Juliana Zanatta de Carvalho Dias

**Influência do *Pegivirus* humano (HPgV) na medula óssea:
impacto clínico e tropismo viral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo

2018

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Juliana Zanatta de Carvalho Dias

**Influência do *Pegivirus* humano (HPgV) na medula óssea:
impacto clínico e tropismo viral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo

2018

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, Juliana Zanatta de Carvalho
Influência do pegivirus humano (HPgV) na medula
óssea : impacto clínico e tropismo viral / Juliana
Zanatta de Carvalho Dias. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Pegivirus humano 2.Vírus GB C
3.Medula óssea 4.Transplante de células-tronco
hematopoiéticas 5.Tropismo viral 6.Doença enxerto-
hospedeiro

USP/FM/DBD-413/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus amores. Amo mais que coxinha e chocolate junto. Amo tanto que a
ausência dói mais que qualquer coisa.

Aos que me orientaram, em especial àqueles que tiveram a paciência de
ensinar.

A qualquer um que possa ter concebido uma ideia que tenha me inspirado.
E, principalmente, àqueles que, com qualquer gesto, insistem em dedicar suas
vidas à pesquisa: vocês movem a humanidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Esper Kallás, um ser humano excepcional a quem agradecerei o resto dos meus dias por sua paciência, sua paixão pelo trabalho e todos os seus valores éticos que me fizeram acreditar na ciência mais uma vez, que faz com que seja quase impossível dizer que acaba aqui.

A todos do LIM-60, a equipe maravilhosa que me acompanhou nesses 4 anos e que vou levar comigo para o resto da vida:

- Cândida Dantas, Issler Moraes e Renan Carvalho por todo apoio nas questões relacionadas ao suporte financeiro, de papelaria, ou simplesmente pelos chocolates, ferramentas, ações e desejos de bom dia. Vocês entendem o significado da palavra urgência como ninguém.
- Helena Tomiyama, Claudia Tomiyama, Maria Angélica Neves, Aline Lumertz, Roni Macedo, Lucas Souza, Carlos Palma e Ederson Xavier por cada material e reagente solicitado, por todos os empréstimos temporários de equipamentos e pela prontidão em responder sim para absolutamente tudo que eu pedi nesses 4 anos. Vocês são a solicitude de que esse mundo precisa.
- Cássia Terrassani, Mariana Marmorato e Anne Medrado pelas discussões científicas e não científicas que fizeram minha vida mais leve e mais feliz. Por todos os dias e noites de trabalho, seja pela ajuda, seja simplesmente pela companhia. Por cada tubo que eu não precisei fazer, por cada reagente que eu deixei fora do *freezer* guardado e por cada vez que não tive que sair correndo para achar meu celular. Por cuidarem de mim. Por não desistirem de mim. Por compartilharem minha obsessão de tentar fazer tudo certo, sempre. Não, nós não temos T. O. C. (Transtorno Obsessivo Compulsivo).
- Carolina Argondizo, Ana Carolina Soares, Camila Donini, Luiz Zanella e Mateus Tomazella por todos os dias em que a morte não era opcional. Por cada TCLE assinado, família abordada, agulhada, pares de luva, tubos e lâminas sem fim, botas lavadas e jalecos limpos. Por cada dia de coleta, cada amostra coletada. Sem vocês a coleta no SVOC teria sido aflitiva e insustentável.
- Priscilla Costa por toda a citometria. Montagem de painel, experimentos, análises, resolução de problemas, montagem de novo painel, mais experimentos, mais análises, mais resolução de problemas... Se não fosse por você o trabalho seria pobre, literalmente.
- Andrea Niquirilo por toda a ajuda com os citômetros. Todas as noites, madrugadas, dias seguintes em claro, fotos enviadas, vida contada. As horas foram definitivamente mais curtas com você.
- Eleni Arruda por toda a calma, tranquilidade e documento preenchido quando eu mais precisei. Se todas as pós-graduações fossem gerenciadas por pessoas como você, todos os programas seriam 7.

À Valéria Capabarbo do LIM 17 pelo empréstimo do equipamento StepOnePlus. Uma das pessoas mais solícitas que conheci na ciência, pois sua ajuda foi essencial num momento de crise.

Aos professores David O'Connor e Shelby O'Connor da Universidade de Wisconsin por me receberem tão calorosamente como parte do projeto, todas as análises de *next-generation sequence*, todas as ideias para incrementar o trabalho e por incentivar a publicação de resultados independentemente de quais sejam. A ciência caminha a passos lentos atualmente porque faltam pessoas como vocês.

A Connor Buechler, Katie Zarbock e Paola Paz pelos dias e noites de *next-generation sequence*, contas de diluição, desenvolvimento de primers e, principalmente, por terem me recebido tão bem que nem pareceu que eu estava tão longe de casa.

Ao dr. Celso Arrais, Hematologista do Hospital Sírio-Libanês, por nos permitir usar amostras tão preciosas de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea e por todas as horas dispensadas nas análises estatísticas.

À dra. Vivian Avelino-Silva, Infectologista do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, por todas as discussões e análises estatísticas. Nunca conheci alguém que fizesse estatística parecer tão descomplicado.

Aos professores Paulo Saldiva, Luiz Fernando Ferraz e Antônio Pasqualluci, do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo incentivo à pesquisa, pelas discussões produtivas e, principalmente, por permitirem e facilitarem o acesso e a coleta das amostras SVOC.

Aos técnicos e médicos do SVOC-SP, por todos os ensinamentos de anatomia, todas as discussões científicas, políticas e as non-sense também. Uma das primeiras vezes que escutei alguém de fora do círculo dizer que já conhecia o HPgV e ainda me indicar publicações para ler. O nosso trabalho só foi possível porque vocês nos permitiram, tão docemente, atrapalhar o trabalho de vocês.

Aos médicos ortopedistas do IOT Leandro Ejnisman, Ana Lúcia Munhoz e Bruno Rudelli por comprarem a ideia, permitirem e facilitarem o seguimento das coletas das amostras IOT e por cada puxada de orelha nos residentes de plantão. Pessoas como vocês fazem com que seja possível que amostras tão preciosas possam ser aproveitadas na pesquisa. A todos os residentes que passaram pela ortopedia do IOT pela consideração com a pesquisa. Cada tubo armazenado é fruto do trabalho de vocês também.

Aos órgãos de fomento CAPES e NIH pelo financiamento dos recursos e investimento na pesquisa. Infelizmente, ainda não é possível fazer ciência sem dinheiro.

A todos os membros da banca, titulares e suplentes, que aceitaram tão prontamente o convite.

E, finalmente, aos pacientes e às famílias. Cada TCLE assinado, cada amostra coletada, cada descoberta alcançada só foi possível porque vocês nos deram seu voto de confiança. A pesquisa clínica agradece imensamente, pois é movida pelo consentimento de vocês.

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

"E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos
por aqueles que não podiam escutar a música."

Friedrich Nietzsche

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTRUTURA GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO	2
1.2 TROPISMO	4
1.3 CICLO DE VIDA	6
1.4 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	7
1.5 HPgV E HIV.....	8
1.6 HPgV E A MEDULA ÓSSEA	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MÉTODOS	14
3.1 POPULAÇÕES DE ESTUDO.....	16
3.1.1 Amostras HSCT.....	16
3.1.2 Amostras SVOC	16
3.1.3 Amostras IOT	17
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	19
3.2.1 Amostras HSCT.....	19
3.2.2 Amostras SVOC	19
3.2.2.1 Sangue e medula óssea.....	19
3.2.2.2 Tecidos.....	20
3.2.3 Amostras IOT	21
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA	21
3.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HPgV.....	22
3.4.1 Construção da Curva Padrão	22
3.4.1.1 Plasmídeo	22
3.4.1.2 Transformação bacteriana e extração plasmidial	23
3.4.1.4 Linearização	24

3.4.1.5 Transcrição <i>in vitro</i> e quantificação do RNA.....	24
3.4.2 qRT-PCR em Tempo Real para Detecção do HPgV	25
3.4.2.1 <i>One-step</i> para detecção e quantificação da viremia plasmática.....	25
3.4.2.2 <i>Two-step</i> para detecção das fitas de RNA de polaridades positiva e negativa.....	26
3.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS HSCT PAREADAS.....	27
3.5.1 Preparo e Sequenciamento das Amostras	27
3.5.2 Análise dos Dados de Sequência Viral.....	28
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO	28
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 AMOSTRAS HSCT	39
4.1.1 Sequenciamento	40
4.1.2 Influência do HPgV nos Desfechos Clínicos dos Pacientes HSCT	42
4.2 AMOSTRAS SVOC E IOT	46
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	58
7 ANEXOS	59
8 REFERÊNCIAS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aGVHD	- GVHD Aguda
AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
CCR5	- <i>Chemokine C-C motif Receptor 5</i>
CD	- <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	- <i>Complementary DNA</i>
Ct	- <i>Cycle threshold</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
exp	- função inversa do logaritmo neperiano
FSC-A	- <i>Forward Scatter – area</i>
FSC-H	- <i>Forward Scatter – height</i>
FSC-W	- <i>Forward Scatter – width</i>
GBV	- Vírus GB
GVHD	- <i>Graft Versus Host Disease</i>
HBSS	- <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCSP	- Hospital das Clínicas de São Paulo
HCV	- <i>Hepatitis C Virus</i>
HEPES	- Ácido Hidroxietil Piperazinaetanosulfônico
HGV	- <i>Hepatitis G Virus</i>
HHpgV-1	- <i>Human Hepegivirus 1</i>
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA-DR	- <i>Human Leukocyte Antigen type DR</i>
HPgV	- <i>Human Pegivirus</i>
HPgV-2	- <i>Human Pegivirus type 2</i>
HRAS	- <i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
HSCT	- <i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
IC	- Incidência Cumulativa
IL	- Interleucina
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IQR	- Intervalo Interquartil

IRES	- <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
K ₂ EDTA	- EDTA dipotássico
kb	- kilobase
LB	- Luria-Bertani
LDLra	- <i>Low-Density Lipoprotein Receptor</i>
NK	- <i>Natural Killer</i>
NPC1L1	- <i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NTR	- <i>Non Translated Region</i>
ORF	- <i>Open Reading Frame</i>
pb	- pares de base
PBMC	- <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
qRT-PCR	- <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RCF	- <i>Relative Centrifugal Force</i>
RNA	- <i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S. O. C.	- <i>Super Optimal Broth With Catabolite Repression</i>
SFB	- Soro Fetal Bovino
SIV	- <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SPgV	- <i>Simian Pegivirus</i>
SSC-A	- <i>Side Scatte – area</i>
SSC-H	- <i>Side Scatter – height</i>
SSC-W	- <i>Side Scatter – width</i>
SVOC-SP	- Serviço de Verificação de Óbito da Capital de São Paulo
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	- <i>T Cell Receptor</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização genômica e relação filogenética do HPgV e do HCV	3
Figura 2 – Replicação do <i>Pegivirus</i> símio	5
Figura 3 – Aumento da sobrevivência de indivíduos que vivem com HIV quando infectados pelo HPgV	9
Figura 4 – Fluxograma experimental	15
Figura 5 – Estratégia de análise dos parâmetros de qualidade	33
Figura 6 – Estratégia de análise utilizada para separar a microglia	33
Figura 7 – Estratégia de análise utilizada para purificar hepatócitos	34
Figura 8 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de linfonodos	34
Figura 9 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações do sangue	35
Figura 10 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações do baço e da medula óssea	35
Figura 11 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de linfócitos B do baço e da medula óssea	36
Figura 12 – Estratégia de análise do grau de pureza das amostras	37
Figura 13 – Matriz de distância das 24 amostras pareadas pré e pós-HSCT	41
Figura 14 – Incidência cumulativa de aGVHD maior que grau 2 entre os pacientes HSCT	44
Figura 15 – Sobrevivência livre de recaída entre os pacientes HSCT	45
Figura 16 – Sobrevivência entre os pacientes HSCT	46
Figura 17 – Quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade positiva em 10 ⁵ células	48
Figura 18 – Quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade negativa em 10 ⁵ células	49
Figura 19 – Quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade positiva e negativa em 1 µL de plasma sanguíneo	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores e sonda hidrolítica utilizados para amplificar o RNA do HPgV	26
Tabela 2 – Protocolo de amplificação do <i>kit</i> TaqMan® Fast Virus One-Step Master Mix	26
Tabela 3 – Protocolo de amplificação do <i>kit</i> TaqMan® Fast Advanced Master Mix.....	27
Tabela 4 – Painel de citometria de fluxo para discriminação de células da microglia	30
Tabela 5 – Painel de citometria de fluxo para purificação de hepatócitos	30
Tabela 6 – Painel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do linfonodo.....	30
Tabela 7 – Painel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do sangue periférico	30
Tabela 8 – Painel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do baço e da medula óssea.....	30
Tabela 9 – Painel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações de linfócitos B do baço e da medula óssea	31
Tabela 10 – Características demográficas e clínicas dos pacientes HSCT incluídos	39
Tabela 11 – Desfechos clínicos de acordo com a presença do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT	42

RESUMO

Dias JZC. *Influência do Pegivirus humano (HPgV) na medula óssea: impacto clínico e tropismo viral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O HPgV (*Pegivirus Humano*), conhecido anteriormente por GBV-C, causa infecção assintomática, persistente e com alta carga viral. Sendo o vírus de RNA sem patologia associada mais prevalente no mundo até os dias de hoje, os estudos *in vitro* ainda não foram capazes de mimetizar a replicação *in vivo*, permanecendo pouco esclarecidos vários aspectos de sua biologia. Estudos em macacos mostraram que os órgãos responsáveis pela maior replicação viral são o baço e a medula óssea, no entanto as células específicas permissíveis à infecção ainda não foram determinadas. Na década de 90, o HPgV ganhou notoriedade por diminuir os efeitos patológicos do HIV e aumentar a sobrevida de pacientes coinfectados HIV/HPgV, através da diminuição da ativação do sistema imune. Devido a essa característica, diversos estudos tentaram associar a presença de viremia a doenças hematológicas e um deles mostrou que a viremia de HPgV parece estar associada com o desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin, porém muitas variáveis de confusão parecem influenciar esse resultado. Em conjunto, os dados mostram que o HPgV pode ter influência sobre a maturação e liberação de células progenitoras da medula óssea e, portanto, tornou-se primordial avaliar o impacto da viremia em pacientes com doenças hematológicas e definir o tropismo viral. Para tanto, o presente trabalho analisou a dinâmica de exposição à viremia de HPgV em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT), em cadáveres autopsiados pelo Sistema de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo (SVOC-SP) e em pacientes submetidos à cirurgia de artroplastia pelo Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do HCSP. A carga viral de HPgV foi mensurada por qRT-PCR em Tempo Real levando em consideração valores adquiridos com um curva padrão desenvolvida para este trabalho. Para os pacientes HSCT, o efeito da presença de viremia antes e após o procedimento foi avaliada quanto aos principais desfechos do transplante: doença enxerto-hospedeiro aguda (aGVHD), recaída da doença hematológica primária e mortalidade. Para amostras SVOC e IOT, células específicas dos tecidos (cérebro, fígado, baço, linfonodo, medula óssea e sangue) foram avaliadas quanto à quantidade de RNA viral de polaridade positiva e negativa, a fim de quantificar a replicação e definir o tropismo do vírus. Os resultados mostraram que a prevalência de HPgV encontrada nos pacientes HSCT foi maior do que em estudos similares: 42% para as amostra pré-HSCT e 31% para as amostras pós-HSCT; porém, para as amostras SVOC, a prevalência foi menor do que o esperado: 1,2%. A presença de alta carga viral de HPgV em pacientes HSCT foi associada com aumento da taxa de incidência de aGVHD (95% CI 1,05-5,37, $p=0,038$). Dada a alta prevalência de HPgV na população brasileira, é essencial confirmar esse achado em outras coortes, de modo a determinar se o monitoramento do HPgV pode beneficiar o cuidado a esses pacientes. Nas amostras SVOC e IOT, a medula óssea apresentou maior número de populações celulares com replicação viral, com destaque para as células B progenitoras e para as células dendríticas. Porém, devido às condições da coleta e do processamento das amostras, o tipo celular permissível à infecção não pôde ser identificado com clareza, portanto fazendo-se necessária a coleta de um número maior de amostras SVOC.

