



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

REGINA ATHALYS RAFAEL SOARES TELES

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS INTERLEUCINAS 4 E 10 EM
PACIENTES COINFECTADOS HIV/HPgV

Recife
2019

REGINA ATHALYS RAFAEL SOARES TELES

**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS INTERLEUCINAS 4 E 10 EM PACIENTES
COINFECTADOS HIV/HPgV**

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

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Co-orientadora: Dra. Viviane Martha de Moraes

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Elaine Freitas, CRB4:1790

T269a Teles, Regina Athalys Rafael Soares
Concentrações séricas das interleucinas 4 e 10 em pacientes coinfectados HIV/HPGV / Regina Athalys Rafael Soares Teles. – Recife: o autor, 2019.
54 f.; il.
Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Inclui referências, apêndice e anexos.

1. HIV. 2. Coinfecção. 3. Citocinas. 4. Imunologia. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (orientadora). II. Título.

616.9792

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 106)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

REGINA ATHALYS RAFAEL SOARES TELES

**CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS INTERLEUCINAS 4 E 10 EM PACIENTES
COINFECTADOS HIV/HPgV**

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

Aprovada em: 25/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Cecilia Cavalcanti de Albuquerque (Examinadora Externa)
Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES)

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Moreira (Examinadora Externa)
Instituto Adolfo Lutz (IAL)

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

AGRADECIMENTOS

Agradecer, sempre. Agradecer pela aprendizagem, pela evolução, pela melhora como pessoa, pelas amizades. Agradecer a conclusão de mais uma etapa, nessa eterna busca de conhecimentos. Sermos gratos nos torna mais humanos, e mais próximos do criador, a quem peço luz para saber escolher e trilhar os melhores caminhos, não os mais fáceis, mas os caminhos mais certos.

A meus pais David e Maria Aparecida que sempre me apoiaram e me deram meios para seguir em frente. Vocês são para mim exemplo maior de AMOR! Meu “PORTO SEGURO”, me ensinaram o que há de melhor em mim. A minha irmã, meus sobrinhos, que tornam minha vida “mais engraçada”. A minha querida Vó Badu, a vizinha mais fofinha que alguém pode ter! A meus tios e tias em especial Anunciada Rafael que me ajudou de tantas formas que seria impossível descrever, Ademar Rafael sempre com seus valiosos conselhos, Fátima Rafael, Ana Rafael, Antônio Rafael e Eunice. Tenho a certeza e a confiança de que sempre posso contar com vocês.

De todo coração, agradeço a meu esposo Silvino Teles, que fez despertar em mim a paixão pela BIOMEDICINA, por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis e me acompanhar em mais uma jornada. Aos meus filhos Daniel e José Arthur minhas pedras mais preciosas.

Aos meus colegas de trabalho, dos laboratórios Gilson Cidrim, Nossa Senhora do Ó e Real Lab, pela paciência e parceria, em especial a Maria de Fátima.

A minha orientadora Prof.^a Maria Rosângela, por todo apoio, viabilidade, amizade, solicitude, e conhecimentos a mim dedicados. A minha co-orientadora Viviane Marta, pelo apoio e compartilhamento de ideias.

A Dr. Evônio Campello que gentilmente cedeu dados e apoio referentes a essa pesquisa.

Aos colegas (amigos), do setor de Virologia do LIKA, Mel, Marcela, Yan, Luan, Dayvson, Luana e Gabriel. Em especial a Juliana, por toda a sua participação nesse projeto e pelos seus ensinamentos e conhecimento e a Thaísa, também por toda participação nesse projeto e por sua imensa capacidade de consertar “tudo que eu quebro”.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho.

RESUMO

A interação entre o HPgV e o HIV está associada a maior sobrevida nos coinfectados com diminuição da progressão para a aids. O HPgV parece desempenhar um mecanismo de interação com o HIV, através da alteração do meio de citocina/quimiocina, destacando a regulação ascendente das citocinas Th1 e a regulação negativa das citocinas Th2, favorecendo um melhor prognóstico com a diminuição da IL-4 e IL-10. Considerando que a concentração de citocinas no soro de indivíduos coinfectados HIV/HPgV é importante para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos o objetivo desse estudo foi determinar as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em pessoas coinfectadas HIV/HPgV e monoinfectadas pelo HIV, e verificar a associação entre as concentrações dessas citocinas com a carga viral do HIV e do HPgV, e a contagem de linfócitos TCD4. Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle, realizado com 105 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, com média de idade de 40,5 anos, entre os pacientes 54%(57/105) eram do sexo masculino. A quantificação das citocinas foi realizada por *cytometric bead array* (CBA) utilizando kits comerciais Becton Dickinson (BD) no citômetro BD FACSCalibur. Entre os pacientes 70 eram monoinfectados pelo HIV e 35 eram coinfectados HIV/HPgV, a mediana da carga viral do HIV foi mais elevada no grupo de pacientes monoinfectados, a mediana da contagem de linfócitos TCD4 apresentou-se semelhante nos dois grupos. As médias das concentrações da IL-4 e IL10 foram mais elevadas nos pacientes coinfectados, com a IL-4 apresentando valores significativos ($p=0.0013$).

Palavras-chave: HIV. Coinfecção. Citocinas. Imunologia.

ABSTRACT

The interaction between HPgV and HIV is associated with greater survival in those coinfecting with decreased progression to AIDS. HPgV appears to play a mechanism of interaction with HIV through cytokine/chemokine media alteration, highlighting the upward regulation of Th1 cytokines and the negative regulation of Th2 cytokines, such as the decrease of IL-4 and IL-10. Considering that the serum cytokine concentration of HIV/HPgV coinfecting individuals is important for a better understanding of the immunological aspects, the objective of this study was to determine the serum concentrations of IL-4 and IL-10 in HIV/HPgV coinfecting and HIV-monoinfecting persons, and to verify the association between the concentrations of these cytokines with the viral load of HIV and HPgV, and the count of TCD4 lymphocytes. It is an analytical study of the case-control type, carried out with 105 patients attended at the Hospital das Clínicas of Federal University of Pernambuco, with a mean age of 40.5 years, among the patients 54% (57/105) were males. Quantification of cytokines was performed by cytometric bead array (CBA) using commercial Becton Dickinson (BD) kits on the BD FACSCalibur cytometer. Among the patients 70 were monoinfecting by HIV and 35 were HIV/HPgV coinfecting, the median HIV viral load was higher in the monoinfecting patients group, the median TCD4 lymphocyte count was similar in both groups. The mean concentrations of IL-4 and IL-10 were higher in co-infecting patients, with IL-4 presenting significant values ($p = 0.0013$).

Keywords: HIV. Coinfection. Cytokines. Immunology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Comparação das sequências genômicas do HPgV e HCV.....	14
Figura 2 -	Distribuição de prevalências do HPgV em doadores de sangue no mundo.....	16
Figura 3 -	Mecanismos postulados sobre a ação que o HPgV exerce nos pacientes coinfectados com HIV.....	20
Artigo		
Tabela 1-	Carga viral do HIV e HPgV, contagem de linfócitos TCD4 e concentrações da IL-4 e IL-10.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> , síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AZT	Zidovudina
CBA	Cytometric bead array
DIP	Ambulatório de Doenças Infecciosas e parasitárias
HC	Hospital das clínicas
HCV	vírus da hepatite C , do inglês <i>Hepatitis C vírus</i>
HGV	Vírus da hepatite G, do inglês <i>Hepatitis G vírus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , vírus da imunodeficiência humana
HPgV	Pegivirus humano do inglês <i>Human pegivirus</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL -10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL 13	Interleucina 13
PVHA	Pessoa vivendo com HIV/ aids
RATES	<i>Regulated upon activation normal Tcell expressed and secreted</i> , Quimiocina expressa e secretada por célula T normal e regulada por ativação.
TARV	<i>Terapia antirretroviral</i>
VATS	<i>Viral Activation Transmission Study</i> , Estudo de Transmissão de Ativação Viral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
CV	Carga viral

GBV-A	Vírus GB tipo A
GBV-B	Vírus GB tipo B
GBV-C	Vírus GB tipo C
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , Células mononucleares de sangue periférico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	HPgV – Pegivirus humano.....	13
2.2	Epidemiologia do HPgV.....	15
2.3	Coinfecção HIV/HPgV.....	17
2.4	Resposta imune da interação HIV/HPgG.....	18
2.5	Interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10).....	20
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Desenho, população e local do estudo.....	24
4.1.1	Critérios de inclusão.....	24
4.1.2	Critérios de exclusão.....	24
4.2	Categorização das variáveis.....	24
4.2.1	Variáveis dependentes.....	24
4.2.2	Variáveis independentes.....	25
4.3	Armazenamento das amostras.....	25
4.4	Quantificação das citocinas.....	25
4.5	Análise estatística.....	26
4.6	Considerações éticas.....	26
5	RESULTADOS.....	27
6	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICE A - INTERLEUKINS 4 AND 10 SERUM CONCENTRATIONS IN HIV/HPgV COINFECTED PATIENTS.....	45
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	54

1 INTRODUÇÃO

O Pegivirus humano (HPgV), gênero pertencente à família Flaviviridae, é um vírus linfotrófico, com sítios de replicação na medula óssea, tecido linfóide e células mononucleares do sangue periférico, com transmissão pelas rotas sexual e parenteral (GEORGE, VARMAZ, STAPLETON, 2006). Estimativas sugerem que cerca de 750 milhões de pessoas estão infectadas com o HPgV em todo o mundo, aproximadamente 25% dos indivíduos podem desenvolver uma infecção persistente modulando uma resposta imune inata (STAPLETON et al., 2010). No entanto o HPgV tem sido considerado um vírus não patogênico (OSPINA et al., 2018).

A influência da coinfeção HIV/HPgV de forma persistente, tem sido proposta como capaz de reduzir a ativação de linfócitos T, prejudicando a replicação do HIV-1 e aumentando a sobrevida dos coinfectados (MOTA et al., 2016). A influência dessa coinfeção foi inicialmente proposta por Toyoda et al., (1998) e Heringlake et al., (1998), pacientes que possuíam RNA de HPgV no soro apresentaram menor incidência de aids, sugerindo que esta interação seria capaz de retardar a progressão do HIV. Mandaina-Giret et al., (2009), demonstraram que os indivíduos coinfectados apresentavam diminuição dos índices de mortalidade e uma melhora nas condições clínicas, que foram avaliados pela redução da carga viral e aumento da contagem de linfócitos TCD4.

