, em pessoas vivendo com HIV/aids coinfectadas pelo HPgV, fomos motivados a realizar a presente pesquisa abordando esses fatores imunológicos e genéticos relacionados à coinfeção

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico e características gerais do HPgV

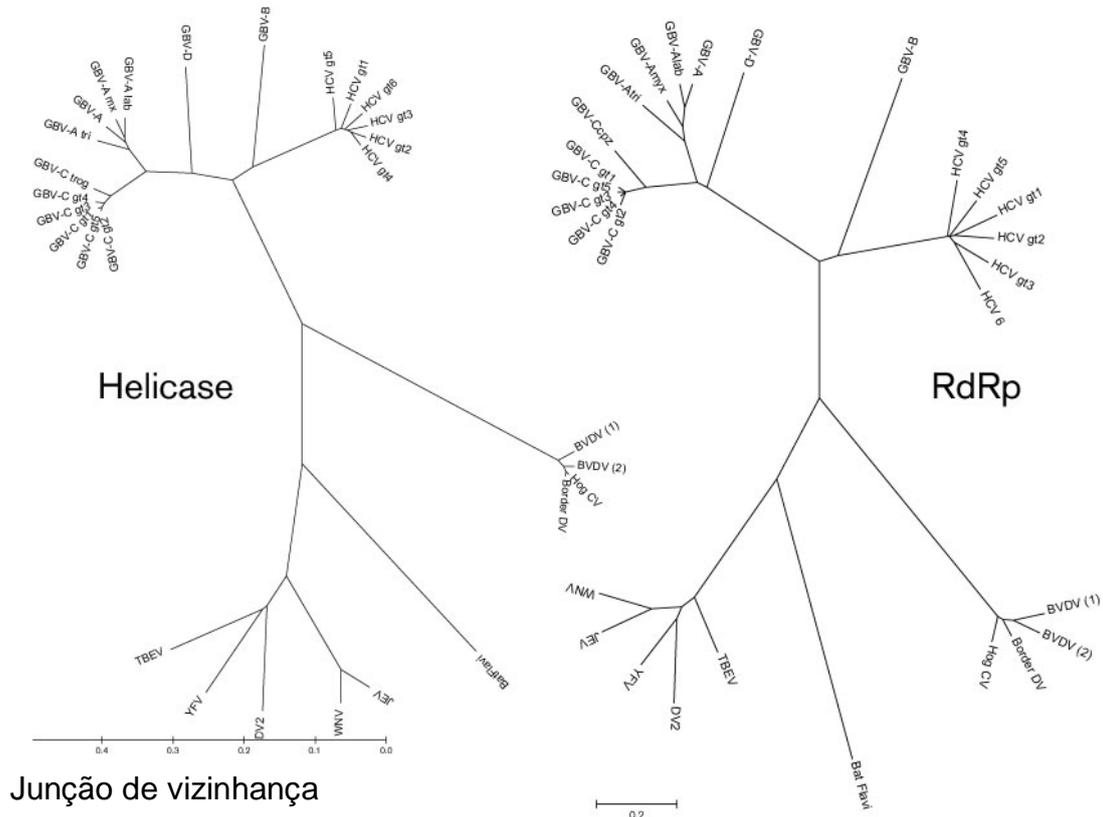
A identificação do HPgV, anteriormente conhecido como GB vírus C, iniciou-se com relatos de estudos experimentais sobre a transmissão de hepatites virais agudas de humanos para macacos, gênero *Saguinus* sp, advindo GB das iniciais de um médico cirurgião que estava em terceiro dia de icterícia e cedeu amostra sanguíneas, que foram inoculadas nos saguis causando icterícia, o que posteriormente possibilitou a classificação do vírus de hepatite não A, não B, em agente GB (DEINHARDT et al., 1967).

Todavia, somente em meados da década de 90, a partir de amostras séricas de macacos saguis, o HPgV foi identificado através de técnica de amplificação de ácido nucléico chamada RDA (*Representation Differential Amplification*) Lisitsyn et al., (1993) em dois diferentes tipos, classificado em GB vírus A (GBV-A) e GB vírus B (GBV-B) (SIMONS et al., 1996). Logo depois, o mesmo grupo isolou e denominou dessa vez em seres humanos, o GB vírus C (GBV-C).

Em 1996, Linnen et al., utilizando 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 *centro de controle e prevenção de doenças (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)* e o chamou de vírus C (GBV-C). Posteriormente a comparação de genomas demonstraria serem eles isolados do mesmo vírus e pertencendo à mesma família *Flaviviridae*, ainda que de grupos diferentes (MUERHOFF et al., 1995; LEARY et al., 1996).

Estudos utilizando análise filogenética e construindo árvores evolutivas (figura 1), além diferenças nas sequências do genoma, tipo de hospedeiro, tropismo celular e tecido, patogenicidade ou citopatologia, propriedades físicas e propriedades antigênicas propuseram uma nova classificação dos vários vírus GB, entre eles o GBV-A, GBV-B, HPgV e GBVD, (STAPLETON et al., 2011; SMITH et al., 2016).

**Figura 1.** Árvores filogenéticas de membros selecionados da família *Flaviviridae* mostrando a similaridade entre helicase e RNA Dependente Polimerase Dependente (RdRp). Uma escala de distância nas substituições de aminoácidos por posição é mostrada.



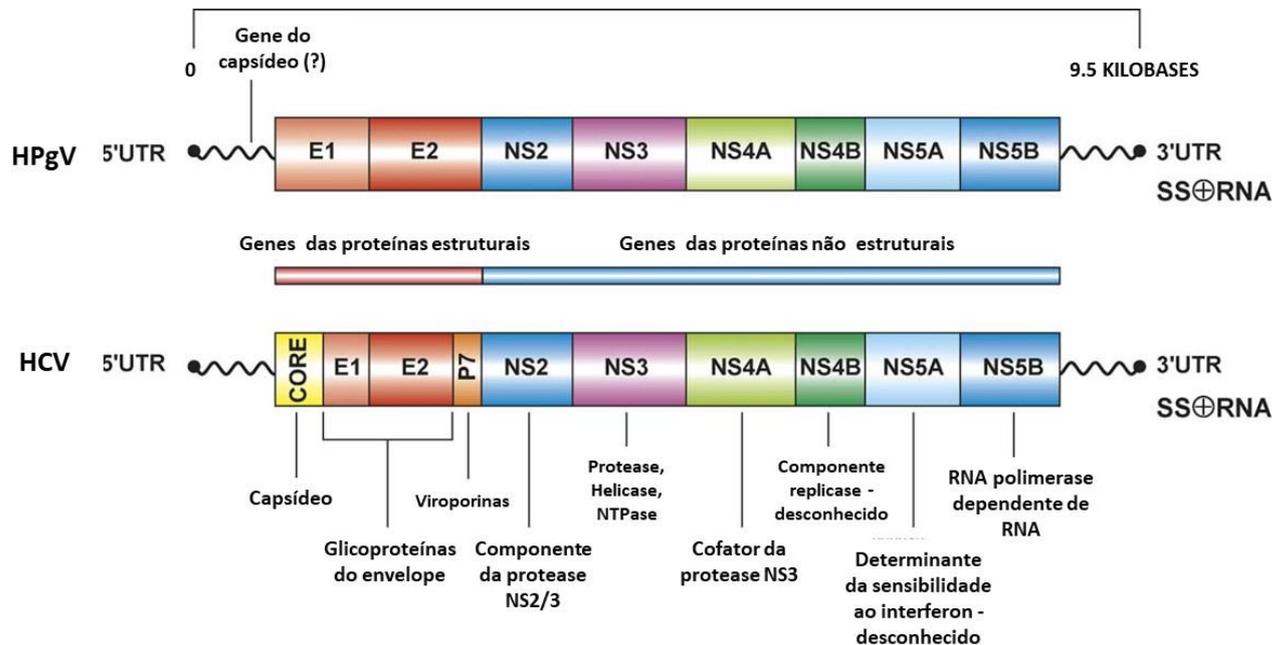
Fonte: Adaptado de Smith et al. (2016).

Dessa forma, dentro da família *Flaviviridae*, o GBV-B foi colocado como segunda espécie do gênero *Hepacivirus*, ao lado do vírus da hepatite C (HCV), já que mesmo apresenta caráter hepatotrópico e, portanto, seria o verdadeiro agente GB (THIEL et al., 2005). O GBV-B foi então renomeado para GBV, uma vez que não haverá outros vírus GB na nova classificação proposta. O GBV-A, HPGV e GBV-D ficaram em um novo gênero, *pegivirus*, sendo nomeados como SPgV, HPgV, BPgV respectivamente. Na nova nomenclatura o H representa humano, o P de vírus com infecção persistente, o g é agente GB e o V de vírus (STAPLETON et al., 2011; SMITH et al., 2016).

O HPgV apresenta 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. Possui uma região não

codificadora 5'(NCR) e apesar de sua estrutura genômica ser similar aovírus da hepatite C(HCV), o HPgV não apresenta proteínas do core viral e são conhecidos seis genótipos(SIMONS et al., 1996; BERZSENYI; BOWDEN; ROBERTS, 2005; STAPLETON et al., 2011; SMITH et al., 2016).O HPgV e o HCV possuem similaridade parcial de suas sequências genômicas, conforme figura 2.

**Figura 2.** Comparação das sequências genômicas do HPgV e HCV.



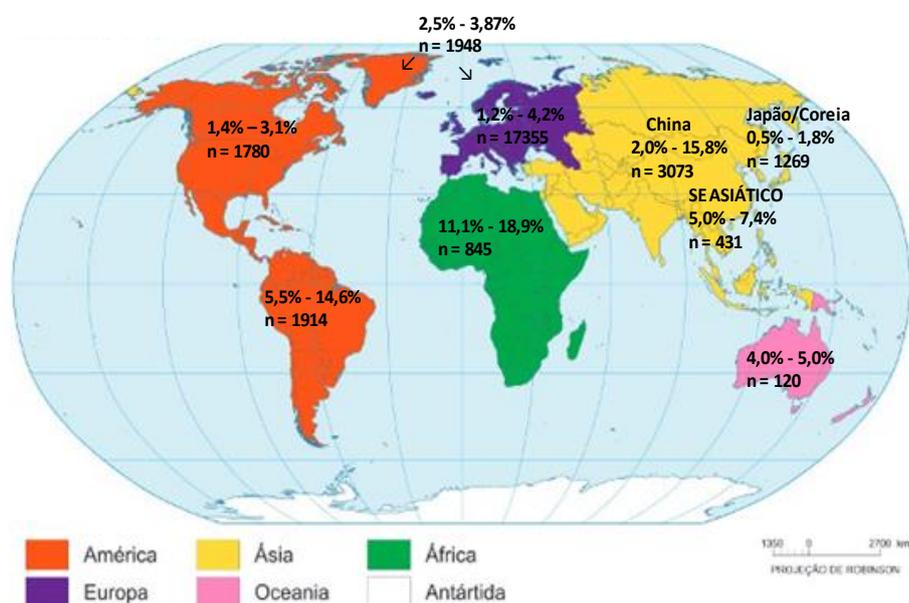
Fonte: Adaptado de Berzsenyi et al. (2005).

## 2.2 Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HPgV e da coinfeção HIV/HPgV

OHPgV é cosmopolita, apresentando distribuição mundial, com transmissão similar ao do HIV, podendo ser através da via sexual, parenteral e vertical.Em relação a via sexual, existe uma maior probabilidade de ocorre infecção pelo HPgV na relação homossexual entre homens quando comparada a relação heterossexual, mesmo que os heterossexuais sejam profissionais do sexo (BERZSENYI; BOWDEN; ROBERTS, 2005). Por outro lado, avia de transmissão parenteral representa a mais eficiente, com taxas de prevalências que divergem muito entre os diversos grupos, sendo mais baixas em doadores de sangue e mais elevadas nos usuários de drogas injetáveis(FEUCHT et al., 1997).

Na figura 3 encontram-se as prevalências do HPgV em doadores de sangue de diversos países mostrando uma relação inversamente proporcional entre o grau de desenvolvimento de uma região e sua prevalência.

**Figura 3.** Distribuição de prevalências do HPgV em doadores de sangue no mundo



Fonte: Adaptado de Mohr et al. 2009.

Há várias pesquisas relatando diferenças nas prevalências de HPgV em doadores de sangue no mundo. Ren et al., (1998) estudaram 279 doadores de sangue, remunerados pela doação, na China e detectaram prevalência de 4,3% (12/279) do HPgV-RNA. Mastouriet al., (2005) pesquisaram 912 doadores de sangue na Tunísia e obtiveram 4,9% (45/912) do anti-E2 para HPgV e 5,3% (32/600) do HPgV-RNA. Xiao et al., (2014) fizeram um estudo com 748 doadores de sangue voluntários na China e relataram uma prevalência de 0,13% (1/748) de HPgV-RNA, 11% (82/748) IgM e 10,6% (79/748) IgG para o HPgV. Apesar também investigou a coinfeção com o HAV, HBV, HCV, HEV, HIV, obtendo resultados negativos na sorologia e PCR.

Enquanto que no Brasil, Oliveira et al., (2002) realizaram uma pesquisa com 241 doadores de sangue em Goiânia e obtiveram uma prevalência de 7,1% para HPgV, 5,0% do anti-HBc e 0,8% anti-HCV.

Apesar das prevalências do HPgV em doadores de sangue, ainda não se tem relatos que este vírus seja um agente causador de doença. No entanto, alguns

estudos referem que ele exerce um papel benéfico ao paciente coinfectedo com HIV, levando a uma sobrevida maior e uma progressão mais lenta para a imunodeficiência, quando comparado 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; VAHIDNIA et al., 2012).

Quando se compara as taxas de prevalência do HPgV em doadores de sangue saudáveis, que variam entre 0,5%- 5% nos países desenvolvidos e 5-18,9% nas nações em desenvolvimento (MOHR; STAPLETON, 2009), com aquelas encontradas em pacientes HIV positivos, observa-se que são taxas elevadas, podendo chegar a aproximadamente 80% somando-se o teste molecular (HPgV-RNA) e a sorologia (anti-E<sub>2</sub>), dependendo da região e característica da população estudada, tendo a maior prevalência em homens que fazem sexo com homens (HSH) de regiões em desenvolvimento (HERINGLAKE et al., 1998; TILLMANN et al., 2001; VAN DER BIJ et al., 2005).

Heringlake et al. (1998), em um estudo prospectivo envolvendo 197 pacientes HIV positivos da Alemanha, observaram que os indivíduos com viremia pelo HPgV progrediam lentamente para aids e possuíam uma maior sobrevida, mesmo após a instalação da imunodeficiência. Foi encontrada também uma relação inversamente proporcional entre as cargas virais dos dois vírus e um aumento da carga viral de HPgV em todos os pacientes que tinham iniciado a terapia antirretroviral (TARV).

Lefrere et al. (1999), realizando uma coorte retrospectiva com 95 pacientes HIV positivos na França, mostraram prevalências de 24,2% do HPgV RNA e 25% do anti- E<sub>2</sub>. Além disso, Xiang et al. (2001), demonstram em cultura de células de medula óssea, que o HPgV inibe a replicação do HIV, o qual não apresentaria efeito citopático e não realizaria síntese de proteínas.

Um estudo de coorte multicêntrico nos Estados Unidos, com amostra de pacientes anterior ao uso de TARV combinada, fez associação entre carga viral do HPgV e sobrevida dos indivíduos HIV positivos. Constatou-se que a viremia estava associada com maior sobrevida em pacientes 5 a 6 anos após a soroconversão para o HIV e, que a negativação do HPgV RNA após este tempo, foi associada com pior prognóstico, porém não era sabido quanto tempo de infecção pelo HPgV os pacientes tinham antes de adquirirem o HIV. Além disso não houve modificação na sobrevida de pacientes entre 12 a 18 meses da soroconversão (WILLIAMS et al., 2004).

Na Tailândia, um estudo de coorte abordando transmissão vertical com 245 gestantes coinfectadas com o HPgV e HIV revelou a aquisição do HPgV em 41% dos recém-nascidos. Nesse estudo também foi constatado um aumento da transmissão vertical quando a mãe fez uso durante a gestação da zidovudina(AZT), uma vez que a droga não interfere na replicação do HPgV diferindo do que aconteceu com o HIV, o qual apresentou-se reduzido com o uso da droga (SUPAPOL et al., 2008).

No Brasil, Maidana-Giret et al., (2009) realizaram uma pesquisa com 48 pacientes virgens de tratamento e recém-diagnosticadas com o HIV, das quais 23 tinham HPgV- RNA. Esse estudo correlacionou a carga viral do HPgV com a contagem de T CD4 e demonstrou haver uma correlação inversa entre as cargas virais dos vírus. Os autores utilizaram como marcador de infecção ativa o CD38, e foi observado a possibilidade do HPgV interferir na ativação celular, uma vez que houve menor expressão de CD 38 em T CD4+ de coinfectados do que monoinfectados (grupo controle), ressaltando que ativação imune persistente é reconhecidamente um dos principais fatores para progressão da doença no paciente HIV (RYT-HANSEN et al., 2006; SUPAPOL et al., 2008).

Um estudo prospectivo com PVHA que receberam concentrado de hemácias revelou que, a aquisição do HPgV de forma acidental, trouxe benefícios aos mesmos, uma vez que a viremia do HPgV foi associada a uma tendência, embora não significativa, para progressão mais lenta, menos falhas virológicas ou mortes, entre indivíduos infectados pelo HIV, independentemente do uso de TARV(VAHIDNIA et al., 2012).

Entretanto, o efeito benéfico da coinfeção HIV/HPgV não foi evidenciado em outros estudos como na coorte sueca com 157 pacientes HIV-1 e tendo controlado fatores prognósticos como idade, sexo, ano de soroconversão, TARV e profilaxia para pneumonia por *Pneumociste jirovecii* (BIRK; LINDBÄCK; LIDMAN, 2002). Assim como na pesquisa de Brumme et al., (2002), com 441 pacientes canadenses, HIV-1 virgens de tratamento e que iniciariam sua primeira terapia antirretroviral.

Ademais, algumas pesquisas discutem se a presença do HPgV é uma consequência e não a causa, como o estudo de Bjorkman et al., (2004), que analisou prospectivamente 230 pacientes suecos HIV positivos, com diagnóstico de até dois anos. Os pacientes foram seguidos até o início da TARV, morte ou sua última visita

à clínica e concluiu que a viremia do HPgV seria um fenômeno secundário à progressão do HIV, ao invés de um fator prognóstico.

Van Der Bij et al., (2005), realizaram estudo de prospectivo com pacientes homossexuais masculinos infectados com HIV e propuseram que a viremia pelo HPgV estaria vinculada ao número de T CD4+ circulantes e que, a depuração do HPgV, seria consequência desta redução e não a causa.

### **2.3 Aspectos imunológicos e genéticos da coinfeção HIV/HPgV**

O aparecimento da aids no início da década de 1980, ocasionou pânico mundial, principalmente após o surgimento do teste sorológico para o HIV em 1985, pois dessa forma se começou a ter noção de quão enorme era a dispersão do vírus, surgindo a preocupação sobre a falência imunológica, progressão da síndrome e morte. Tudo isso seria ratificado em hospitais de várias nações, fazendo com que HIV fosse sinônimo de morte (DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2011).

Contudo houve expansão da aids alcançando características de pandemia e com o passar dos anos pesquisadores começaram a evidenciar que a progressão da doença não acometia todos pacientes por igual, tanto em relação aos aspectos imunológicos, como a contagem de TCD4 (BUCHBINDER et al., 1994). Quanto ao aspecto virológico alguns pacientes mantinham cargas virais abaixo do limite inferior de detecção de 50 cópias/mL (DEEKS; WALKER, 2007) e, no entanto, sabe-se que cerca de 1 em 300 pacientes mantém cargas virais abaixo do limite inferior espontaneamente, ou seja, estão em equilíbrio dinâmico com o vírus. E em relação aos aspectos clínicos, alguns pacientes apresentavam desenvolvimento favorável mesmo após décadas de acompanhamento depois de receber o diagnóstico (BUCHBINDER et al., 1994; DEEKS; WALKER, 2007).