Descritores: *Pegivirus humano*; Vírus GB C; Medula óssea; Transplante de células-tronco hematopoiéticas; Tropismo viral; Doença enxerto-hospedeiro.

ABSTRACT

Dias JZC. *Human Pegivirus (HPgV) influence on bone marrow: clinical impact and viral tropism* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

HPgV (Human *Pegivirus*), previously known as GBV-C, causes asymptomatic, persistent and high viral load infection. To date, it is the most prevalent RNA virus without associated pathologies in the world, yet *in vitro* studies have not yet been able to mimic the *in vivo* replication, consequently many aspects of its biology remaining unclear. Studies in non-human primates have shown that the organs responsible for the greatest viral replication are spleen and bone marrow, however the specific cells permissible for infection have not yet been determined. In the 1990s, HPgV gained notoriety by decreasing the pathological effects of HIV and increasing the survival of coinfecting HIV/HPgV patients, by decreasing the activation of the immune system. Because of this characteristic, several studies have attempted to associate the presence of viremia with haematological diseases, and one has shown that HPgV appears to be associated with the development of non-Hodgkin's lymphoma, but many confounding variables still seem to influence this outcome. Together, the data show that HPgV may influence the maturation and release of bone marrow progenitor cells and therefore it has become crucial to evaluate the impact of HPgV viremia in patients with haematological diseases and to define viral tropism. Therefore, the present study analyzed the dynamics of HPgV viremia exposure in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), in cadavers autopsied by the São Paulo City Death Verification System (SVOC-SP) and in patients submitted to arthroplasty surgery by the Orthopedics and Traumatology Institute (IOT) of the Clinics Hospital of São Paulo. The HPgV was identified by real-time qRT-PCR and the viral load quantification was estimated by a standard curve developed for this work. For HSCT patients, the effect of viremia before and after the procedure was evaluated for the main transplant outcomes: acute graft vs host disease (aGVHD), relapse of primary haematological disease and mortality. For SVOC and IOT samples, tissue-specific cells (brain, liver, spleen, lymph node, bone marrow and blood) were evaluated for the amount of viral positive and negative RNA strains, in order to quantify replication and define virus tropism. The results showed that the prevalence of HPgV found in HSCT patients was higher than in similar studies: 42% for pre-HSCT samples and 31% for post-HSCT samples; however, for SVOC samples, the prevalence was lower than expected: 1.2%. The presence of high viral load of HPgV in HSCT patients was associated with an increase in the incidence rate of aGVHD (95% CI 1.05-5.37, $p = 0.038$). Given the high prevalence of HPgV in the Brazilian population, it is essential to confirm this finding in other cohorts, in order to determine if HPgV monitoring can improve the care of these patients. In the SVOC and IOT samples, the bone marrow presented a higher number of cell populations with viral replication, especially the progenitor B cells and the dendritic cells. However, due to the conditions of specimen collection and processing, the major permissible cell could not be clearly identified, thus making it necessary to collect a larger number of SVOC samples.

Descriptors: Human *Pegivirus*; GB virus C; Bone marrow; Hematopoietic stem cell transplantation; Viral tropism; Graft vs host disease.

1 INTRODUÇÃO

Deinhardt et al.¹, em 1967, inocularam soro de um paciente com sintomas de hepatite não-A e não-B em saguis (*Saguinus sp*) e, através de diversas transmissões por passagem nesses animais, obtiveram alterações histológicas e aumento das enzimas no fígado compatíveis com o desenvolvimento de hepatite em humanos. Somente em 1995, os laboratórios Abbott identificaram dois agentes virais, relacionados entre si, nas amostras de soro e tecido hepático desses animais, que foram então denominados vírus GB (a amostra humana inoculada pertencia a G. Barker) dos tipos A e B (GBV-A e GBV-B), sendo apenas o tipo B associado ao desenvolvimento de hepatite nesses primatas e ambos não detectados na amostra humana de G. Barker^{2,3,4}. Ainda em 1995, um terceiro tipo do vírus GB foi descrito por dois laboratórios independentes. Baseados nas sequências dos dois novos vírus descobertos, os pesquisadores dos laboratórios Abbott utilizaram iniciadores degenerados para amplificar amostras humanas com hepatite crônica e com hepatite não-(A-E), identificando um terceiro tipo com alta similaridade nucleotídica ao GBV-A e ao GBV-B, ao qual denominaram GBV-C (vírus GB tipo C)⁵. Concomitantemente, pesquisadores da Genelabs Technologies isolaram um vírus no plasma de um paciente com hepatite crônica e, concluindo que haviam encontrado o agente etiológico da doença, denominaram-no HGV (vírus da Hepatite tipo G)⁶. A análise posterior da sequência genômica do GBV-C e do HGV revelou 96% de similaridade, indicando que eram dois isolados do mesmo vírus⁷.

Ao longo dos anos, outros vírus do tipo GB foram descritos, incluindo aqueles que infectam roedores, morcegos, equinos e outros primatas⁸⁻¹². Para designar todos os vírus GB foi criado o gênero *Pegivirus* e, a partir de 2012, a letra que identificava o tipo de vírus foi substituída pelo nome do organismo que ele infecta¹³. Assim, a nomenclatura do GBV-C, por exemplo, que infecta o organismo humano, passa a ser *Pegivirus* humano (HPgV – *Human Pegivirus*)^{14,15}.

1.1 ESTRUTURA GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO

O HPgV é membro da família *Flaviviridae* e, apesar de serem de gêneros diferentes, possui cerca de 30% de similaridade da sua região codificante com o vírus da hepatite tipo C (HCV), sendo a organização e a função dos genes de ambos muito semelhantes^{16,17}.

O HPgV possui um genoma de aproximadamente 9,4 kb, composto por uma fita única de RNA de polaridade positiva, que é flanqueada por regiões não codificantes (NTR – *Non-Translated Region*) nas extremidades 3' e 5' (3'NTR e 5'NTR, respectivamente)^{7,18}. Possui apenas uma fase de leitura (ORF – *Open Reading Frame*) e codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que posteriormente é processada em uma proteína de core truncada, duas proteínas estruturais (E1 e E2), seis proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b) e uma proteína p5,6 de função ainda desconhecida, mas que parece ser equivalente à proteína p7 de HCV (Figura 1A)^{7,13,18}. O RNA possui um elemento de entrada interna de ribossomos tipo IV (IRES - *Internal Ribosomal Entry Site*) na região 5'NTR, que recruta as subunidades ribossomais e os fatores de tradução sem necessidade de capeamento da extremidade 5', e na extremidade 3' não apresenta cauda poli-A ou poli-U^{7,18}.

Sete genótipos (1 a 7) e dois subtipos dentro do genótipo 2 (2a e 2b) foram descritos para o HPgV (Figura 1B). O genótipo 1 predomina na maior parte dos países africanos; o 2, na Europa, América do Norte, Austrália, Brasil e península arábica; o 3, na Ásia e populações ameríndias; o 4, no sudeste da Ásia e Filipinas; o 5, na África central e meridional; o 6, na Indonésia, China e Japão e o 7 na província chinesa de Yunnan¹⁹⁻³⁴. No Brasil, a maior prevalência descrita é do genótipo 2 (~40%), porém já foram encontrados também os genótipos 1 (~10%) e 3 (~5%)^{33,35,36}. Em 2015, dois grupos independentes descreveram outro *Pegivirus* que também infecta humanos. Mais relacionados ao *Pegivirus* que infecta ratos e morcegos do que ao próprio HPgV, os novos tipos foram denominados HHpgV-1 (*Human Hepegivirus* 1, visto que na árvore filogenética ele se encontra entre os gênero *Hepacivirus* e *Pegivirus*) e HPgV-2 (*Human Pegivirus* type 2)^{37,38}.

Figura 1 – Organização genômica e relação filogenética do HPgV e do HCV

FONTE: Adaptado de Mohr e Stapleton³⁹.

NOTA: Em A), a figura detalha a organização genômica e o processamento proteolítico da poliproteína codificada pela única fase de leitura aberta descrita para o vírus da Hepatite C (HCV) e para o *Pegivirus* Humano (HPgV). Ambos os vírus contêm uma região 5' NTR, diferenciadas pelo elemento de entrada de ribossomo (IRES) (tipo III para o HCV e tipo IV para o HPgV). As poliproteínas são processadas pós-tradução em proteína do core (C) (truncada e com função ainda desconhecida no caso do HPgV), glicoproteínas de envelope (E1 e E2), um canal de íons (P7 para o HCV e P5.6 para o HPgV) e proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Em B), a figura mostra a árvore filogenética dos sete genótipos descritos para o HPgV e para o HCV e dos dois novos vírus descritos (HPgV-2 e HHPgV-1).

1.2 TROPISMO

Devido à sua semelhança com o HCV e ao fato de ter sido descoberto em pacientes com hepatites crônica e não-(A-E), diversos estudos tentaram associar a infecção pelo HPgV com patologias hepáticas. Porém, quando controlado o risco de exposição à transmissão em populações de risco para doenças de fígado, não foi encontrada nenhuma associação convincente entre a infecção pelo HPgV e qualquer forma de doença hepática⁴⁰⁻⁴². Isso porque estudos mostraram que a replicação viral se estabelece não em hepatócitos, mas sim em linfócitos e tecidos linfoides⁴²⁻⁴⁵.

De fato, o RNA do HPgV foi detectado em vários compartimentos do corpo, incluindo fígado, cérebro, fluído cérebro-espinhal, medula óssea, baço e células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)^{41,42,45-51}. Porém, a fita negativa de RNA viral (um dos intermediários de replicação, indicador de replicação viral ativa) só foi encontrada em quantidades significativas na medula óssea e no baço (tecidos linfoides altamente estratificados)^{47,52}. Para o fígado, ou a fita não foi encontrada ou foram obtidos resultados inconclusivos^{40,53-55}.

A fim de elucidar qual é o tipo celular permissível à infecção, diversos estudos tentaram cultivar o HPgV em diferentes células, porém, assim como ocorre com o HCV, a pesquisa *in vitro* não produziu resultados significativos^{43,45,56-57}. O vírus proveniente do PBMC de pacientes infectados se mostrou infectivo em múltiplas células, como linfócitos T, B e NK e monócitos, porém a carga viral não atinge valores muito maiores que 10^4 cópias de RNA viral por mL de sobrenadante de cultura mesmo após diversas passagens^{50,58-60}. Um estudo analisou especificamente a quantidade de vírus presente em diferentes níveis de diferenciação de linfócitos T do sangue periférico de pacientes infectados, identificando que as células T *naïve* (CD45RA+) apresentaram maior concentração de RNA viral de polaridade negativa⁵⁰.

Para tentar elucidar essas questões do tropismo viral, foram desenvolvidos modelos animais em primatas não humanos com um *Pegivirus* símio (SPgV) que mimetiza a infecção em humanos⁶¹. Estudos nesses animais mostraram que, quando a carga viral de SPgV vista nos tecidos é normalizada

pela encontrada no plasma, os tecidos com maior quantidade de RNA viral são o baço e a medula óssea (Figura 2A). Porém, quando realizada uma esplenectomia total (remoção do baço) nesses animais, a carga viral de SPgV circulante não sofreu alteração significativa, com exceção de um animal (Figura 2B), mostrando que, mesmo havendo células replicativas no baço, a responsabilidade pela manutenção da carga viral circulante ainda é da medula óssea na maior parte dos animais.

Figura 2 – Replicação do *Pegivirus simio*

FONTE: Adaptado de Bailey et al.⁶¹.

NOTA: Cada símbolo representa um animal nos gráficos. Em A) o gráfico mostra a diferença da carga viral encontrada nos diferentes tecidos de cada animal sobre o plasma. Em B), o gráfico mostra a carga viral de SPgV circulante antes e após a esplenectomia total de seis animais, com apenas um deles diminuindo a replicação após o procedimento.

1.3 CICLO DE VIDA

O HPgV produz uma infecção assintomática e persistente, ainda que não tão eficiente quanto o HCV, mesmo em pacientes sem nenhum imunocomprometimento, com títulos de carga viral médios de 10^7 cópias de RNA viral por mL de plasma⁶²⁻⁶⁴. Estima-se que aproximadamente 75% dos indivíduos infectados com HPgV desenvolvam anticorpos neutralizantes, apenas após cerca de dois anos de infecção, enquanto os outros 25% persistem cronicamente por vários anos^{65,66}. Ao contrário do HCV, anticorpos contra proteínas do vírus não são detectados ao longo da viremia na maior parte dos indivíduos infectados (95%)^{64,67}. O aparecimento de anticorpos contra a proteína E2 indica o final da infecção e confere proteção parcial contra novas infecções^{64,68,69}.

Sem um modelo *in vitro* de estudo, questões básicas acerca da biologia do vírus ainda precisam ser elucidadas. Algumas questões como o ciclo do vírus, desde sua entrada na célula até a liberação de uma nova partícula viral infectiva, são descritas baseando-se nas similaridades genômicas e na homologia dos aminoácidos que HPgV e HCV compartilham. Por exemplo, *in vitro*, o HCV utiliza diversos receptores de ligação e de entrada, incluindo o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLra – *Low-Density Lipoprotein Receptor*), o receptor *scavenger* classe B tipo I, CD81, claudina-1, ocludina, DC-SIGN (molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas), HRAS (*Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*) e o receptor de transferrina 1 e é possível que o HPgV partilhe alguns desses receptores⁷⁰⁻⁷⁷. Porém, visto que os vírus do gênero *Pegivirus* ou não possuem a proteína de nucleocapsídeo ou ela está truncada^{2,13}, também é possível que vesículas CD63+ com propriedades de exossomos derivadas de células sejam as principais responsáveis pela infecção de novas células, como mostrou um estudo em que microvesículas positivas para CD63 contendo o RNA de HPgV foram capazes de entregar o RNA e infectar células de PBMC de pacientes não infectados⁵⁰.