A progressão do HIV está correlacionada com diminuição de citocinas reguladoras da resposta Th1 e aumento da produção de citocinas relacionadas a resposta Th2. A resposta imune Th1, está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, sendo fundamental na diminuição das complicações da infecção, retardando o desenvolvimento e a progressão do HIV para a aids (CAMPOS et al., 2011). A resposta imune Th2, é mais efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares, e direciona uma progressão mais rápida do HIV para a aids (SPELLBERG, EDWARDS 2001; SHING, BLACKARD, 2017).

De acordo com Nunnari et al., (2003), em PVHA, a resposta celular na progressão da infecção pelo HIV está associada a presença de linfócitos T auxiliares capazes de produzir um padrão de resposta Th2, com o aumento das citocinas IL-4 e IL-10. Entretanto em indivíduos coinfectados HIV/HPgV, a manutenção da concentração de citocinas relacionada a resposta TH1 está associado à uma

progressão mais lenta para a aids. Embora nesse estudo não tenha sido encontrada diferença significativa na expressão da IL-4 em coinfectados.

Em 2014, Lanteri et al. relataram uma associação significativa de várias citocinas, na coinfecção HIV/HPgV, descrevendo um efeito protetor, através da baixa regulação imune, diminuição da inflamação e melhora na evolução da doença. Entre as 64 citocinas estudadas, a IL-10 apresentou níveis séricos significativamente diminuídos nos pacientes coinfectados, acompanhados pelo período de quatro anos. Contrariamente, Blackgard et al., (2017) não encontraram associação da IL-10 em coinfectados, porém níveis significativamente baixos da IL-4 foram observados.

Considerando que o HPgV pode influenciar ou modular a resposta imune do hospedeiro, e pela falta de consenso na literatura sobre o efeito IL-4 e IL-10 nessa coinfecção, o objetivo deste estudo foi comparar as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em coinfectados HIV/HPgV e monoinfectados pelo HIV. E verificar a associação das concentrações de IL-4 e IL-10 com a carga viral do HIV e do HPgV e contagem de linfócitos TCD4.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HPgV- Pegivirus humano

Os primeiros estudos sobre o HPgV datam de 1967, quando Friedrich Deinhardt et al., realizaram investigações a partir de casos de pacientes com hepatite não-A, não-B. O soro dos indivíduos que apresentaram um quadro de hepatite de etiologia desconhecida, foi inoculado em sagui (*Saguinus labiatus*), utilizado como modelo experimental. Com a inoculação, os animais apresentaram um quadro clínico de hepatite, com elevação das enzimas hepáticas e alterações histológicas no fígado. Após a realização de sucessivas inoculações foi observada a presença de um agente transmissor causador de hepatite, chamada agente GB (OSPINA et al., 2018).

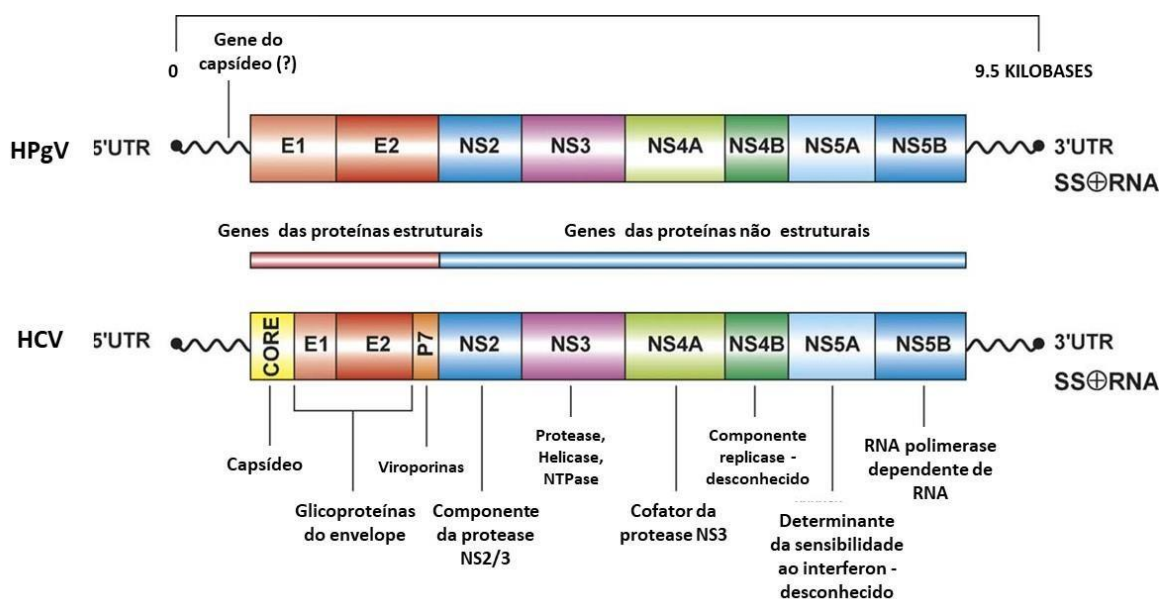
Por falta de metodologias especializadas, em 1967 não foi possível a identificação do vírus, porém em 1995 através de técnicas de biologia molecular, novamente amostras foram inoculadas em macacos, conseguindo identificar a sequência de dois agentes virais relacionados, GBV-A e GBV-B, por sua relação com o agente GB, estes foram incluídos na família *Flaviviridae* (MUERHOFF, et al., 1995). Foi visto que esses dois vírus têm a capacidade de infectar especificamente primatas (YOSHIBA, OKAMOTO, MISHIRO, 1995), embora apenas o GBV-B esteja relacionado ao desenvolvimento de hepatite nesses animais.

No mesmo ano de 1995, Simons et al. identificaram um terceiro agente, em amostras humanas com hepatite não A, não B, não C. Este vírus mostrou uma diferença de 43,8% com as sequências de GBV-A e 28,4% com o GBV-B, sendo denominado vírus GB tipo C (GBV-C). Em outro estudo em 1996, um novo vírus foi aparentemente detectado em um paciente com hepatite crônica de etiologia desconhecida e chamado vírus da hepatite G (VHG), porém ao realizar a análise da sequência foi demonstrada uma alta homologia (95%) com o GBV-C anteriormente relatado, sendo verificado que se tratava do mesmo vírus (FIODALISI et al., 1995; PINHO, DA SILVA, 1996).

O GBV-C / HGV está classificado na família *Flaviviridae* e devido a sua capacidade de gerar infecção persistente foi incluído em um novo gênero, o *Pegivirus*, passando a ser denominado então pegivírus humano (HPgV) (OSPINA et al., 2018). O HPgV é um vírus com genoma de RNA de sentido positivo de 9,4 Kb de cadeia

simples, que apresentam as regiões codificadoras de proteínas estruturais E1 e E2, glicoproteínas do envelope e regiões codificadoras de proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. Possui uma região não codificadora 5'(NCR) e não apresenta proteínas do core viral, sendo conhecidos seis genótipos (SIMONS et al., 1996; BERZSENYI; BOWDEN; ROBERTS, 2005; STAPLETON et al., 2011; SMITH et al., 2016). O HPgV é filogeneticamente relacionado ao vírus da hepatite C (HCV), pois ambos pertencem à mesma família, mas dentro de um gênero diferente (Pegivirus e Hepacivirus, respectivamente) (OSPINA et al., 2018). A figura 1 mostra as sequências genômicas do HPgV e HCV.

Figura 1- Comparação das sequências genômicas do HPgV e HCV



Fonte: Adaptado de Berzsényi, Bowden, Roberts (2005).

O HPgV e HCV compartilham diversas características e são capazes de causar infecção em humanos, porém estima-se que 25% das infecções por HPgV tornam-se persistentes, e em 75% dos casos a viremia clareia em até dois anos da infecção. Diferentemente da infecção pelo HCV, que a cronificação ocorre em 85% dos pacientes (CHIVERO, STAPLETON, 2015).

O ciclo de replicação do HPgV, foi postulado com base no conhecimento do processo de replicação dos flavivírus. Resumidamente, no primeiro estágio, o vírus entra em sua célula-alvo através da interação das glicoproteínas do envelope viral (E1 / 2) e do receptor celular, alguns receptores foram propostos dependendo das células infectadas (JOHANNA et al., 2018).

Estudos iniciais propuseram que o HPgV era hepatotrópico, mesmo após tantos anos de sua descoberta, os locais primários de replicação e os receptores celulares para entrada do HPgV não foram identificados, evidências indicam que o vírus seja linfotrópico (CHIVERO, STAPLETON, 2015). Em infecções crônicas, o RNA do HPgV foi encontrado principalmente em linfócitos T e B, células NK e monócitos de humanos infectados, onde se sugere um amplo tropismo celular (CHIVERO et al., 2014).

Na literatura, tem sido consenso, que o HPgV não cause doença hepática ou agravamento de doença hepática já instalada (FREY et al., 2002); não provoque sintomas ou sinais evidentes de doença (STAPLETON, 2003), e não gere nenhuma ativação do sistema imunológico em imunocompetentes, mesmo permanecendo com altos títulos no sangue, por longos períodos de tempo (BAILEY et al., 2017). A maioria das investigações não conseguiu demonstrar qualquer consequência patogênica do HPgV e a instalação de doenças humanas (BHATTARAI; STAPLETON, 2012).

Entretanto, estudos retrospectivos sugerem uma associação entre a infecção pelo HPgV e o linfoma não-Hodgkin (LNH), a infecção pelo HPgV antecederia o desenvolvimento do linfoma (DE RENZO et al., 2002; MICHAELIS et al., 2003; KERESZTES et al., 2003; GIANNOULIS et al., 2004; CHANG et al., 2014). Outros estudos relataram altas prevalências de HPgV em doenças hematológicas, linfoproliferativas e linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin com prevalências do HPgV de 8 a 13% (DE RENZO et al., 2002; KERESZTES et al., 2003; OSPINA et al., 2018). A coinfeção HPgV e vírus Ebola, caracterizada no estudo de Lauck et al., (2014), mostra sobrevida maior no grupo de coinfectados, comparada com a dos pacientes monoinfectos pelo Ebola. Esse resultado é relevante, diante da alta mortalidade do vírus Ebola, que é de 50% e 90% e para a qual ainda não foi encontrada cura.