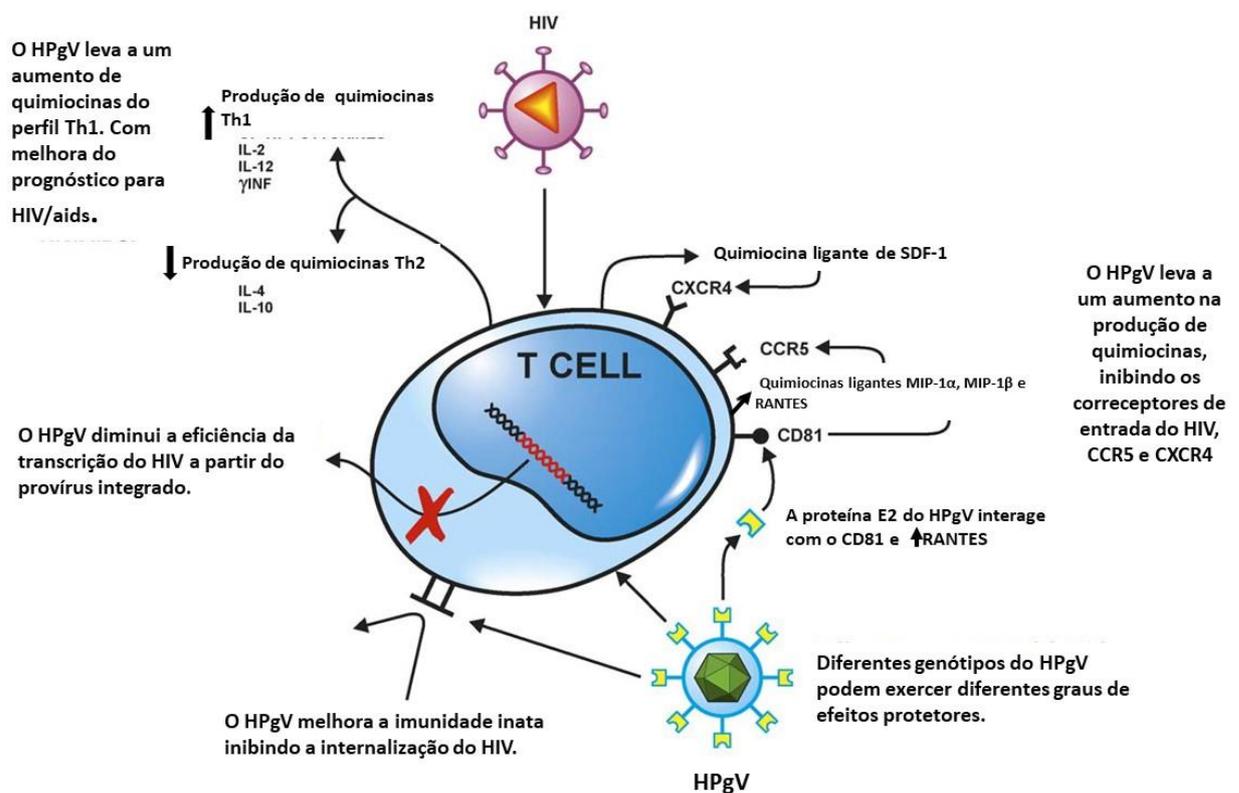
Nesse contexto, o HPgV vem ganhando destaque nas pesquisas com PVHA, devido vários estudos terem encontrado uma associação entre progressão mais lenta para a imunodeficiência e maior sobrevida com a coinfeção HIV/HPgV, quando comparados com indivíduos infectados apenas pelo HIV (LEFRÈRE et al., 1999; YEO et al., 2000; TILLMANN et al., 2001; XIANG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004; VAHIDNIA et al., 2012).

Muitos pesquisadores estão explicando a associação positiva entre os dois vírus através da interação do HIV e os correceptores CCR5 e CXCR4, receptores

para as cepas de HIV R5 e X4, respectivamente. Esses estudos envolvem análises de quimiocinas, citocinas e correceptores, correlacionado ou associando com cargas virais e TCD4 (TEBAS et al., 2014; SINGH; ARORA, 2015)

A figura4 abaixo esquematiza os múltiplos mecanismos postulados sobre a ação que o HPgV exerce nos pacientes coinfectados com HIV.

**Figura 4.** Mecanismos postulados sobre a ação que o HPgV exerce no pacientes coinfectados com HIV.



Fonte: Adaptado Barzsenyi et al. (2005).

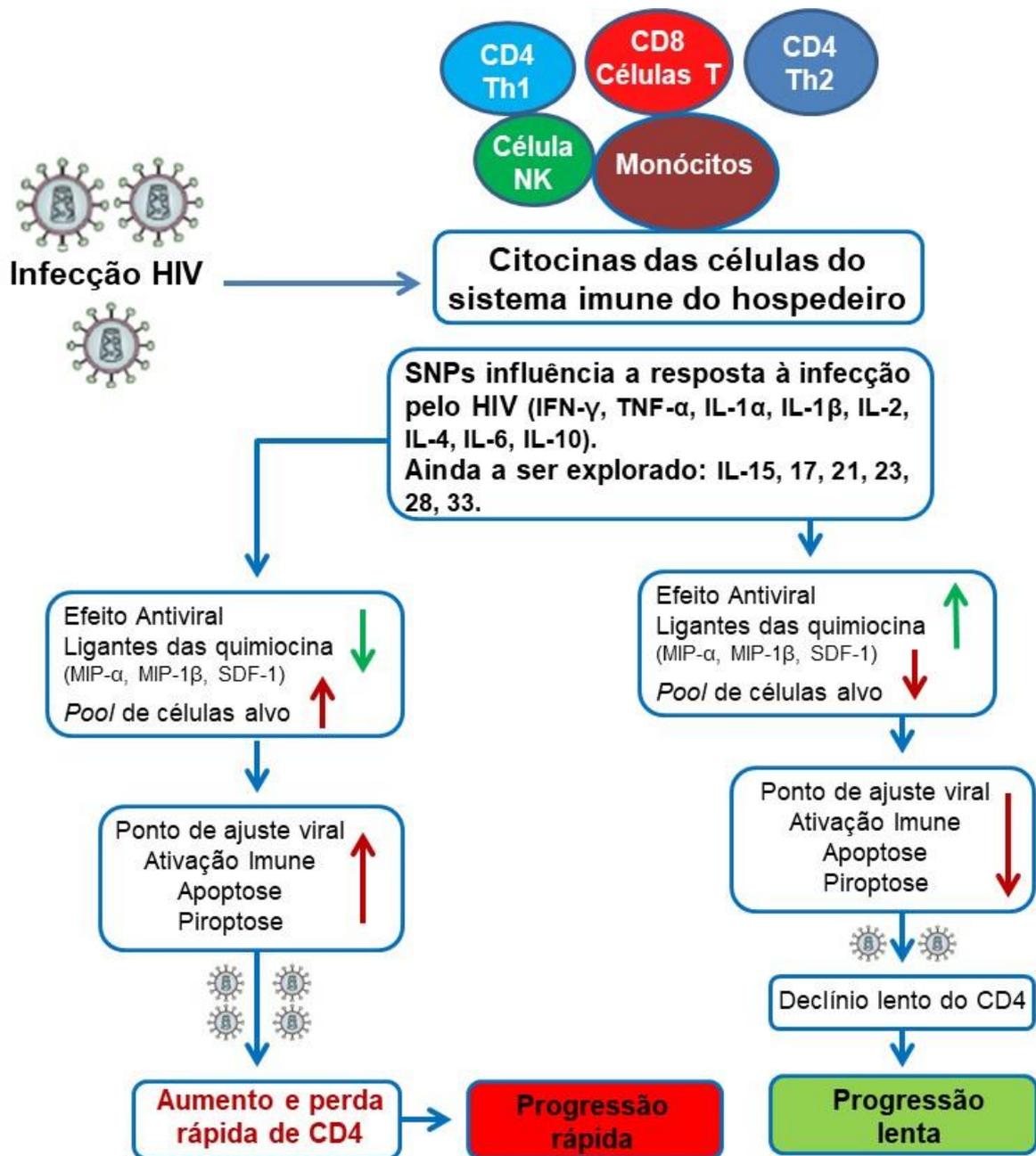
Por outro lado, a TARV diminuiu a morbidade e mortalidade da infecção pelo HIV, porém não conseguiu erradicar completamente o vírus do hospedeiro devido a diversos fatores, como a existência de reservatórios de vírus que ficam ocultos no hospedeiro. No entanto, existe uma considerável heterogeneidade entre os indivíduos em relação à susceptibilidade à infecção, a taxa de depleção de linfócitos T CD4 +e o desenvolvimento da aids. Além de outros fatores que desempenham um papel nesta heterogeneidade, a composição genética do hospedeiro parece ser a mais importante (SINGH; ARORA, 2015).

Pesquisas entre coortes únicas de PVHA resultaram na identificação de diversas variantes genéticas do hospedeiro, especialmente dos correceptores de quimiocinas e seus ligantes naturais, genes de resposta imune, complexo de histocompatibilidade e genes de citocinas (SAMSON et al., 1996; VANDERGEETEN; FROMENTIN; CHOMONT, 2012; TEBAS et al., 2014). Entre essas variedades genéticas, uma deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 continua sendo a mais bem aceita, no qual confere resistência à infecção pelo HIV-1 em indivíduos homozigotos (TEBAS et al., 2014).

As citocinas desempenham um papel central na regulação da resposta imune inata e adaptativa, portanto, também têm um impacto na patogênese das doenças infecciosas, incluindo a infecção pelo HIV. As variações genéticas interindividuais podem influenciar a regulação transcricional das citocinas, especialmente os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) na região promotora e na região exônica que conseguem afetar os níveis da expressão, levando a um desfecho alterado da infecção, afetando o estabelecimento, persistência e erradicação do HIV.

A presença do polimorfismo de determinadas citocinas promove aumento de ligantes naturais dos correceptores ( $MIP1\alpha$ ,  $MIP-1\beta$ ,  $SDF-1$ ), diminuição de correceptores em células alvo, atividade celular, apoptose e piroptose. Dessa maneira há declínio lento de CD4 e progressão lenta da doença pelo HIV. Já ausência do polimorfismo de determinadas citocinas promove redução de ligantes naturais dos correceptores ( $MIP1\alpha$ ,  $MIP-1\beta$ ,  $SDF-1$ ), aumento de: correceptores em células alvo, atividade celular, apoptose e piroptose. Dessa maneira há declínio rápido de CD4 e progressão rápida da doença pelo HIV (Figura 5).

**Figura 5.** Patogênese do HIV e resposta imunológica do hospedeiro



Fonte: Traduzido e adaptado de Sigh & Arora, 2015

As citocinas estão envolvidas no início da patogênese da infecção pelo HIV e durante a progressão da doença, com níveis alterados dependendo do estágio clínico (MIEDEMA et al., 2013). O monitoramento dos níveis das citocinas durante a progressão da doença pelo HIV pode ser crucial para o manejo da doença. Pesquisas têm demonstrado que variações nos genes das citocinas podem alterar a

significativamente a expressão da proteína e, portanto, alterariam a contagem de CD4, afetando assim a progressão da doença do HIV e a resposta à terapia (NAKAYAMA et al., 2002; WICHUKCHINDA et al., 2006).

### 2.3.1 Interleucina 4

A interleucina (IL-4) é uma citocina produzida por linfócitos T CD4+, mastócitos e basófilos ativados sendo a principal citocina responsável pela produção de anticorpos IgE e para a diferenciação de células Th2 a partir de células T auxiliares CD4+. A IL-4 desempenha papel fundamental na formação da resposta imune, incluindo a indução e expressão das células dendríticas diferenciadas *in vitro* DC-SIGN (RELLOSO et al., 2002). Na infecção pelo HIV, a IL-4 regula diferencialmente dois correceptores principais, o CXCR4 para vírus indutores de sincícios (SI) e CCR5 para variantes não indutoras de sincícios (NSI) (WANG et al., 1998).

Assim, a IL-4 reduz a regulação da expressão de CCR5 e, portanto, inibe a replicação de isolados de NSI do HIV-1 em células T e macrófagos humanos (WANG et al., 1998). Por outro lado, a IL-4 regula a expressão de CXCR4 levando à indução de variantes SI, principalmente observadas no estágio avançado da progressão da doença do HIV (VALENTIN et al., 1998). Além disso, a combinação desses efeitos da IL-4 na replicação do HIV-1 pode estar envolvida na mudança fenotípica de NSI para SI, bem como a progressão da doença na infecção pelo HIV-1 (VALENTIN et al., 1998). Em 2001, Spellberg et al. fizeram um estudo relatando a relevância da resposta celular T-helper no HIV e demonstraram que a progressão para aids está relacionada com incapacidade das células mononucleares em produzir citocinas do perfil TH1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) e promoverem a produção de citocinas da resposta TH2 (IL-4 e IL-10) (SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

Assim, a IL-4 desempenha um papel importante na evolução viral e na progressão da doença pelo HIV, devido a isso, diversos estudos têm avaliado a importância dos SNPs das citocinas para a infecção pelo HIV. No gene *IL-4*, os SNPs -589C/T, -33 e um no receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) foram associados com resultados diferenciais em indivíduos virgens de tratamento (NAKAYAMA et al., 2000; WICHUKCHINDA; NAKAYAMA, 2006).

Em 1998, Valentin et al. demonstraram *in vitro* que a IL-4 diminui a expressão de CCR5 e inibe a replicação de cepas R5 do HIV-1 (VALENTIN et al., 1998). Nakayama et al., (2002), estudaram 427 pacientes participantes de uma coorte francesa e mostraram um efeito protetor da IL-4 -589T, reduzindo a carga viral na infecção precoce e atrasando a progressão da doença do HIV, sugerindo que o efeito protetor deve-se, em parte, à redução da replicação do HIV e à dinâmica do HIV *in vivo*. Em 2006, foi realizada uma pesquisa do polimorfismo da IL-4 e RANTES com 246 pessoas, encontrando efeito protetor de IL4-589T e RANTES-28G. Ao contrário disso, um estudo com HSH mostrou um adiamento da aquisição do vírus X4 em portadores do alelo T e nenhuma associação com a progressão da doença do HIV (KWA et al., 2003). Outros também não encontraram associação do SNP -589T da IL-4 com progressão da doença (MODI et al., 2003; VASILESCU et al., 2003; SINGH et al., 2004).

É possível que diferentes resultados do polimorfismo do promotor da IL-4 e susceptibilidade ou progressão do HIV-1 possam ser devidos a interações de múltiplos genes e desequilíbrio de ligação dos SNPs da IL-4 que levam a efeitos cis e trans, podendo afetar a progressão da doença no HIV-1 em indivíduos infectados e tem efeitos variáveis dependendo da etnia.

### 2.3.2 Interleucina 10

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica sintetizada principalmente por monócitos, macrófagos, células Th-2 e linfócitos B, podendo estimular ou suprimir a resposta imune (MOORE et al., 2001). Dependendo da concentração de IL-10, foram observados efeitos inibitórios e indutivos na replicação *in vitro* do HIV (MAHAJAN et al., 2010). Os níveis de IL-10 foram elevados, particularmente nos gânglios linfáticos de indivíduos infectados pelo HIV, enquanto que a progressão para aids foi correlacionada com a variante-592A do promotor de IL-10 associada a uma diminuição da expressão de IL-10 (MAHAJAN et al., 2010).

Os níveis de produção de IL-10 são cruciais para a regulação imune e o controle do equilíbrio entre as respostas inflamatórias e humorais. A capacidade de produção da IL-10 em indivíduos está correlacionada com a composição genética encontrada no *locus* do IL-10, aproximadamente 75% da variação na capacidade de secreção de IL-10 em seres humanos são devidos a fatores genéticos e essas

diferenças genéticas contribuem para a susceptibilidade à doença (WESTENDORP et al., 1997)

Vários locais polimórficos dentro da região do promotor do gene *IL-10* foram descritos, incluindo o polimorfismo na posição -1082A/G(CHEONG et al., 2006). Foi demonstrado que os portadores do alelo G tiveram uma redução da mortalidade e diminuição da contagem de CD4 atenuada em indivíduos virgens de terapia (ERIKSTRUP et al., 2007), indicando um papel importante de polimorfismo do gene *IL-10* na progressão da doença do HIV. Portanto, há uma necessidade de estudar o efeito combinatório das variações em múltiplos genes que interagem para entender melhor o papel dos polimorfismos genéticos de citocinas na progressão da doença do HIV, bem como em outras doenças infecciosas.

### 2.3.3 MIP-1 $\alpha$ e SDF-1

As quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  são os ligantes naturais para o CCR5 e a ligação dessas promove a quimiotaxia e a ativação celular. Elas são capazes de inibir a replicação do HIV-R5 ao competir pela ligação do CCR5. Por outro lado, o SDF-1 é o único ligante conhecido para CXCR4, que provoca mobilização de cálcio, ativação da proteína G, geração de fosfato de inositol, fosforilação dos complexos de adesão, ativação de MAP quinases e do fator nuclear  $\beta$ , além inibir a replicação das cepas do HIV-X4 ao competir pela ligação do CXCR4(MAHAJAN et al., 2010; SINGH; ARORA, 2015).

O HIV usa qualquer um dos receptores de quimiocinas CCR5 e/ou CXCR4 para entrada em células TCD4+, assim, a sobrevivência mais longa em indivíduos HIV positivos está sendo associada às concentrações séricas elevadas dos ligantes para o CCR5 (RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ ) e para o CXCR4 (SDF-1). A infecção pelo HPgV em PBMC resulta em replicação reduzida de cepas de HIVque utilizam CCR5 ou CXCR4 como correceptor e,a inibição foi relacionada à quantidade de carga viral e ao tempo da infecção pelo HPgV(XIANG et al., 2001). Os autores verificaram que a expressão do mRNA para RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  e SDF-1 e a secreção de quimiocinas, em sobrenadantes de cultura, foram maiores em células infectadas com HPgV. Assim como, a expressão superficial do CCR5, *in vitro*, foi significativamente menor em células infectadas com HPgV, sugerindo que o vírus

induz quimiocinas inibidoras do HIV e reduz a expressão do correptor do HIV CCR5 (WILLIAMS et al., 2004).

Em outra pesquisa realizada com 150 mulheres com HIV coinfectadas com HPgV, foram encontrados níveis mais elevados de IL-7, IL-13, IL-12p70 e IFN $\gamma$  e níveis baixos de IL-4, IL-8, TGF- $\beta$ 1 e IP-10. Além disso, não houve a associação dos níveis de IL-2, IL-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  ou TNF $\alpha$  com o HPgV (BLACKARD et al., 2017). Os autores consideraram como limitação o tipo de estudo (transversal) e a TARV ser realizada com monoterapia ou terapia dupla terapia.

Portanto, resolvemos pesquisar o HPgV devido a sua relevância na progressão mais lenta da doença pelo HIV, principalmente no que se refere às quimiocinas, pois as mesmas podem promover benefício às pessoas coinfectadas, além de serem importantes no entendimento no mecanismo da coinfeção, uma vez que podem levar à inibição da replicação de cepas do HIV que utilizam os correceptores CCR5 e CXCR4 para a entrada do vírus na célula e que essa inibição é mediada pela produção dos respectivos ligantes naturais como o MIP-1 $\alpha$  e SDF-1.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Fazer a associação de pessoas vivendo com HIV/aids coinfectadas com HPgV, de 2011 a 2015, com as concentrações séricas do MIP-1 $\alpha$ , SDF-1, contagem de TCD4, carga viral do HIV e SNPs IL-4, IL-10.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Em HPgV RNA negativo e HPgV RNA positivo:

- ✓ Determinar e associar as concentrações séricas do MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 em 2011 e 2015;
- ✓ Verificar a associação do TCD4 e de 2011 a 2015;
- ✓ Estimar as frequências dos alelos e genótipos da IL-4 ( -589) e IL- 10 (-1082);
- ✓ Verificar a associação dos polimorfismos do IL-4 (-589) e IL-10 (-1082) com contagem do TCD4 e carga viral do HIV em 2011.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1. Desenho e população de estudo**

Foi realizado um estudo de coorte analisado em dois momentos (2011 e 2015), onde foram avaliadas pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) HPgV RNA negativos e positivos de 2011 e 2015 acompanhadas no ambulatório de doença infecciosa e parasitária do Hospital das Clínicas da UFPE, Recife. As amostras foram armazenadas no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFPE (processo: 20125113.0.0000.5208).