A cinética de produção de anticorpos e de depuração do vírus também são pontos que permanecem pouco conhecidos. Diversos mecanismos já

foram descritos para justificar como o HCV, um vírus de RNA exclusivamente citoplasmático sem intermediários replicativos de DNA conhecidos, mantém a viremia persistente e evade continuamente o sistema imune. Dentre eles, regiões hipervariáveis da proteína E2, mutação de epítomos de células T, interferência de diversas proteínas do vírus com sinalizações celulares e/ou estimulação crônica de células T levando-as à exaustão⁷⁸⁻⁸¹. Para o HPgV, no entanto, os mecanismos de escape do sistema imune não parecem ser os mesmos. O vírus não possui regiões hipervariáveis na proteína E2, não mostra variação de sequência em epítomos de células T em indivíduos cronicamente infectados e a presença de viremia, contrariamente, está associada com a diminuição da ativação celular e da exaustão de células T^{39,82,83}. Um dos mecanismos mais aceitos para o escape imune é a alta diversidade genética do vírus dentro do hospedeiro determinada pela alta taxa de recombinação genética⁸⁴⁻⁸⁶. Porém, somente esse mecanismo não explica como o vírus mantém carga viral em níveis tão altos por tão longo período sem ser efetivamente reconhecido pelo sistema imune.

1.4 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

O HPgV permanece, até os dias de hoje, o vírus de RNA sem patologia associada mais prevalente no mundo todo^{87,88}. Em 2014, estimou-se que cerca de 2,5 bilhões de indivíduos estavam infectados ou apresentavam anticorpos de uma infecção prévia e que, desse total, 750 milhões de indivíduos apresentavam viremia positiva naquele ano⁸⁷. A alta prevalência é explicada tanto pela persistência do vírus no sistema quanto por ser parenteral a principal via de transmissão, incluindo a exposição a componentes sanguíneos infectados, a exposição sexual e a transmissão vertical⁸⁹⁻⁹¹.

Estima-se que 1 a 5% dos doadores de sangue saudáveis possuam viremia no momento da doação em países desenvolvidos e esse número pode chegar até 20% em países em desenvolvimento³⁹. África e América do Sul apresentam uma prevalência moderada-alta, podendo variar de 5 a 15%^{67,92,93}.

Após a descoberta do HPgV em 1995, esforços na tentativa de associar a infecção a alguma patologia levaram à pesquisa de prevalência do vírus em populações variadas^{49,92,94-98}. Esses estudos mostraram que indivíduos que

possuem coinfeções com vírus que compartilham a mesma via de transmissão têm maiores chances de apresentarem viremia de HPgV. A prevalência do vírus pode atingir 20% em indivíduos coinfectados com HCV e até 50% em indivíduos coinfectados com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*)^{33,94-96,99-100}.

Além dessas, populações com malignidades hematológicas que necessitam de transfusões frequentes de hemocomponentes podem alcançar prevalência de até 40%, dependendo do país em que se encontram, visto que o vírus continua não fazendo parte dos testes de rotina em bolsas de sangue^{49,95-97,101-106}. Nos Estados Unidos, em 2012, por exemplo, a taxa de transmissão de HPgV foi de cerca de 1.000 novas infecções diárias somente pela transfusão de hemocomponentes⁶⁰.

Devido à alta prevalência do vírus na população em geral e em populações com neoplasias hematológicas e ao fato de a replicação estar estabelecida primariamente em tecidos linfoides, diversos estudos sugeriram a relação entre a infecção com HPgV e doenças como anemia aplástica, talassemia e linfomas não-Hodgkin^{49,98,107-115}. Porém, apenas um desses estudos encontrou associação indicando que a infecção prévia pelo HPgV poderia aumentar o risco de desenvolver linfomas não-Hodgkin, mas que, ainda assim, o desenvolvimento da patologia dependia também de outros fatores ainda desconhecidos¹¹⁶.

1.5 HPgV E HIV

Ainda devido à semelhança estrutural com o HCV, os primeiros estudos de coinfeção entre HIV e HPgV começaram buscando possíveis efeitos negativos, assim como ocorre na coinfeção HCV/HIV¹¹⁷⁻¹²¹. Contrariamente, no entanto, diversos trabalhos associaram a presença de viremia de HPgV com o aumento da sobrevida de pacientes que vivem com HIV, ao diminuir a progressão para doença e reduzir em até 2,5 vezes a taxa de mortalidade por AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (Figura 3)^{16, 57,122-127}.

Figura 3 – Aumento da sobrevivência de indivíduos que vivem com HIV quando infectados pelo HPgV

FONTE: Adaptado de Xiang et al.⁵⁷.

NOTA: A figura mostra a diferença de sobrevivência na curva de Kaplan-Meier em indivíduos infectados apenas pelo HIV (linha sólida preta) e coinfectados HIV/HPgV (linha tracejada cinza).

Ao longo dos anos, a viremia de HPgV em indivíduos HIV positivos foi associada à diminuição da carga viral de HIV-1^{126,128}, ao aumento da contagem de linfócitos T CD4+^{122,129} e à melhora na resposta ao tratamento antirretroviral, medida por meio da diminuição da carga viral, do aumento de linfócitos T CD4+ e devido à troca de regime de tratamento ser menos frequente^{100,122,124,129-131}. Além disso, foi visto que indivíduos coinfectados produzem anticorpos anti-E2 com menos frequência, o que leva à persistência prolongada do HPgV e, consequentemente, dos seus efeitos protetivos^{132,133}.

Algumas formas pelas quais a presença de viremia de HPgV pode interferir na infecção por HIV já foram descritas, como, por exemplo, a diminuição da expressão dos receptores e correceptores do HIV em células hematopoiéticas^{134,135}, o aumento da produção de Interferon e de citocinas que bloqueiam a fusão viral¹³⁶⁻¹³⁹ e a produção de anticorpos contra proteínas do envelope de HPgV que têm ação neutralizante contra o HIV^{124,126,136}. Estudos *in vitro* mostraram ainda que quando adicionadas proteínas isoladas do HPgV (E1, E2, NS3, NS5a) em cultura de células infectadas com HIV, ocorria diminuição significativa dos títulos de antígeno p24, sugerindo interferência direta do HPgV na replicação do HIV¹⁴⁰⁻¹⁴⁶.

Mas foi somente em 2009 que Maidana-Giret e colaboradores⁸² identificaram que a viremia persistente de HPgV modula a ativação de células T, diminuindo os efeitos patogênicos da constante ativação imune causada pelo HIV^{147,149}. De fato, diversos trabalhos mostraram que a infecção pelo *Pegivirus* diminui marcadores clássicos de ativação celular de células T CD4+ e CD8+ como CD25, CD38, Ki67, CD69 e HLA-DR^{39,65,150-156}.

Uma das formas pela qual o vírus modula a ativação dos linfócitos T é inibindo a sinalização celular desencadeada pelo TCR ao mimetizar a molécula que é fosforilada pela proteína LCK¹⁴³. Assim, a produção de IL-2 dependente da ativação do TCR é inibida, bloqueando a expansão de linfócitos T CD4+¹⁵⁷. Essa mesma imunomodulação, que reduz a liberação de agentes pró-inflamatórios, foi observada em pacientes do oeste da África coinfectados com Ebola/HPgV, mostrando que esse efeito não é dependente da presença do HIV¹³³.

1.6 HPgV E A MEDULA ÓSSEA

Estudos recentes sugerem que os efeitos do HPgV na modulação da ativação não são restritos apenas às células T. Marcadores de ativação de monócitos, como CCR5, de linfócitos NK, como o CD69, e de células B, como o CD86, foram encontrados reduzidos em pacientes coinfectados HIV/HPgV^{132,158,159}.

De fato, durante a infecção pelo HIV, diversas anormalidades na medula óssea são encontradas (e.g. depleção massiva de células CD34+CD4+) e contribuem fortemente para a alta taxa de morbidade e mortalidade¹⁶⁰⁻¹⁶². Um estudo sugeriu que células-tronco hematopoiéticas duradouras seriam o principal reservatório do vírus latente^{163,164} e os famosos casos dos pacientes de Berlim e de Boston parecem confirmar essa hipótese^{165,166}.

Esses estudos, juntamente com os achados em tropismo viral, parecem indicar que o principal tipo celular responsável pela produção dos altos títulos circulantes *in vivo* está restrito a alguma população progenitora hematopoiética encontrada apenas na medula, que pode ou não manter a infecção e seus efeitos imunomodulatórios após sua diferenciação. Assim sendo, a modulação não apenas de células T, mas de todas as possíveis células infectadas pelo

HPgV, poderia justificar a relação benéfica em indivíduos coinfectados HIV/HPgV. Se esse modelo for real, isso significa que o HPgV replica em células progenitoras sem efeitos citopáticos e gera tolerância imunológica do organismo à sua infecção, tornando-se parte do viroma humano¹⁶⁷⁻¹⁶⁸.

A análise de organismos que compõem o viroma se torna particularmente importante em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT – *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*). A intensa imunossupressão, tanto pela doença hematológica primária quanto pela imunodeficiência induzida pelo tratamento a que esses pacientes estão sujeitos, associada ao alto número de transfusões de hemocomponentes, aumenta o risco de infecções transmitidas via parenteral^{94,169}. De fato, estudos mostraram alta prevalência de HPgV em diversas populações com malignidades hematológicas^{49,95-97,101,104-106}.

O HSCT alogênico ainda é a forma mais eficaz de tratamento de doenças onco-hematológicas¹⁷⁰⁻¹⁷⁵. Porém, apesar da rápida evolução do suporte clínico durante o procedimento, o tratamento para a principal complicação pós-HSCT, a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD – *Graft Versus Host Disease*), ainda é precário, apresentando o desenvolvimento dessa complicação elevada taxa de mortalidade e comprometimento da qualidade de vida dos pacientes^{176,177}. Dividida nas formas aguda e crônica, a GVHD é caracterizada pela falha tanto na reconstituição imune quanto no desenvolvimento de tolerância das células do doador.

Apesar de diversos estudos terem avaliado a presença do HPgV em doadores e recipientes de células-tronco^{49,102,103}, apenas um avaliou a influência do vírus nos desfechos clínicos clássicos do HSCT como enxertia, desenvolvimento de GVHD, recaída da doença hematológica primária ou mesmo sobrevivência após procedimento, não encontrando diferenças entre os 122 pacientes infectados e não infectados pelo HPgV em nenhum dos desfechos analisados¹⁰⁶. Porém, assim como a pesquisa clínica dos efeitos benéficos da coinfecção HIV/HPgV necessitou de várias coortes mostrando resultados similares (que ainda assim apresentaram variações segundo a carga viral do HPgV, o momento da infecção e o genótipo do vírus), os efeitos que o HPgV pode causar nos desfechos clínicos de pacientes HSCT também

devem ser avaliados em diferentes coortes antes de serem descartados. Os efeitos da severa imunomodulação associados aos efeitos anti-inflamatórios moderados do HPgV podem provocar perturbações não esperadas nos principais desfechos clínicos ou até mesmo induzir patogenicidade do próprio HPgV e/ou de outros vírus associados ao HSCT.

Visto que o HPgV pode se tornar uma bioterapia eficaz para pacientes HIV positivos – uma terapia que previna o desenvolvimento da AIDS modulando o sistema imune e evitando o comprometimento desse sistema¹⁸¹ bem como um vetor viral para entrega de terapia genética para células progenitoras (similarmente aos adenovírus), elucidar questões básicas da biologia do vírus e desenvolver um modelo *in vitro* funcional se tornam pontos essenciais. Sendo assim, este trabalho tenta elucidar como o HPgV interage com a medula óssea, ao avaliar a replicação do HPgV em diversos tipos celulares desse órgão em comparação com outros e ao avaliar o impacto da infecção do HPgV no desfecho clínico de pacientes HSCT.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o tropismo do HPgV, bem como analisar sua influência sobre os principais desfechos clínicos de pacientes submetidos ao HSCT.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para caracterização do tropismo viral, o seguinte objetivo específico foi proposto:

- Quantificar as fitas positiva e negativa de RNA viral nas células totais e em suas subpopulações dos seguintes tecidos: cérebro, fígado, linfonodo, sangue, baço e medula óssea.

Para investigar a influência do HPgV nos pacientes HSCT, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Identificar a dinâmica de exposição ao vírus;
- Identificar os genótipos prevalentes e possíveis variações de sequência;
- Analisar o efeito da viremia nos principais desfechos do transplante: GVHD, recaída da doença hematológica primária e mortalidade.

3 MÉTODOS

Para atender aos objetivos específicos do projeto, foram utilizadas amostras de diferentes sujeitos:

- Para caracterizar o tropismo do HPgV, foram coletadas amostras de indivíduos recém-falecidos autopsiados pelo Serviço de Verificação de Óbito da Capital de São Paulo (SVOC-SP) e de pacientes submetidos à artroplastia eletiva pelo Instituto de Ortopedia (IOT) do Hospital das Clínicas de São Paulo (HCSP).
- A fim de analisar a influência do HPgV nos desfechos clínicos de recipientes HSTC, foram selecionadas amostras de uma coorte de pacientes do Hospital Sírio-Libanês que foram submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (cortesia do Dr. Celso Arrais).

O fluxo de processamento das amostras está representado na Figura 4.

Hospital Sírio-Libanês

Disponibilidade de amostras
e de dados clínicos

Coleta de plasma livre de
plaquetas dias antes do HSCT

Coleta de plasma livre de
plaquetas ~30 dias após o HSCT

Detecção da viremia de HPgV nas
amostras pré e pós-HSCT
(qRT-PCR em tempo real)

Análises
estatísticas

Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC)

> 18 anos
< 18 horas post-mortem

Coleta de sangue, medula óssea e
tecidos sólidos
(Cérebro, Fígado, Baço e Linfonodo)

Detecção do HPgV no plasma
(qRT-PCR em tempo real)

HPgV (+)

HPgV (-)

Dissociação das
células de
tecidos sólidos

Separação das células
mononucleares do sangue,
medula óssea, baço e linfonodos

Descarte
das
amostras

Separação das populações celulares
(Fluorescence Activated Cell Sorting)

Detecção do HPgV e da replicação viral
(qRT-PCR em tempo real do RNA fitas (-) e (+))

15

Instituto de Ortopedia (IOT)

> 18 anos
Artroplastia
eletiva

Coleta de sangue periférico e
medula óssea

Figura 4 – Fluxograma experimental

3.1 POPULAÇÕES DE ESTUDO

3.1.1 Amostras HSCT

Entre agosto de 2012 e setembro de 2014, pacientes que se sujeitariam ao HSCT alogênico no Hospital Sírio-Libanês, em São Paulo, foram recrutados para formar um banco de amostras que seria utilizado para diversos estudos. A coleta dessas amostras foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital Sírio-Libanês sob o número 01671612.9.1001.5461 (Anexo A) e todos os indivíduos recrutados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

O sangue periférico foi coletado via cateter venoso central em tubos de vácuo contendo 3,2% (0,105 M) de citrato de sódio (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Reino Unido), alguns dias antes do HSCT (amostra pré-HSCT) e em uma média de 30 dias após o procedimento (amostra pós-HSCT). A seleção das amostras para esse estudo foi realizada conforme a disponibilidade tanto da amostra quanto dos dados clínicos de cada paciente, não havendo critérios de seleção em consequência de idade, sexo, etnia, doença de base e/ou tratamento.