2.2 Epidemiologia da coinfeção HIV/HPgV

Os vírus pertencentes ao *Pegivirus* são pouco estudados, o HPgV é cosmopolita, apresentado uma alta prevalência na população mundial (BAILEY et al., 2017). A prevalência ocorre mais frequentemente em indivíduos com fatores de risco para a aquisição de agentes transmitidos por via parenteral, como pacientes expostos a transfusão de hemoderivados, pacientes transplantados, usuários de drogas injetáveis, hemofílicos, e usuários de hemodiálise, constituindo um fator importante

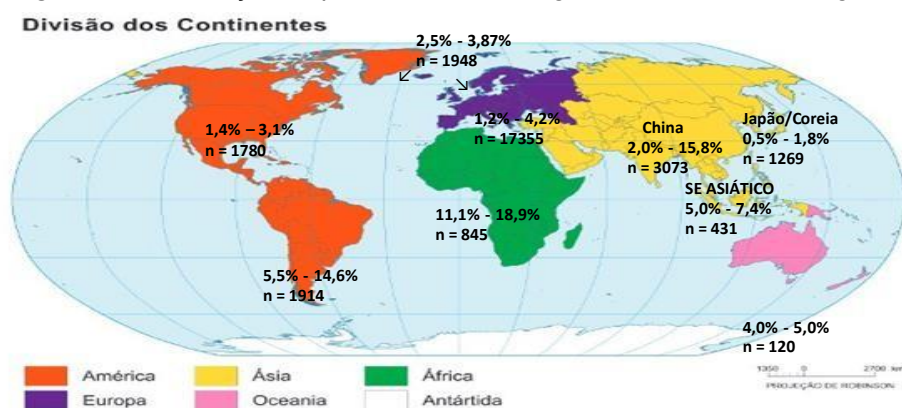
para determinar se este vírus pode estar associado ao desenvolvimento de alguma doença (OSPINA et al., 2018). Devido a compartilhar modos de transmissão semelhantes, a sua prevalência também é alta nas populações infectadas com HIV e HCV (MOHR, STAPLETON, 2009)

De acordo com Vahdnia et al., (2012), o HPgV pode ser transmitido por via parenteral, vertical ou sexual, porém apresentando uma maior frequência de transmissão através de hemoderivados (BHATTARAI, STAPLETON, 2012).

Em populações saudáveis o HPgV apresenta uma prevalência de aproximadamente 1 a 4% na Europa e América do Norte; na América do Sul, África e Ásia varia de 5 a 19% (MOHR, STAPLETON, 2009). Nas PVHA, a prevalência mundial de HPgV varia entre 17% e 89%, de acordo com a região estudada (HERINGLAKEET al., 1998; ALCALDE et al., 2010; CAMPOS et al., 2011; MONDAINA-GIRET et al., 2011; SOUZA et al., 2012; ANGGOROWATI et al., 2013; ERNST et al., 2013; LEE et al., 2014; SAHNI et al., 2014).

Na Tailândia, um estudo de coorte com 245 gestantes coinfectadas com o HIV/HPgV revelou a presença do HPgV em 41% dos bebês recém-nascidos. Foi observado também um aumento da transmissão vertical, quando a mãe fez uso de azidovudina (AZT) durante a gestação, a referida droga não interfere na replicação do HPgV, diferente do que acontece com o HIV, que se apresenta reduzido com o uso da droga (SUPAPOL et al., 2008). Na China, em 748 voluntários doadores de sangue, foi encontrada uma prevalência de 0,13% (1/748) de HPgV-RNA, 11% (82/748) Ac-IgM e 10,6% (79/748) Ac-IgG para o HPgV (XIANG et al., 2014). A figura 2 traz a distribuição da prevalência em doadores de sangue de diversos países do mundo.

Figura 2 - Distribuição de prevalências do HPgV em doadores de sangue no mundo.



Fonte: Adaptado de Mohr, Stapleton 2009.

No Brasil, a prevalência de RNA do HPgV em pacientes HIV-1 positivos foi estimada de 21% a 30% (ALCALDE et al., 2010; CAMPOS et al., 2011; MONDAINAGIRET et al., 2011), em Goiânia uma pesquisa com 241 doadores de sangue, a prevalência encontrada foi de 7,1% (OLIVEIRA et al., 2002). Em São Paulo, um estudo com 102 pacientes HIV positivos, a coinfeção foi de 21% (SOUZA et al., 2012). No sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul (RS) a prevalência de infecção ativa por HPgV em 357 pacientes foi de 34% (MOTA et al., 2016). Em Pernambuco, a prevalência encontrada em coinfectados HIV/HPgV foi de 23,4 % (CAMPELO JR, 2012).

2.3 Coinfecção HIV/HPgV

No ano de 1998 estudos de Toyoda e Henringlake sugeriram que a interação entre o HIV e o HPgV retardaria a progressão do HIV para o desenvolvimento da aids (BLACKARD et al., 2017). Em 1999, Lefrère et al., acompanharam infectados pelo HIV por cinco anos e analisaram a presença do HPgV. No grupo que apresentou HPgV/RNA, as contagens de linfócitos TCD4 foram maiores com menor progressão para aids, melhora da sobrevida e menores cargas virais. Os efeitos benéficos da viremia de HPgV em PVHA, foram relatados em outros estudos (TILLMANN et al. 2001; XIANG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004; SHING, BLACKARD et al., 2017).

O HPgV parece funcionar como um antagonista natural do HIV, uma vez que sua viremia foi associada a uma progressão mais lenta, menos falhas virológicas e mortes nos indivíduos infectados pelo HIV (VAHIDNIA, 2012). A progressão para a aids poderá ocorrer de forma mais lenta em pacientes coinfectados, resultando em menores taxas de mortalidade e melhora nas condições clínicas (XIANG et al., 2001; STAPLETON et al., 2013).

Em uma análise realizada no período pós tratamento para o HIV, com pacientes que já tinham desenvolvido aids e estavam fazendo uso de TARV, a viremia pelo HPgV permaneceu como um fator preditivo de maior sobrevida (TILMANN et al., 2001). Os coinfectados com HPgV são protegidos da depleção de linfócitos TCD4 induzida pelo HIV e da ativação imune patológica que leva a piores prognósticos (STAPLETON et al., 2011; LANTERI et al., 2014).

Em coinfectados, houve uma redução de 2,5 vezes na mortalidade por todas as causas em relação aos monoinfectados pelo HIV. No entanto, o período de

ocorrência e o mecanismo dessa associação protetora não são conhecidos, a maioria dos dados sobre a coinfeção HIV/HPgV vem de estudos realizados durante a fase crônica da infecção pelo HIV. O impacto da viremia por HPgV na infecção precoce pelo HIV, período que corresponde as alterações patológicas no infectado pode modificar o curso da infecção (BAILEY et al., 2017).

2.4 Resposta imune da interação HIV/HPgV

A viremia do HPgV está associada a maior sobrevida, demonstrando que a coinfeção melhora a eficácia e aumenta a resposta à TARV (NUNNARI et al., 2003). Em 2004, Williams et al., demonstraram que a infecção pelo HPgV não seria capaz de exercer efeito protetor nos primeiros 12 a 18 meses da soroconversão do HIV, porém identificaram uma sobrevida significativamente maior no grupo de coinfectados após cinco a seis anos de história de infecção por HIV.

O HPgV interfere na progressão do HIV através de mecanismos que não estão esclarecidos, especula-se um efeito inibitório direto do HPgV na replicação do HIV, ou um efeito potencializador do HPgV na resposta imunológica, ou ainda que o HPgV seja simplesmente um marcador de outro fator não identificado (XIANG et al., 2004). A teoria do efeito inibitório sobre o HIV, leva em conta que ambos os vírus replicam-se em células mononucleares do sangue periférico, a coinfeção dessas células, poderia afetar vários estágios do ciclo de replicação do HIV, como a ligação e fusão as células-alvo da replicação; transcrição reversa; integração ao genoma da célula hospedeira; produção de pró-vírus; transcrição e morfogênese viral; diminuindo a replicação do HIV sem contudo aumentar a toxicidade celular (XIANG et al., 2001, 2004).

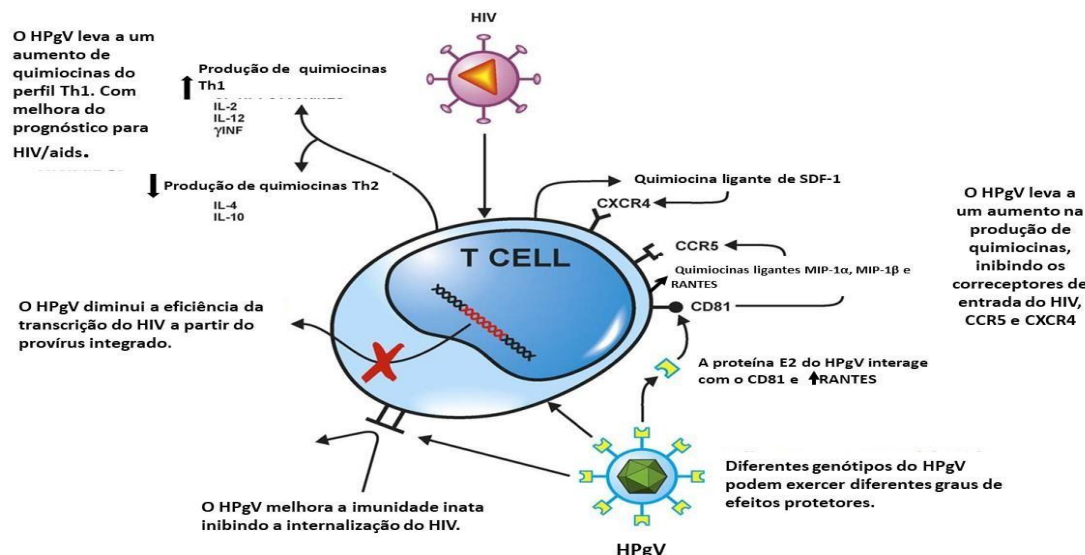
Um mecanismo capaz de explicar o efeito protetor do HPgV em coinfectados foi realizado *in vitro*, demonstrando que o HPgV induz a secreção de citocinas RANTES, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP1- α e MIP-1 β), ligantes do CCR5 e fator derivado de estroma (SDF-1), ligante do CXCR4, correceptores necessários para entrada na célula de cepas do HIV. A indução da secreção das citocinas bloqueia e ou reduz o declínio da contagem de TCD4 (XIANG et al., 2004; SILVA, 2012), os correceptores são fatores importantes na transmissão do HIV e na progressão da infecção, devido a dependência desses para entrada do vírus na célula. O HPgV

influenciaria na diminuição da transmissão do HIV-1 e consequente progressão da imunodeficiência, justificando um melhor prognóstico (MONDAINA- GIRET et al., 2009). No estudo realizado por Natermann et al., (2003), foi demonstrado que a glicoproteína E2 do envelope do HPgV, se liga ao receptor CD81 dos linfócitos T, aumentando também a secreção de RANTES. Nos coinfectados, o efeito protetor, parece acontecer principalmente durante a fase crônica do HIV, o HPgV parece proteger os coinfectados de doenças associadas ao HIV (BAILEY et al., 2017).