### **4.2. Local de estudo**

Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) considerado Unidade de Referência para o atendimento de PVHA, localizado na cidade de Recife – PE.

### **4.3 Critérios de inclusão**

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

### **4.4 Critérios de exclusão**

- Mulheres grávidas;
- Pacientes internados ou que fazem uso de drogas moduladoras das citocinas;
- Menores de 18 anos.

## 4.5. Definição das variáveis e coletas de dados

### 4.5.1. Variáveis relacionadas ao estudo

**Quadro 1. Variáveis relacionadas ao estudo**

Variável	Definição conceitual	Categorização
Pessoas infectadas com HIV/HPgV	Pessoas com sorologia positiva para o HIV e HPgV RNA positivo.	1-SIM 2-NÃO
Sexo	Sexo biológico do paciente. Variável nominal dicotômica.	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea. Variável quantitativa discreta.	1. 18 – 30 2. 31 – 40 3. 41-50 4. > 60
Raça	Referida pelos pacientes durante a entrevista, por qual raça se considera. Variável nominal.	1. Branca 2. Preta 3. Parda
Número de linfócitos T CD4+	Contagem do número de linfócitos CD4 circulantes no sangue. Expresso em células/ $\mu$ L. Variável quantitativa.	Número absoluto
Carga viral do HIV	Quantidade de RNA viral circulante no sangue, expresso em cópias/mL, Variável quantitativa.	Número absoluto
Alelo CCR5 ou $\Delta$ 32A	Presença do alelo CCR5 ou $\Delta$ 32A referente do gene <i>CCR5</i> . Variável nominal.	CCR5 = selvagem $\Delta$ 32 = mutante
Alelo -589	Presença do alelo C ou T referente à posição rs 2243250 na região promotora do gene <i>IL-4</i> . Variável nominal.	C = selvagem T = mutante
Alelo -1082	Presença do alelo A ou G referente à posição rs 1800896 na região promotora do gene <i>IL-10</i> . Variável nominal.	A = selvagem G = mutante
Genótipo do CCR5	Junção dos alelos CCR5 e/ou $\Delta$ 32 do gene. Variável categórica nominal.	CCR5/CCR5=homozigoto selvagem CCR5/ $\Delta$ 32 = heterozigoto $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32=homozigoto mutante
Genótipo do -589	Junção dos alelos C e/ou T do polimorfismo -589 da região promotora do gene <i>IL-4</i> . Variável categórica nominal.	C/C= homozigoto selvagem C/T = heterozigoto T/T = homozigoto mutante
Genótipo do -1082	Junção dos alelos A e/ou G do polimorfismo -1082 da região promotora do gene <i>IL-10</i> . Variável categórica nominal.	A/A= homozigoto selvagem A/G = heterozigoto G/G = homozigoto mutante
Concentração do MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória macrófágica 1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ). Quantificada no plasma do paciente. Expressa em pg / mL. Variável quantitativa	Numérico continua
Concentração do SDF-1	Fator derivado do estroma-1 (SDF-1). Quantificado no plasma do paciente Expresso em pg / mL. Variável quantitativa.	Numérico continua

#### 4.5.2 Coleta e processamento de dados

Cada paciente que aceitou participar da pesquisa assinou juntamente com duas testemunhas, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) utilizado na pesquisa de Campelo (2013) em duas vias de igual teor (sendo uma para o paciente e outra para o pesquisador). Após a assinatura do TCLE, os dados de cada paciente foram coletados por meio do formulário elaborado para a pesquisa, a fim de obter dados referentes às variáveis sócio demográficas. Os prontuários foram consultados no serviço de arquivo médico e estatística (SAME) do HC-UFPE para obtenção dos dados referentes à quantificação do CD4 e cargas virais do HIV, os quais foram realizados no serviço de referência do Estado. A detecção do RNA viral do HPgV foi realizada no Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

#### 4.6 Dosagem do MIP-1 $\alpha$ e SDF-1

Para as dosagens das quimiocinas MIP- $\alpha$  e SDF-1 $\alpha$  foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*. As microplacas do MIP- $\alpha$  foram sensibilizadas com anticorpo anti-MIP-1 $\alpha$  e incubadas *overnight* em geladeira e, no dia seguinte a placa foi lavada e bloqueada com BSA 1% para evitar ligações inespecíficas, em seguida foram adicionadas as amostras e incubadas *overnight* em geladeira. No dia seguinte as placas foram lavadas e adicionada a enzima estreptavidina-HRP em seguida o cromógeno foi adicionado para revelar a reação. Foram utilizados os anticorpos, enzima e cromógeno da eBioscience<sup>®</sup> (Waltham, MA-USA). Para o SDF-1 as placas foram sensibilizadas e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas, lavadas e as amostras incubadas novamente em temperatura ambiente, as demais etapas foram realizadas e seguiram o protocolo anterior. Foram utilizados os anticorpos, enzima e cromógeno R&D systems<sup>®</sup> (Minneapolis, MN-USA). Todas as amostras foram dosadas em duplicatas e as placas foram analisadas em espectrofotômetro de microplacas (Thermoplate<sup>®</sup>), no comprimento de onda de 450nm.

#### 4.7 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pela metodologia de *mini-salting* (MILLER et al., 1988) e a quantificação por espectrofotômetro (280nm/280nm).

#### 4.8 Genotipagem da IL-4 e IL-10

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico seguindo o protocolo de *mini-salting out* (Miller et al., 1988) e quantificado em espectrofotômetro (260nm/280nm) com posterior diluição para a concentração de 50 ng. Os polimorfismos da IL-4 C\_\_16176216\_10 (rs2243250) e IL-10 C\_\_1747360\_10 (rs1800896) foram identificados através da qPCR utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) e a solução de amplificação da qPCR, para ambos os polimorfismos, foi realizada utilizando 5 µL de TaqMan 2x, 0,5 µL de cada sonda, 3,5 µL de água livre de nucleasse ultrapura e 1 µL de DNA, com volume final de 10 µL. O perfil de temperatura utilizado na termociclagem foi de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A detecção da fluorescência foi determinada pelo 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software v1.3 (SDS, Applied Biosystems).

#### 4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R studio versão 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A), aplicando os testes de Qui-quadrado ( $X^2$ ), Wilcoxon, ANOVA e T para avaliar as associações dos polimorfismos e concentrações das quimiocinas. O teste de Hardy-Weinberg foi realizado para verificar se a população estava em equilíbrio.

#### **4.10 Considerações Éticas**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFPE sob número CAAE 20125113.0.0000.5208 (anexo A). O trabalho utilizou o TCLE (apêndice B), obedecendo às diretrizes da resolução nº 466/2012-IV do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Artigo 1

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

#### AUMENTO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE QUIMIOCINAS MIP-1 $\alpha$ E SDF-1 EM COINFECTADOS HIV/HPgV

### Introdução

Desde a descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vários estudos têm procurado identificar fatores associados à progressão mais lenta da infecção pelo HIV. Um desses fatores seria a coinfeção com o pegivírus humano (HPgV) e, portanto, a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nesta coinfeção como níveis séricos de quimiocinas têm sido objeto de estudo *in vitro* e *in vivo* [1–4,].

Estudos, *in vitro*, demonstraram que na coinfeção HIV/HPgV há diminuição da replicação do HIV, que estaria relacionada ao aumento das quimiocinas, MIP-1 $\alpha$  e SDF-1, que são ligantes naturais dos correceptores, CCR5 e CXCR4 respectivamente[5,6]. Além disso, essas quimiocinas promoveriam alterações dos níveis de expressão de seus correceptores, evitando a entrada do HIV na célula [7].

Por outro lado, estudos *in vivo* não encontraram associação dos níveis de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 com a coinfeção HIV/HPgV trazendo benefício para os coinfectados, muito provavelmente devido ao fato de que os pacientes envolvidos nos dois estudos estavam em uso de monoterapia e dupla terapia antirretroviral [8,9].

Portanto, o objetivo da pesquisa foi verificar, *in vivo*, o nível sérico de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 e sua associação com a infecção do HPgV em pessoas vivendo HIV/aids.

## **Material e métodos**

### **População e local do estudo**

Foi realizado um estudo de coorte analisado em dois momentos, a partir de amostras de pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e infectadas com o HPgV, acompanhadas no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFPE, Recife, Brasil. Foram consideradas como HPgV positivas, as pessoas com presença de HPgV RNA, pela PCR quantitativa (qPCR) realizada no Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e negativas aquelas PVHA sem a presença do HPgV RNA. Foram excluídos do estudo pacientes em uso de imunossupressores e, 95% dos pacientes faziam uso de terapia antirretroviral (HAART). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFPE (processo: 20125113.0.0000.5208) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Níveis séricos do MIP-1 $\alpha$ e SDF-1**

Os níveis séricos do MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 foram realizados por um imunoenensaio enzimático (ELISA) *in house*, utilizando anticorpos e enzima da eBioscience<sup>®</sup>, (Waltham, MA-USA).

### **Carga viral do HIV e contagem do TCD4**

A concentração plasmática do RNA do HIV foi determinada pela PCR quantitativa utilizando kit comercial (Abbott<sup>®</sup> RealTime HIV1) e a contagem de TCD4 foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo (Facscalibur<sup>®</sup>), ambas obtidas a partir dos prontuários.

### **Análise estatística**

Para verificar associação das variáveis categóricas, sexo e raça, com a presença do HPgV RNA foi utilizado o teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) e a ANOVA a mediana da contagem de TCD4. As médias de variáveis contínuas MIP-1 $\alpha$  e SDF-1

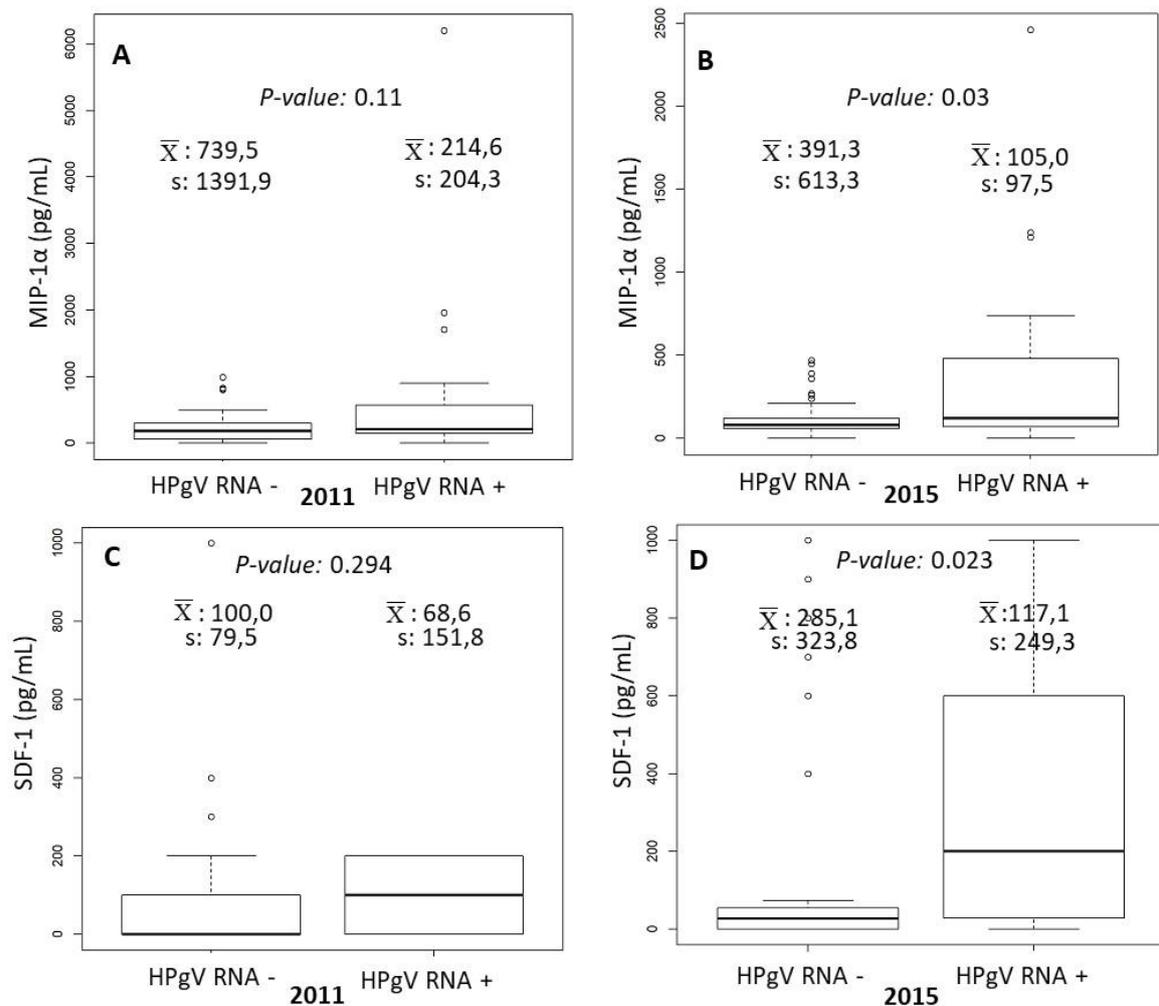
normalmente distribuídas foram comparadas em todo o status de infecção HPgV usando um teste t. As médias das variáveis contínuas que não estavam normalmente distribuídas foram comparadas pelo teste Wilcoxon®. Todos os valores p foram bicaudais. Embora apenas p-valores < 0,5 foram considerados estatisticamente significativos, outros p-valores foram fornecidos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A).

## Resultados

Foram analisadas 98 pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) sendo 76 HPgV-RNA negativas e 22 pessoas HPgV-RNA positivas. Foi encontrada nos HPgV-RNA positivos uma prevalência 72,7% (16/22) no sexo feminino e 35,5% (27/76) nos HPgV-RNA negativos (p=0,004).

A figura 1 mostra a comparação das médias dos níveis séricos de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 em pessoas HPgV RNA negativos e positivos nos anos 2011 e 2015. No ano de 2015, a média dos níveis séricos de MIP-1 $\alpha$  e SDF foram estatisticamente significante em HPgV RNA positivos, quando comparada com HPgV RNA negativos.

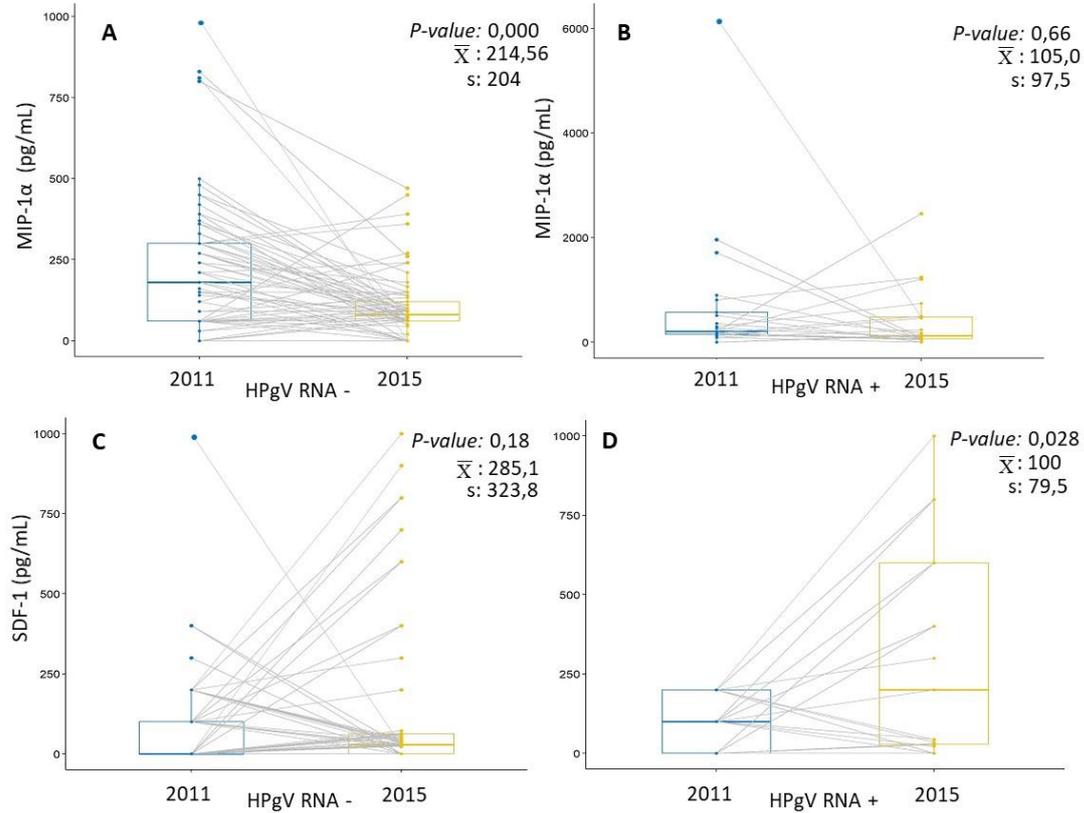
**Fig 1.** Médias dos níveis séricos de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 em pessoas HPgV RNA negativos e positivos nos anos



A e B: Concentração de MIP-1 $\alpha$ . C e D: Concentração de SDF-1. Valor de  $p$  obtido pelo teste T;  $\bar{X}$ : Média; s: Desvio Padrão.

Na fig 2 encontram-se as concentrações por pessoas/ano de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 em pacientes HPgV RNA negativos e positivos nos anos 2011 e 2015. O MIP-1 $\alpha$  apresentou redução das médias de concentrações em mono infectados, no ano de 2011 em relação ao ano de 2015. Para o SDF-1, houve aumento das médias de concentrações em co infectados, no ano de 2015.

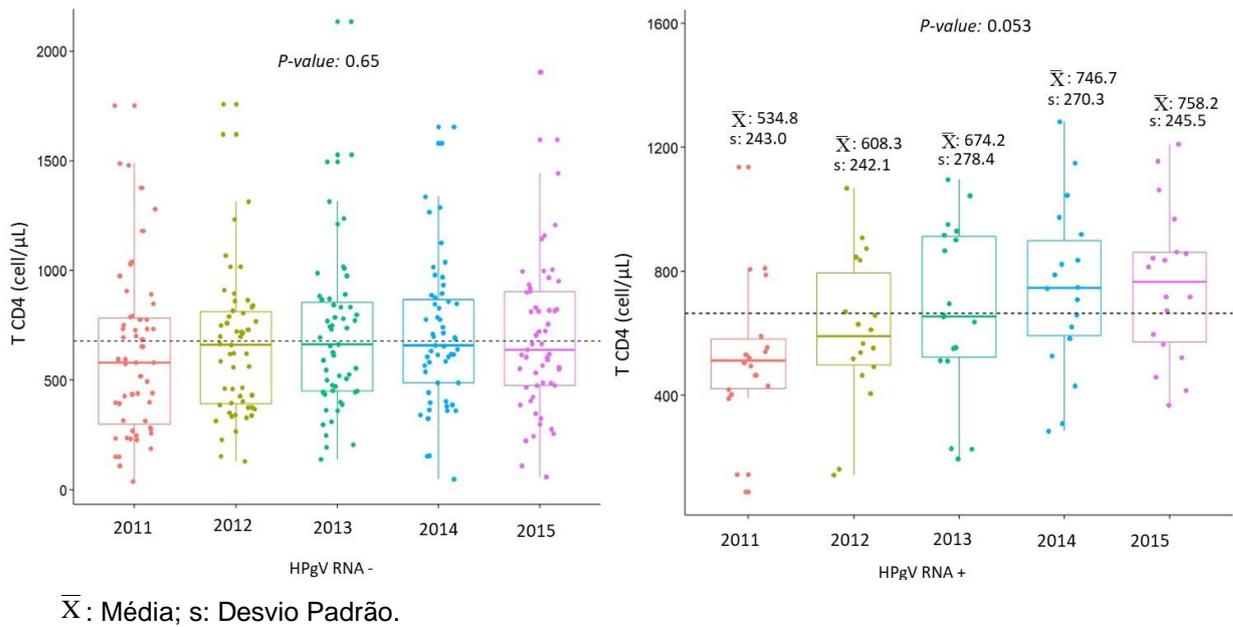
**Fig 2.** Níveis séricos de MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 por indivíduos HPgV RNA negativos e positivos nos anos de 2011 e 2015



A e B: Concentração de MIP-1 $\alpha$ . C e D: Concentração de SDF-1. Valor de  $p$  obtido pelo teste Wilcoxon;  $\bar{X}$ : Média; s: Desvio Padrão.