3.1.2 Amostras SVOC

A coleta de amostras de indivíduos autopsiados no SVOC-SP foi aprovada pela Pós-Graduação de Alergia e Imunopatologia da Faculdade de Medicina e pela Coordenadoria de Ética em Pesquisa da FMUSP, sob o número 30312914.1.0000.0065 (Anexo C). Todos os responsáveis pelos indivíduos autopsiados foram devidamente esclarecidos acerca do destino das amostras e assinaram o TCLE (Anexo D).

As amostras coletadas foram selecionadas segundo os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos:

Critérios de inclusão:

- Idade igual ou superior a 18 anos completos;
- Intervalo *post-mortem* menor que 18 horas;

Critérios de exclusão:

- Cadáveres transplantados (transplante de órgão e/ou medula óssea);
- Morte por doenças altamente infecciosas e/ou infecções por vírus transmitidos via parenteral, à exceção do HIV;
- Ausência de relatório de autópsia;
- Qualquer outra condição que impossibilitasse a obtenção de consentimento para participação no estudo.

Não foram utilizados critérios de seleção em consequência de idade, sexo e/ou etnia dos indivíduos.

Para os indivíduos selecionados o sangue foi coletado via artéria subclavicular ou via ventrículo direito com seringa de 5 mL e agulha de 40x12 mm e a medula óssea foi coletada a partir dos ossos vertebrais com seringa de 20 mL e agulha de 40x16 mm. Ambos os materiais foram armazenados, até o processamento, em tubos de vácuo contendo como anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) dipotássico (K₂EDTA) (BD Vacutainer Systems).

Os tecidos do baço, linfonodos, fígado e cérebro foram cortados em pedaços de aproximadamente 2x2x2 cm³ e acondicionados até o processamento em placas de poliestireno de 6 poços (Corning Inc., Corning, NY, EUA) contendo meio R10 gelado - RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Gibco por Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 1 mM de penicilina/estreptomicina (Gibco), 55 µM de β-mercaptoetanol (Gibco) e 10 mM de HEPES (ácido hidroxietil piperazinaetanosulfônico) (Gibco).

3.1.3 Amostras IOT

A artroplastia é uma cirurgia invasiva para colocação de prótese no quadril. Durante o procedimento, a cabeça do osso fêmur degenerada é substituída por uma prótese de cerâmica que se articulará com um encaixe côncavo de aço inox alocado na fossa do osso ilíaco. Para que a prótese de cerâmica semelhante à cabeça do fêmur seja fixada, aproximadamente 15 cm do material interno do

corpo do osso são retirados e descartados, a fim de inserir a coluna metálica que segura a cabeça de cerâmica. Esse procedimento foi selecionado por ser a melhor forma de conseguir grandes quantidades de material medular de sujeitos vivos, apenas em prol da pesquisa e sem causar lesão ao paciente, aproveitando um material que seria descartado.

A coleta de material desses pacientes foi aprovada pela Pós-Graduação de Alergia e Imunopatologia da Faculdade de Medicina, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sob o número 46009215.6.0000.0068 (Anexo E). Cada paciente foi convidado a participar do estudo pelo médico responsável pela cirurgia na consulta anterior ao procedimento e o TCLE (Anexo F) foi recolhido, devidamente assinado, no dia do procedimento cirúrgico.

As amostras coletadas foram selecionadas segundo os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos pacientes:

Critérios de Inclusão:

- Idade igual ou superior a 18 anos completos;
- Pacientes que foram submetidos à artroplastia primária eletiva;
- Para os pacientes com sorologia reagente para o HIV, a contagem da carga viral inferior a três meses;
- Concordância com os procedimentos a serem realizados, descritos no TCLE.

Critérios de exclusão

- Pacientes transplantados (transplante de órgão e/ou medula óssea);
- Paciente incapaz de compreender e/ou assinar o TCLE;

A inclusão de voluntários não fez qualquer distinção em consequência de idade, sexo e etnia dos pacientes e/ou da doença de base que levou à necessidade de realizar a artroplastia.

Para os pacientes selecionados o sangue periférico foi coletado pelo acesso vascular inserido para fins da cirurgia, preferencialmente antes de a sedação ser aplicada. Aproximadamente 6-8 mL de sangue foram coletados em dois tubos de vácuo contendo K₂EDTA (BD Vacutainer Systems). Durante o

procedimento de remoção do material do interior do corpo do osso fêmur para inserção do pino de referência, 6-8 mL de material medular foram aspirados com seringa de 20 mL e armazenados em dois tubos de vácuo contendo K₂EDTA (BD Vacutainer Systems).

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Amostras HSCT

As amostras de sangue foram processadas dentro de duas horas após a coleta. O plasma livre de plaquetas foi separado através de duas centrifugações sequenciais: a primeira a 20 °C por 15 minutos a 1500 RCF e a segunda na mesma temperatura por 2 minutos a 13000 RCF. O plasma foi aliquoteado e imediatamente congelado e armazenado em *freezer* -80 °C até o momento da extração de RNA.

3.2.2 Amostras SVOC

As amostras provenientes dos indivíduos autopsiados foram processadas e analisadas no mesmo dia da coleta, devido à intensa degradação *post-mortem* das células.

3.2.2.1 Sangue e medula óssea

O sangue foi submetido a 10 minutos de centrifugação em temperatura ambiente a 650 RCF, a fim de separar o plasma do conteúdo celular. Foram separadas 3 alíquotas de 200 µL de plasma; uma delas foi utilizada para detecção do *status* de HPgV e as restantes foram armazenadas em *freezer* -80 °C.

Todas as amostras de sangue SVOC coletadas foram submetidas aos procedimentos descritos até aqui e à detecção do RNA do HPgV no plasma sanguíneo; no entanto, apenas as amostras positivas para o RNA viral foram submetidas aos procedimentos que se seguem.

O conteúdo celular restante do sangue e a medula óssea foram submetidos à separação de PBMC pela técnica de gradiente com Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). O material foi diluído na proporção de 1 para 1 com HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Gibco) e gradualmente dispensado sobre uma camada de Ficoll-Paque. O gradiente foi submetido a 30 minutos de centrifugação em temperatura ambiente a 1050 RCF sem força de desaceleração, seguida por consecutivas lavagens para lise e remoção de células eritrocitárias. O PBMC resultante seguiu para marcação das proteínas identificadoras do tipo celular com anticorpos específicos para a citometria de fluxo.

3.2.2.2 Tecidos

Os tecidos foram dissociados em suspensão de células únicas utilizando *kits* que combinam métodos enzimáticos e mecânicos específicos para cada tipo de órgão. Foram utilizados aproximadamente 300 mg de baço e linfonodo com o Spleen Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Germany), 500 mg de fígado com o Liver Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) e 2 g de cérebro com o Adult Brain Dissociation Kit (Miltenyi Biotec).

Para separar essas quantidades, cada pedaço de 2x2x2 cm³ foi cortado em pedaços menores, a fim também de remover partes cartilaginosas e/ou gordurosas. As porções, agora livres de tecido conectivo e de gordura, foram pesadas e imersas em solução enzimática específica para cada órgão seguindo instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processamento mecânico, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante para cada *kit*. O produto resultante da dissociação do tecido cerebral foi ainda submetido à remoção de neurônios e bainha de mielina e de células eritrocitárias. O produto resultante da dissociação dos tecidos do baço e dos linfonodos foram também submetidos à separação de PBMC por gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), a fim de remover células e moléculas que interferem na citometria de fluxo.

As células dissociadas resultantes de todos os tecidos seguiram para o protocolo de marcação das proteínas identificadoras do tipo celular com anticorpos específicos para a citometria de fluxo.

3.2.3 Amostras IOT

As amostras provenientes dos indivíduos submetidos à artroplastia foram processadas até seis horas após a cirurgia. O sangue periférico foi submetido a 10 minutos de centrifugação em temperatura ambiente a 650 RCF, a fim de separar o plasma do conteúdo celular. Foram separadas 3 alíquotas de 400 μ L de plasma para detecção da carga viral de HPgV que foram armazenadas em *freezer* -80 °C.

O conteúdo celular restante do sangue e o conteúdo medular foram submetidos à separação de PBMC como descrito para o sangue e medula das amostras SVOC. Os PBMCs resultantes seguiram para congelamento lento com 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 90% de SFB (Gibco) em *freezer* -80 °C e posterior armazenamento em nitrogênio líquido até realização dos experimentos de citometria de fluxo.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA foi extraído das amostras de plasma em três momentos distintos: da primeira alíquota de plasma SVOC, a fim de determinar o *status* do HPgV e dar seguimento ao processamento das amostras de tecido; das amostras pré e pós-HSCT, da primeira alíquota de plasma IOT e da segunda alíquota de plasma SVOC, a fim de quantificar a carga viral de HPgV; e das células das amostras SVOC e IOT separadas pela citometria, a fim de identificar o nível de replicação nos diferentes tipos celulares.

Para as amostras de plasma, 140 μ L de material foi submetido à extração de RNA com o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN, Venlo, Países Baixos), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante para extração com centrifuga, com volume final de eluição de 60 μ L. Para as amostras de células, cerca de 10^5 células foram submetidas à extração de RNA por Trizol LS (Thermo Fisher

Scientific) mais clorofórmio (Vetec Química por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguido de lavagens consecutivas com isopropanol P.A. (Vetec Química) e etanol P.A. (Vetec Química), respectivamente, com volume final de eluição de 20 μ L em água livre de nucleases (Integrated DNA Technologies - IDT, Inc. Skokie, IL, USA). O RNA extraído por ambos os métodos foi armazenado em *freezer* -80 °C até o momento da reação de qRT-PCR em tempo real (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Real Time*) para detecção e quantificação do HPgV.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HPgV

A análise de presença do HPgV foi feita de modo quantitativo utilizando como referência o Ct (*Cycle threshold*) gerado por uma curva padrão. A curva padrão foi construída baseada no plasmídeo AF121950 e os processos necessários para produzi-la estão detalhados nos próximos subitens.

3.4.1 Construção da Curva Padrão

3.4.1.1 Plasmídeo

O plasmídeo, construído em 2000 por Xiang et al.⁵⁶, possui o genoma completo do HPgV da cepa Iowan genótipo 2a (9395 bp) clonado no vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O tamanho total do plasmídeo é de 13295 bp e o RNA resultante é infeccioso em PBMCs. Ele foi disponibilizado pelo programa de doação de reagentes para pesquisas relacionadas ao HIV do NIH (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program) ao laboratório do Dr. Amilcar Tanuri e, posteriormente, uma alíquota foi gentilmente doada ao nosso grupo pelo Dr. Renato Santana Aguiar.

3.4.1.2 Transformação bacteriana e extração plasmidial

Uma alíquota do DNA plasmidial foi transformada por choque térmico em bactérias quimiocompetentes, de forma a manter um estoque e amplificar a quantidade de material quando necessário.

Para o procedimento, um tubo contendo bactérias *Escherichia coli* competentes da cepa Dh5 α (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Edécio Cunha Neto) foi descongelado em gelo por, aproximadamente, 30 minutos. Após o descongelamento, 50 ng de DNA plasmidial foram adicionados às bactérias competentes e essa mistura foi incubada em gelo por outros 30 minutos. O choque térmico foi realizado a 42 °C por exatos 30 segundos e a mistura voltou para o gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado meio S. O. C. (*Super Optimal Broth With Catabolite Repression*) (Thermo Fisher Scientific)¹⁸² e as células recém-transformadas foram incubadas com agitação constante a 37 °C por uma hora. Nesse ínterim, placas de Petri preparadas previamente contendo o meio de Luria-Bertani (LB - *Lysogeny Broth*) (Thermo Fisher Scientific)¹⁸³, ágar-ágar (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e o antibiótico ampicilina (Thermo Fisher Scientific), para indução da resistência gerada pelo plasmídeo, foram colocados à temperatura ambiente.

Após uma hora de incubação, uma alíquota do meio contendo as bactérias transformadas foi semeada em uma placa de Petri (diluída). O restante do meio foi submetido à centrifugação em temperatura ambiente por 8 minutos a 450 RCF. O sobrenadante foi descartado e o *pelet* de células, ressuspensionado, foi semeado em outra placa de Petri (concentrada). Ambas as placas foram armazenadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após as 24 horas, as colônias que cresceram foram coletadas e incubadas em agitação constante em meio LB líquido contendo ampicilina por 72 horas a 28 °C, visto que o plasmídeo é maior que 10 kb e *lowcopy*.

O meio LB contendo as células transformadas foi utilizado para extração plasmidial com o *kit* QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante para plasmídeos *lowcopy*. O material resultante foi eluído com 200 μ L do tampão AE (QIAGEN) e quantificado com fluorímetro Qubit (Thermo Fisher

Scientific) utilizando o *kit* dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante. O DNA plasmidial quantificado foi armazenado em *freezer* -20 °C.

3.4.1.4 Linearização

A enzima de restrição Sall (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) foi selecionada, pois faz apenas um corte no plasmídeo entre os nucleotídeos 6603/6607, região que codifica a proteína NS4 do HPgV. Para a restrição, as quantidades recomendadas pelo fabricante de tampão, enzima e de plasmídeo purificado foram incubadas por 2 horas a 37 °C. O DNA resultante foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo o corante SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific), para separar o material que foi efetivamente linearizado. O gel foi visualizado e fotodocumentado utilizando o sistema Alphamager HP Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA) e as bandas contendo o plasmídeo linear foram recortadas do gel e purificadas com o *kit* QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN), que purifica plasmídeos maiores que 10 kb a partir de gel de agarose. O material foi eluído em 100 µL e novamente quantificado no fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) utilizando o *kit* dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante.

3.4.1.5 Transcrição *in vitro* e quantificação do RNA

O plasmídeo agora linearizado foi submetido à transcrição *in vitro*, para produção de RNA viral, com o *kit* MEGAscript T7 Transcription (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante. O RNA resultante é de polaridade positiva, possui 6691 pb e foi quantificado com fluorímetro utilizando o *kit* RNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante. Com uma concentração inicial de 10^{11} cópias de genoma/µL, esse RNA foi diluído serialmente de 10^8 até 10^1 cópias de genoma/µL e utilizado em uma qRT-PCR para determinar o Ct de cada diluição do RNA viral puro.