As respostas imunes específicas mediadas por células T desempenham um papel importante no controle da infecção pelo HIV, essas respostas podem retardar a progressão da doença (BAGGIO-ZAPPIA, et al.,2011). Assim o efeito indireto do HPgV sobre a progressão do HIV através da melhora da resposta imune, poderia ser explicado por uma reação cruzada, a infecção pelo HPgV estabelecida, levaria a essa resposta T citotóxica mais intensa contra o HIV, apresentando maior controle sobre a replicação da infecção mais recente, pessoas com essa resposta direta contra o HIV, apresentam geralmente progressão mais lenta (MOISER, CHISARI, 2002; CAMPOS, 2011)

No Brasil, Maidana-Giret et al., (2009), observaram uma correlação positiva entre a carga viral do HIV e a porcentagem de células TCD8 + CD38 e também que a viremia pelo HPgV se associava a diminuição de CD38 nos linfócitos TCD4, TCD8 e também de CCR5 nos linfócitos TCD8, independente da carga viral do HIV-1, concluindo que essa associação celular poderia constituir um dos mecanismos envolvidos na proteção conferida por esse vírus. A figura 3, sintetiza os postulados sobre a ação que o HPgV exerce nos pacientes coinfectados com HIV.

Figura 3- Mecanismos postulados sobre a ação que o HPgV exerce nos pacientes coinfectados com HIV



Fonte: Adaptado de Barzsenyi et al., 2005

Proteínas do HPgV parecem participar na regulação e morte celular programada, a HP5V NS5A apresenta resistência ao interferon, atividade antiapoptótica e imunomoduladora. Conclui-se que os linfócitos T em indivíduos com HPgV, apresentam menor expressão do receptor associado com a ativação de apoptose em células T, o que poderia promover a infecção persistente do HPgV nestas células e um efeito positivo no resultado clínico do HIV.

Um estudo realizado em 2012 teve como objetivo analisar a expressão de citocinas em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) durante a infecção por HPgV *in vivo*, e o nível de de citocinas *in vitro*, utilizando linhagens de linfócitos T que expressaram a proteína NS5A do HPgV. Foi demonstrado *in vitro* que a proteína NS5A regula negativamente também citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, sugerindo que a infecção HPgV, particularmente a proteína NS5A, modula expressão de citocinas em células T (RYDZE et al.,2012).

2.5 Interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10)

A diminuição de citocinas do perfil Th1, relacionadas a resposta imune inata, efetiva na defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, e o aumento da produção de citocinas do perfil Th2, relacionadas a resposta imune adaptativa, efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares (SPELLBERG, 2001), está diretamente

associado a progressão da infecção pelo HIV para a aids. A manutenção do perfil de resposta Th1 é fundamental para melhor evolução do sistema imune dos infectados, através do aumento de linfócitos TCD4, diminuição da carga viral e das complicações da infecção, levando a um melhor prognóstico (CAMPOS et al., 2010). Além disso, o HPgV através da ativação do sistema endógeno interferon, resulta no controle parcial da replicação do HIV, dessa forma um efeito anti-inflamatório nos coinfectados é descrito na fase crônica da infecção (LALLE et al., 2008; MOTA et al., 2016).

Na coinfecção, estudo realizado por Nunnari et al., (2003) sobre o perfil de citocinas procuraram explicar a ação do HPgV em PVHA, destacando a regulação ascendente das citocinas Th1 e a regulação negativa das citocinas Th2, levando a um perfil associado a melhores resultados para coinfectados. A viremia do HPgV na coinfecção com o HIV está associada a resposta Th1 estável. Em indivíduos monoinfectados pelo HIV, há diminuição das citocinas Th1 e aumento ao longo do tempo de citocinas Th2 sugerindo melhora na imunidade inata e diminuição da eficiência da transcrição do HIV integrada ao genoma do hospedeiro.

O HPgV parece desempenhar um mecanismo capaz de inibir a replicação do HIV, através da alteração das concentrações das citocina/quimiocina (BLACKARD, et al., 2017). Em PVHA há aumento de IL-4, citocina que possui efeitos anti-inflamatórios, produzida por linfócitos TCD4+, mastócitos e basófilos, sendo a principal responsável pela produção de anticorpos IgE e desenvolvimento de células Th2 a partir de células TCD4+ (DA SILVA, 2007). A diferenciação da resposta Th2 e da IL-10, sintetizada principalmente por células TCD8 e por células dos perfis Th0, Th1, Th2, linfócitos B, mastócitos e monócitos, atua também como um fator facilitador da evasão imune viral e vem servindo como um fator de progressão para a aids (BENJAMIN et al. 1992; POLIZZOTTO, et al., 2013).

A resposta celular na progressão da infecção pelo HIV, está associada ao predomínio da presença de linfócitos T auxiliares, capazes de produzir um padrão de resposta Th2, como a IL-4 e IL-10. Estudo que avaliou a concentração de IL-4 e a IL 10 em 150 mulheres infectadas com HIV, sendo 70 coinfectadas com HPgV, mostrou níveis de IL-4 mais baixos em monoinfectadas e as concentrações da IL-10 não se mostraram associadas entre coinfectadas e monoinfectadas por HPgV (SHING, BLACKARD et al., 2017).

Um estudo envolvendo 30 pacientes coinfectados e 30 pacientes monoinfectados, avaliou os níveis de citocinas no intervalo de 100 a 300 dias após a transfusão sanguínea por ativação viral do HPgV. As concentrações de IL-4 e IL-10 foram mais baixas nos coinfectados. A IL-10 mostrou associação significativa com a carga viral do HIV, independente do uso da TARV e a IL-4 com a carga viral do HIV. Os autores sugeriram um mecanismo independente de HPgV, que leva à diminuição da inflamação e a melhora do resultado da doença do HIV em coinfectados (LANTERI et al., 2014).

Considerando que até o momento as interações imunológicas e o possível efeito protetor da interação entre o HIV e o HPgV não foram totalmente elucidadas; pelo pequeno número de estudos sobre a concentração das citocinas e a participação destas no perfil inflamatório, a quantificação e as associações com a carga viral e com a contagem de linfócitos TCD4, poderá fornecer melhor entendimento da influência dessa coinfeção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em pessoas coinfectadas HIV/HPgV e monoinfectadas pelo HIV, e verificar a associação entre as concentrações dessas citocinas com a carga viral do HIV e do HPgV, e a contagem de linfócitos TCD4.

3.2 Objetivos Específicos

Em pessoas coinfectadas HIV/HPgV e em monoinfectadas pelo HIV:

- Determinar as concentrações séricas das interleucinas IL-4 e IL-10;
- Verificar a associação entre os níveis de IL-4 e IL-10 com a carga viral do HIV, do HPgV e a contagem de linfócitos TCD4;

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho, população e local de estudo

Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle, onde foram definidos como casos PVHA coinfectadas pelo HPgV e controles PVHA, acompanhados no período de 2011 a 2015 no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE, em ambos os grupos os pacientes eram maiores de 18 anos de ambos os sexos. Dados referentes a carga viral do HIV, carga viral do HPgV e contagem de linfócitos TCD4, assim como as amostras sanguíneas utilizadas para dosagens de citocinas foram provenientes do banco de dados e amostras do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

4.1.1 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) com HPgV RNA positivo, através da RT-PCR em tempo real realizada em conjunto com o Ag Path-ID™ One-Step RT-PCR kit (Applied Biosystems) (ALVES-SOUZA et al., 2012).

4.1.2 Critérios de exclusão

PVHA menores de 18 anos e gestantes.

4.2 Categorização das Variáveis

4.2.1 Variáveis dependentes

Variável	Definição conceitual	Categorização
Coinfectados HIV/HPgV	Pessoas coinfectadas por HIV/HPgV	1. Sim 2. Não
Monoinfectados pelo HIV	Pessoas monoinfectadas pelo HIV	1. Sim 2. Não

4.2.2 Variáveis Independentes

Variável	Definição conceitual	Categorização
Sexo	Sexo biológico. Variável nominal dicotômica.	1.Masculino 2.Feminino
Idade	Intervalo de tempo transcorrido desde a data do nascimento até a data de realização da coleta sanguínea (anos)	1. 18–39 2. 40–59 3. > 60
Contagem de linfócitos T CD4	Quantificação de linfócitos T CD4, referida no prontuário do paciente e realizada no período máximo de três meses anteriores a data da coleta da amostra sanguínea, expressa em número de células.	1. < 350 2. 350- 500 3. > 500
Carga viral do HIV	Carga viral do HIV-RNA detectável ou não no soro do paciente, referida no prontuário do paciente e realizada no período máximo de três meses anteriores a data da coleta sanguínea.	1.Detectável > 20 cópias 2.Indetectável < 20 cópias
Carga viral do HPgV	Carga viral do HPgV detectável ou não no soro do paciente.	Variável continua
IL-4	Concentrações séricas de cada paciente. Expressa em pg / mL.	Variável continua
IL-10	Concentrações séricas de cada paciente. Expressa em em pg / mL.	Variável continua

4.3 Armazenamento das amostras

Todas as amostras estavam armazenadas em freezers a -20°C na soroteca do Setor de Virologia do LIKA-UFPE.