A fig 3 apresenta a média da contagem de TCD4 em indivíduos RNA HPgV negativos e positivos de 2011 a 2015.

**Fig 3.** Média da contagem de TCD4 em indivíduos RNA HPgV negativos e positivos de 2011 a 2015



## Discussão

Nesse trabalho foram avaliados dois momentos, 2011 e 2015, os níveis séricos das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e SDF-1, em pessoas com presença e ausência do HPgV RNA e a associação com a carga viral do HIV e média das contagens do TCD4.

Em nossa pesquisa os níveis séricos elevados do MIP-1 $\alpha$  em HPgV RNA positivos, no ano de 2015, quando comparados com HPgV RNA negativos (figura1B), podem sugerir efeito benéfico, uma vez que uma maior concentração do MIP-1 $\alpha$  facilitaria sua ligação ao CCR5 impedindo a entrada do HIV (cepa R5) nas células. No entanto, em estudo com mulheres vivendo com HIV/aids e coinfetados com HPgV que não estavam sob HAART, não foi encontrado níveis elevados de MIP-1 $\alpha$ , nas coinfetadas não sendo atribuído assim ação benéfica da coinfeção (Blackard e colaboradores [8]. Da mesma forma outro estudo não encontrou associação entre os níveis elevados de MIP-1 $\alpha$  em pessoas com HPgV RNA positivos [9]

Nossos dados corroboram os estudos *in vitro* [6,10], os quais demonstraram haver inibição da entrada do HIV em culturas de células infectadas com HPgV.

Já os resultados das concentrações elevadas do SDF-1 para os coinfectados em 2015, quando comparados ao de 2011 (figura1D), também podem demonstrar efeito benéfico em pacientes coinfectados. Primeiro, a maior concentração de SDF-1 faria com que o mesmo se ligasse ao correceptor CXCR4. Segundo, isso proporcionaria redução da expressão dos correceptores CXCR4 em TCD4 disponíveis para ligação ao HIV e, terceiro, como consequência haveria o impedimento da entrada da cepa X4 do HIV nas células. Esses dados também estão de acordo com os estudos *in vitro* [6,10], os quais demonstraram haver inibição da entrada da cepa X4 do HIV em culturas de células com HPgV.

O fato de encontrarmos diminuição da concentração de MIP-1 $\alpha$  em 2015 quando comparado a 2011 em monoinfectados (figura2A) e, não termos observado o mesmo em coinfectados (figura2B), demonstra que a presença do HPgV está associada com as concentrações elevadas do MIP-1 $\alpha$ . Em relação ao SDF-1, nossos dados demonstraram haver aumento das concentrações de SDF-1 para os coinfectados em 2015, quando comparado à 2011 (figura2D). O que não foi observado em relação aos monoinfectados (figura 2C), ou seja, a presença do HPgV também determina concentrações de SDF-1 elevadas.

Os únicos estudos, *in vivo*, abordando o MIP-1 $\alpha$  e SDF-1, o qual foi realizado por Blackard e colaboradores [8] e, Mireia e colaboradores [9], não encontraram associação da concentração dessas quimiocinas com HPgV. Provavelmente porque estes estudos foram realizados em pacientes que não estavam fazendo uso de HAART, fazendo uso de monoterapia ou terapia dupla. A ausência de terapia antirretroviral efetiva dificulta a supressão da carga viral do HIV e acarreta maior quantidade sérica do vírus. Dessa maneira haverá grande quantidade de espécimes do HIV competindo com MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 pelos correceptores dos linfócitos TCD4, tanto em coinfectados como em monoinfectados. Em nosso trabalho, 94% dos pacientes estavam fazendo uso de HAART em 2011 e quase 100% em 2015.

Após realizarmos a associação entre quimiocinas e coinfecção, buscamos determinar a associação do HPgV com a progressão da doença pelo HIV. Portanto, nessa pesquisa, procuramos usar a contagem TCD4 como marcador de prognóstico.

Em relação a contagem de TCD4, encontramos o aumento das médias de TCD4 entre os anos de 2011 a 2015 nos pacientes coinfectados, porém não observamos em monoinfectados (figura3) e, dessa forma podemos sugerir que o

HPgV apresenta realmente um efeito protetor aos pacientes coinfectados como demonstrado em estudos *in vitro* [2,5,11,12,13].

Entretanto, em relação à carga viral, houve prejuízo nas inferências dos resultados, pois o elevado número de pessoas com cargas virais indetectáveis em decorrência do uso regular da TARV, em parcela significativa da nossa população estudada, prejudicou as médias.

Como conclusão, este estudo foi o primeiro a mostrar a associação, *in vivo*, das concentrações do MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 com HPgV RNA positivos, sugerindo melhor prognóstico em PVHA coinfectadas com HPgV, uma vez que essas quimiocinas se ligariam aos respectivos correceptores CCR5 e CXCR4, diminuindo a expressão dos correceptores em TCD4. Portanto, nossos achados podem contribuir na compreensão do mecanismo imunológico da coinfeção e dessa maneira proporcionar novas perspectivas no entendimento de outras formas de combate ao HIV usando como estratégia o HPgV.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem os pacientes da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco, que concordaram em participar dessa pesquisa.

## Referências

1. Williams C, Klinzman D, Yamashita M, Xiang J, Polgreen P, Rinaldo C, et al. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. *N Engl J Med*. 2004;350: 981–990. doi:10.1056/NEJMoa030107
2. Vahidnia F, Petersen M, Stapleton J, Rutherford G, Busch M, Custer B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. *Clin Infect Dis*. 2012;55: 1012–1019. doi:10.1093/cid/cis589
3. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of Coinfection with GB Virus C on Survival among Patients with HIV Infection. *N Engl J Med*. 2001;345: 707–714. doi:10.1056/NEJMoa003364
4. Nattermann J, Nischalke H-D, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*. 2003;17: 1457–1462. doi:10.1097/01.aids.0000076271.76134.58
5. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 15570–15575. doi:10.1073/pnas.0604728103
6. Xiang J, George SL, Wünschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. *Lancet*. 2004;363: 2040–2046. doi:10.1016/S0140-6736(04)16453-2
7. Ostrowski M a, Justement SJ, Catanzaro a, Hallahan C a, Ehler L a, Mizell SB, et al. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol*. 1998;161: 3195–201. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743388>
8. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, et al. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol*. 2017;89: 1904–1911. doi:10.1002/jmv.24836
9. Mireia Giménez-Barcons, Meritxell Ribera, Anuska Llano, et al. Analysis of Chemokine and Cytokine Expression in Patients with HIV and GB Virus Type C Coinfection. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:1342–9. doi.org/10.1086/429320

10. Benkirane M, Jin D, Chun R, Koup R, Jeang K. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5 $\Delta$ 32. *J Biol Chem*. 1997;272: 30603–30607. doi:10.1074/jbc.272.49.30603
11. 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: 173–180. doi:10.1111/j.1468-1293.2006.00366.x
12. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Spengler U, Rockstroh J. A review of GB virus C co-infection in advanced HIV type-1 disease. *Eur Infect Dis*. 2011;5: 27–30. doi:10.3851/IMP1602
13. Tillmann H, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber J, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2001;345: 715–724. doi:10.1056/NEJMoa010398

## 5.2 Artigo 2

- Título do periódico: BMC Infectious Diseases
- Classificação qualis: B1
- Área de avaliação: Medicina II

### **ASPECTOS CLÍNICOS DO POLIMORFISMO DA IL-4 E IL-10 EM PVHA COINFECTADAS COM O HPgV**

#### **Introdução**

A coinfeção do pegvírus humano (HPgV) com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode levar a progressão mais lenta da doença causada pelo HIV [1–3]. Pesquisas têm demonstrado que mecanismos genéticos e imunológicos mediados pelas citocinas IL-4 e IL-10, desempenham papel importante na progressão da doença pelo HIV [4,5].

A IL-4 é relatada por regular diferencialmente dois correceptores principais, o CXCR4 para vírus indutores por sincícios (SI) e CCR5 para variantes não indutoras de sincícios (NSI). No CCR5, pode atuar reduzindo a regulação da expressão de CCR5 e, portanto, inibindo a replicação de isolados de NSI do HIV em células T e macrófagos humanos. Por outro lado, a IL-4 pode regular a expressão de CXCR4 levando à indução de variantes SI, principalmente observadas no estágio avançado da progressão da doença do HIV [4,6].

Spellberg e colaboradores, fizeram um estudo relatando a relevância da resposta celular T-helper no HIV e demonstraram que a progressão para aids está relacionada com incapacidade das células mononucleares em produzir citocinas do perfil TH1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) e promoverem a produção de citocinas da resposta TH2 (IL-4 e IL-10) [7].

Estudos, *in vivo*, demonstraram que o polimorfismo -589C/T, no gene *IL-4*, foi associado à redução da carga viral do HIV no início da infecção, retardando a progressão da doença e sugerindo que o efeito protetor se deve, em parte, à redução da replicação e à dinâmica do HIV [4,8].

Em relação a IL-10, foi observado, *in vitro*, que os efeitos inibitórios ou indutivos na replicação do HIV dependem da sua concentração. Níveis elevados desta citocina foram encontrados nos pacientes, particularmente nos gânglios linfáticos, enquanto que a progressão para doença foi associada a uma diminuição da expressão de IL-10 [9]. Em pacientes virgens de tratamento, foi demonstrado que portadores do alelo G tiveram uma redução da mortalidade e diminuição da contagem de CD4 [10], indicando um papel importante do polimorfismo do gene IL-10 na progressão da doença do HIV. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação dos polimorfismos da IL-4 e IL-10 com a contagem do CD4 e carga viral do HIV em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) coinfectadas com o HPgV.

## **Métodos**

### **População de estudo**

A partir de um estudo transversal, realizado em 2011, onde foram avaliadas PVHA-HPgV RNA negativos e positivos, acompanhadas no ambulatório de Doença Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFPE, Recife, Brasil, envolvendo 249 pacientes HIV positivos, dos quais 59 foram diagnosticados como HPgV RNA positivos em 2011, iniciou-se um estudo de coorte com 98 pacientes dentre os 249 para serem acompanhados com intervalos de 03 meses até 2015, através de visitas ambulatoriais, sendo 76 RNA negativos e 22 RNA positivos. Os pacientes em uso de imunossupressores não foram incluídos da pesquisa e no início do estudo, apenas 5% dos pacientes ainda não faziam uso de Terapia Antirretroviral (TARV). O diagnóstico de HPgV foi realizado através de PCR quantitativa (qPCR) na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O estudo inicial demonstrou

prevalência de 23,7% de HPgV RNA dentre os 249 pacientes. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFPE (processo: 20125113.0.0000.5208) e todos os participantes forneceram consentimento voluntário informado antes da coleta de amostras e dados clínicos.

### **Polimorfismos da IL-4 e IL-10**

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico seguindo o protocolo de *mini-salting out* [11] e quantificado em espectrofotômetro (260nm/280nm) com posterior diluição para a concentração de 50 ng. Os polimorfismos da IL-4 C\_\_16176216\_10 (rs2243250) e IL-10 C\_\_1747360\_10 (rs1800896) foram identificados através da qPCR utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) e a solução de amplificação da qPCR, para ambos os polimorfismos, foi realizada utilizando 5 µL de TaqMan 2x, 0,5 µL de cada sonda, 3,5 µL de água livre de nucleasse ultrapura e 1 µL de DNA, com volume final de 10 µL. O perfil de temperatura utilizado na termociclagem foi de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A detecção da fluorescência foi determinada pelo 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software v1.3 (SDS, Applied Biosystems).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A), através dos testes de Qui-quadrado ( $X^2$ ), para verificar associação das variáveis categóricas, sexo e raça, com a infecção HPgV. ANOVA foi realizada para a variável contagem de TCD4. O software SNPStats [12] foi utilizado para calcular as frequências alélicas, genotípicas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste de Hardy-Weinberg foi realizado para verificar se a população estava em equilíbrio. Todos os valores p foram bicaudais. Embora apenas p-valores < 0, 5 foram considerados estatisticamente significativos, outros p-valores foram fornecidos.

## Resultados

Foram analisadas 22 PVHA HPgV-RNA positivas e 76 PVHA HPgV-RNA negativas. A média de idade foi de 39 ( $\pm 7,70$ ) anos nos HPgV-RNA positivos e 41 ( $\pm 8,1$ ) anos RNA negativos. O sexo feminino teve maior frequência (72,7%) nos positivos ( $p=0,004$ ). Com relação à raça não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, todavia, nos HPgV-RNA positivos, a maioria era de pardos (68,2%), 4,5% de pretos e 27,3% de brancos. Enquanto nos HPgV-RNA negativos, 57,9% eram pardos, 15,8% pretos e 26,3% brancos.

A tabela 1 apresenta a frequência dos alelos e genótipos da *IL-4* e *IL-10* em HPgV RNA negativos e positivos.

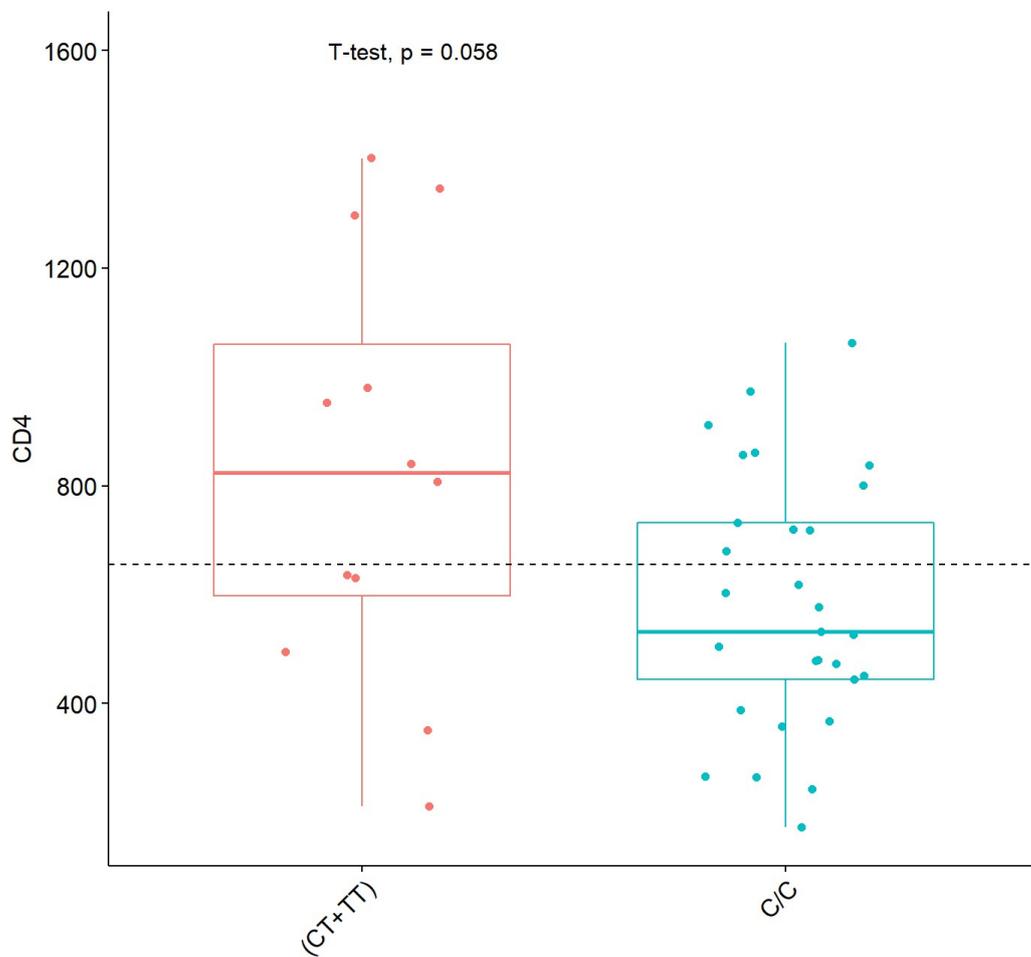
**Tabela 1.** Frequência dos alelos e genótipos da *IL-4* e *IL-10* em HPgV RNA negativos e positivos

Variáveis	HPgV RNA negativo n (%)	HPgV RNA positivo n (%)	$p^1$
<b>IL-4 (-589)</b>			
<i>Alelo</i>			
C	84 (65,5)	22 (58)	
T	44 (34,5)	16 (42)	
<i>Genótipo</i>			
C/C	29 (45)	07 (37)	0,71
C/T	26 (41)	08 (42)	
T/T	09 (14)	04 (21)	
NA	12	03	
<b>IL-10 (-1082)</b>			
<i>Alelo</i>			
A	90 (71,5)	26 (65)	
G	36 (28,5)	14 (35)	
<i>Genótipo</i>			
A/A	32 (51)	08 (40)	0,70
A/G	26 (41)	10 (50)	
G/G	05 (08)	02 (10)	
NA <sup>2</sup>	13	02	

<sup>1</sup>*p*- valor obtido pelo teste do chi-quadrado; <sup>2</sup>não aferido.

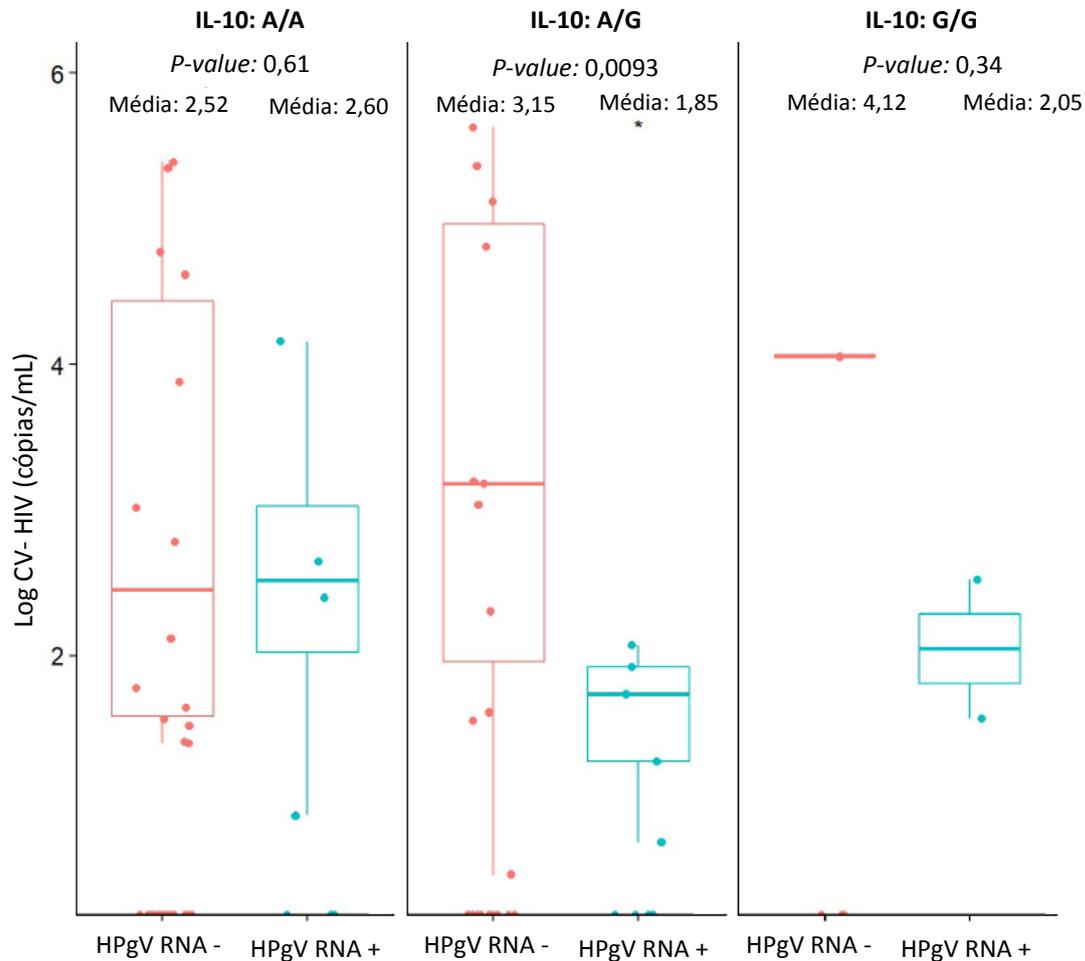
A figura mostra associação do polimorfismo da IL-4 com a contagem de T CD4 em HPgV RNA negativos e positivos.