Com o objetivo de subtrair possíveis efeitos gerados por componentes do plasma ou pela técnica de extração de RNA, quarenta microlitros do RNA

purificado com concentração de 10^{11} cópias de genoma/ μL foram misturados a 100 μL de um *pool* de plasmas negativos para o HPgV (RNA *spiked*). Esse plasma contaminado com HPgV foi submetido à extração de RNA conforme citado anteriormente. O RNA resultante foi novamente quantificado por fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific), diluído serialmente de 10^{11} a 10^5 cópias de genoma/ μL e utilizado em uma qRT-PCR utilizando como curva padrão o RNA viral puro. A nova concentração encontrada para o RNA *spiked*, segundo a curva padrão, foi utilizada para diluir o restante do material. Esse material diluído foi separado em alíquotas de uso único que foram congeladas em *freezer* $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. Finalmente, o RNA *spiked* diluído foi utilizado em uma qRT-PCR em decaplicata partindo de 10^8 até 10^0 cópias de genoma/ μL , para determinar o limite de detecção dessa curva padrão. Para esse RNA, o limite de detecção ficou em 10 cópias de genoma/ μL de plasma.

3.4.2 qRT-PCR em Tempo Real para Detecção do HPgV

3.4.2.1 *One-step* para detecção e quantificação da viremia plasmática

Para detecção do *status* e da carga viral do HPgV, 5 μL do RNA viral extraído do plasma foram utilizados com o *kit* TaqMan™ Fast Virus One-Step Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para reações em sistemas rápidos de RT-PCR com volume final de 20 μL . Os iniciadores e a sonda hidrolítica utilizados (IDT) amplificam um fragmento de 176 bp dentro do domínio da proteína NS3 do vírus (Tabela 1) e foram desenhados para anelar especificamente às sequências dos genótipos 1, 2, 3, 4 e 5 do HPgV. Os iniciadores e a sonda foram testados quanto a especificidade e não identificaram como positivas duas amostras positivas para HCV e quatro amostras positivas para o Pegivirus símio (SPgV). A reação de qRT-PCR foi realizada no instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems) e as condições de corrida estão ilustradas na Tabela 2. Os dados gerados em cada experimento foram analisados com o programa StepOne v. 2.3 (Applied Biosystems).

Tabela 1 – Iniciadores e sonda hidrolítica utilizados para amplificar o RNA do HPgV

Nome	Sequência do Iniciador (5'-3')	Fragmento (pb)
HPgVF	TTACGACGACTGCCCTTACA	176
HPgVR	ACAGTGTTTCCCGGCACAT	
Sonda TaqMan®	FAM/AAAAGT(I)CGCGGCGTCAA/BHQ ⁽¹⁾	108-68

⁽¹⁾ Para garantir que seja possível amplificar todos os genótipos do HPgV, foi adicionada uma base degenerada (inosina) na sétima base da sonda TaqMan®.

Tabela 2 – Protocolo de amplificação do *kit* TaqMan® Fast Virus One-Step Master Mix

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Transcrição reversa	50 °C	5 minutos	1
Inativação da Transcriptase reversa e ativação da Polimerase	95 °C	20 segundos	1
Amplificação	95 °C	3 segundos	40
	60 °C ⁽¹⁾	30 segundos	

⁽¹⁾ A aquisição da fluorescência da sonda TaqMan® se dá durante os 30 segundos dessa etapa. O resultado da fluorescência medida em cada ciclo é mostrada em gráficos de amplificação e mensurada pelo valor de Ct.

3.4.2.2 *Two-step* para detecção das fitas de RNA de polaridades positiva e negativa

A fita de RNA de polaridade negativa é um intermediário de replicação para a maior parte dos *Flaviviridae*. Sua presença indica que o vírus está replicando e, portanto, que a célula se encontra infectada. Com o objetivo de detectar os tipos celulares efetivamente infectados pelo HPgV, as duas fitas do RNA viral foram quantificadas separadamente.

Para isso, foi realizada para todas as amostras SVOC e IOT positivas e para a curva padrão a síntese do cDNA específico de cada fita do RNA viral utilizando o *kit* SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) em duas etapas. Na primeira, 4 µL do RNA foram misturados ao iniciador correspondente de cada fita, água livre de nucleases (IDT) e uma mistura dos quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) em partes iguais (Applied Biosystems). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 65 °C, a fim de desfazer as estruturas secundárias do RNA viral. Na segunda etapa, à mistura inicial foram adicionados o tampão da enzima, DTT (ditiotretitol) (Invitrogen), RNaseOUT (New England

Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e a enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Essa nova mistura foi incubada por 60 minutos a 55 °C, seguido de 15 minutos a 70 °C para inativação da enzima.

Para quantificação do cDNA específico de cada fita, 2 µL de cada amostra e da curva padrão foram utilizados com o *kit* TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante para reações em sistemas rápidos de RT-PCR com volume final de 20 µL. Foram utilizados os mesmos iniciadores e a mesma sonda hidrolítica especificados na Tabela 1 e as condições de corrida estão ilustradas na Tabela 3. Os dados gerados em cada experimento foram analisados com o programa StepOne v. 2.3 (Applied Biosystems).

Tabela 3 – Protocolo de amplificação do *kit* TaqMan® Fast Advanced Master Mix

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Ativação da enzima Uracil-N glicosilase (UDG)	50 °C	2 minutos	1
Ativação da Polimerase	95 °C	20 segundos	1
Amplificação	95 °C	1 segundo	50
	60 °C ⁽¹⁾	20 segundos	

⁽¹⁾ A aquisição da fluorescência da sonda TaqMan® se dá durante os 30 segundos dessa etapa. O resultado da fluorescência medida em cada ciclo é mostrada em gráficos de amplificação e mensurada pelo valor de Ct.

3.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS HSCT PAREADAS

3.5.1 Preparo e Sequenciamento das Amostras

A fim de avaliar as sequências do vírus em amostras pré e pós-HSCT positivas para o HPgV de um mesmo paciente, um fragmento de 2 386 pb (incluindo parte dos domínios dos genes das proteínas NS3, NS4A, NS4B e NS5A) foi gerado utilizando o *kit* SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen) com os iniciadores GBVC-cHu amp3F (5'GATGTGGAGTGCA ATTGGTG3') e GBVC-cHu amp3R (5'AGTTTGTAGGCGGATGTTTCG3') (IDT).

Os fragmentos amplificados foram purificados usando dois ciclos de esferas AMPure XP (1,8x) (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e as bibliotecas de

cDNA foram geradas a partir desses fragmentos purificados utilizando o *kit* Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA). Os adaptadores, responsáveis por identificar e prender os fragmentos, foram adicionados usando o *kit* Nextera DNA Sample Preparation (Illumina) e o sequenciamento foi realizado com o *kit* 600-Cycle MiSeq (Illumina) no equipamento Illumina MiSeq (Illumina).

3.5.2 Análise dos Dados de Sequência Viral

Para analisar os dados das sequências geradas, as leituras FASTQ foram inicialmente cortadas e reduzidas para 40.000 leituras pareadas (20.000 R1 e 20.000 R2) usando `reformat.sh` (BBMap - Bushnell B. - sourceforge.net/projects/bbmap). As leituras reduzidas foram então mapeadas com cada sequência de referência dos sete genótipos de HPgV (Números de acesso no GeneBank - 1: U36380; 2: U63715; 2a: AF121950; 2b: NC_001710; 3: U94695; 4: U75356; 5: AY949771; 6: AB003292; 7: HQ331235) utilizando um código customizado em Python (https://bitbucket.org/dholab/zikv_barcode_manuscript_scripts/src).

Os arquivos BAM gerados foram importados para o programa Geneious R11 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) e a sequência-consenso de cada alinhamento foi gerada utilizando o limite máximo de qualidade e exigindo uma cobertura de pelo menos 10x. Essas sequências-consenso foram então alinhadas umas às outras utilizando o *software* MUSCLE v. 3.8.31¹⁸⁴. Os alinhamentos gerados foram truncados e mapeados às sequências de referência dos genótipos para identificar a maior região contínua, em que não havia bases ambíguas em nenhuma das sequências-consenso. Ainda, a partir das sequências-consenso, uma matriz de distância em nucleotídeos foi criada para identificar quão similar eram as sequências virais nas amostras pré e pós-HSCT no mesmo paciente e entre eles.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Para determinar quais os tipos celulares mais permissíveis à infecção pelo HPgV, as células provenientes das amostras SVOC e IOT foram submetidas à

separação por citometria de fluxo e posterior quantificação das fitas de RNA viral de polaridade positiva e negativa por qRT-PCR, como mencionado anteriormente.

As células de cada tecido foram submetidas à marcação das moléculas de superfície celular identificadoras de cada tipo com anticorpos específicos para citometria de fluxo. Os painéis de marcação foram desenhados para serem compatíveis com o equipamento BD FACSAria™ II U (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) que possui sete filtros (identifica sete fluoróforos diferentes) e é capaz de separar até quatro populações por amostra.

O primeiro painel de marcação com anticorpos está descrito na Tabela 4 e visa separar células da microglia no cérebro. O segundo painel está descrito na Tabela 5 e visa separar hepatócitos de leucócitos no fígado. O terceiro painel, descrito na Tabela 6, visa separar as três principais populações do linfonodo: linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas. O quarto painel está descrito na Tabela 7 e visa separar as quatro principais subpopulações do sangue periférico: linfócitos T, linfócitos B, monócitos e células dendríticas. O quinto painel, descrito na Tabela 8, visa separar as principais subpopulações do baço e da medula óssea: linfócitos T, monócitos e células dendríticas.

Devido à importância das células B na replicação viral descrita em 2015 por Bailey e colaboradores⁶¹ e aos estudos de Chivero e colaboradores¹⁵⁹ mostrando a importância das células progenitoras para manutenção da carga viral de HPgV, as células B do baço e da medula óssea foram marcadas separadamente com um painel que separa os diferentes estágios de maturação dessas células: células B imaturas, células B transitórias e células B maduras (Tabela 9). Esse painel foi desenhado segundo a revisão de Caselna et al.¹⁸⁵ e segundo o manual da BD Biosciences para pesquisa em células B¹⁸⁶. Todos os painéis possuem também marcadores de Anexina V para identificar células mortas e/ou em processo de apoptose.

Tabela 4 – Pannel de citometria de fluxo para discriminação de células da microglia

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD11b	ICRF44	APC-Cy7
CD45	2D1	FITC
Marcador de Anexina	-	PE-CF594

Tabela 5 – Pannel de citometria de fluxo para purificação de hepatócitos

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD45	2D1	FITC
Marcador de Anexina	-	PE-CF594

Tabela 6 – Pannel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do linfonodo

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD3	UCHT1	PE-CF594
CD19	SJ25-C1	APC-Cy7
HLA-DR	G46-6	PE
CD56	B159	PE-Cy7
CD123	6H6	APC
Marcador de Anexina		FITC

Tabela 7 – Pannel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do sangue periférico

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD3	UCHT1	PE-CF594
CD14	M5E2	PerCP-Cy5.5
CD19	SJ25-C1	APC-Cy7
HLA-DR	G46-6	PE
CD56	B159	PE-Cy7
CD123		APC
Marcador de Anexina		FITC

Tabela 8 – Pannel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações do baço e da medula óssea

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD3	UCHT1	PE-CF594
CD14	M5E2	PerCP-Cy5.5
HLA-DR	G46-6	PE
CD56	B159	PE-Cy7
CD123		APC
Marcador de Anexina		FITC

Tabela 9 – Pannel de citometria de fluxo para discriminação das subpopulações de linfócitos B do baço e da medula óssea

Anticorpo	Clone	Fluoróforo
CD34	581	FITC
CD38	HIT2	PerCP-Cy5.5
IgD	IA6-2	APC
CD10	HI10a	PE-Cy7
CD19	SJ25-C1	APC-Cy7
CD27	L128	PE
CD3 ⁽¹⁾	UCHT1	PE-CF594
CD14 ⁽¹⁾	MφP9	PE-CF594
CD56 ⁽¹⁾	B159	PE-CF594
CD11c ⁽¹⁾	B-LY6	PE-CF594
LIVE/DEAD	-	PE-CF594

⁽¹⁾ Serão utilizados como marcadores de exclusão, a fim de purificar a população de linfócitos B.

Antes da marcação, as amostras IOT da medula e do sangue periférico foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e lavadas com meio R10. Cada amostra SVOC e IOT teve suas células contadas com contador automatizado Countess (Modelo C10281, Invitrogen), segundo instruções do fabricante para cada tipo celular.

Cerca de dez milhões de células de cada tecido foram utilizadas para marcação de cada pannel e 1 milhão de células de cada tecido foi utilizado como controle não marcado. Os *mix* foram incubados no escuro por 20 minutos a 4 °C contendo os anticorpos de cada pannel diluídos em tampão MACS: PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), 0,5% de Albumina Bovina (Sigma-Aldrich) e 2 mM de EDTA (Sigma-Aldrich). Os controles não marcados foram incubados apenas com MACS na mesma condição. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS 1x e seguiram para a citometria de fluxo no equipamento BD FACSAria™ II U (BD Biosciences).

Cem mil eventos de cada uma das populações específicas de cada pannel foram separados em tubos livres de nucleases contendo Trizol LS (Thermo Fischer Scientific). As células separadas e uma alíquota de cem mil células do tecido total seguiram imediatamente para a extração de RNA por Trizol conforme descrito anteriormente. A estratégia dos parâmetros de qualidade utilizados para

todas as amostras está representada na Figura 5, enquanto as Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11 mostram as estratégias de separação das populações específicas: cérebro, fígado, linfonodo, sangue, subpopulações do baço e da medula óssea e células B do baço e da medula óssea, respectivamente. Uma alíquota das células separadas de cada amostra foi utilizada para determinar a pureza das populações (Figura 12). Para experimentos com pureza menor que 95%, as células separadas foram descartadas e um novo sorteamento foi realizado.

Figura 5 – Estratégia de análise dos parâmetros de qualidade

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) Time x HLA-DR, analisa a continuidade do *laser* ao longo do experimento; B) FSC-A x FSC-H e C) SSC-A x SSC-H, exclui células aberrantes ou adquiridas duplicadas, respectivamente (Singlets); D.1) Live/Dead x FSC-W, marcador de viabilidade celular, células marcadas excluem células mortas e em D.2) além das células mortas, excluem também células

positivas para CD3, CD14, CD11c e CD56.

Figura 6 – Estratégia de análise utilizada para separar a microglia

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar as células de possíveis detritos; B) CD45 x CD11b, a delimitação nesse gráfico mostra células CD45+ /CD11b+ que identificam as células da microglia.

Figura 7 – Estratégia de análise utilizada para purificar hepatócitos

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar as células de possíveis detritos; B) CD45 x FSC-A, a delimitação nesse gráfico mostra células CD45⁻ que identificam os hepatócitos e CD45⁺ que identificam leucócitos.