4.4 Quantificação das citocinas

A quantificação das citocinas foi realizada por *cytometric bead array* (CBA) utilizando kits comerciais Becton Dickinson (BD) no citômetro BD FACSCalibur™, em colaboração com o Setor de Imunopatologia do IAM/Fiocruz. Para cada dosagem das citocinas (IL-4, IL-10) foram utilizados 25uL de soro (não diluído), com limite de detecção entre 2- 2.500 pg / mL.

4.5 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o teste de Mann Whitney para as variáveis contínuas e foi considerado como significativo um valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* (versão 6.0, San Diego, Califórnia, EUA).

4.6 Considerações éticas

A pesquisa faz parte de um projeto maior intitulado “Coinfecção GB-virus C e HIV em Pacientes acompanhados no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-UFPE em 2011”, e foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE-0276.0.172.000-11) e pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa 232/2011 CEP-CCS.

5 RESULTADOS

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS INTERLEUCINAS 4 E 10 EM PACIENTES COINFECTADOS HIV/HPgV

RESUMO

A interação entre o HPgV e o HIV está associada a maior sobrevida nos coinfectados e diminuição da progressão para a aids. O HPgV parece desempenhar um mecanismo de interação com o HIV, destacando a regulação ascendente das citocinas Th1 e negativa das citocinas Th2, como a diminuição da IL-4 e IL-10, favorecendo um melhor prognóstico para as PVHA. O objetivo desse estudo foi comparar as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em pessoas coinfectadas HIV/HPgV e monoinfectadas pelo HIV, e verificar a associação entre as concentrações dessas citocinas com a carga viral do HIV e do HPgV, e a contagem de linfócitos TCD4. Trata-se de um estudo tipo caso-controle, realizado com 105 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, com média de idade de 40,5 anos, 54% (57/105) eram homens. A quantificação das citocinas foi realizada por *cytometric bead array* (CBA). Entre os pacientes 70 eram monoinfectados pelo HIV e 35 eram coinfectados HIV/HPgV, a mediana da carga viral do HIV foi mais elevada no grupo de pacientes monoinfectados, a de linfócitos TCD4 apresentou-se semelhante nos dois grupos. As médias das concentrações da IL-4 e IL10 foram mais elevadas nos pacientes coinfectados, a IL-4 apresentou valores significativos ($p=0.0013$).

Palavras-chave: HIV. Coinfecção. Citocinas. Imunologia.

1 INTRODUÇÃO

A coinfecção Pegivírus humano (HPgV) e HIV apresenta uma prevalência mundial de 17% a 89% de acordo com a região estudada ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9}.

A interação HIV/HPgV foi inicialmente proposta por Toyoda e Heringlake (1998) ^{10,11}, que relataram que os pacientes com RNA do HPgV tinham menor incidência de aids, sugerindo que esta interação seria capaz de retardar a progressão do HIV. Os

indivíduos coinfectados apresentam diminuição dos índices de mortalidade e melhora nas condições clínicas, com redução da carga viral e aumento da contagem de linfócitos TCD4^{4,12}.

A diminuição das complicações associadas à infecção pelo HIV, estão relacionadas à resposta imune Th1, importante ao retardamento do desenvolvimento da aids³. A importância dessa resposta em relação à resposta Th2 demonstra que a progressão da doença está correlacionada com diminuição de citocinas do perfil Th1 e aumento de citocinas do perfil Th2^{13,14}.

Em PVHA, o aumento das concentrações de citocinas do perfil Th2, como a IL-4 e a IL-10, está associado à uma progressão para a aids¹⁵. Um efeito protetor foi relatado na coinfecção HIV/HPgV, devido a diminuição da inflamação com consequente melhora na evolução da doença¹⁶. Níveis mais baixos de IL-4 foram associados à coinfecção, entretanto não foi encontrada associação da IL-10¹⁷.

Considerando que o HPgV pode influenciar ou modular a resposta imune do hospedeiro, e pela falta de consenso na literatura sobre o efeito IL-4 e IL-10 nessa coinfecção, o objetivo deste estudo foi determinar as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em coinfectados HIV/HPgV e monoinfectados pelo HIV. E verificar a associação das concentrações de IL-4 e IL-10 com a carga viral do HIV e do HPgV e contagem de linfócitos TCD4.

2 METODOLOGIA

2.1 Desenho, população e local de estudo

Trata-se de um estudo analítico do tipo caso-controle, onde foram definidos como casos pessoas coinfectadas HIV/HPgV, e controles pessoas monoinfectadas pelo HIV. Os participantes do estudo eram acompanhados no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). As amostras de soro utilizadas no estudo foram provenientes da soroteca do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE. Dados referentes ao sexo, idade, carga viral do HIV, carga viral do HPgV realizada através da RT-PCR em tempo real, e contagem de linfócitos

TCD4 foram provenientes do banco de dados do setor mencionado. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFPE (CAAE: 0276.0.172.000-11).

2.2 Quantificação das citocinas

A quantificação das citocinas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o método *cytometric bead array* (CBA) com kits comerciais Becton Dickinson (BD) no citômetro BD FACSCalibur™, em colaboração com o Setor de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz. Para cada dosagem das citocinas (IL-4, IL-10) foram utilizados 25uL de soro (não diluído), com limite de detecção entre 2- 2.500 pg / mL.

2.3 Análise estatística

As análises das concentrações das citocinas, contagem de linfócitos TCD4 e análise da carga viral do HIV e HPgV foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* (versão 6.0, San Diego, Califórnia, EUA).

3 RESULTADOS

Participaram do estudo 105 pessoas, no período de 2011 a 2015, com média de idade de 40,5 anos ($\pm 9,2$), dos quais 54% (57/105) eram do sexo masculino. Entre os participantes 70 eram monoinfectados pelo HIV, com 38% (27/70) apresentando carga viral do HIV detectável; dos 35 coinfectados HIV/HPgV, 48%(17/35) estavam com carga viral do HIV detectável. A tabela 1 mostra a carga viral do HIV e HPgV, a contagem de linfócitos TCD4 e as concentrações de IL-4 e IL-10.

Tabela 1 – Carga viral do HIV e HPgV, contagem de linfócitos TCD4 e concentrações da IL-4 e IL-10

	HIV (n=70)	HIV/HPgV (n=35)	Valor de p ¹
CV HIV ² (cópias/mL)	1.971 (51-500.000) ³	600 (56-28.376)	0.2328
CV HPgV ² (cópias/mL)	-	621.3 (5.0 – 7.181) ³	-
LTCD4 ⁴ (células/mm ³)	552.5 (135-2.107) ³	555 (158 – 1.143)	0.8199
IL-4 (pg/mL)	1.379 ⁵	3.722	0.0013
IL-10 (pg/mL)	2.437 ⁵	3.941	0.5743

¹Valor de p obtido pelo teste de Mann Whitney; ²Carga viral; ³valores correspondentes a mediana; ⁴ Linfócitos TCD4; ⁵valores correspondentes a média.

3 DISCUSSÃO

A presente pesquisa comparou as concentrações séricas da IL-4 e IL-10 em coinfectados HIV/HPgV e monoinfectados pelo HIV, e avaliou a associação com carga viral do HIV e do HPgV e a contagem de linfócitos TCD4. Estudos têm associado à viremia do HPgV com a maior sobrevida nos coinfectados pelo HIV, melhorando a resposta imune e eficácia da terapia antirretroviral (TARV) ¹⁵. O HPgV parece interferir na progressão do HIV para aids por mecanismos não esclarecidos, especula-se que há um efeito inibitório direto, potencializador ou protetor da resposta imunológica, ou ainda outro fator não identificado ¹⁸. Além disso, estudo *in vitro* demonstrou que a proteína NS5A do HPgV regula negativamente as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, sugerindo que há modulação da expressão de citocinas em células T ¹⁹.

A resposta imune celular mediada por células T desempenha papel importante no controle da infecção pelo HIV, retardando a progressão da doença²⁰. O efeito protetor indireto do HPgV na coinfecção HIV/HPgV poderia ser explicado por uma reação T citotóxica cruzada levando a uma resposta imune mais intensa, com maior controle sobre a replicação do HIV ^{3,21}. O HPgV parece desempenhar um mecanismo capaz de inibir a replicação do HIV, através da modulação das concentrações séricas de citocinas/quimiocinas¹⁷.

A população de coinfectados estudada apresenta semelhanças com outros estudos, quanto à média de idade de 40,5 anos, corroborando com a pesquisa realizada no Rio Grande do Sul, que foi de < 50 anos¹². Em estudo realizado em São Paulo ⁴, a média de idade foi de 32 anos. Em relação ao gênero, a maior parte dos

participantes eram homens, sendo esses os mais expostos aos fatores de risco relacionados a infecções sexuais.

A redução da carga viral do HIV parece estar associada à presença do HPgV e melhora da sobrevida entre os pacientes coinfectados ^{22,16}. A análise da carga viral do HIV na pesquisa não mostrou diferença significativa entre os grupos, porém esta mostrou-se menor nos coinfectados, sugerindo uma possível redução devido a presença do HPgV. Em estudo realizado com pacientes coinfectados e acompanhados ao longo dos anos, mostrou que durante a viremia do HPgV, houve uma correlação inversa entre a carga viral do HIV e do HPgV ¹⁶. Em nossa pesquisa não foi possível essa observação, uma vez que a carga viral do HPgV foi mensurada apenas uma única vez, constituindo uma limitação do estudo.