**Figura 1.** Associação do polimorfismo da IL-4 com a contagem de TCD4 em HPgV RNA negativos e positivos em 2011.



A figura 2 mostra a associação dos genótipos da *IL-10* com a carga viral do HIV em HPgV RNA negativos e positivos.

**Figura 2.** Associação dos genótipos da *IL-10* com a carga viral do HIV em HPgV RNA negativos e positivos em 2011.



## Discussão

Nossa pesquisa buscou demonstrar se havia associação do polimorfismo da *IL-4* e *IL-10* com a contagem de *TCD4* e a carga viral do HIV, em indivíduos HIV/HPgV. Estudos em monoinfectados com o HIV mostraram que a presença do alelo -589T da *IL-4* diminui a expressão de *CCR5* e com isso inibe a replicação da cepa HIV R5. Se acreditarmos que os vírus R5 são resistentes a anticorpos neutralizantes enquanto vírus X4 são sensíveis e que, raramente são detectados em fases posteriores [13], é plausível hipótese de que os vírus R5 são os principais responsáveis por direcionar a imunodeficiência na infecção pelo HIV e dessa maneira, maior expressão de *IL-4* associa-se a um melhor prognóstico [4,6].

Portanto nossos resultados além de pioneiros na abordagem do polimorfismo do *IL-4* em coinfectados HIV/HPgV, estão em consonância com trabalhos que demonstraram associação do gene -589T da *IL-4* em monoinfectados [14,15]. Em nosso estudo a presença do alelo T apresentou maior contagem de TCD4 em indivíduos HPgV RNA positivos do que em HPgV RNA negativos, demonstrando a possibilidade de haver efeito benéfico da presença do alelo -589T da *IL-4* em coinfectados.

Em relação à associação do polimorfismo do alelo -1082G da *IL-10* com redução da carga viral do HIV, nossos achados pode sugerir que a presença desse alelo, em indivíduos coinfectados HIV/HPgV, promove prognóstico favorável na doença pelo HIV na fase crônica como foi demonstrado em pesquisas com monoinfectados com HIV [9,10,16]. Esse polimorfismo está ligado ao aumento da concentração da *IL-10*, que tem como consequência a diminuição da atividade imunológica com redução da replicação viral.

Como conclusão, este estudo foi o primeiro a mostrar a associação dos polimorfismos da *IL-4* e *IL-10* com HPgV, demonstrado através da análise com marcadores de prognósticos como TCD4 e carga viral do HIV em indivíduos coinfectados HIV/ HPgV. Entretanto, com limitação do estudo tivemos o fato de não ter sido dosadas as citocinas *IL-4* e *IL-10* e tamanho da população estudada.

## **Declarações**

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram ausência de conflito de interesse.

### **Financiamento**

Nenhum financiamento foi obtido para este estudo.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem os pacientes da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco, que concordaram em participar dessa pesquisa.

## Referências

1. Tillmann H, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber J, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001;345: 715–724.
2. Xiang J, George SL, Wünschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. *Lancet.* 2004;363: 2040–2046.
3. Stapleton JT. GB Virus Type C (GBV-C), Alternative Denomination Hepatitis G Virus (HGV). *Transfus Med Hemotherapy.* 2005;32: 128–131.
4. Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, et al. Polymorphism in the Interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol.* 2000;74: 5452–5459.
5. Mahajan S, Agosto-Mojica A, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, et al. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396: 348–352.
6. Valentin a, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson a, et al. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 8886–8891.
7. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32: 76–102.
8. Wichukchinda N, Nakayama EE. Protective Effects of IL4-589T and RANTES - 28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. 2006;20: 189–196.
9. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97: 14467–14472.

10. Erikstrup C, Kallestrup P, Zinyama-Gutsire RB, Gomo E, Butterworth AE, Pedersen BK, et al. Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. *Aids*. 2007;21: 2283–2291.
11. Miller S, Dykkes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16.
12. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22:1928–1929.
13. Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H. A group of V3 sequences from human immunodeficiency virus type 1 subtype E non-syncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J Virol*. 2000;74:1069–1078.
14. Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C, Delfraissy JF, Debre P, McIlroy D, Theodorou I, Shioda T. Protective effect of interleukin-4–589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression: Relationship with virus load. *J Infect Dis*. 2002; 185:1183–1186.
15. Vasilescu A, Heath SC, Ivanova R, Hendel H, Do H, Mazoyer A, et al. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes Immun*. 2003, 4:441– 449.
16. Dshanta D, Naicker, Bingxia Wang, Elena Losina, Jennifer Zupkosky, Susan Bryan, Shabashini Reddy, et al. Association of IL-10-Promoter Genetic Variants With the Rate of CD4 T-Cell Loss, IL-10 Plasma Levels, and Breadth of Cytotoxic T-Cell Lymphocyte Response During Chronic HIV-1 Infection. 2012, 54(2):294-302. doi:10.1093/cid/cir811.

## 6 CONCLUSÕES DA TESE

Em PVHA coinfectadas pelo HIV/HPgV:

- ✓ Houve associação das concentrações séricas do MIP-1 $\alpha$  e SDF-1 com HPgV RNA positivos em 2015;
- ✓ Houve associação da contagem de TCD4 com HPgV RNA positivo de 2011 a 2015;
- ✓ Não houve associação da contagem de TCD4 com HPgV RNA negativo de 2011 a 2015;
- ✓ Foi estimada pela primeira vez a frequência dos alelos e genótipos da IL-4, IL-10;
- ✓ Houve associação do polimorfismo da IL-4, em HPgV RNA positivo, com a contagem de TCD4 em 2011;
- ✓ Não houve associação do polimorfismo da IL-4, em HPgV RNA negativo, com a contagem de TCD4 em 2011;
- ✓ Houve associação do polimorfismo da IL-10, em HPgV RNA positivo, com a carga viral do HIV em 2011;
- ✓ Não houve associação do polimorfismo da IL-10, em HPgV RNA negativo, com a carga viral do HIV em 2011;

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esperamos que os resultados desta tese representem informações relevantes no conhecimento de fatores genéticos e imunológicos da coinfeção HIV/HPgV. Além disso, outros estudos são necessários para que novas perspectivas surjam no combate à infecção pelo HIV, trazendo benefícios reais aos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- BARMANIA, F.; PEPPER, M. S. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. **Applied and Translational Genomics**, v. 2, n. 1, p. 3–16, 2013.
- BENKIRANE, M.; JIN, D.; CHUN, R.; KOUP, R.; JEANG, K. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5 $\Delta$ 32. **J Biol Chem**, v. 272, n. 49, p. 30603–30607, 1997.
- BERZSENYI, M. D.; BOWDEN, D. S.; ROBERTS, S. K. GB virus C: Insights into co-infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, n. 4, p. 257–266, 2005.
- BIRK, M.; LINDBÄCK, S.; LIDMAN, C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 16, n. 18, p. 2482–2485, 2002.
- BJORKMAN, P.; FLAMHOLC, L.; NAUCLER, a; MOLNEGREN, V.; WALLMARK, E.; WIDELL, a. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. **AIDS**, v. 18, n. 6, p. 877–886, 2004.
- BLACKARD, J. T.; MA, G.; WELGE, J. A.; TAYLOR, L. E.; MAYER, K. H.; KLEIN, R. S.; CELENTANO, D. D.; SOBEL, J. D.; JAMIESON, D. J.; KING, C. C. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 11, p. 1904–1911, 2017.
- BRUMME, Z. L.; CHAN, K. J.; DONG, W. W.; MO, T.; WYNHOVEN, B.; HOGG, R. S.; MONTANER, J. S.; O'SHAUGHNESSY, M. V.; HARRIGAN, P. R. No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 16, n. 14, p. 1929–1933, 2002.
- BUCHBINDER, S.; KATZ, M.; HESSOL, N.; O'MALLEY, P.; HOLMBERG, S. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. **AIDS**, v. 8, n. 8, p. 1123–1128, 1994.
- CHELLI, M.; ALIZON, M. Determinants of the trans-Dominant Negative Effect of

Truncated Forms of the CCR5 Chemokine Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 46975–46982, 2001.

CHEONG, J. Y.; CHO, S. W.; HWANG, I. L.; YOON, S. K.; LEE, J. H.; PARK, C. S.; LEE, J. E.; HAHM, K. B.; KIM, J. H. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. 7, p. 1163–1169, 2006.

DE COCK, K. M.; JAFFE, H. W.; CURRAN, J. W. Reflections on 30 years of AIDS. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 6, p. 1044–1048, 2011.

DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G.; SMITH, M.; ALLIKMETS, R.; GOEDERT, J.; BUCHBINDER, S.; VITTINGHOFF, E.; GOMPERTS, E.; DONFIELD, S.; VLAHOV, D.; KASLOW, R.; SAAH, A.; RINALDO, C.; DETELS, R.; O'BRIEN, S. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856–1862, 1996.

DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 406–416, 2007.

DEINHARDT, F.; HOLMES, A. W.; CAPPS, R. B.; POPPER, H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. **The Journal of experimental medicine**, v. 125, n. 4, p. 673–88, 1967.

ERIKSTRUP, C.; KALLESTRUP, P.; ZINYAMA-GUTSIRE, R. B.; GOMO, E.; BUTTERWORTH, A. E.; PEDERSEN, B. K.; OSTROWSKI, S. R.; GERSTOFT, J.; ULLUM, H. Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. **Aids**, v. 21, n. 17, p. 2283–2291, 2007.

FEUCHT, H. H.; ZOLLNER, B.; POLYWKA, S.; KNODLER, B.; SCHROTER, M.; NOLTE, H.; LAUFS, R. Prevalence of hepatitis G viraemia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission.

**Journal of Clinical Microbiology**, v. 35 (3), n. 3, p. 767–768, 1997.

HERINGLAKE, S.; OCKENGA, J.; TILLMANN, H. L.; TRAUTWEIN, C.; MEISSNER, D.; STOLL, M.; HUNT, J.; JOU, C.; SOLOMON, N.; SCHMIDT, R. E.; MANNS, M. P. GB Virus C/Hepatitis G Virus Infection: A Favorable Prognostic Factor in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients? **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 6, p. 1723–1726, 1998.

KWA, D.; VAN RIJ, R. P.; BOESER-NUNNINK, B.; VINGERHOED, J.; SCHUIITEMAKER, H. Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants. **Aids**, v. 17, n. 7, p. 981–985, 2003.

LAU, R. R.; SIGELMAN, L.; HELDMAN, C.; BABBITT, P. The Effects of Negative Political Advertisements: A Meta-Analytic Assessment. **American Political Science Review**, v. 93, n. 4, p. 851–875, 1999.

LEARY, T. P.; MUERHOFF, A. S.; SIMONS, J. N.; PILOT-MATIAS, T. J.; ERKER, J. C.; CHALMERS, M. L.; SCHLAUDER, G. G.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M.; MUSHAHWAR, I. K. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the Flaviviridae associated with human Non-A-E hepatitis. **Journal of Medical Virology**, v. 48, n. 1, p. 60–67, 1996.

LEFRÈRE, J. J.; ROUDOT-THORAVAL, F.; MORAND-JOUBERT, L.; PETIT, J. C.; LERABLE, J.; THAUVIN, M.; MARIOTTI, M. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 4, p. 783–789, 1999.

LIU, R.; PAXTON, W. A.; CHOE, S.; CERADINI, D.; MARTIN, S. R.; HORUK, R.; MACDONALD, M. E.; STUHLMANN, H.; KOUP, R. A.; LANDAU, N. R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367–377, 1996.

MAHAJAN, S.; AGOSTO-MOJICA, A.; AALINKEEL, R.; REYNOLDS, J. L.; NAIR, B. B.; SYKES, D. E.; MARTINEZ, J.; ADAMS, J.; N, S.; BERNSTEIN, Z.; HSIAO, C.; SCHWARTZ, S. A. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the

progression of HIV-1 disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 5, p. 348–352, 2010.

MAIDANA-GIRET, M. T.; SILVA, T. M.; SAUER, M. M.; TOMIYAMA, H.; LEVI, J. E.; BASSICHETTO, K. C.; NISHIYA, A.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; PALACIOS, R.; KALLAS, E. G. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. **Aids**, v. 23, n. 17, p. 2277–2287, 2009.

MASTOURI, M.; SAFER, L.; POZZETTO, B.; BOURLET, T.; KHEDHER, M. Prévalence du virus de l'hépatite G chez les donneurs de sang en Tunisie. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 11, n. 5–6, p. 1053–1060, 2005.

MIEDEMA, F.; HAZENBERG, M. D.; TESSELAAR, K.; VAN BAARLE, D.; DE BOER, R. J.; BORGHANS, J. A. M. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–14, 2013.

MILLER, S.; DYKKES, D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, 1988.

MODI, W. S.; O'BRIEN, T. R.; VLAHOV, D.; BUCHBINDER, S.; GOMPERTS, E.; PHAIR, J.; O'BRIEN, S. J.; WINKLER, C. Haplotype diversity in the interleukin-4 gene is not associated with HIV-1 -transmission and aids progression. **Immunogenetics**, v. 55, n. 3, p. 157–164, 2003.

MOHR, E.; STAPLETON, J. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. **J Viral Hepat**, v. 16, n. 11, p. 757–768, 2009.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin -10 and the I Nterleukin -10 R Eceptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MUERHOFF, a S.; LEARY, T. P.; SIMONS, J. N.; PILOT-MATIAS, T. J.; DAWSON, G. J.; ERKER, J. C.; CHALMERS, M. L.; SCHLAUDER, G. G.; DESAI, S. M.; MUSHAHWAR, I. K. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. **Journal of virology**, v. 69, n. 9, p. 5621–5630, 1995.

NAICKER, D. D.; WERNER, L.; KORMUTH, E.; PASSMORE, J.; MLISANA, K.; KARIM, S. A.; NDUNG'U, T. Interleukin- 10 Promoter Polymorphisms Influence HIV- 1 Susceptibility and Primary HIV- 1 Pathogenesis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 3, p. 448–452, 2009.

NAKAYAMA, E. E.; HOSHINO, Y.; XIN, X.; LIU, H.; GOTO, M.; WATANABE, N.; TAGUCHI, H.; HITANI, A.; KAWANA-TACHIKAWA, A.; FUKUSHIMA, M.; YAMADA, K.; SUGIURA, W.; OKA, S.-I.; AJISAWA, A.; SATO, H.; TAKEBE, Y.; NAKAMURA, T.; NAGAI, Y.; IWAMOTO, A.; SHIODA, T. Polymorphism in the Interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. **Journal of Virology**, v. 74, n. 12, p. 5452–5459, 2000.

NAKAYAMA, E. E.; MEYER, L.; IWAMOTO, A.; PERSOZ, A.; NAGAI, Y.; ROUZIOUX, C.; DELFRAISSY, J.; DEBRE, P.; MCILROY, D.; THEODOROU, I.; SHIODA, T. Protective Effect of Interleukin- 4 –589T Polymorphism on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease Progression: Relationship with Virus Load. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1183–1186, 2002.

NATTERMANN, J.; NISCHALKE, H.-D.; KUPFER, B.; ROCKSTROH, J.; HESS, L.; SAUERBRUCH, T.; SPENGLER, U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. **AIDS (London, England)**, v. 1, n. 10, p. 1457–1462, 2003.

OLIVEIRA, L. A.; MARTINS, R. M. B.; CARNEIRO, M. A. S.; TELES, S. A.; SILVA, S. A.; CARDOSO, D. D. P.; LAMPE, E.; YOSHIDA, C. F. T. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 953–957, 2002.

OSTROWSKI, M. a; JUSTEMENT, S. J.; CATANZARO, a; HALLAHAN, C. a; EHLER, L. a; MIZELL, S. B.; KUMAR, P. N.; MICAN, J. a; CHUN, T. W.; FAUCI, a S. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 6, p. 3195–201, 1998.

RELLOSO, M.; PUIG-KROGER, A.; PELLO, O. M.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L.; DE LA ROSA, G.; LONGO, N.; NAVARRO, J.; MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.;

SANCHEZ-MATEOS, P.; CORBI, A. L. DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- $\beta$ , and Anti-Inflammatory Agents. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 6, p. 2634–2643, 2002.

REN, F.; WANG, Y.; LI, H.; CHEN, H.; ZHAO, H. Hepatitis G virus infection in screened chinese blood donors. **Vox Sang**, v. 74, p. 51–52, 1998.

RYT-HANSEN, R.; KATZENSTEIN, T.; GERSTOFT, J.; EUGEN-OLSEN, J. No Influence of GB Virus C on Disease Progression in a Danish Cohort of HIV-Infected Men. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 6, p. 496–498, 2006.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B. J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, M.; SARAGOSTI, S.; LAPOUMEROULIE, C.; COGNAUX, J.; FORCEILLE, C.; MUYLDERMANS, G.; VERHOFSTEDDE, C.; BURTONBOY, G.; GEORGES, M.; IMAI, T.; RANA, S.; YI, Y.; SMYTH, R. J.; PARMENTIER, M.; ET, al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v.22, p722-725, 1996.

SCHWARZE-ZANDER, C.; BLACKARD, J. T.; SPENGLER, U.; ROCKSTROH, J. A review of GB virus C co-infection in advanced HIV type-1 disease. **European Infectious Disease**, v. 5, p. 27–30, 2011.

SHIN, H. D.; WINKLER, C.; STEPHENS, J. C.; BREAN, J.; YOUNG, H.; GOEDERT, J. J.; O'BRIEN, T. R.; VLAHOV, D.; BUCHBINDER, S.; GIORGI, J.; RINALDO, C.; DONFIELD, S.; WILLOUGHBY, A.; O'BRIEN, S. J.; SMITH, M. W. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14467–14472, 2000.

SIMMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans 2000. **Journal of General Virology (2001)**, v. 82, p. 693–712, 2001.

SIMONS, J. N.; DESAI, S. M.; SCHULTZ, D. E.; LEMON, S. M.; MUSHAHWAR, I. K. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. **Journal of virology**, v. 70, n. 9, p. 6126–35, 1996.

SINGH, K. K.; HUGHES, M. D.; CHEN, J.; SPECTOR, S. a. Lack of protective effects

of interleukin-4 -589-C/T polymorphism against HIV-1-related disease progression and central nervous system impairment, in children. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 4, p. 587–92, 2004.

SINGH, S.; ARORA, S. K. Impact of Cytokine Gene Polymorphism on the HIV-1 Disease Progression and Response to Therapy. **Journal of AIDS & Clinical Research**, v. 6, n. 10, p. 1–8, 2015.

SMITH, D. B.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, A. S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; STAPLETON, J. T.; SIMMONDS, P. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 2016.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. February, p. 76–102, 2001.