Figura 8 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações dos linfonodos

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar linfócitos e granulócitos; B) CD3 x CD19, para separar linfócitos T (CD3⁺), linfócitos B (CD19⁺) e células negativas para CD3 e CD19; C) dentro das células duplo negativas - HLA-DR x CD14, para separar células negativas para CD14 e positivas para HLA-DR; D) dentro das células HLA-DR⁺ - CD56 x CD123, para excluir linfócitos NK (CD3-CD19-CD14-HLA-DR⁺ CD56⁺CD123⁻) e separar células dendríticas (CD3-CD19-CD14-HLA-DR⁺CD56⁻CD123⁺).

Figura 9 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações do sangue

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar linfócitos e granulócitos; B) CD3 x CD19, para separar linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+) e células negativas para CD3 e CD19; C) dentro das células duplo negativas - HLA-DR x CD14, para separar monócitos (CD3-CD19-CD14+) e células CD14- HLA-DR+; D) dentro das células HLA-DR+ - CD56 x CD123, para excluir linfócitos NK (CD3-CD19-CD14-HLA-DR+ CD56+CD123-) e separar células dendríticas (CD3-CD19-CD14-HLA-DR+CD56-CD123+).

Figura 10 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações do baço e da medula óssea

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar linfócitos e granulócitos; B) CD3 x CD19, para separar linfócitos T (CD3+) e células negativas para CD3 e CD19; C) dentro das células duplo negativas - HLA-DR x CD14, para separar monócitos (CD3-CD19-CD14+) e células CD14- HLA-DR+; D) dentro das células HLA-DR+ - CD56 x CD123, para excluir linfócitos NK (CD3-CD19-CD14-HLA-DR+ CD56+CD123-) e separar células dendríticas (CD3-CD19-CD14-HLA-DR+CD56-CD123+).

Figura 11 – Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de linfócitos B do baço e da medula óssea

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) FSC-A x SSC-A, para separar linfócitos e granulócitos; B) CD19 x CD10, para separar células positivas para CD19 e duplo positivas (CD10+CD19+); C) dentro das células duplo positivas - CD27 x IgD, para separar células duplo negativas (CD10+CD19+CD27-IgD-); D) CD38 x FSC-W, para separar células B imaturas (CD10+CD19+CD27-IgD-CD38+); E) dentro das células CD19+ - CD27 x IgD, para separar as células positivas apenas para IgD e apenas para CD27; F) dentro das células IgD+ - CD38 x SSC-W, para separar células B transitórias (CD10-CD19+CD27-IgD+CD38+); G) dentro das células CD27+ - CD38 x SSC-W, para separar células B de memória (CD10-CD19+CD27+IgD-CD38+).

Figura 12 – Estratégia de análise do grau de pureza das amostras

NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos mesmos parâmetros descritos para o sangue. A frequência da célula separada deve ser superior a 95%.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as variáveis numéricas foram representadas em medianas e em intervalos interquartis (IQR).

O efeito da viremia de HPgV em GVHD aguda (aGVHD), recaída da doença hematológica primária e mortalidade foram analisados de duas formas. A primeira foi realizada levando em conta apenas os valores altos de carga viral de amostras pós-HSCT. Para tanto foi construída uma variável binária considerando a exposição ao HPgV após o transplante, em que foram designadas positivas e com carga viral alta somente aquelas que foram maiores que o percentil 50 medido para as amostras pós-HSCT. A segunda forma foi de acordo com a dinâmica viral nas amostras pré e pós-HSCT para os pacientes que possuíam ambas as amostras. Isso significa que, para essa análise, os pacientes foram separados em quatro grupos: aqueles negativos para o HPgV antes e após o transplante (neg/neg); aqueles que adquiriram o HPgV após o transplante (neg/pos); aqueles que perderam a viremia após o transplante (pos/neg); e aqueles que mantiveram a viremia mesmo após o transplante (pos/pos).

A incidência cumulativa (IC) de aGVHD e recaída foram calculadas considerando morte como evento competitivo e usando o estimador de Aalen-Johansen. A significância prognóstica do HPgV foi avaliada pelo teste *log-rank*. Todos os valores de p encontrados são bilaterais e todas as análises foram realizadas utilizando o *software* Stata v. 15.1 (StataCorp LLC, College Station, TE, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS HSCT

Um total de 112 pacientes incluídos na coorte do Hospital Sírio-Libanês foi selecionado para este estudo. Ao todo 191 amostras estavam disponíveis e incluíam dados clínicos: 83 pré-HSCT e 108 pós-HSCT. As características demográficas e clínicas estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Características demográficas e clínicas dos pacientes HSCT incluídos

	N=112
Acompanhamento (meses)	17 (8-48)
Idade (anos)	29 (10-51)
Sexo Masculino (%)	73 (65.2)
Doença de Base (%)	
Leucemia Mieloide Aguda	37 (33.0)
Leucemia Linfóide Aguda	29 (25.9)
Linfoproliferaivas	17 (15.2)
Síndromes Mielodisplásicas	14 (12.5)
Anemia Aplástica	11 (9.8)
Outras	4 (3.6)
Regime de Condicionamento (%)	
Mieloablativo	66 (58.9)
Intensidade Reduzida	46 (41.1)
Fonte das Células Transplantadas(%)	
Medula Óssea	48 (42.9)
Sangue Periférico	42 (37.5)
Cordão Umbilical	22 (19.6)
Doador (%)	
Irmãos Compatíveis	40 (35.7)
Doadores Não Relacionados Compatíveis	51 (45.5)
Células Haploidenticas	21 (18.8)
Profilaxia para GVHD (%)	
Ciclosporine	10 (8.9)
Ciclosporine + Esteroides	4 (3.6)
Ciclosporine + Metotrexato	28 (25.0)
Tacrolimus + Metotrexato	7 (6.3)
Ciclosporine + Micofenolato de mofetila	40 (35.7)
Tacrolimus + Micofenolato de mofetila	1 (0.9)
Outras	22 (19.6)

Variáveis numéricas estão apresentadas como mediana e intervalos interquartis

A prevalência do HPgV foi de 42% nas amostras coletadas pré-HSCT (35/83) e 31% nas amostras coletadas pós-HSCT (33/108). Para os 112 pacientes, 44 (39%) foram positivos para o RNA de HPgV em algum momento, seja na amostra pré-HSCT, seja na pós-HSCT. Para aqueles pacientes que possuíam ambas as amostras (79), 39 deles (49%) apresentaram viremia indetectável, 24 (30%) apresentaram viremia detectável nas duas amostras (neg/neg e pos/pos respectivamente); 10 (13%) perderam a viremia após o transplante (pos/neg) e 6 (8%) apresentaram viremia apenas após o transplante (neg/pos). A mediana de carga viral em amostras pré-HSCT foi de $\exp(14,4)$ cópias de genoma/mL de plasma (IQR 12,8 a 16) e em amostras pós-HSCT de $\exp(12,9)$ cópias/mL (IQR 11,7 a 14,6). A diferença mediana entre a carga viral das amostras pré-HSCT e pós-HSCT foi de $\exp(1,9)$ cópias/mL (IQR 3,5 a 0,9).

4.1.1 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento de 24 amostras pareadas (pré e pós-HSCT), derivadas de 12 pacientes diferentes. As sequências-consenso mais longas abrangem os nucleotídeos 4076 a 6565 da sequência de referência do genótipo 2 (U63715) e a melhor combinação para todas as sequências-consenso após o mapeamento dessas com os sete genótipos do HPgV foi com o genótipo 2, sugerindo ser esse o genótipo prevalente nessas amostras. O número de acesso das sequências submetidas ao GenBank está representado no Anexo G.

A distância em nucleotídeos entre as amostras foi calculada e, na maior parte dos casos, as sequências longitudinais eram mais similares do que os pares não relacionados (Figura 13). As exceções foram dois pares de amostras de quatro pacientes (M078/M129 e M086/M125) que apresentaram sequências quase idênticas entre si.

Mapeado à U63715

	M076	M076	M078	M078	M086	M086	M092	M092	M101	M101	M118	M118	M123	M123	M125	M125	M129	M129	M139	M139	M144	M144	M147	M147
	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT	PRÉ-HSCT	PÓS-HSCT
M076 PRÉ-HSCT		95,8	91,2	91,3	88,4	88,4	92,1	92,2	91	91	88,6	88,6	87,5	87,6	88,4	88,4	91,2	91,2	92	92	90,7	90,9	88,7	88,8
M076 PÓS-HSCT	95,8		91,5	91,5	88,9	88,9	91,4	91,6	91,5	91,5	88,8	88,8	88,9	89	88,9	88,9	91,5	91,5	91,8	91,8	90,9	91,1	89,1	89,2
M078 PRÉ-HSCT	91,2	91,5		99,9	88,5	88,5	92	92,2	93,3	93,3	88,9	88,9	87,8	87,8	88,5	88,5	99,9	100	92,5	92,5	92,4	92,5	89,7	89,8
M078 PÓS-HSCT	91,3	91,5	99,9		88,5	88,5	92	92,3	93,3	93,3	88,9	88,9	87,8	87,8	88,5	88,5	99,9	99,9	92,5	92,5	92,4	92,6	89,8	89,8
M086 PRÉ-HSCT	88,4	88,9	88,5	88,5		100	88,7	88,8	89,1	89,1	90,7	90,7	86,7	86,7	100	100	88,5	88,5	88,6	88,7	88,3	88,6	89,3	89,3
M086 PÓS-HSCT	88,4	88,9	88,5	88,5	100		88,7	88,8	89,1	89,1	90,7	90,7	86,7	86,7	100	100	88,5	88,5	88,6	88,7	88,3	88,6	89,3	89,3
M092 PRÉ-HSCT	92,1	91,4	92	92	88,7	88,7		99,7	91,4	91,4	87,8	87,8	86,5	86,5	88,7	88,7	92	92	92,4	92,4	91,3	91,4	89,2	89,4
M092 PÓS-HSCT	92,2	91,6	92,2	92,3	88,8	88,8	99,7		91,6	91,6	88	88	86,7	86,7	88,8	88,8	92,2	92,2	92,6	92,6	91,5	91,6	89,4	89,6
M101 PRÉ-HSCT	91	91,5	93,3	93,3	89,1	89,1	91,4	91,6		100	89,1	89,1	87,7	87,8	89,1	89,1	93,3	93,3	93	93	92,6	92,8	89,9	90
M101 PÓS-HSCT	91	91,5	93,3	93,3	89,1	89,1	91,4	91,6	100		89,1	89,1	87,7	87,8	89,1	89,1	93,3	93,3	93	93	92,6	92,8	89,8	90
M118 PRÉ-HSCT	88,6	88,8	88,9	88,9	90,7	90,7	87,8	88	89,1	89,1		100	87	86,9	90,7	90,7	88,9	88,9	88,5	88,5	88,6	88,8	89,6	89,7
M118 PÓS-HSCT	88,6	88,8	88,9	88,9	90,7	90,7	87,8	88	89,1	89,1	100		87	86,9	90,7	90,7	88,9	88,9	88,5	88,5	88,6	88,8	89,6	89,7
M123 PRÉ-HSCT	87,5	88,9	87,8	87,8	86,7	86,7	86,5	86,7	87,7	87,7	87	87		99,9	86,7	86,7	87,8	87,8	87,7	87,7	87	87,2	88	88
M123 PÓS-HSCT	87,6	89	87,8	87,8	86,7	86,7	86,5	86,7	87,8	87,8	86,9	86,9	99,9		86,7	86,7	87,8	87,8	87,7	87,8	87	87,2	88,1	88,1
M125 PRÉ-HSCT	88,4	88,9	88,5	88,5	100	100	88,7	88,8	89,1	89,1	90,7	90,7	86,7	86,7		100	88,5	88,5	88,6	88,7	88,3	88,6	89,3	89,3
M125 PÓS-HSCT	88,4	88,9	88,5	88,5	100	100	88,7	88,8	89,1	89,1	90,7	90,7	86,7	86,7	100		88,4	88,5	88,6	88,7	88,3	88,6	89,3	89,3
M129 PRÉ-HSCT	91,2	91,5	99,9	99,9	88,5	88,5	92	92,2	93,3	93,3	88,9	88,9	87,8	87,8	88,5	88,4		99,9	92,5	92,5	92,4	92,5	89,7	89,8
M129 PÓS-HSCT	91,2	91,5	100	99,9	88,5	88,5	92	92,2	93,3	93,3	88,9	88,9	87,8	87,8	88,5	88,5	99,9		92,5	92,5	92,4	92,5	89,7	89,8
M139 PRÉ-HSCT	92	91,8	92,5	92,5	88,6	88,6	92,4	92,6	93	93	88,5	88,5	87,7	87,7	88,6	88,6	92,5	92,5		100	91,8	91,9	89,5	89,7
M139 PÓS-HSCT	92	91,8	92,5	92,5	88,7	88,7	92,4	92,6	93	93	88,5	88,5	87,7	87,8	88,7	88,7	92,5	92,5	100		91,8	91,9	89,5	89,7
M144 PRÉ-HSCT	90,7	90,9	92,4	92,4	88,3	88,3	91,3	91,5	92,6	92,6	88,6	88,6	87	87	88,3	88,3	92,4	92,4	91,8	91,8		100	89,1	89,1
M144 PÓS-HSCT	90,9	91,1	92,5	92,6	88,6	88,6	91,4	91,6	92,8	92,8	88,8	88,8	87,2	87,2	88,6	88,6	92,5	92,5	91,9	91,9	100		89,2	89,3
M147 PRÉ-HSCT	88,7	89,1	89,7	89,8	89,3	89,3	89,2	89,4	89,9	89,8	89,6	89,6	88	88,1	89,3	89,3	89,7	89,7	89,5	89,5	89,1	89,2		99,8
M147 PÓS-HSCT	88,8	89,2	89,8	89,8	89,3	89,3	89,4	89,6	90	90	89,7	89,7	88	88,1	89,3	89,3	89,8	89,8	89,7	89,7	89,1	89,3	99,8	

Os números estão representados em porcentagem de similaridade

Figure 13 – Matriz de distância das 24 amostras pareadas pré e pós-HSCT

NOTA: Cada linha representa uma amostra de um paciente, pré para amostras coletadas antes do transplante e pós para as amostras coletadas 30 dias após o transplante. Cada amostra está pareada com ela mesma e com as outras amostras nas colunas. A graduação de cinza, juntamente com o número em porcentagem indica a similaridade entre as sequências.

4.1.2 Influência do HPgV nos Desfechos Clínicos dos Pacientes HSCT

A maior parte dos artigos que buscam efeitos benéficos da infecção por HPgV em indivíduos HIV-positivos diferem nos resultados, principalmente pelo fato de as coortes não serem semelhantes quanto ao momento da infecção pelo HPgV (antes, durante ou após a infecção pelo HIV) e/ou quanto ao valor de carga viral de HPgV circulante¹³⁹. Portanto, para este estudo, foi avaliado o efeito nos desfechos clínicos (aGVHD, recaída da doença de base e mortalidade) da dinâmica de infecção pelo HPgV em relação ao transplante em amostras pré e pós-HSCT, bem como da carga viral elevada (maior que o percentil 50) na amostra pós-HSCT (Tabela 11).