Assim como a carga viral do HIV, o aumento da contagem de TCD4 na coinfecção está relacionado com a melhora da resposta imune e melhor prognóstico ^{23,22}. Em nosso estudo, não foi observada diferenças nas contagens de TCD4 entre os grupos, ressaltando que todos os pacientes estavam sob TARV. Em um estudo de coorte, apenas 58% dos pacientes estavam sob TARV e esse mesmo estudo não encontrou associação do TCD4 com a coinfecção HIV/HPgV ²². Por outro lado, estudos que acompanharam os pacientes ao longo do tempo, observaram aumento significativo da contagem de TDC4 entre os coinfectados ^{24,25,16}

Estudo mostrou que baixas concentrações de citocinas e quimiocinas são encontradas na coinfecção HIV/HPgV, sugerindo um efeito anti-inflamatório e protetor ¹⁶. Em nosso estudo, as médias das concentrações da IL-4 foram significativamente mais elevadas nos pacientes coinfectados ($p=0,0013$), contrariamente as baixas concentrações encontradas em outro estudo ¹⁷. A IL-10 não se mostrou associada à coinfecção HIV/HPgV, de forma semelhante Blackard et al., (2017) não encontraram associação entre a IL-10 e a coinfecção.

Em conclusão, nossos resultados não evidenciaram o efeito anti-inflamatório e protetor da IL-4 e IL-10 na coinfecção HIV/HPgV, pois ambas apresentaram valores menores em monoinfectados. Ressaltamos que os pacientes do estudo não foram acompanhados ao longo do tempo, o que poderia elucidar a possível associação entre essas citocinas e a coinfecção.

REFERÊNCIAS

1. 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.

2. Alcalde, R.; Nishiya, A.S.; Casseb, J.; Inocêncio, L.; fonseca, L.A.; Duarte, A. J. Prevalence and distribution of the GBV-C/ HGV among HIV-1 infected patients under antirretroviral therapy. *Virus Res* 151:148–152, 2010.

3. Campos, A.F.; Tengan, F.M.; Silva, S.A.A.; Levi, J.E. Influence of hepatitis G virus (GB virus C) on the prognosis of HIV-infected women. *Int J STD AIDS* 22:209– 213, 2011.

4. 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.

5. Souza, A.K.V.; Komninakis, V.C.S.; Zappia, B.L.G.; Barbosa, J. A.; Mantovani, P.N.; Diaz, S.R.; Abrao, P.; Lanzara, A.G.; Granato, H.F.C.I.. Evaluation of GB virus C/hepatitis G viral load among HIV type 1 co-infected patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:289–294, 2012

6. Anggorowati, N.; Yano, Y.; Subronto, W.; Utsumi, T.; Heriyanto, D.S.; Mulya, D.P.; Rinonce, H.T.; Widasari, D.I.; Lusida, M.I.; Soetjipto, Hayashi, Y.; GB virus C infection in Indonesian HIV-positive patients. *Microbiol Immunol* 57:298–308, 2013.

7. Ernst, D.; Greer, M.; Akmatova, R.; Pischke, S.; Wedemeyer, H.; Akmatova, R.; Pischke, S.; Wedemeyer, H.; Heiken, H.; Tillmann, H.L.; Schmidt, R.E.; Stoll, M. Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: A 20-year follow-up study. *HIV Med* 15:245–250, 2013.

8. Lee, C.K.; Tang J.W.T.; Chiu, L.; Loh, T.P.; Olszyna, D.; Chew, N.; Archuleta, S. Koay.,E.S.C. Epidemiology of GB virus Type C among patients infected with HIV in Singapore. *J Med Virol* 86:737–744, 2014.
9. Sahni, H.; Kilrkwod, K.; Kyriakides, T.C.; Stapleton, J.; Brown, S.T.; Holodniy, M. GBV-C viremia and clinical events in advanced HIV infection. *J Med Virol* 86:426–432, 2014.
10. Toyoda, H.; Fukuda, Y.; Hayakawa, T.; Takamatsu, J.; Saito, H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17:209–213, 1998.
11. 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 VirusInfected Patients? *Journal of Infectious Diseases*, v. 177, n. 6, p. 1723–1726, 1998.
12. Mota, L.D.; Nishiya, A. S.; Finger-Jardim, F.; Barral, M.F.M; Silva, C.M.; Nader, M.M.; Gonçalves, C.V.; Da Hora, V.P.; Silveira, J.; Basso, R.P.; Soares, M. A.; Levi, J.E.; Martinez, A.M.B. Prevalence of Human Pegivirus (HPgV) Infection in Patients Carrying HIV-1C or Non-C in Southern Brazil. *Journal of Medical Virology*.19, 2016.
13. 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.
14. Singh, S., Blackard, J. T. Human pegivirus (HPgV) infection in sub-Saharan Africa. A cale for a renewed research agenda. *Ver. Med. Virol*, 2017, 27 e 1951.
15. Nunnari, G.; Nigro, L.; Palermo, F.; Attanasio, M.; Berger, A., Doerr, H.W.; Pomerantz, R.J.; Cacopardo, B.; Slower progression of HIV-1 infection in persons

with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med.* 139:26–30. 2003.

16. Lanteri, M.C.; Vahidnia, F.; Tan, S.; Stapleton, J.T.; Norris, P.J.; Heitman, J. ET AL. Downregulation of cytokines and chemokines by GB virus C after transfusion transmission in HIV+ blood recipients. *J Infect Dis.*, 2014.

17. 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.

18. 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 α , MIP-1 β , and SDF-1. *The Lancet*, v. 363, n. 9426, p.2040–2046, 2004.

19. Rydze, R.T., Bhattarai, N., Stapleton, J.T. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther*; 17:1271–9, 2012.

20. Baggio-zappia, G.L.; Barbosa, A.J.; Coló, M.K.; Brunialti, M.K.C.; Salomão, R.; Granato, C.F.H. Influence of GB virus C on IFN- γ and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. *MEM INST OSWALDO Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(6): 662-669, September 2011.

21. Moiser, D.E.; Chisari, F.V.; GB virus C and mortality from HIV infection. *N. Engl. J. Med* 9, 346-377, 2002.

22. 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.

23. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, et al. GB virus C coinfection in advanced HIV type-1 disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4(+) T-cells. *Antivir Ther* 2010; 15:745–52.
24. Bjorkman P, Flamholc L, Naucier A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 2004; 18:877–86.
25. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, et al. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: the Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* 2005; 191:678–85.

6 CONCLUSÕES

- As médias das concentrações da IL-4 foram significativamente mais elevadas nos pacientes coinfectados em comparação aos monoinfectados;
- As médias das concentrações da IL-10 foram mais elevadas nos pacientes coinfectados, embora não tenham apresentado significância estatística;
- As concentrações de citocinas não se mostraram associadas a carga viral do HIV e HPgV e a contagem de linfócitos TCD4.

REFERÊNCIAS

ALCALDE, R.; NISHIYA, A.S.; CASSEB, J.; INOCÊNCIO, L.; FONSECA, L.A.; DUARTE, A. J. Prevalence and distribution of the GBV-C/ HGV among HIV-1 infected patients under antirretroviral therapy. **Virus Res** 151:148–152, 2010.

ANGGOROWATI, N.; YANO, Y.; SUBRANTO, W.; UTSUMI, T.; HERIYANTO, D.S.; MULYA, D.P.; RINONCE, H.T.; WIDASARI, D.I.; LUSIDA, M.I.; SOETJIPTO, HAYASHI, Y.; GB virus C infection in Indonesian HIVpositive patients. **Microbiol Immunol** 57:298–308, 2013.

BAGGIO-ZAPPIA, G.L.; BARBOSA, A.J.; COLÓ, M.K.; BRUNI ALTI, M.K.C.; SALOMÃO, R.; GRANATO, C.F.H. Influence of GB virus C on IFN- γ and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. **MEM INST OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, Vol. 106(6): 662-669, September 2011.

BAILEY, A. L.; BUECHLER, C.R.; MATSON, D. R., PETERSON E. J.; BRUNNER K.G., MOHNS M.S.; BREITBACH, M.; STEWART, L.M.; ERICSEN, A.J.; NEWMAN, C.M.; MICHELLE R. KOENIG M.R.; MOHR, E.; TAN, J.; CAPUANO, S.; SIMMONS H. A.; YANG D.T.; O’CONNOR, D. H. Pegivirus avoids immune recognition but does not attenuate acute-phase disease in a macaque model of HIV infection. **PLOS Pathogens**. October 26: 1-20, 2017.

BERZSENYI, M. D.; BOWDEN, D. S.; ROBERTS, S. K. GB virus C: Insights into coinfection. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, n. 4, p. 257–266, 2005.

BHATTARAI, N.; STAPLETON, J.T. GB virus C: the good boy virus? **Trends Microbiol**. 20:124–130, 2012.

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.

CAMPELO JÚNIOR, E. B. Associação das concentrações de MIP-1A/SDF-1 e polimorfismos do CCR5, IL-4, IL-10 com pessoas vivendo com HIV/AIDS coinfectados com o HPgV. Tese (Tese em Medicina Tropical)- UFPE. Recife, 2018.

CAMPOS, A.F.; TENGAN, F.M.; SILVA, S.A.A.; LEVI, J.E. Influence of hepatitis G virus (GB virus C) on the prognosis of HIV-infected women. **Int J STD AIDS** 22:209–213, 2011.

CHANG, C. M., STAPLETON, J. T., KLINZMAN, D., MCLINDEN, J. H., PURDUE, P., KATKI, A., et al. GBV-C infection and risk of NHL among U.S. adults. **Cancer Res** 2014; 74: 5553-60. 2014 Aug 12.

CHIVERO, E. T.; BHATTARAI, N.; RYDZE, R. T.; WINTERS, M. A.; HOLODNIY, M.; STAPLETON, J. T. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious in vitro. **J Gen Virol.**; 95:1307–1319, 2014.

CHIVERO, E.T.; STAPLETON J.T. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/Hepatitis G virus) and host immunomodulation: Insights into a highly successful viral infection. **J Gen Virol** 96:1531–1532, 2015.

DE RENZO, A., PERSICO, E., DE MARINO, F., DI GIACOMO RUSSO, G., NOTARO, R., DI GRAZIA, C., et al. High prevalence of hepatitis G virus infection in Hodgkin's disease and B-cell lymphoproliferative disorders: absence of correlation with hepatitis C virus infection. **Hematologica** 2002; 87: 714-8.

ERNST, D.; GREER, M.; AKMATOVA, R.; PISCHKE, S.; WEDEMEYER, H.; AKMATOVA, R.; PISCHKE, S.; WEDEMEYER, H.; HEIKEN, H.; TILLMANN, H.L.; SCHMIDT, R.E.; STOLL, M. Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: A 20-year follow-up study. **HIV Med** 15:245–250, 2013.