STAPLETON, J. T. GB Virus Type C (GBV-C), Alternative Denomination Hepatitis G Virus (HGV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 32, n. 3–4, p. 128–131, 2005.

STAPLETON, J. T.; FOUNG, S.; MUERHOFF, A. S.; BUKH, J.; SIMMONDS, P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 2, p. 233–246, 2011.

SUPAPOL, W. B.; REMIS, R. S.; RABOUD, J.; MILLSON, M.; TAPPERO, J.; KAUL, R.; KULKARNI, P.; MCCONNELL, M. S.; MOCK, P. A.; CULNANE, M.; MCNICHOLL, J.; ROONGPISUTHIPONG, A.; CHOTPITAYASUNONDH, T.; SHAFFER, N.; BUTERA, S. Reduced Mother-to-Child Transmission of HIV Associated with Infant but not Maternal GB Virus C Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 10, p. 1369–1377, 2008.

TEBAS, P.; STEIN, D.; WW, T.; FRANK, I.; SQ, W.; LEE, G.; SK, S.; RT, S.; MA, G.; NICHOL, G.; MC, H. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 10, p. 901–910,

2014.

THIEL, H.; COLLETT, M.; GOULD, E.; HEINZ, F.; HOUGHTON, M.; MEYERS, G.; PURCELL, R.; RICE, C. Virus Taxonomy: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **London: Elsevier Academic Press.**, 2005.

TILLMANN, H.; HEIKEN, H.; KNAPIK-BOTOR, A.; HERINGLAKE, S.; OCKENGA, J.; WILBER, J.; GOERGEN, B.; DETMER, J.; MCMORROW, M.; STOLL, M.; SCHMIDT, R.; MANNS, M. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 10, p. 715–724, 2001.

VAHIDNIA, F.; PETERSEN, M.; STAPLETON, J.; RUTHERFORD, G.; BUSCH, M.; CUSTER, B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 7, p. 1012–1019, 2012.

VALENTIN, a; LU, W.; ROSATI, M.; SCHNEIDER, R.; ALBERT, J.; KARLSSON, a; PAVLAKIS, G. N. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. July, p. 8886–8891, 1998.

VAN DER BIJ, A. K.; KLOOSTERBOER, N.; PRINS, M.; BOESER-NUNNINK, B.; GESKUS, R. B.; LANGE, J. M.; COUTINHO, R. A.; SCHUIJTEMAKER, H. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 5, p. 678–685, 2005.

VANDERGEETEN, C.; FROMENTIN, R.; CHOMONT, N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 23, n. 0, p. 143–149, 2012.

VARGAS, A.; MARRERO, A.; SALZANO, F.; BORTOLINI, M.; CHIES, J. Frequency of CCR5 $\Delta$ 32 in Brazilian populations. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, p. 321–325, 2006.

VASILESCU, A.; HEATH, S. C.; IVANOVA, R.; HENDEL, H.; DO, H.; MAZOYER, A.; KHADIVPOUR, E.; GOUTALIER, F. X.; KHALILI, K.; RAPPAPORT, J.; LATHROP, G. M.; MATSUDA, F.; ZAGURY, J. F. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: Identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the

disease progression. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 6, p. 441–449, 2003.

WANG, C.; SONG, W.; LOBASHEVSKY, E.; WILSON, C. M. Cytokine and Chemokine Gene Polymorphisms Among. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 35, n. 5, p. 446–454, 2004.

WANG, J.; RODERIQUEZ, G.; ORAVECZ, T.; NORCROSS, M. a. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7642–7647, 1998.

WESTENDORP, R. G. J.; LANGERMANS, J. A. M.; HUIZINGA, T. W. J.; ELOUALI, A. H.; VERWEIJ, C. L.; BOOMSMA, D. I.; VANDENBROUKE, J. P. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. **Lancet**, v. 349, p. 170–173, 1997.

WICHUKCHINDA, N.; NAKAYAMA, E. E. Protective Effects of IL4-589T and RANTES -28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. v. 20, n. 2, p. 189–196, 2006.

WILLIAMS, C.; KLINZMAN, D.; YAMASHITA, M.; XIANG, J.; POLGREEN, P.; RINALDO, C.; LIU, C.; PHAIR, J.; MARGOLICK, J.; ZDUNEK, D.; HESS, G.; STAPLETON, J. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 10, p. 981–990, 2004.

XIANG, J.; GEORGE, S. L.; WÜNSCHMANN, S.; CHANG, Q.; KLINZMAN, D.; STAPLETON, J. T. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. **The Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2040–2046, 2004.

XIANG, J.; MCLINDEN, J. H.; CHANG, Q.; KAUFMAN, T. M.; STAPLETON, J. T. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15570–15575, 2006.

XIANG, J.; WÜNSCHMANN, S.; DIEKEMA, D. J.; KLINZMAN, D.; PATRICK, K. D.; GEORGE, S. L.; STAPLETON, J. T. Effect of Coinfection with GB Virus C on Survival among Patients with HIV Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n.

10, p. 707–714, 2001.

XIAO, W.; LIN, F.; SUN, P.; MA, L.; LI, C. Detection of GB virus C/hepatitis G markers in Chinese voluntary blood donors. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 352–353, 2014.

YEO, A.; MATSUMOTO, A.; HISADA, M.; SHIH, J.; ALTER, H.; GOEDERT, J. Effect of Hepatitis G Virus Infection on Progression of HIV Infection in Patients with Hemophilia. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, p. 959–963, 2000.

ZHANG, W.; CHALONER, K.; TILLMANN, H. L.; WILLIAMS, C. F.; STAPLETON, J. T. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: A meta-analysis. **HIV Medicine**, v. 7, n. 3, p. 173–180, 2006.

## Apêndice A – Formulário da pesquisa

<b>Dados Individuais</b>																									
<b>1. Data da entrevista</b>  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>				/				/					<b>2. Registro do paciente</b>  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>												
			/				/																		
<b>3. Identificação do paciente na pesquisa</b>  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>					<b>4. Data de nascimento</b>  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>				/				/												
			/				/																		
<b>5. Nome do paciente na pesquisa</b>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"/> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin-top: 5px;"/>	<b>6. Sexo</b>  1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino <input type="checkbox"/>																								
<b>Dados Sócio-Demográficos</b>																									
<b>7. Qual a sua Raça/etnia?</b> 01. Branca 02. Preta 03. Amarela 04. Parda 05. Indígena  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>				<b>8. Em que você trabalha ou trabalhou nos últimos 6 meses?</b>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>																					
<b>9. Qual é a espécie do curso mais elevado concluído por você?</b>  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>																									
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																								
<b>10. Qual o seu rendimento em Reais no mês passado?</b> 1- Tem <input type="checkbox"/> 0- Não tem 8- Não sabe informar 9- Beneficiário do INSS  <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>																									

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

<p><b>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?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p>	<p><b>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?</b></p> <p>1. 0 <input type="checkbox"/></p> <p>2. Ocasionalmente (&lt; metade das relações)</p> <p>3. Cerca de metade das vezes</p> <p>4. Na maioria das vezes(&gt; metade das vezes)</p> <p>5. Sempre</p> <p>9. Não se aplica</p>
<p><b>23. Nos últimos 6 meses com que frequência você fez sexo oral?</b></p> <p>1. 0</p> <p>2. Ocasionalmente (&lt; metade das relações) <input type="checkbox"/></p> <p>3. Cerca de metade das vezes</p> <p>4. Na maioria das vezes(&gt; metade das vezes)</p> <p>5. Sempre</p> <p>9. Não se aplica</p>	<p><b>24. (Pergunta para o sexo masculino). Você já fez sexo anal ou oral com homem?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p>
<p><b>25. Com quantos parceiros masculinos você teve relações sexuais (anais ou orais) nos últimos 6 meses?</b></p> <p><input type="text"/> <input type="text"/></p>	<p><b>26. Nas relações sexuais com outro homem com que frequência você usou preservativo (camisinha)?</b></p> <p>1. 0</p> <p>2. Ocasionalmente (&lt; metade das relações) <input type="checkbox"/></p> <p>3. Cerca de metade das vezes</p> <p>4. Na maioria das vezes(&gt; metade das vezes)</p> <p>5. Sempre</p> <p>9. Não se aplica</p>
<p><b>27. (Pergunta para o sexo feminino). Você já fez sexo com mulher?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p>	<p><b>28. Com quantos parceiras do sexo feminino você teve relações sexuais últimos 6 meses?</b></p> <p><input type="text"/> <input type="text"/></p>
<p><b>29. Nas relações sexuais com outra mulher com que frequência você usou preservativo (camisinha)?</b></p> <p>1. 0</p> <p>2. Ocasionalmente (&lt; metade das relações) <input type="checkbox"/></p> <p>3. Cerca de metade das vezes</p> <p>4. Na maioria das vezes(&gt; metade das vezes)</p> <p>5. Sempre</p> <p>9. Não se aplica</p>	<p><b>30. Você já recebeu vacina contra hepatite B?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não →Seguir para questão 32</p> <p>8. Não sabe informar →Seguir para questão 32</p>

<p><b>31. Quantas doses de vacina contra hepatite B recebeu?</b></p> <p>1. Uma dose</p> <p>2. Duas doses <input type="checkbox"/></p> <p>3. Três doses ou mais</p> <p>8. Não sabe informar</p> <p>9. Não se aplica</p>	<p><b>32. Você já fez tratamento dentário nos últimos 12 meses?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p> <p>8. Não sabe informar</p>
<p><b>33. Você fez cirurgia nos últimos 12 meses?</b></p> <p>1. Sim →Seguir para questão 35 <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p> <p>8. Não sabe informar</p>	<p><b>34. Você fez cirurgia alguma vez na sua vida?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p> <p>8. Não sabe informar</p> <p>9. Não se aplica</p>
<p><b>35. Você fez transfusão de sangue, derivados ou uso de imunoglobulina nos últimos 12 meses?</b></p> <p>1. Sim →Seguir para questão 37 <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p> <p>8. Não sabe informar</p>	<p><b>36. Você fez transfusão de sangue, derivados ou uso de imunoglobulina alguma vez na sua vida?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p> <p>8. Não sabe informar</p> <p>9. Não se aplica</p>
<p><b>37. Você tem tatuagem?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p>	<p><b>38. Você tem ou teve piercing?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p>
<p><b>39. Você compartilha (ou) escova de dente com outras pessoas?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p>	<p><b>40. Compartilha (ou) objetos cortantes (tesoura, lâmina de barbear, navalha, alicate) com outras pessoas em casa ou em salões de beleza (manicure, pedicure, etc)?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não</p>
<p><b>41. Você já fez uso de drogas fumadas?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>8. Não informou</p>	<p><b>42. Você já fez uso de drogas cheiradas?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>8. Não informou</p>
<p><b>43. Você já fez uso de drogas injetáveis?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>8. Não informou</p>	<p><b>44. Você já tomou injeção com seringa de vidro ou compartilhou seringa?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não (Encerrar entrevista)</p> <p>8. Não informou</p>
<p><b>45. Qual o motivo de ter tomado injeção com seringa de vidro ou ter compartilhado seringa?</b></p>	

1. Estimulante para prática de esportes	4. Outros (especificar: _____)	<input type="checkbox"/>
2. Vitaminas e/ou glicose em farmácia	8. Não sabe informar	
3. Orientação médica	9. Não se aplica	

### Resultado de Diagnósticos e Exames

<p><b>46. Qual a data do diagnóstico de HIV?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">/</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">/</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			/			/					<p><b>47. Você faz uso da HAART?</b></p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div> <p>1. Sim</p> <p>2. Não →Seguir para questão 49</p>
		/			/						
<p><b>48. Qual a data do início da HAART?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">/</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">/</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table> <p>→Seguir para questão 50</p>			/			/					<p><b>49. Você já fez uso da HAART anteriormente?</b></p> <p>1. Sim</p> <p>2. Não →Seguir para questão 52</p> <p>3. Sim por até 6 meses</p> <p>4. Sim de 6 meses até 1 ano</p> <p>5. Sim de 1 ano até 2 anos</p> <p>6. Irregularmente</p> <p>9. Não se aplica →Seguir para questão 56</p> <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></div>
		/			/						



<p><b>70. Qual o resultado da sorologia Anti-HBs?</b></p> <p>1. Positivo  2. Negativo <input type="checkbox"/>  3. Indeterminado  4. Material danificado  5. Extravio  9. Não se aplica</p> <p><b>71. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			/			/							<p><b>72. Qual o resultado da sorologia Anti-HCV?</b></p> <p>1. Positivo  2. Negativo <input type="checkbox"/>  3. Indeterminado  4. Material danificado  5. Extravio  9. Não se aplica</p> <p><b>73. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			/			/																						
		/			/																																				
		/			/																																				
<p><b>74. Qual o resultado do PCR do HPGV?</b></p> <p>1. Positivo  2. Negativo <input type="checkbox"/>  3. Indeterminado  4. Material danificado  5. Extravio  9. Não se aplica</p> <p><b>75. PCR do HPGV:</b> <table border="1" style="display: inline-table; text-align: center;"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table></p> <p><b>76. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>													/			/							<p><b>77. Qual o resultado da sorologia Anti-E<sub>2</sub>HPGV?</b></p> <p>1. Positivo  2. Negativo <input type="checkbox"/>  3. Indeterminado  4. Material danificado  5. Extravio  9. Não se aplica</p> <p><b>78. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			/			/												
		/			/																																				
		/			/																																				
<p><b>79. Qual a quantidade de albumina?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table> <p><b>80. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>											/			/							<p><b>81. Qual a quantidade de hemoglobina?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table> <p><b>82. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>											/			/						
		/			/																																				
		/			/																																				
<p><b>83. Qual a quantidade de AST?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table> <p><b>84. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>											/			/							<p><b>85. Qual a quantidade de ALT?</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table> <p><b>86. Data:</b></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;">/</td><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>											/			/						
		/			/																																				
		/			/																																				

<p><b>87. Qual a quantidade de plaqueta?</b></p> <table border="1" data-bbox="359 338 695 394"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> <p><b>88. Data:</b></p> <table border="1" data-bbox="274 501 778 568"><tr><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>											/			/					<p><b>89. Qual a quantidade de CV do HIV atual?</b></p> <table border="1" data-bbox="938 338 1276 394"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> <p><b>90. Data:</b></p> <table border="1" data-bbox="853 501 1358 568"><tr><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>											/			/				
		/			/																																
		/			/																																
<p><b>91. Qual a quantidade da primeira CV?</b></p> <table border="1" data-bbox="359 680 695 736"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<p><b>92. Data:</b></p> <table border="1" data-bbox="853 680 1358 748"><tr><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td>/</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>			/			/																						
		/			/																																

## Apêndice B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



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

**“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais manifestem, a sua anuência à participação na pesquisa.”** (Resolução. nº 466/2012-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Covidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa (**Coinfecção HPGV/HIV em Pacientes acompanhados em um Hospital Universitário do Recife, Brasil**), que está sob responsabilidade do pesquisador Evônio de Barros Campelo Júnior, (Médico Infectologista). Endereço: Avenida Profº Moraes Rego, s/n Bairro: Cidade Universitária, CEP: 50670-420. Telefones p/contato: 81- 21263902, e-mail: [evoniojunior@iq.com.br](mailto:evoniojunior@iq.com.br), orientado pela Profª Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho, telefone: 21268586.

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

### **Informações sobre a pesquisa:**

- Que o estudo se destina a investigar a ocorrência de um vírus (micróbio), chamado HPGV, em seu sangue, que possa estar ajudando no combate a sua 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 o Sr, que também apresente este vírus e assim ajudar em novos conhecimentos no combate à doença que é portador;

- Que os resultados que se deseja alcançar é conhecer a prevalência do vírus HPGV na população HIV positivo de Pernambuco;
- Que esse estudo continuará o projeto iniciado em julho de 2011 e terminará em fevereiro de 2016.
- Que será agendada uma consulta ao médico responsável por este Estudo, quando será tratada, além de sua rotina clínica, algumas perguntas a mais, devido a sua participação voluntária no estudo, como por exemplo, idade, de que maneira pegou o vírus do HIV, se faz sexo apenas com 01 parceiro, se usa drogas, quantos anos estudou, através de questionário, o qual ficará sob guarda do pesquisador responsável.
- Que a pesquisa será feita pela coleta do seu sangue e análise para verificação da carga de CD4 e quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e SDF (moléculas imunológicas importantes para combater o microorganismo pelo qual é portador), da quantidade de HIV e para verificação da presença do vírus HPGV, HBV e HCV. A coleta e análise serão no laboratório de rotina clínica do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Que os riscos e desconfortos que poderá sentir com a sua 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 sua identificação, sendo minimizada pelo compromisso do responsável pelo estudo de manter sigilo sobre seus dados, garantindo-lhe o direito a privacidade e confidencialidade, sendo excluído seu nome dos formulários da pesquisa, substituído por códigos.
- Que os benefícios diretos que deverá esperar com a sua participação são: o diagnóstico negativo ou positivo da presença deste vírus e das quantidades das quimiocinas, os quais podem ajudar o seu 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 serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, o Sr poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, que o Sr poderá retirar este seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da sua participação não permitirão sua identificação, exceto ao responsável pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que o Sr deverá ser indenizado por qualquer despesa que venha a ter com a sua participação nesse estudo e, também, por todos os danos que venha a sofrer pela

mesma razão, sendo que, para essas despesas, lhe será garantida à existência de recursos.

- Finalmente, tendo o Sr compreendido perfeitamente tudo o que lhe foi informado sobre a sua participação no mencionado estudo e estando consciente dos seus direitos, das suas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a sua participação implica, concorde em dele participar e para isso Sr Dá O SEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO o Sr TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

**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](mailto:cepccs@ufpe.br)

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

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

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Apêndice C – Artigo 1 em inglês****CCR5 GENE POLYMORPHISM AND CONCENTRATION OF MIP-1 $\alpha$  AND SDF-1  
IN PEOPLE LIVING WITH HIV/AIDS COINFECTED WITH HPgV**

Evônio de Barros Campelo Júnior <sup>1</sup>, Kláudia Emanuela Ramos Tenório<sup>3</sup>; Juliana Prado Gonçalves<sup>2</sup>; Viviane Martha Santos de Moraes<sup>2</sup>; Thaysa Regina Lopes<sup>2</sup>; Valdir Queiroz Balbino<sup>3</sup>; Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnio<sup>3</sup>; Ricardo Arraes de Alencar Ximenes<sup>1,4</sup>; Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduation in Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Virology Sector, Keizo-Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Genetics, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

\*Corresponding author

E-mail: rcoelholika@gmail.com

## Abstract

Genetic and immunological mechanisms may be associated with a slower progression of human immunodeficiency virus (HIV) infection, especially in coinfecting with human pegivirus (HPgV). The objective was to verify, *in vivo*, an association of the concentration of MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 and the CCR5-corrector polymorphism with HIV viral load and TCD4 count in people living with HIV / AIDS coinfecting with HPgV. A cohort study was performed in two moments (2011 and 2015) with samples from the Virology Sector Laboratory of Immunology Laboratory Keizo Asami (LIKA) of UFPE, people living with HIV/AIDS (PLWHA) HPgV RNA negative and positive patients, not accompanied by an Infectious and Parasitic Outpatient Clinic at the UFPE Hospital das Clínicas, Recife, Brazil. To investigate the CCR5/ $\Delta$ 32 polymorphism the DNA was extracted by the mini-salting methodology and a genotyping performed by real-time PCR using Taqman<sup>®</sup> probes (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Quantification of MIP- $\alpha$  and SDF-1 was performed by an enzyme immunoassay (ELISA) at home, using antibodies and enzymes from eBioscience<sup>®</sup>, (Waltham, MA-USA). For statistical analysis and used software Rstudio version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A), through the chi-square ( $X^2$ ), Wilcoxon, ANOVA and T tests. The Hardy-Weinberg test was applied to verify if the population was in equilibrium. We analyzed 98 samples of people living with HIV / AIDS (PLWHA), being 56.1% (55/98) females and an average age of the population for 40 years. Of these, 22 were HPgV-RNA positive and 76 HPgV-RNA negative. No association was found for CCR5 alleles and CCR5 genotypes in positive and negative HPgV-RNA, but the CCR5 / CCR5 genotype frequency was high. As concentrations of MIP- $\alpha$  and SDF-1 were raised in positive HPV-RNA, corroborating the studies, *in vitro*, representing a beneficial effect on the progression of the disease.