Tabela 11 – Desfechos clínicos de acordo com a presença do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT

	Total (%)	≥ Grau 2 aGVHD (%)	Recaída (%)	Mortalidade (%)
Pacientes	112 (100)	36 (32)	20 (18)	51 (46)
HPgV positivo pré-HSCT ⁽¹⁾ , N=35	35 (31)	14 (40)	6 (17)	16 (46)
Mediana da carga viral exp(cópias de genoma/mL) (IQR)	14.4 (12.8-16.0)	14.2 (13.1-15.3)	13.3 (12.3-15.3)	14.5 (12.7-15.3)
HPgV positivo pós-HSCT ⁽²⁾ , N=33	33 (29)	14 (42)	4 (12)	12 (36)
Mediana da carga viral exp(cópias de genoma/mL) (IQR)	12.9 (11.7-14.6)	13.6 (11.2-14.6)	11.8 (11.1-13.8)	13.1 (11.6-14.9)
HPgV positivo em qualquer amostra, N=44	44 (39)	18 (41)	8 (18)	18 (41)
Dinâmica do HPgV:	79 (100)			
+ pré → + pós-HSCT HPgV ⁽³⁾ , N=24	24 (30)	10 (42)	2 (8)	10 (42)
+ pré → - pós-HSCT HPgV ⁽³⁾ , N=10	10 (13)	4 (40)	4 (40)	5 (50)
- pré → + pós-HSCT HPgV ⁽³⁾ , N=6	6 (8)	3 (50)	1 (17)	0 (0)
- pré → - pós-HSCT HPgV ⁽³⁾ , N=39	39 (49)	9 (23)	8 (21)	19 (49)

⁽¹⁾ faltante para 29 pacientes; ⁽²⁾ faltante para 4 pacientes; ⁽³⁾ faltante para 33 pacientes

Trinta e seis pacientes (32%) desenvolveram aGVHD maior que grau 2 em uma média de 29 dias após o HSCT (IQR 20-45). A recaída da doença primária foi observada em 20 casos (18%), em uma média de 278 dias após o

procedimento (IQR 97-562) e a mortalidade foi de 46% (51 casos), ocorrendo em uma média de 212 dias após o HSCT (IQR 48-364). Entre os óbitos observados no estudo, 18 (35%) foram devidos à progressão ou à recaída; 28 (55%), devidos a complicações relacionadas ao transplante e 5 (10%), devidos a outras causas.

A Figura 14A mostra a incidência cumulativa de aGVHD com grau<2 de acordo com a dinâmica do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT. Embora sem significância estatística, o gráfico mostra que pacientes HPgV positivos em qualquer momento tiveram maior incidência de aGVHD do que pacientes não infectados. Na Figura 14B, a análise discriminando os indivíduos com carga viral de HPgV maior que o percentil 50 nas amostras pós-HSCT mostra, com significância estatística ($p=0,0051$), que indivíduos com alta carga viral têm maior tendência de desenvolver aGVHD do que aqueles considerados negativos.

Em uma análise multivariada usando um modelo de riscos proporcionais de Cox ajustado para idade, sexo e profilaxia de GVHD, pacientes com carga viral maior que o percentil 50 nas amostras pós-HSCT tiveram uma taxa de desenvolvimento de aGVHD 2,4x maior (IC 95% 1,05-5,37, $p=0,038$) do que pacientes considerados negativos para HPgV.

Figura 14 – Incidência cumulativa de aGVHD maior que grau 2 entre os pacientes HSCT

NOTA: Em A, cada linha representa um grupo de pacientes estratificados segundo *status* do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT: a linha preta e a cinza representam os pacientes que eram HPgV negativos e positivos em ambas as amostras, respectivamente; a linha tracejada aqueles que perderam a viremia após o transplante e a pontilhada aqueles que adquiriram viremia pós-HSCT. Em B, cada linha representa um grupo de pacientes separados pelo valor de carga viral detectado na amostra pós-HSCT: a linha preta representa pacientes com carga viral indetectável ou abaixo do percentil 50, enquanto a linha cinza representa aqueles com carga viral maior que o percentil 50.

Como mostrado nas Figuras 15 e 16, não foi encontrado nenhum efeito significativamente estatístico nem da dinâmica de exposição ao HPgV nem dos altos níveis de carga viral nas amostras pós-HSCT na recaída da doença de base ou na mortalidade dos pacientes, respectivamente.

Figura 15 – Sobrevivência livre de recaída entre os pacientes HSCT

NOTA: Em A, cada linha representa um grupo de pacientes estratificados segundo *status* do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT: a linha preta e a cinza representam os pacientes que eram HPgV negativos e positivos em ambas as amostras, respectivamente; a linha tracejada aqueles que perderam a viremia após o transplante e a pontilhada aqueles que adquiriram viremia pós-HSCT. Em B, cada linha representa um grupo de pacientes separados pelo valor de carga viral detectado na amostra pós-HSCT: a linha preta representa pacientes com carga viral indetectável ou abaixo do percentil 50, enquanto a linha cinza representa aqueles com carga viral maior que o percentil 50.

Figura 16 – Sobrevivência entre os pacientes HSCT

NOTA: Em A, cada linha representa um grupo de pacientes estratificados segundo *status* do HPgV nas amostras pré e pós-HSCT: a linha preta e a cinza representam os pacientes que eram HPgV negativos e positivos em ambas as amostras, respectivamente; a linha tracejada aqueles que perderam a viremia após o transplante e a pontilhada aqueles que adquiriram viremia pós-HSCT. Em B, cada linha representa um grupo de pacientes separados pelo valor de carga viral detectado na amostra pós-HSCT: a linha preta representa pacientes com carga viral indetectável ou abaixo do percentil 50, enquanto a linha cinza representa aqueles com carga viral maior que o percentil 50.

4.2 AMOSTRAS SVOC E IOT

De março de 2016 até novembro de 2018, 103 amostras foram coletadas de pacientes submetidos à cirurgia de artroplastia no IOT do HCSP. A mediana de idade desses pacientes no momento do procedimento foi de 54 anos (IQR 45-61), a maioria era do sexo feminino (52%) e a mediana da quantidade de leucócitos antes da cirurgia foi de 8,795 mil/mm³ (IQR 7,155-10,6625). Sete pacientes (6,8%) apresentaram viremia plasmática positiva de HPgV, sendo um deles coinfetado HIV/HPgV com carga viral de HIV indetectável antes do procedimento. Apenas quatro das sete amostras IOT positivas têm seus resultados aqui mostrados; as demais foram utilizadas para padronização de técnica. Devido ao baixo número de células viáveis após o descongelamento, as células da medula óssea só foram separadas pelo painel de diferenciação das células B, conforme a Tabela 9 apresentada em Métodos.

De agosto a dezembro de 2018, 239 amostras foram coletadas de indivíduos autopsiados no SVOC-SP. A maior parte era do sexo masculino (55%), a mediana da idade foi de 66 anos (IQR 57-80) e a mediana do intervalo *post-mortem* foi de 12h25 (IQR 10h14-15h13). Desses, 3 indivíduos (1,2%) apresentaram viremia positiva para HPgV no plasma sanguíneo e tiveram seus tecidos processados. O restante do material foi descartado no mesmo dia da coleta. Devido a problemas com a marcação e pela *causa mortis* dos indivíduos, não foi possível separar com precisão nem as células da microglia nem as células B transitórias e de memória do baço. Visto que o padrão para diferenciar microglia de leucócitos é a presença dos marcadores CD11b e CD123 altamente expressos (CD11b^{High}CD123^{High}) e que não havia células suficientes nessa população, foram separadas células com expressão de CD11b e CD123 intermediária e baixa e isso está representado como tecido cerebral total.

O Anexo H e o Anexo I mostram a porcentagem de cada tipo celular em relação às células vivas totais para cada população nas amostras IOT e SVOC, respectivamente. As Figuras 17 e 18 mostram a quantidade encontrada de cópias da fita de RNA de polaridade positiva e negativa em 10⁵ células nas 3 amostras SVOC (A) e nas 4 amostras IOT (B) processadas, respectivamente, enquanto a Figura 19 mostra a quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade positiva e negativa em 1 µL de plasma sanguíneo.

Figura 17 – Quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade positiva em 10^5 células

NOTA: Cada símbolo representa um paciente, como especificado nas respectivas legendas. Os gráficos mostram a carga da fita de RNA de polaridade positiva de HPgV em cópias de genoma para cada 10^5 células, para as diferentes subpopulações de cada tecido, especificadas no eixo x.

Figura 19 – Quantidade de cópias da fita de RNA de polaridade positiva e negativa em 1 µL de plasma sanguíneo

NOTA: Cada símbolo representa um paciente, como especificado nas respectivas legendas. O gráfico mostra a carga de HPgV em cópias de genoma em cada µL de plasma, para as fitas de polaridade positiva e negativa, como mostra o eixo x.

Como observado na Figura 17, todos os tecidos apresentam carga viral do RNA de polaridade positiva em pelo menos uma das populações separadas, tanto nas amostras SVOC quanto nas amostras IOT, com exceção das células do tecido cerebral. Já a análise da carga viral da fita de RNA de polaridade negativa para as amostras SVOC (Figura 18A) mostra que sangue, baço e medula óssea, além de uma das amostras de cérebro, possuem replicação ativa do vírus nas células separadas, sendo a medula a responsável pelos maiores títulos. Para as amostras IOT (Figura 18B), apenas o sangue periférico aparenta ter replicação ativa do HPgV, com altos títulos sendo expressos pelas células dendríticas do sangue periférico.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo é uma tentativa de agregar maiores informações sobre o tropismo viral e os efeitos do HPgV em pacientes HSCT. Apesar de o vírus ter sido descrito há mais de vinte anos, muitas das questões básicas sobre sua biologia continuam não resolvidas. Entender como um vírus de RNA citoplasmático, sem intermediários de DNA, que mantêm altos níveis de viremia circulante e não causa patogenicidade, evade e modula o sistema imune por tanto tempo, pode prover novos mecanismos para serem utilizados como uma terapia eficaz.

Algumas dessas questões já foram parcialmente respondidas baseando-se em estudos que levam em consideração a semelhança genética entre o HPgV e o HCV. Todavia, ainda não existe um modelo *in vitro* que mimetize a infecção *in vivo*. Os únicos modelos desenvolvidos em primatas não humanos não conseguiram mimetizar os efeitos benéficos do HPgV na coinfeção SIV/SPgV¹⁸⁷.

Na busca por desenvolver um modelo *in vitro* funcional, foi mensurada a replicação dos subtipos celulares dos principais tecidos em que já foi descrita a presença do HPgV para determinar a célula mais permissível à infecção^{41,42,45-51}. Com tal objetivo, foram coletadas amostras de cadáveres autopsiados (SVOC) e de pacientes submetidos à cirurgia de artroplastia (IOT), a fim de obter grande diversidade e quantidade de tecido.

O fígado foi selecionado a fim de tentar eliminar de uma vez por todas a presença de replicação em hepatócitos, enquanto que o cérebro foi selecionado devido a estudos recentes terem mostrado replicação viral em tecido cerebral e fluido cérebro-espinhal em pacientes com encefalites^{51,188,189}. Linfonodos, sangue, baço e medula óssea foram selecionados por abrigarem a maior quantidade de: linfócitos B em seus diversos estágios de maturação, linfócitos T, monócitos e células dendríticas. Devido às limitações do equipamento disponível, somente essas quatro populações de cada um desses tecidos foram escolhidas para serem separadas.

O número limitado de amostras positivas para o HPgV (3 SVOC e 4 IOT), no entanto, não permitiu determinar o tipo celular permissível à infecção.

Levando em consideração que a prevalência do HPgV para a cidade de São Paulo é de aproximadamente 10%⁹², foi prevista coleta de 100 amostras IOT e 200 amostras SVOC. Porém, apesar de as amostras IOT terem se aproximado desse valor (6,8%), as amostras SVOC se limitaram a uma fração dele (1,2%). Ainda que a prevalência reduzida nessas amostras fosse esperada, devido à intensa degradação *post mortem*, haja vista o número de amostras coletadas serem o dobro das amostras IOT, o que se observou foi que os valores intermediários de carga viral de HPgV, encontrados em coortes de sujeitos vivos, não foram observados para essas amostras: ou a amostra era negativa, ou positiva com alta carga viral (acima de 10^7 cópias de genoma por mL de plasma).

Além disso, alguns pontos devem ser considerados. As amostras SVOC, apesar de processadas frescas, trazem consigo o viés da *causa mortis*, da idade e do intervalo *post mortem* de cada indivíduo. Os três sujeitos tinham idade superior a 65 anos, o que pode justificar a baixa frequência de microglia, apresentavam intensa patologia esplênica, o que pode justificar a falta de células B transitórias e de memória no baço, e tinham intervalo *post mortem* superior a 10 horas, o que pode justificar a baixa frequência das células mais sensíveis. As amostras IOT, além de terem ficado congeladas por um longo período, provêm de pacientes com inflamação e degradação avançada e prolongada do tecido ósseo, o que pode ter influenciado a presença do vírus e pode justificar a frequência baixa das células B de memória na medula óssea. Ainda, visto que as três amostras SVOC apresentaram replicação apenas para o tecido total da medula óssea, talvez o método utilizado para separação e/ou coleta dessas células possa não ser o ideal, uma vez que as metodologias que se seguem a partir daí são as mesmas para o tecido total e para as células separadas.

Todavia, mesmo em números reduzidos e com os vieses de coleta e processamento, foi possível verificar a replicação viral em populações já descritas como monócitos e células B do sangue e células do tecido cerebral^{50,58-60,190} e em populações ainda não descritas como células dendríticas do sangue e do baço e células T, dendríticas, B imaturas e B transitórias da medula óssea. O fato de a medula óssea abrigar o maior

número de populações celulares com replicação viral, reforça a hipótese de a permissividade ao HPgV estar em algum progenitor hematopoiético desse tecido¹⁵⁹.

Para o cérebro, apenas umas das amostras mostrou replicação viral ativa nas células denominadas como cérebro total. Isso pode ter ocorrido devido ao intervalo *post mortem* desse indivíduo ser menor em comparação com outros e, portanto, as células separadas abrigarem uma proporção maior de células da microglia. O fígado, apesar de mostrar carga viral positiva para a fita positiva no tecido total e em uma amostra de hepatócitos, não mostrou nenhuma amplificação da fita negativa. A amplificação tanto do tecido total quanto dos hepatócitos pode ser justificada pela alta presença de leucócitos na amostra, visto que o painel visa apenas separar hepatócitos de leucócitos e não identificar os hepatócitos especificamente.