FIORDALIS, I. G., ZANELLA, I., MANTERO, G., BETTINARDI, A., STELLINI, R., PARANINFO, G., et al. High prevalence of GB virus C infection in a group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. **J Infect Dis** 1996; 174; 181-3.

FREY, S.E.; HOMAN, S.M.; SOKOL-ANDERSON, M.; CAYCO, M.T.; COTORREAL, P.; MUSIAL, C.E.; DI BISCEGLIE, A. Evidence for Probable Sexual Transmission of the Hepatitis G Virus. **Clin Inf. Dis** 34:1033-8, 2002.

GEORGE, S. L.; VARMAZ, D.; STAPLETON, J. T. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. **J Infect Dis** 2006; 193; 451-4.

GIANNOULIS, E., ECONOMOPOULOS, T., MANDRAVELI, K., GIANNOULIS, K., NIKOLAIDES, C., ZERVOU, E., et al. The prevalence of hepatitis C and hepatitis G virus infection in patients with B cell non-Hodgkin lymphomas in Greece: A Hellenic Cooperative Oncology Group study. **Acta Haematol** 2004; 112: 189-93.

GIMENEZ-BARCONS, M.; RIBERA, M.; LLANO, A.; CLOTET, B.; ESTE, J., MARTINEZ, M. Analysis of chemokine and cytokine expression in patients with HIV and GB virus type C coinfection. **Clinical Infectious Diseases** 40:1342-1349, 2005.

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.

KERESZTES, K., TAKÁCS, M., HORÁNYI, M., MILTÉNYI, Z., ILLÉS, Á. HCV and HGV Infection in Hodgkin's Disease. **Pathol Oncol Res** 2003; 9: 222-5.

LALLE, E.; SACCHI, A.; ABBATE, I.; et al. Activation of interferon response genes in plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C coinfection. **Int. J. Immunopathol Pharmacol.** 21:161-171, 2008.

LANTERI, M.C.; VAHIDNIA, F.; TAN, S.; STAPLETON, J.T.; NORRIS, P.J.; HEITMAN, J. ET AL. Downregulation of cytokines and chemokines by GB virus C after transfusion-transmission in HIV+ blood recipients. **J Infect Dis.**, 2014.

LEE, C.K.; TANG J.W.T.; CHIU, L.; LOH, T.P.; OLSZYNA, D.; CHEW, N.; ARCHULETA, S. KOAY.,E.S.C. Epidemiology of GB virus Type C among patients infected with HIV in Singapore. **J Med Virol** 86:737–744, 2014.

LEFRÈRE, J. J.; ROUDOT-THORAVALL, 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.

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.

MICHAELIS, S., KAZAKOV, V., SCHMID, M., DUMMER, R., BURG, G., KEMPF, W. Hepatitis C and G viruses in B-cell lymphomas of the skin. **J Cutan Pathol** 2003; 30: 369-72.

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.

MOISER, D.E.; CHISARI, F.V.; GB virus C and mortality from HIV infection. **N. Engl. J. Med** 9, 346-377, 2002.

MOTA, L.D.; NISHIYA, A. S.; FINGER-JARDIM, F.; BARRAL, M.F.M; SILVA, C.M.; NADER,M.M.; GONÇALVES,C.V.; DA HORA, V.P.; SILVEIRA, J.; BASSO, R.P.; SOARES, M. A.; LEVI,J.E.; MARTINEZ, A.M.B. Prevalence of Human Pegivirus (HPgV) Infection in Patients Carrying HIV-1C or Non-C in Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**.1-9, 2016.

MUERHOFF, A. S., LEARY T. P., SIMONS J. N., PILOTMATIAS T.J., DAWSON G.J., ERKER J. C., et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. **J Virol** 1995; 69: 5621-30.

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.

NUNNARI, G.; NIGRO, L.; PALERMO, F.; ATTANASIO, M.; BERGER, A., DOERR, H.W.; POMERANTZ, R.J.; CACOPARDO, B.; Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. **Ann Intern Med.** 139:26–30. 2003.

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

OSPINA, J. C. A.; CAICEDO, M. F.; NAVAS, M. C.; CORTÉS-MANCERA, F. M. Pegivirus humano: Potencial patogénico y riesgo de desarrollo de linfoma no Hodgking. **Rev. chil. infectol.** vol.35 no.2 Santiago abr. 2018.

PINHO, J. R. R., DA SILVA, L.C. Invited review GB virus C/hepatitis G virus and other putative hepatitis non A-E viruses. **Rev Inst Med Trop** Sao Paulo 1996; 38: 441-50.

RYDZE RT, BHATT.ARAI N, STAPLETON JT. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. **Antivir Ther**; 17:1271–9, 2012.

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

SAHNI,H.; KIRKWOOD, K.; KYRIAKIDES, T.C.; STAPLETON, J.; BROWN, S.T.; HOLODNIY, M. GBV-C viremia and clinical events in advanced HIV infection. **J Med Virol** 86:426–432, 2014.

SILVA, S. A.; RODRIGUES, C. L.; CAMPOS, A. F.; LEVI, J. E. Evaluation of gbv-c / hgv viremia in hiv-infected women. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 54(1):31-35, January-February, 2012.

SIMONS, J.N.; PILOT-MATIAS, T.J.; LEARY, T.P.; DAWSON, G.J.; DESAI, S.M., SCHLAUDER, G.G.; et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; 92:3401– 3405, 1995.

SINGH, S., BLACKARD, J. T. Human pegivirus (HPgV) infection in sub-Saharan Africa. A cale for a renewed research agenda. **Ver. Med. Virol**, 2017, 27 e 1951.

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.

SOUZA, A.K.V.; KOMNINAKIS, V.C.S.; ZAPPIA, B.L.G.; BARBOSA, J. A.; MANTOVANI, P.N.; DIAZ, S.R.; ABRAO, P.; LANZARA, A.G.; GRANATO, H.F.C.I. Evaluation of GB virus C/hepatitis G viral load among HIV type 1 co-infected patients in São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses** 28:289–294, 2012.

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.; 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.

STAPLETON, J.T. GB virus type C/hepatitis G virus. **Semin Liver Dis.**; 23:137–148, 2003.

STAPLETON, J.T.; MARTINSON, J.A.; KLINZMAN, D.; XIANG, J.; DESAI, S.N.; LANDAY, A. GB virus C infection and B-cell, natural killer cell, and monocyte activation markers in HIV-infected individuals. **AIDS** 27: 1829– 1832, 2013.

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.

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.

TOYODA, H.; FUKUDA, Y.; HAYAKAWA, T.; TAKAMATSU, J.; SAITO, H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 17:209–213, 1998.

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.

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 α , MIP-1 β , 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.

YOSHIBA, M., OKAMOTO, H., MISHIRO, S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. **Lancet** 1995; 346: 1131-2.

APÊNDICE A- INTERLEUKINS 4 AND 10 SERUM CONCENTRATIONS IN HIV/HPgV COINFECTED PATIENTS

Regina Athalys Rafael Soares Teles ¹, Viviane Martha Santos de Moraes¹, Juliana Prado Gonçalves¹, Thaisa Regina Rocha Lopes¹, Virginia Maria Barros de Lorena², Evônio de Barros Campelo Júnior¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,3 *}

¹ Virology sector, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil,

² Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Departament of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

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

ABSTRACT

The interaction between HPgV and HIV is associated with greater survival in coinfecting patients and decreased progression to AIDS. HPgV seems to play a mechanism of interaction with HIV, highlighting the upward regulation of Th1 cytokines and negative Th2 cytokines, such as the decrease of IL-4 and IL-10. The aim of this study was to determine the serum concentrations of IL-4 and IL-10 in HIV/HPgV coinfecting and HIVmonoinfecting individuals, and to verify the association between the concentrations of these cytokines and the HIV and HPgV viral load, of TCD4 lymphocytes. It is a casecontrol study, carried out with 105 patients attended at the Hospital das Clínicas of Federal University of Pernambuco, with a mean age of 40.5 years, 54% (57/105) were men. Quantification of cytokines was performed by cytometric bead array (CBA). Among the patients 70 were monoinfecting by HIV and 35 were HIV/HPgV coinfecting, the median HIV viral load was higher in the monoinfecting group, the CD4 + lymphocyte group was similar in both groups. The

mean concentrations of IL-4 and IL-10 were higher in coinfecting patients, IL-4 presented significant values ($p = 0.0013$).

Keywords: HIV. HPgV. Coinfection. Cytokines.

1 INTRODUCTION

The *Human pegivirus* (HPgV) and *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) coinfection presents a 17% to 89% worldwide prevalence according to the region^{1,2,3,4,5,6,7,8,9}

The HIV and HPgV interaction was proposed by Toyoda and Heringlake (1998)^{10,11}, who reported that patients with HPgV RNA had a lower incidence of AIDS, suggesting that this interaction would be able to delay the progression of HIV. The coinfecting individuals present a decrease in mortality rates and an improvement in clinical conditions, with a reduction in viral load and an increase in TCD4 lymphocyte count⁴. The decrease in complications associated with HIV infection are related to the Th1 immune response, which is important to retard the development of AIDS³. The importance of this response to the Th2 response demonstrates that disease progression is correlated with decreased Th1 profile cytokines and increased Th2 profile cytokines^{13,14}

In HIV/HPgV coinfecting individuals, the increase in Th2 profile cytokines, such as IL-4 and IL-10, is associated with a progression to AIDS¹⁵. A protective effect was reported in this coinfection, due to the decrease of the inflammation with consequent improvement in the evolution of the disease in coinfecting individuals¹⁶ Lower levels of IL-4 were associated with coinfection, but no association was found for IL-10¹⁷.

Considering that HPgV may influence or modulate host immune response, and lack of consensus in the literature on the IL-4 and IL-10 effect in this coinfection, the aim of this study was to evaluate the serum concentrations of IL-4 and IL-10 in HIV/HPgV coinfecting patients and HIV mono-infected. We also verify the association of IL-4 and IL-10 concentrations with HIV and HPgV viral load and TCD4 lymphocyte count.