**Keywords:** CCR5 polymorphism, serum concentration, Mip- $\alpha$ , SDF-1, HPgV/HIV

## Introduction

Since the discovery of the human immunodeficiency virus (HIV), several studies have sought to identify factors associated with the slower progression of HIV infection. One of these factors would be the co-infection with the human pegivirus (HPgV) and, therefore, the understanding of the immunological mechanisms involved in this co-infection as serum levels of chemokines have been studied *in vitro* and *in vivo* [1-4,].

*In vitro* studies have shown that in HIV / HPgV coinfection there is a decrease in HIV replication, which would be related to the increase in the chemokines, MIP-1 $\alpha$  and SDF-1, which are natural ligands of the coreceptors, CCR5 and CXCR4, respectively [5,6 ]. In addition, these chemokines would promote changes in the expression levels of their coreceptors, preventing the entry of HIV into the cell [7].

On the other hand, *in vivo* studies did not find an association between MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 levels with HIV / HPGV coinfection bringing benefit to coinfecting patients, most probably due to the fact that the patients involved in both studies were using monotherapy and dual antiretroviral therapy [8,9].

Therefore, the objective of the study was to verify, *in vivo*, the serum level of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 and its association with HPGV infection in people living with HIV / AIDS.

## **Methodology**

### **Population and place of study**

A cohort study was carried out at two moments, from samples of people living with HIV / AIDS (PLHA) and infected with HPGV, followed at the Infectious and Parasitic Diseases Clinic of the UFPE Hospital das Clínicas, Recife, Brazil. Patients with HPGV RNA, quantitative PCR (qPCR) performed at the Clinical Virology Laboratory of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) and negative HPVV RNA were considered as positive HPGV. Patients using immunosuppressants were excluded from the study, and 95% of the patients were taking antiretroviral therapy (HAART). This study was approved by the research ethics committee of UFPE (process: 20125113.0.0000.5208) and all participants signed the informed consent form.

### **Serum levels of MIP-1 $\alpha$ and SDF-1**

Serum levels of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 were performed by an in-house enzyme immunoassay (ELISA) using antibodies and an enzyme from eBioscience® (Waltham, MA-USA).

### **HIV viral load and TCD4 count**

Plasma concentration of HIV RNA was determined by quantitative PCR using commercial kit (Abbott® RealTime HIV1) and the TCD4 count was performed by flow cytometry (Facscalibur®) immunophenotyping, both obtained from the medical records.

## Statistical analysis

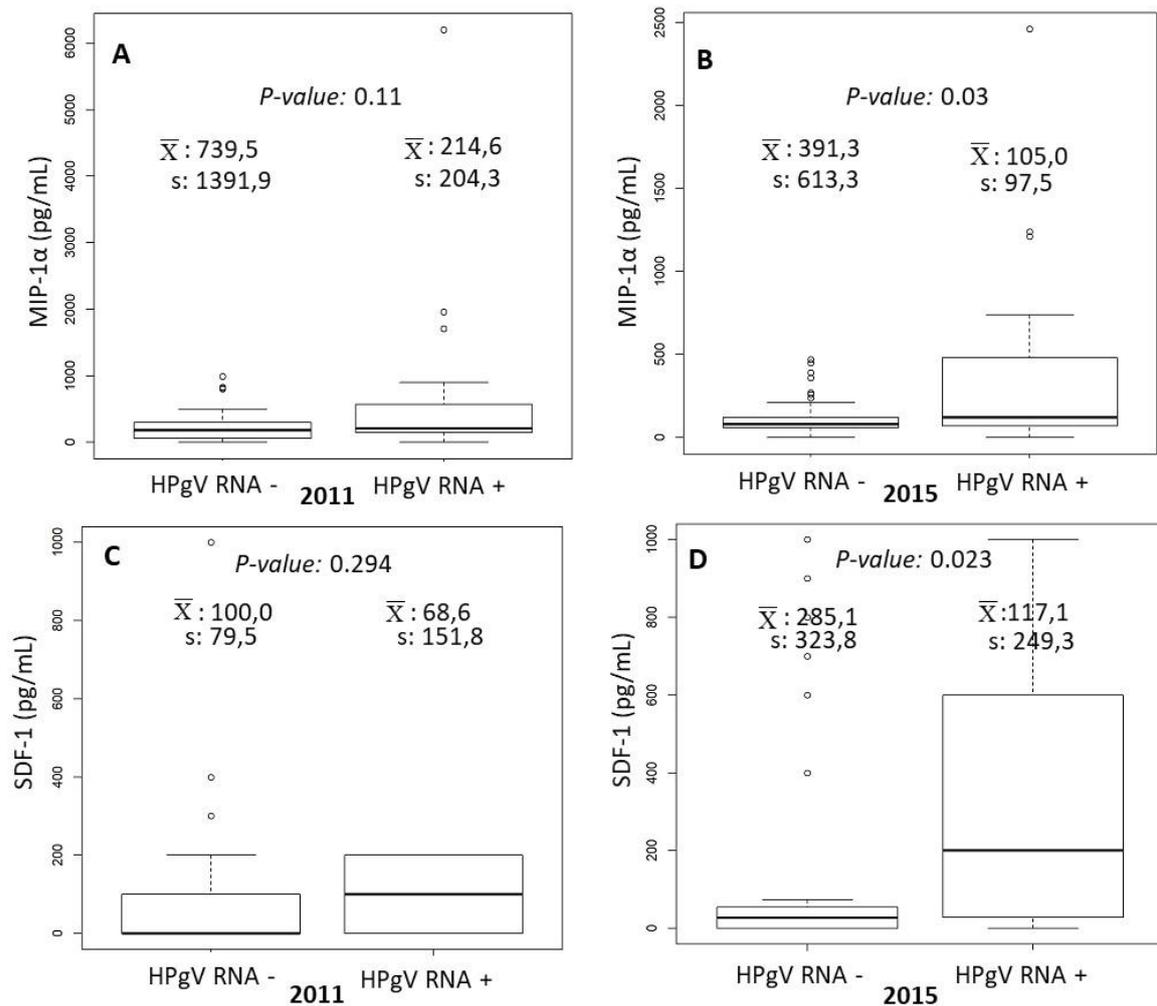
In order to verify the association of categorical variables, sex and race, with the presence of HPGV RNA, the Chi-square test ( $X^2$ ) was used and the ANOVA was the median TCD4 count. The normally distributed MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 continuous variable means were compared across the HPGV infection status using a t-test. The averages of the continuous variables that were not normally distributed were compared by the Wilcoxon® test. All p values were two-tailed. Although only p-values <0.5 were considered statistically significant, other p-values were provided. Statistical analyzes were performed using software version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A).

## Results

We analyzed 98 people living with HIV / AIDS (PLHA), 76 HPgV-RNA negative and 22 HPgV-RNA positive individuals. A prevalence of 72.7% (16/22) in the female sex and 35.5% (27/76) in the negative HPgV-RNA was found ( $p = 0.004$ ).

Figure 1 shows the comparison of the mean serum levels of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 in negative and positive HPgV RNA people in the years 2011 and 2015. In the year 2015, the mean serum levels of MIP-1 $\alpha$  and SDF were statistically significant in HPgV RNA positive, when compared to HPgV RNA negative.

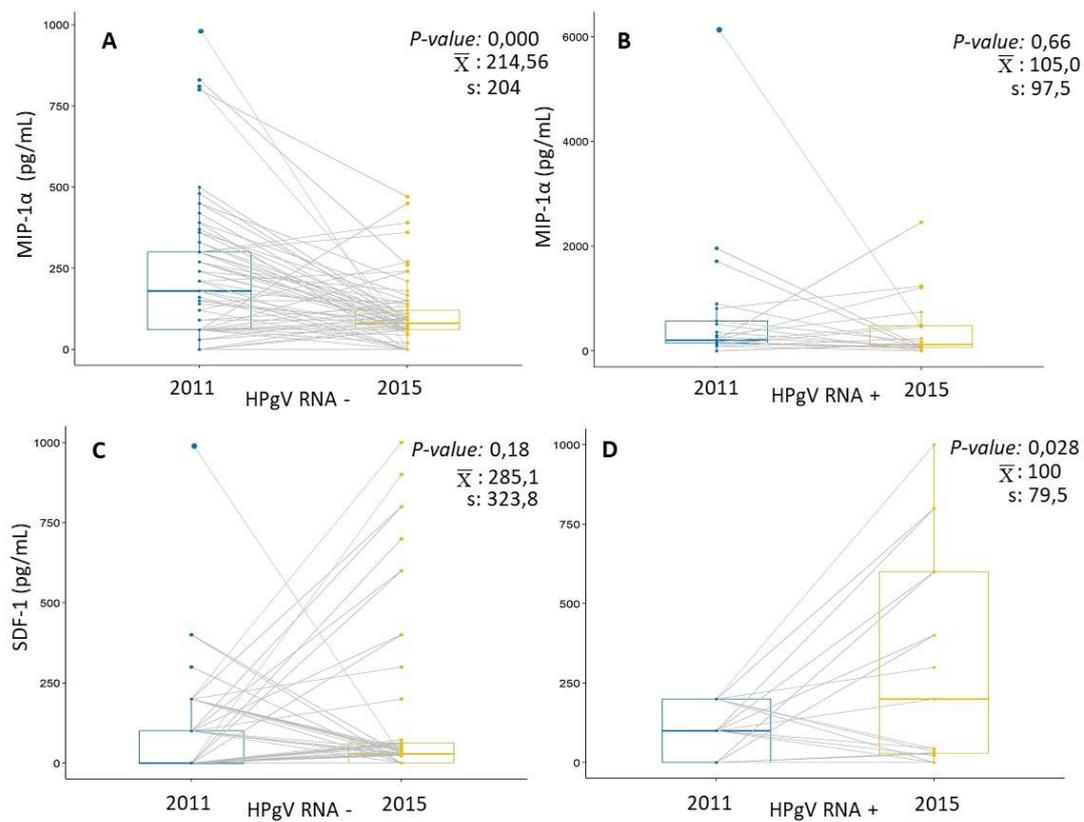
**Fig 1. Mean serum levels of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 in negative and positive HPgV RNA people in the years 2011 and 2015.**



A and B: MIP-1 $\alpha$  concentration. C and D: SDF-1 concentration. P value obtained by the T test;  $\bar{X}$ : Average; s: Standard Deviation.

In figure 2 are the concentrations per person / year of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 in negative and positive HPgV RNA patients in the years 2011 and 2015. MIP-1 $\alpha$  presented a reduction in the mean concentrations of monoinfected in the year of 2011 in relation to the year 2015. For the SDF-1, there was an increase in the means of concentrations in coinfectados, in the year 2015.

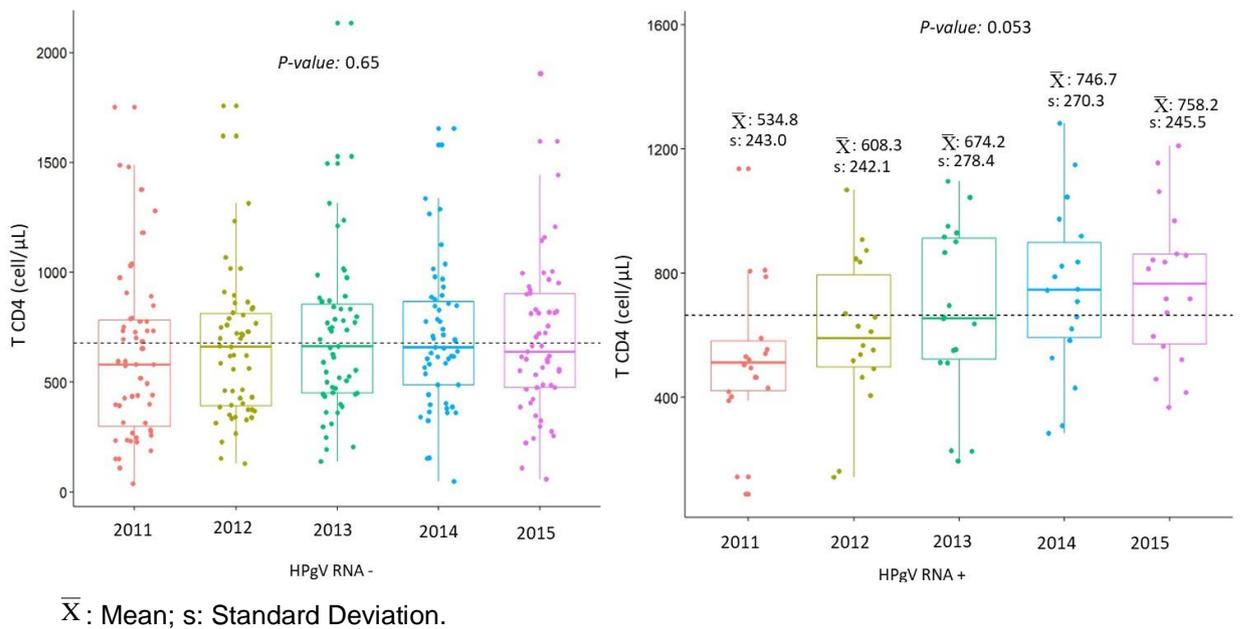
**Fig 2. Serum levels of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 by negative and positive HPgV RNA individuals in the years 2011 and 2015**



A and B: MIP-1 $\alpha$  concentration. C and D: SDF-1 concentration. P value obtained by the Wilcoxon test;  $\bar{X}$ : Average;  $s$ : Standard Deviation.

figure 3 shows the mean of the TCD4 count in positive and negative HPGV RNA subjects from 2011 to 2015.

**Fig 3. Mean of the TCD4 count in negative and positive HPGV RNA individuals from 2011 to 2015.**



## Discussion

In this study, the serum levels of the MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 chemokines were evaluated in patients with presence and absence of HPGV RNA and the association with the HIV viral load and mean of the TCD4 counts.

In our study, elevated serum levels of MIP-1 $\alpha$  in HPV RNA-positive, in the year 2015, when compared to negative HPGV RNA (figure 1B), may suggest a beneficial effect, since a higher concentration of MIP-1 $\alpha$  would facilitate its binding to CCR5 preventing the entry of HIV (R5 strain) into cells. However, in a study of women living with HIV / AIDS and coinfecting with HPGV who were not under HAART, no elevated levels of MIP-1 $\alpha$  were found in the coinfecting women, thus not being attributed a beneficial effect of coinfection (Blackard et al. Similarly another study found no association between elevated levels of MIP-1 $\alpha$  in people with HPgV positive RNA [9]

Our data corroborate the in vitro studies [6,10], which have demonstrated inhibition of HIV entry into cultures of HPGV-infected cells.

The results of SDF-1 elevations for co-infected patients in 2015, when compared to 2011 (figure1D), may also show a beneficial effect in coinfecting patients. First, the higher concentration of SDF-1 would cause it to bind to the CXCR4 co-receptor. Second, this would provide reduced expression of the available CD4 CXCR4 coreceptors for HIV binding and, third, as a consequence, there would be an impediment of entry of the HIV X4 strain into the cells. These data are also consistent with in vitro studies [6,10], which demonstrated inhibition of entry of HIV strain X4 into HPGV cell cultures.

The fact that we found a decrease in the concentration of MIP-1 $\alpha$  in 2015 when compared to monoinfected in 2011 (figure 2A), and we did not observe the same in coinfectados (figure2B), demonstrates that the presence of HPGV is associated with the high concentrations of MIP- 1 $\alpha$ . Regarding SDF-1, our data showed that SDF-1 concentrations increased for the co-infected in 2015, when compared to 2011 (figure2D). What was not observed in relation to the monoinfected ones (figure 2C), i.e., the presence of HPgV also determines high SDF-1 concentrations.

The only in vivo studies addressing MIP-1 $\alpha$  and SDF-1, which was conducted by Blackard et al. [8] and, Mireia et al. [9], found no association of the concentration of these chemokines with HPgV. Probably because these studies were performed in patients who were not taking HAART, using monotherapy or dual therapy. The absence of effective antiretroviral therapy makes it difficult to suppress HIV viral load and leads to a higher serum level of the virus. Thus, there will be large numbers of HIV specimens competing with MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 for CD4 + T-cell lymphocytes, both in coinfectados and in monoinfected animals. In our study, 94% of patients were using HAART in 2011 and almost 100% in 2015.

After performing the association between chemokines and coinfection, we sought to determine the association of HPGV with HIV disease progression. Therefore, in this research, we tried to use the TCD4 count as a prognostic marker.

In relation to the TCD4 count, we found an increase in the means of CD4 between the years 2011 to 2015 in coinfectados patients, but we did not observe in monoinfected patients (figure 3) and, therefore, we can suggest that HPGV does

present a protective effect to coinfecting patients as demonstrated in in vitro studies [2,5,11,12,13].

However, in relation to the viral load, there was an impairment in the inferences of the results, since the high number of people with undetectable viral loads due to the regular use of HAART, in a significant portion of our population, affected the averages.

In conclusion, this study was the first to show the association, in vivo, of MIP-1 $\alpha$  and SDF-1 concentrations with HPgV positive RNA, suggesting a better prognosis in HPVV coinfecting PLHA, since these chemokines would bind to respective coreceptors CCR5 and CXCR4, decreasing the expression of the coreceptors in TCD4. Therefore, our findings may contribute to the understanding of the immunological mechanism of coinfection and thus provide new perspectives in the understanding of other ways of combating HIV using strategy HPGV.

## **Acknowledgments**

The authors thank the patients of the Infectious and Parasitic Diseases Clinic of the Hospital das Clínicas - Federal University of Pernambuco, who agreed to participate in this research.

## References

1. Williams C, Klinzman D, Yamashita M, Xiang J, Polgreen P, Rinaldo C, et al. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. *N Engl J Med*. 2004;350: 981–990. doi:10.1056/NEJMoa030107
2. Vahidnia F, Petersen M, Stapleton J, Rutherford G, Busch M, Custer B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. *Clin Infect Dis*. 2012;55: 1012–1019. doi:10.1093/cid/cis589
3. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of Coinfection with GB Virus C on Survival among Patients with HIV Infection. *N Engl J Med*. 2001;345: 707–714. doi:10.1056/NEJMoa003364
4. Nattermann J, Nischalke H-D, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*. 2003;17: 1457–1462. doi:10.1097/01.aids.0000076271.76134.58
5. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 15570–15575. doi:10.1073/pnas.0604728103
6. Xiang J, George SL, Wünschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. *Lancet*. 2004;363: 2040–2046. doi:10.1016/S0140-6736(04)16453-2
7. Ostrowski M a, Justement SJ, Catanzaro a, Hallahan C a, Ehler L a, Mizell SB, et al. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol*. 1998;161: 3195–201. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743388>
8. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, et al. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol*. 2017;89: 1904–1911. doi:10.1002/jmv.24836
9. Mireia Giménez-Barcons, Meritxell Ribera, Anuska Llano, et al. Analysis of Chemokine and Cytokine Expression in Patients with HIV and GB Virus Type C

- Coinfection. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:1342–9.  
[doi.org/10.1086/429320](https://doi.org/10.1086/429320)
10. Benkirane M, Jin D, Chun R, Koup R, Jeang K. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by CCR5 $\Delta$ 32. *J Biol Chem*. 1997;272: 30603–30607. doi:10.1074/jbc.272.49.30603
  11. 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: 173–180. doi:10.1111/j.1468-1293.2006.00366.x
  12. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Spengler U, Rockstroh J. A review of GB virus C co-infection in advanced HIV type-1 disease. *Eur Infect Dis*. 2011;5: 27–30. doi:10.3851/IMP1602
  13. Tillmann H, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber J, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2001;345: 715–724. doi:10.1056/NEJMoa010398

**Apêndice D – Artigo 2 em inglês****CLINICAL ASPECTS OF IL-4 AND IL-10 POLYMORPHISM IN PVHA  
COINFECTED WITH HPGV**

Evônio de Barros Campelo Júnior<sup>1</sup>, Kláudia Emanuela Ramos Tenório<sup>3</sup>; Juliana Prado Gonçalves<sup>2</sup>; Viviane Martha Santos de Moraes<sup>2</sup>; Thaisa Regina Rocha Lopes<sup>2</sup>; Valdir Queiroz Balbino<sup>3</sup>; Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior<sup>3</sup>; Ricardo Arraes de Alencar Ximenes<sup>1,4</sup>; Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduation in Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup> Virology Sector, Keizo-Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Genetics, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Center for Biosciences, Federal

University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

\*Corresponding author

E-mail: rcoelholika@gmail.com

## Abstract

**Background:** interleukin polymorphisms, such as IL-4 and IL-10, may be involved in the clinical course of HIV infection. IL-4 regulates the expression of the CXCR4 coreceptor leading to the induction of syncytium-forming variants. And in the CCR5 coreceptor of non-syncytia-inducing viruses, it reduces their regulation. *In vivo* studies demonstrated that the -589C / T polymorphism in the IL-4 gene was associated with a reduction in HIV viral load at the onset of infection, slowing the progression of the disease. IL-10 polymorphism, on the other hand, may act by inhibiting or inducing HIV replication. In treatment-naive patients, it was observed that carriers of the G allele had a reduction in mortality and a decrease in the CD4 count, indicating an important role of this polymorphism in the progression of HIV disease. However, there are no data on these polymorphisms in PLHIV coinfecting with HPGV. Therefore, the objective of the research was to verify the association of IL-4 and IL-10 polymorphisms in HIV / HPgV coinfecting individuals.

**Methods:** a cohort study with PLWHA was carried out, accompanied at the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient of Clinical Hospital of UFPE, Recife, PE, Brazil. DNA extraction was performed by mini-salting methodology and genotyping of the polymorphisms was performed by real-time PCR using probes for IL-4 -589 C / T (C\_16176216\_10) and IL-10 -1082 A / G (C\_1747360\_10 ) from Taqman® (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. Chi-square ( $X^2$ ), Fisher exact, Wilcoxon test, Anova, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed using Rstudio software version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A.).

**Result:** we analyzed 98 PLHA, of these 22 coinfecting with HPGV, whose samples were stored in the Virology Sector of LIKA of UFPE. There was an association between IL-10 polymorphism and HIV viral load reduction

**Conclusions:** the association of the IL-10 polymorphism found suggests that the presence of the G allele in HIV/HPgV coinfecting individuals may lead to a favorable prognosis of HIV disease in the chronic phase. The research showed for the first time the frequency of alleles and genotypes of IL-4 and IL-10 polymorphisms in HIV/HPgV individuals, despite the size limitation of the population studied.

**Keywords:** HIV, HPgV, IL-4, IL-10, Polymorphism.

## Background

Coinfection of human pegivirus (HPgV) with human immunodeficiency virus (HIV) may lead to slower progression of HIV disease [1-3]. Research has shown that genetic and immunological mechanisms mediated by IL-4 and IL-10 cytokines play an important role in the progression of HIV disease [4,5].

IL-4 is reported to differentially regulate two major co-receptors, CXCR4 for syncyticity inducing virus (SI) and CCR5 for non-syncytia inducing variants (NSI). In CCR5, it can act by reducing the regulation of CCR5 expression and thus inhibiting the replication of HIV NSI isolates in human T cells and macrophages. On the other hand, IL-4 can regulate the expression of CXCR4 leading to the induction of SI variants, mainly observed at the advanced stage of HIV disease progression [4,6].

Spellberg et al. Carried out a study reporting the relevance of the T-helper cell response in HIV and demonstrated that the progression to AIDS is related to the inability of mononuclear cells to produce TH1 cytokines (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) and promote cytokine production of the TH2 response (IL-4 and IL-10) [7].

In vivo studies demonstrated that the -589C / T polymorphism in the IL-4 gene was associated with a reduction in HIV viral load at the onset of infection, slowing the progression of the disease and suggesting that the protective effect is partly due to , reduced replication and HIV dynamics [4,8].

Regarding IL-10, it was observed, in vitro, that the inhibitory or inductive effects on HIV replication depend on its concentration. Elevated levels of this cytokine were found in patients, particularly in lymph nodes, whereas progression to disease was associated with a decrease in IL-10 expression [9]. In treatment-naive patients, G-allele carriers have been shown to have reduced mortality and decreased CD4 count [10], indicating an important role of IL-10 gene polymorphism in the progression of HIV disease. Therefore, the objective of this study was to evaluate the association of IL-4 and IL-10 polymorphisms with CD4 count and HIV viral load in people living with HIV / AIDS (HALP) coinfecting with HPGV.

## Methods

### Study population

Based on a cross-sectional study carried out in 2011, negative and positive PVHA-HPgV RNAs were evaluated at the Infectious and Parasitic Diseases Clinic of the Hospital das Clínicas of UFPE, Recife, Brazil, involving 249 HIV-positive patients, of which 59 were diagnosed as positive HPV RNA in 2011, a cohort study was started with 98 patients out of 249 to be followed at 03-month intervals by 2015, through outpatient visits, 76 of which were RNA-negative and 22 RNA-positive. Patients on immunosuppressants were not included in the study and at baseline, only 5% of patients still did not use antiretroviral therapy (ART). The diagnosis of HPGV was performed through quantitative PCR (qPCR) at the Federal University of São Paulo (UNIFESP). The initial study showed a prevalence of 23.7% of HPGV RNA among the 249 patients. This study was approved by the research ethics committee of UFPE (process: 20125113.0.0000.5208) and all participants provided informed voluntary consent prior to sample collection and clinical data.

### IL-4 and IL-10 polymorphisms

The genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes following the mini-salting out protocol [11] and quantified in a spectrophotometer (260nm / 280nm) with subsequent dilution to the 50 ng concentration. The polymorphisms of IL-4 Cys16176216\_10 (rs2243250) and IL-10 Cys1747360\_10 (rs1800896) were identified through qPCR using the TaqMan (Applied Biosystems® TaqMan Genotyping Assays) system and the qPCR amplification solution for both polymorphisms was performed using 5 µL of 2x TaqMan, 0.5 µL of each probe, 3.5 µL of ultrapure nucleate free water and 1 µL of DNA, with a final volume of 10 µL. The temperature profile used in thermocycling was 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and 40 replicates of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Fluorescence detection was determined by the 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) at each amplification cycle and thereafter analyzed by Sequence Detection Software v1.3 (SDS, Applied Biosystems).

### Statistical analysis

Statistical analyzes were carried out using the software R version 1.0.143 (Northern Ave, Boston, M.A), using chi-square ( $X^2$ ) tests to verify association of categorical variables, sex and race, with HPgV infection. ANOVA was performed for the variable TCD4 count. The SNPStats software [12] was used to calculate the allelic, genotypic, and Hardy-Weinberg equilibria. The Hardy-Weinberg test was performed to verify if the population was in equilibrium. All p values were two-tailed. Although only p-values <0.5 were considered statistically significant, other p-values were provided.

## Results

22 HPHA-positive HPVV-RNAs and 76 HPHA-negative HPVV-RNAs were analyzed. The mean age was 39 ( $\pm$  7.70) years in the HPgV-positive RNA and 41 ( $\pm$  8.1) years negative RNA. The female sex had a higher frequency (72.7%) in the positive ( $p = 0.004$ ). Regarding the breed, there were no statistically significant differences between the groups, however, in the positive HPGV-RNA, the majority were browns (68.2%), 4.5% blacks and 27.3% whites. While in HPGV-negative RNA, 57.9% were brown, 15.8% black and 26.3% white.

Table 1 shows the frequency of IL-4 and IL-10 alleles and genotypes in negative and positive HPgVRNA.

**Table 1. Frequency of IL-4 and IL-10 alleles and genotypes in negative and positive HPgV RNA.**

Variables	Negative HPgV	Positive HPgV	<i>p-value</i> <sup>1</sup>	
	RNA n (%)	RNA n (%)		
<b>IL-4(-589)</b>				
<i>Allele</i>				
C	84 (65,5)	22 (58)		
T	44 (34,5)	16 (42)		
<i>Genotype</i>				
C/C	29 (45)	07 (37)	0,71	
C/T	26 (41)	08 (42)		
T/T	09 (14)	04 (21)		
NA	12	03		
<b>IL-10 (-1082)</b>				
<i>Allele</i>				
A	90 (71,5)	26 (65)		
G	36 (28,5)	14 (35)		
<i>Genotype</i>				
A/A	32 (51)	08 (40)	0,70	
A/G	26 (41)	10 (50)		
G/G	05 (08)	02 (10)		
NM <sup>2</sup>	13	02		

<sup>1</sup>*p-value* Chi-square test; <sup>2</sup> Not measured.

Figure 1 shows association of IL-4 polymorphism with counts of CD4 T-cells in negative and positive HPgV RNA

**Figure 1. Association of IL-4 polymorphism with the TCD4 count in negative and positive HPgV RNA in 2011.**

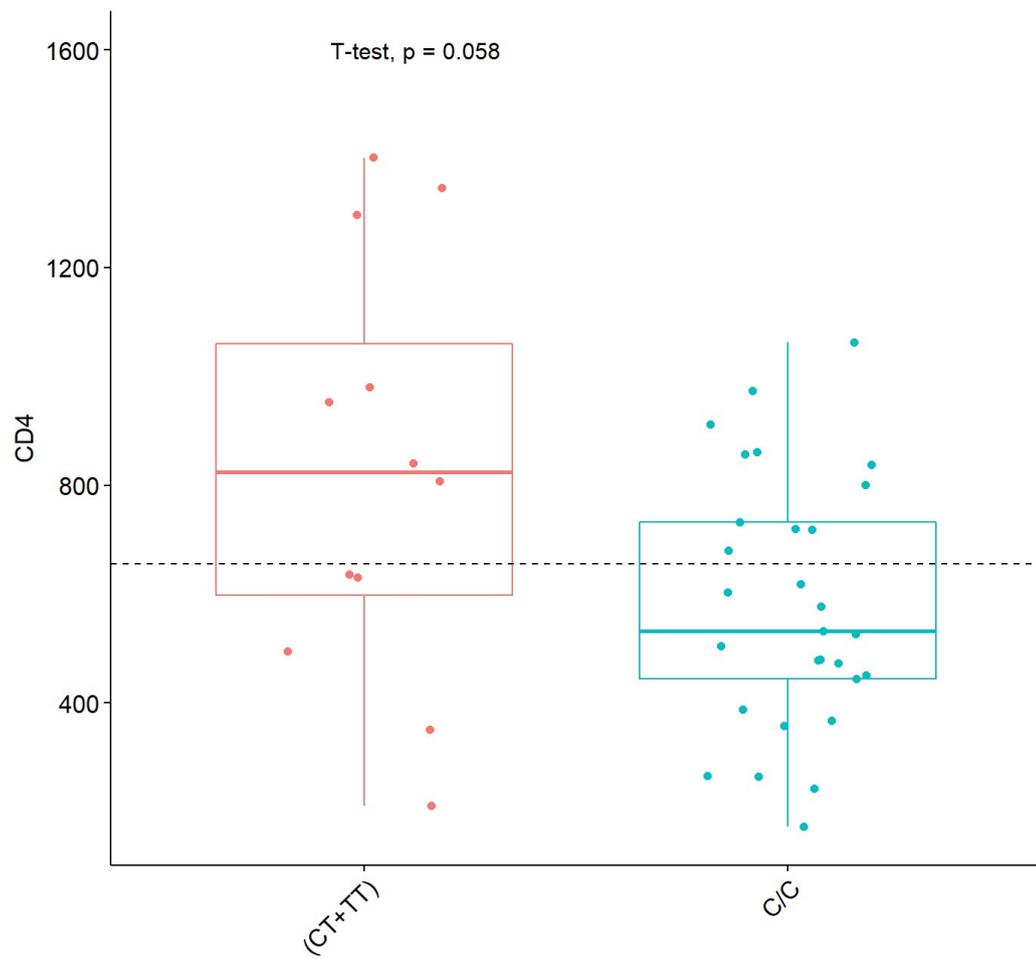
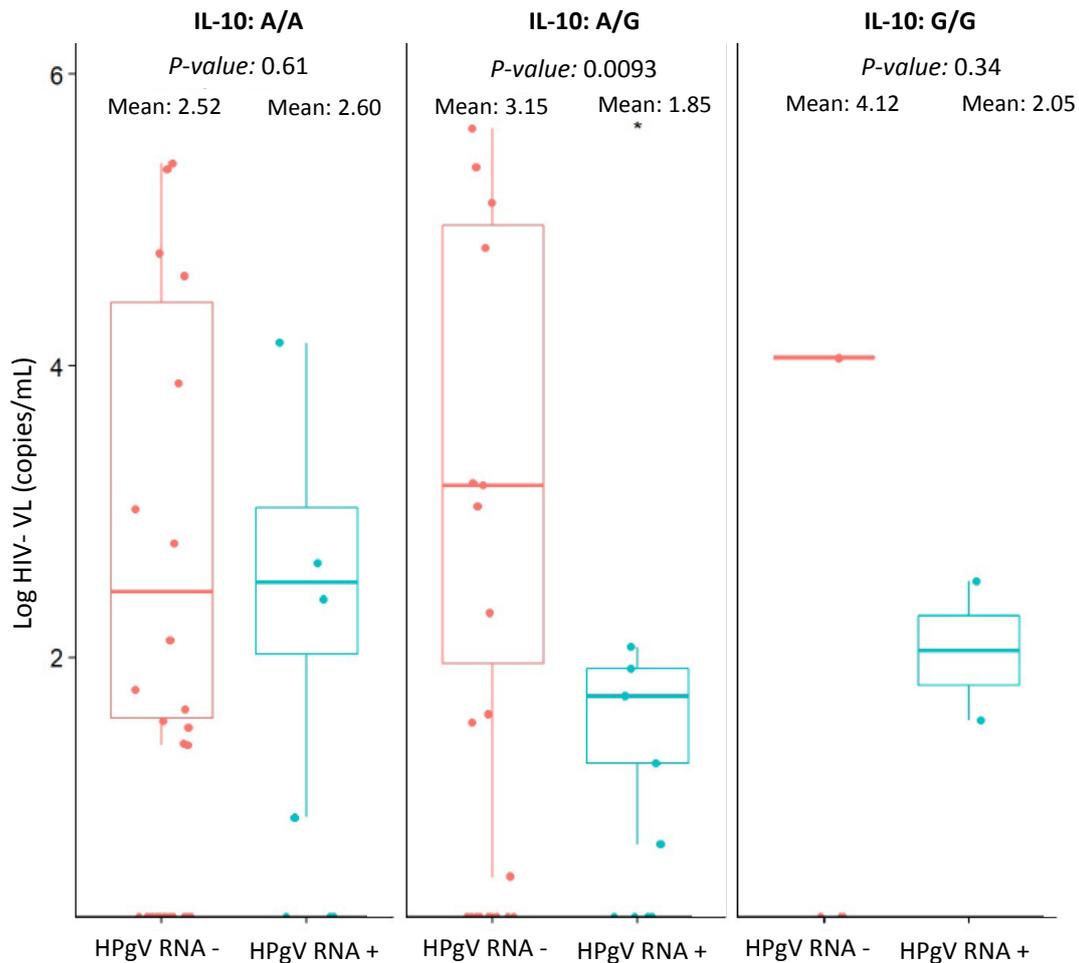


Figure 2 shows the association of IL-10 with HIV viral load in negative and positive HPgV RNA.

**Figure 2. Association of IL-10 with HIV viral load on negative and positive HPgV RNA.**



## Discussion

Our research aimed to demonstrate the association of IL-4 and IL-10 polymorphism with the CD4 count and HIV viral load in HIV / HPVV individuals. Studies on monoinfected with HIV have shown that the presence of the -589T allele of IL-4 decreases CCR5 expression and thereby inhibits replication of the HIV R5 strain. If we believe that R5 viruses are resistant to neutralizing antibodies while X4 viruses are sensitive and are rarely detected in later stages [13], it is plausible hypothesis that R5 viruses are primarily responsible for directing immunodeficiency in HIV infection and thus, greater IL-4 expression is associated with a better prognosis [4,6]. Therefore, our results, in addition to being pioneers in the approach to IL-4 polymorphism in HIV / HPVV coinfected patients, are in agreement with studies

demonstrating the association of the IL-4 -589T gene in monoinfected [14,15]. In our study, the presence of the T allele had a higher TCD4 count in HPgV RNA positive individuals than in negative HPVV RNA, demonstrating the possibility of a beneficial effect of the presence of the -589T allele of IL-4 in coinfecting individuals.

Regarding the association of the IL-10 -1082G allele polymorphism with HIV viral load reduction, our findings may suggest that the presence of this allele in HIV / HPVV coinfecting individuals promotes favorable prognosis in HIV disease in the chronic phase as was demonstrated in HIV monoinfected trials [9,10,16]. This polymorphism is linked to the increased concentration of IL-10, which results in decreased immunological activity with reduced viral replication.

As a conclusion, this study was the first to show the association of IL-4 and IL-10 polymorphisms with HPGV, demonstrated by the analysis of prognostic markers such as TCD4 and HIV viral load in HIV / HPVV coinfecting individuals. However, with the limitation of the study, the IL-4 and IL-10 cytokines and the size of the studied population were not measured.

## **Statements**

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Financing**

No funding was obtained for this study.

### **Acknowledgements**

The authors thank the patients of the Infectious and Parasitic Diseases Clinic of the Hospital das Clínicas - Federal University of Pernambuco, who agreed to participate in this research.

## Referências

1. Tillmann H, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber J, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2001;345: 715–724.
2. Xiang J, George SL, Wünschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and SDF-1. *Lancet*. 2004;363: 2040–2046.
3. Stapleton JT. GB Virus Type C (GBV-C), Alternative Denomination Hepatitis G Virus (HGV). *Transfus Med Hemotherapy*. 2005;32: 128–131.
4. Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, et al. Polymorphism in the Interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol*. 2000;74: 5452–5459.
5. Mahajan S, Agosto-Mojica A, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, et al. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396: 348–352.
6. Valentin a, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson a, et al. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 8886–8891.
7. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2001;32: 76–102.
8. Wichukchinda N, Nakayama EE. Protective Effects of IL4-589T and RANTES - 28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. 2006;20: 189–196.
9. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97: 14467–14472.

10. Erikstrup C, Kallestrup P, Zinyama-Gutsire RB, Gomo E, Butterworth AE, Pedersen BK, et al. Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. *Aids*. 2007;21: 2283–2291.
11. Miller S, Dykkes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16.
12. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22:1928–1929.
13. Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H. A group of V3 sequences from human immunodeficiency virus type 1 subtype E non-syncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J Virol*. 2000;74:1069–1078.
14. Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C, Delfraissy JF, Debre P, Mcllroy D, Theodorou I, Shioda T. Protective effect of interleukin-4–589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression: Relationship with virus load. *J Infect Dis*. 2002; 185:1183–1186.
15. Vasilescu A, Heath SC, Ivanova R, Hendel H, Do H, Mazoyer A, et al. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes Immun*. 2003, 4:441– 449.
16. Dshanta D. Naicker, Bingxia Wang, Elena Losina, Jennifer Zupkosky, Susan Bryan, Shabashini Reddy, et al. Association of IL-10-Promoter Genetic Variants With the Rate of CD4 T-Cell Loss, IL-10 Plasma Levels, and Breadth of Cytotoxic T-Cell Lymphocyte Response During Chronic HIV-1 Infection. 2012, 54(2):294-302. doi:10.1093/cid/cir811.

## Anexo A – Parecer do comitê de ética



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

## **Anexo B – Normas das revistas**

1. Artigo 1: Plos ONE

**<http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>**

2. Artigo 2: BMC Infectious diseases

**<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/submission-guidelines>**