2 METHODOLOGY

2.1 Design, population and place of study

It is an analytical study of the case-control type, where HIV/HPgV coinfecting individuals and HIV-infected individuals were defined as cases and control, respectively. The study participants were followed up at the Infectious and Parasitic Diseases Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE). Serum samples used in the study were obtained from the Virology Sector of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - LIKA / UFPE. The data regarding sex, age, HIV and HPgV viral load, TCD4 lymphocyte count were obtained from the mentioned sector database. This study was approved by the research ethics committee of UFPE (CAAE: 0276.0.172.000-11).

2.2 Cytokines quantification

Cytokine quantification was performed by cytometric bead array (CBA) with commercial Becton Dickinson (BD) kits on the BD FACSCalibur™ cytometer, in collaboration with the Immunopathology Department of the Aggeu Magalhães Institute - Oswaldo Cruz Foundation. For each cytokine dosage (IL-4, IL-10), 25uL of serum (undiluted) was used, with a 2- 2,500 pg/mL detection limit.

2.3 Statistical analysis

Cytokine concentrations, TCD4 lymphocyte count and HIV and HPgV viral load analysis were performed by the Mann-Whitney test. Statistical analyzes were performed in the GraphPad Prism program (version 6.0, San Diego, California, USA).

3 RESULTS

The study included 105 people with a mean age of 40.5 years ($\pm$ 9.2), of which 54% (57/105) were male. Among the participants, 70 were HIV monoinfected, with 38% (27/70) presenting detectable HIV viral load, and 35 HIV/HPgV coinfecting, of

which 48% (17/35) had a detectable HIV viral load. Table 1 shows the HIV and HPgV viral load, TCD4 lymphocyte count and IL-4 and IL-10 concentrations.

Table 1 - Concentrations of IL4 and IL10, ALT dosage, AST, TCD4 lymphocyte count

	HIV (n=70)	HIV/HPgV (n=35)	p-value ¹
HIV VL ² (cópias/mL)	1.971 (51-500.000) ³	600 (56-28.376)	0.2328
HPgV VL ² (cópias/mL)	-	621.3 (5.0 – 7.181) ³	-
TCD4 count (células/mm ³)	552.5 (135-2.107) ³	555 (158 – 1.143)	0.8199
IL-4 (pg/mL)	1.379 ⁴	3.722	0.0013
IL-10 (pg/mL)	2.437 ⁴	3.941	0.5743

¹p-value obtained by the Mann Whitney test; ²Viral load; ³values corresponding to median; ⁴ values corresponding to mean.

4 DISCUSSION

The present study evaluated the IL-4 and IL-10 serum concentrations in HIV/HPgV coinfecting and HIV mono-infected individuals, and verified the association with HIV and HPgV viral load and TCD4 lymphocyte counts. Studies have associated HPgV viremia with the highest survival in HIV coinfecting patients, improving the immune response and efficacy of antiretroviral therapy (ART) ¹⁵. HPgV interferes in the HIV progression to AIDS by unclarified mechanisms, it is speculated that there is a direct HPgV inhibitory effect, potentiating or protecting the immune response, or another unidentified factor ¹⁸. In addition, an *in vitro* study has shown that the HPgV NS5A protein regulates negatively IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 cytokines, suggesting that there is modulation of cytokine expression in T cells ¹⁹

The T cell-mediated immune response plays an important role in the control of HIV infection, slowing the progression of the disease ²⁰. The indirect protective effect of HPgV on HIV/HPgV coinfection could be explained by a cross-cytotoxic T reaction leading to a more intense immune response with greater control over HIV replication ^{21,3}. HPgV appears to play a mechanism capable of inhibiting HIV replication by modulating serum cytokine/chemokine concentrations ¹⁷

The HIV/HPgV coinfecting population studied is similar to other studies in relation to the mean age of 40.5 years, corroborating with the research done in Rio Grande do Sul, which was <50 years old ¹² In a study in São Paulo, the mean age was

32 years⁴ Regarding gender, the majority of the participants were men, who were the most exposed to the risk factors related to sexual infections.

A lower HIV viral load is associated with the presence of HPgV and improved survival between coinfecting patients^{22,16} Analysis of the HIV viral load in the present study showed no significant difference between the groups, however, this was shown to be lower in the HIV/HPgV coinfecting patients, suggesting a possible reduction due to the presence of HPgV. In a study conducted with HIV/HPgV coinfecting patients and monitored over the years, it was shown that after the diagnosis of HPgV there was an inverse correlation between HIV viral load and HPgV¹⁶. In our study, this observation was not possible, since viral load was measured only once, constituting a limitation of the study.

As HIV viral load, increased TCD4 lymphocyte count in coinfection is related to improved immune response and better prognosis^{23,22} In our study, no differences were observed in the TCD4 counts between the groups, emphasizing that all patients were under ART. In a cohort study, only 58% of the patients were undergoing ART and this study also found no association of TCD4 counts with HIV/HPgV coinfection²² On the other hand, studies that accompanied patients over time, observed a significant increase in TCD4 counts among coinfecting patients^{24,25,16}

A study showed that low concentrations of cytokines and chemokines are found in HIV/HPgV coinfection, suggesting an anti-inflammatory and protective effect¹⁶ In our study, mean IL-4 concentrations were significantly higher in coinfecting patients ($p = 0.0013$), contrary to the low concentrations found in the study of Blackard et al., 2017¹⁷ IL-10 was not shown to be associated with HIV / HPV coinfection, similarly¹⁷ found no association between IL-10 and coinfection.

In conclusion, our results did not evidence the IL-4 and IL-10 anti-inflammatory and protective effect on HIV/HPgV coinfection. We emphasize that the study patients were not followed up over time, which could elucidate the possible association between these cytokines and coinfection.

REFERENCES

1. 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.
2. Alcalde, R.; Nishiya, A.S.; Casseb, J.; Inocêncio, L.; fonseca, L.A.; Duarte, A. J. Prevalence and distribution of the GBV-C/ HGV among HIV-1 infected patients under antirretroviral therapy. *Virus Res* 151:148–152, 2010.
3. Campos, A.F.; Tengan, F.M.; Silva, S.A.A.; Levi, J.E. Influence of hepatitis G virus (GB virus C) on the prognosis of HIV-infected women. *Int J STD AIDS* 22:209– 213, 2011.
4. 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.
5. Souza, A.K.V.; Komninakis, V.C.S.; Zappia, B.L.G.; Barbosa, J. A.; Mantovani, P.N.; Diaz, S.R.; Abrao, P.; Lanzara, A.G.; Granato, H.F.C.I.. Evaluation of GB virus C/hepatitis G viral load among HIV type 1 co-infected patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:289–294, 2012
6. Anggorowati, N.; Yano, Y.; Subronto, W.; Utsumi, T.; Heriyanto, D.S.; Mulya, D.P.; Rinonce, H.T.; Widasari, D.I.; Lusida, M.I.; Soetjipto, Hayashi, Y.; GB virus C infection in Indonesian HIVpositive patients. *Microbiol Immunol* 57:298–308, 2013.
7. Ernst, D.; Greer, M.; Akmatova, R.; Pischke, S.; Wedemeyer, H.; Akmatova, R.; Pischke, S.; Wedemeyer, H.; Heiken, H.; Tillmann, H.L.; Schmidt, R.E.; Stoll, M. Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: A 20year follow-up study. *HIV Med* 15:245–250, 2013.

8. Lee, C.K.; Tang J.W.T.; Chiu, L.; Loh, T.P.; Olszyna, D.; Chew, N.; Archuleta, S. Koay, E.S.C. Epidemiology of GB virus Type C among patients infected with HIV in Singapore. *J Med Virol* 86:737–744, 2014.
9. Sahni, H.; Kilrwood, K.; Kyriakides, T.C.; Stapleton, J.; Brown, S.T.; Holodniy, M. GBV-C viremia and clinical events in advanced HIV infection. *J Med Virol* 86:426–432, 2014.
10. Toyoda, H.; Fukuda, Y.; Hayakawa, T.; Takamatsu, J.; Saito, H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17:209–213, 1998.
11. 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.
12. Mota, L.D.; Nishiya, A. S.; Finger-Jardim, F.; Barral, M.F.M; Silva, C.M.; Nader, M.M.; Gonçalves, C.V.; Da Hora, V.P.; Silveira, J.; Basso, R.P.; Soares, M. A.; Levi, J.E.; Martinez, A.M.B. Prevalence of Human Pegivirus (HPgV) Infection in Patients Carrying HIV-1C or Non-C in Southern Brazil. *Journal of Medical Virology*.19, 2016.
13. 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.
14. Singh, S., Blackard, J. T. Human pegivirus (HPgV) infection in sub-Saharan Africa. A call for a renewed research agenda. *Ver. Med. Virol*, 2017, 27 e 1951.
15. Nunnari, G.; Nigro, L.; Palermo, F.; Attanasio, M.; Berger, A., Doerr, H.W.; Pomerantz, R.J.; Cacopardo, B.; Slower progression of HIV-1 infection in persons

with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med.* 139:26–30. 2003.

16. Lanteri, M.C.; Vahidnia, F.; Tan, S.; Stapleton, J.T.; Norris, P.J.; Heitman, J. ET AL. Downregulation of cytokines and chemokines by GB virus C after transfusiontransmission in HIV+ blood recipients. *J Infect Dis.*, 2014.

17. 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.

18. 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 α , MIP-1 β , and SDF-1. *The Lancet*, v. 363, n. 9426, p.2040–2046, 2004.

19. Rydze, R.T., Bhattarai, N., Stapleton, J.T. GB virus C infection is associated with a reducedrate of reactivation of latent HIV and protection against activationinduced T-cell death. *Antivir Ther*; 17:1271–9, 2012.

20. Baggio-zappia, G.L.; Barbosa, A.J.; Coló, M.K.; Brunialti, M.K.C.; Salomão, R.; Granato, C.F.H. Influence of GB virus C on IFN- γ and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. *MEM INST OSWALDO Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(6): 662-669, September 2011.

21. Moiser, D.E.; Chisari, F.V.; GB virus C and mortality from HIV infection. *N. Engl. J. Med* 9, 346-377, 2002.

22. 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.

23. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, et al. GB virus C coinfection in advanced HIV type-1 disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4(+) T-cells. *Antivir Ther* 2010; 15:745–52.
24. Bjorkman P, Flamholc L, Naucner A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 2004; 18:877–86.
25. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, et al. GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: the Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis* 2005; 191:678–85.

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