Observou-se que um indivíduo SVOC mostrou amplificação da fita negativa para as células dendríticas de todos os tecidos, com exceção do linfonodo e que, em um dos pacientes IOT, essas células mostraram a maior amplificação encontrada. Apesar de já ter sido mostrado um aumento na produção de INF- γ e dos marcadores de superfície CD80 e CD86 mediado pelo HPgV em indivíduos coinfectados HIV/HPgV¹⁹¹, a infecção dessas células pelo *Pegivirus* não havia sido reportada.

As células dendríticas são sentinelas imunes responsáveis por detectar infecções e inflamação, apresentar possíveis antígenos e orquestrar a interação entre a resposta imune inata e a adaptativa no combate aos patógenos. A infecção desse tipo celular já foi notificada para outros *Flaviviridae* (e.g. Vírus da Dengue) como possível responsável, tanto por agir como célula sentinela quanto por disseminar o vírus no organismo ao exercer a função de apresentadora de antígenos nos tecidos linfoides^{192,193}. Assim, a infecção das células dendríticas pode ajudar a entender os mecanismos pelos quais o HPgV diminui a ativação de outras células imunes. Infecções virais diversas podem diminuir a produção de IL-12 e aumentar a secreção de IL-10, reduzindo a interação e interferindo na cascata de apresentação da principal sentinela imune¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Isso poderia justificar a longa persistência e o escape do sistema imune do HPgV.

Contrariamente ao encontrado nas amostras SVOC, as amostras HSCT apresentaram uma prevalência maior de viremia de HPgV (39%) comparadas a outros estudos em populações semelhantes^{49,94-97,101,104-106}.

A dinâmica da infecção pelo HPgV nas amostras pré e pós-HSCT não é previsível. Embora estudos mostrem que a medula óssea é o principal tecido responsável pela manutenção da carga viral de HPgV^{61,159} e mesmo com 23 dos pacientes com ambas as amostras (pré e pós-HSCT) recebendo regime de condicionamento mieloablativo, somente 10 pacientes perderam a viremia após o procedimento. Em contrapartida, apesar do elevado número de transfusões de hemocomponentes ao longo dos 30 dias entre uma coleta e outra e da alta prevalência do HPgV na cidade São Paulo, apenas 6 pacientes adquiriram a infecção pelo HPgV após o HSCT.

As 24 amostras pareadas positivas para o HPgV que puderam ter o genoma do vírus sequenciado, alinharam suas sequências-consenso com a sequência de referência do genótipo 2 (U63715), indicando que esse continua sendo o genótipo mais prevalente no Brasil³³. Não houve diferenças significativas entre as amostras pré e pós-HSCT do mesmo paciente, sugerindo que nenhuma nova cepa de HPgV foi introduzida no receptor durante o HSCT pelo doador ou por transfusões associadas, ou que a região sequenciada do vírus é extremamente conservada, não sendo possível identificar diferenças^{7,198}.

A estabilidade da sequência poderia justificar porque poucos pacientes parecem ter perdido viremia após o transplante. Outros podem ter perdido, mas recuperado cepas que não puderam ser discriminadas com o sequenciamento dessa região. Isso pode ser corroborado por duas amostras pareadas derivadas de quatro pacientes diferentes (M078/M129 e M086/M125) que apresentaram sequências quase idênticas entre si, ou pode indicar apenas contaminação entre as amostras.

Devido aos efeitos imunomoduladores descritos para o HPgV^{39,82,83,132,158,159}, a expectativa inicial era a de que esses possíveis efeitos anti-inflamatórios do vírus interferissem nos principais desfechos clínicos dependentes da reconstituição imune do HSCT, como o aGVHD, a recaída da doença hematológica primária e a sobrevivência dos pacientes.

Uma vez que os artigos que diferem quanto aos efeitos benéficos da coinfeção HIV/HPgV divergem principalmente quanto ao valor da carga viral de HPgV necessário para atingir o potencial protetor e ao momento em que se deu a infecção pelo HPgV (antes, durante ou após a infecção pelo HIV), para analisar o efeito da viremia nos pacientes HSCT duas formas de análise foram realizadas. A primeira leva em consideração a dinâmica de infecção pelo HPgV em relação ao HSCT, ou seja, se o paciente se encontrava infectado antes do procedimento e se essa infecção se manteve após o transplante. A segunda estima o efeito da carga viral alta estabelecida como valores maiores que o percentil 50 apenas da viremia detectada nas amostras pós-HSCT, visto que é mais provável que o vírus influencie o desfecho clínico do paciente quando presente após o procedimento.

A dinâmica de infecção mostrou que, dos 112 pacientes analisados, apenas 79 (71%) possuíam amostras pré e pós-HSCT. Desses, 24 (30%) mantiveram a viremia ao longo do procedimento. A análise da dinâmica com relação aos desfechos clínicos não mostrou nenhum efeito estatisticamente significativo. Embora as curvas de Kaplan-Meier sugiram que existam alguns efeitos protetores quando a viremia por HPgV permanece ou aparece após o HSCT, nossa coorte é provavelmente muito limitada para alcançar uma associação estatisticamente significativa.

Para a recaída da doença de base e para a sobrevivência dos pacientes, a análise da carga viral acima do percentil 50 das amostras pós-HSCT também não se mostrou estatisticamente significativa. Porém para o desenvolvimento de aGVHD, nossos dados mostraram que quando a viremia por HPgV é detectável na amostra pós-HSCT, os pacientes tiveram maior incidência de aGVHD em relação aos pacientes não infectados ou com carga viral menor que o percentil 50 ($p=0,0051$). De fato, em uma análise multivariada usando um modelo de riscos proporcionais de Cox ajustado para idade, sexo e profilaxia de GVHD, a taxa de incidência de aGVHD foi 2,4x maior em pacientes infectados (IC 95% 1,05-5,37, $p=0,038$).

Entre outras características, a aGVHD tem sido associada à inflamação geral seguida de alta citotoxicidade contra as células do receptor mediadas por células T doadoras ativadas¹⁹⁹. Embora esperado que os possíveis efeitos anti-

inflamatórios do HPgV reduzissem essa resposta, o contexto da infecção em pacientes HSCT pode ser diferente de uma infecção em um indivíduo imunocompetente.

Primeiramente, durante uma infecção viral em um organismo funcional, em geral, poucas partículas virais são responsáveis por infectar e colonizar o corpo de uma pessoa. Estabelece-se assim, um delicado equilíbrio entre a replicação e a disseminação do vírus pelo organismo sem que o sistema imune reconheça e combata a infecção. O HPgV desenvolveu mecanismos, ao longo da evolução, que mantém esse balanço de forma duradoura, considerando que seu tempo médio de persistência em um indivíduo saudável é de cerca de dois anos^{5,62-64,67}. No entanto, quando um sistema imunológico competente, o enxerto, depara-se com uma grande quantidade de vírus, replicando sem nenhum desafio no hospedeiro imunossuprimido, as chances são de que esse novo sistema imune ao combater intensamente a infecção estabelecida também ataque o hospedeiro. Essa intensa resposta à infecção pode inviabilizar o desenvolvimento da tolerância imunológica necessária para que não ocorra GVHD crônica e para que o receptor seja capaz de manter o enxerto.

O que pode estar sendo observado também é uma maior intercorrência de HPgV devido ao desenvolvimento de GVHD. Uma vez que o HPgV por si só diminui discretamente os mecanismos de vigilância imunológica e que os pacientes com sintomas de aGVHD são tratados com doses maciças de imunossupressores^{200,201}, para aqueles que respondem a esse tratamento, isso pode gerar um ambiente propício para a replicação do vírus livre das pressões do sistema imune, sendo o resultado constatado apenas fruto dessa replicação descontrolada.

De qualquer forma, avaliar a presença do HPgV após o transplante pode significar uma nova maneira de implementar o tratamento de aGVHD. Por exemplo, para aqueles pacientes que não respondem aos imunossupressores, utilizar um antiviral para combater a infecção pelo *Pegivirus* pode ajudar a restabelecer o controle do tratamento. Nos casos em que é imperativo que não se desenvolva aGVHD, o paciente pode ter a viremia de HPgV monitorada e, caso ela se desenvolva, tratada assim que detectada. Ainda, a infecção poderia

ser utilizada para induzir aGVHD nos casos de recaída contínua da doença hematológica primária, com o objetivo de ajudar o sistema imune do doador a eliminar as células malignas do hospedeiro.

Apesar de o HPgV ser estudado em vários contextos, ainda existe uma falta significativa de informações sobre o vírus. Este estudo oferece um novo entendimento sobre os efeitos do HPgV no aGVHD atribuído ao HSCT e sobre as células que replicam ativamente o vírus. Os dados sugerem que o monitoramento da infecção em doadores e receptores de HSCT pode ajudar a melhorar o desenvolvimento e o tratamento de aGVHD e parece confirmar que a principal célula permissiva à infecção é um progenitor hematopoiético da medula óssea. Para tornar o HPgV uma bioterapia viável, é necessário encontrar o tipo celular permissível à infecção, além de confirmar possíveis interferências do vírus com outros desfechos clínicos do HSCT.

6 CONCLUSÃO

Nos experimentos descritos, pudemos avaliar aspectos do tropismo viral e comportamento da infecção viral durante o cuidado a pacientes submetidos ao HSCT que desenvolveram ou não aGVHD. Os resultados evidenciaram a replicação do HPgV na medula óssea e em células B progenitoras e mostraram o aumento de incidência de aGVHD em pacientes com viremia positiva de HPgV após o HSCT (IC 95% 1,05-5,37, $p=0,038$).

Não foram observados efeitos da viremia de HPgV em outros desfechos clínicos dos pacientes submetidos ao HSCT e o tipo celular permissível a infecção não pôde ser efetivamente identificado, devido às condições da coleta e do processamento das amostras SVOC e IOT.

Faz-se necessária a coleta de um número maior de amostras SVOC e de separação de um número maior de células de cada subtipo celular, para tentar desvendar a principal célula permissível à infecção.

Além disso, dada a alta prevalência de HPgV na população brasileira, é essencial confirmar os achados das amostras HSCT em outras coortes para determinar se o monitoramento do HPgV em pacientes submetidos ao HSCT deveria ser implementado para beneficiar o cuidado a esses pacientes.

7 ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COORDENADORIA DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS, ERITRÓCITOS, LEUCÓCITOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

Pesquisador: Celso Arrais Rodrigues da Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01671612.9.1001.5461

Instituição Proponente: Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês

Patrocinador Principal: Fleury S.A

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 232.412

Data da Relatoria: 20/03/2013

Apresentação do Projeto:

Segunda a justificativa do pesquisador quanto ao conteúdo da emenda, trata-se apenas da inclusão de novas co-participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentado adequadamente

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentado adequadamente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentado adequadamente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado adequadamente

Recomendações:

não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Peltoto Gomide, 316 - 11º andar

Bairro: Jardim Paulista

CEP: 01.409-000

UF: SP

Município:

Telefone: (11)3155-8318

Fax: (113)155-8965

E-mail: cepesq@hsl.org.br; alsarkis@uol.com.br

ANEXO B – TCLE APLICADO AOS PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS NO HOSPITAL
SÍRIO-LIBANÊS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE
PLAQUETAS, ERITRÓCITOS, LEUCÓCITOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
RECEPTORES DE TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS
PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS”

Investigador Principal: Dr. Celso Arrais Rodrigues,
Endereço: Rua Dona Adma Jafet, 91 - Cento de Oncologia
CEP: 01308-050
telefones: 3155 0991 3155 0681.

Convite para Participação

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Avaliação do perfil de micropartículas derivadas de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e células endoteliais em receptores de transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas” porque você será submetido a um transplante de medula óssea.

Esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido irá explicar a você o propósito e os procedimentos para esse Estudo.

Esse Consentimento pode conter palavras que você não entenda. Por favor, pergunte qualquer palavra ou informação que não seja familiar a você. Se você concordar em participar desse Estudo, indicar por meio da sua assinatura sua concordância em duas cópias desse Formulário. Um Formulário será devolvido a você para seu arquivo, e a outra cópia permanecerá com seu médico.

II. Visão Geral e Propósito do Registro

Esse é um estudo observacional prospectivo, multicêntrico que será realizado no Brasil para obter dados sobre partículas presentes no sangue de pacientes que serão submetidos ao transplante de medula óssea. O estudo destas partículas tem como objetivo compreender melhor as alterações presentes no organismo durante o transplante e melhorar o procedimento no futuro.

A sua participação nesse estudo não irá alterar ou afetar os cuidados que você está recebendo do seu médico; serão coletados uma ou duas vezes por semana amostras de sangue para serem realizados exames laboratoriais. As coletas serão iniciadas na semana do transplante e serão realizadas até dois meses após o transplante.

Como participante desse Estudo, você será solicitado a responder uma série de questões sobre sua saúde no início de sua participação durante a visita médica.

IV. Benefícios

Não existem benefícios médicos esperados com sua participação nesse Estudo. Espera-se que as informações aprendidas com esse Estudo possam melhorar o tratamento de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea no futuro.

V. Riscos

Os exames serão realizados através de coleta de sangue pelo cateter utilizado para o transplante. A passagem do cateter faz parte do transplante de medula e não está relacionada com este estudo.

Todas as medidas razoáveis e apropriadas serão tomadas para manter a confidencialidade das informações de saúde, no entanto, há sempre a possibilidade de que essas informações possam ser divulgadas inadvertidamente.

VI. Custos e Compensação

Como você estará recebendo seus cuidados médicos normais/habituais, a cobertura para serviços médicos e de tratamento será realizada como seria normalmente feita (seguro ou convênio de saúde, particular, etc.). Você não será recompensado por sua participação nesse Estudo.

VII. Participação voluntária / Retirada

A sua participação nesse Estudo é voluntária. Se você se decidir por participar, o seu médico irá inserir seus dados em um sistema eletrônico de coleta de dados; com a entrada inicial de dados, será atribuído a você um número de identificação exclusivo.

Você pode decidir não participar ou você pode optar por interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidade e sem afetar sua assistência médica futura com o seu médico. Se você optar por retirar-se, você continuará a ser tratado pelo médico como de costume.

Para retirar-se desse Estudo, informe o seu médico. Retirando-se do Estudo significa que nenhuma informação adicional sobre você será inserida no Estudo.

As informações que já tenham sido coletados serão mantidas no Estudo e poderão continuar a serem utilizadas para as análises, relatórios e outros fins do Estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

_____
Paciente ou representante legal

_____
Testemunha

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

São Paulo, ____ de _____ de _____.

_____
Responsável pelo estudo

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COORDENADORIA DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP 30312914.1.0000.0065

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Definição do tropismo tecidual do GBV-C em humanos

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30312914.1.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 676.008

Data da Relatoria: 04/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta a pendências encontradas no projeto original, que foram plenamente atendidas na atual correção por carta.

Objetivo da Pesquisa:

Pesquisa de vírus em materiais de necrópsia

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Poderá identificar a presença e a relação de vírus de baixa patogenicidade com eventuais evoluções de doenças humanas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa prospectiva interessante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há necessidade, pela responsabilidade de sigilo proposta pelos autores

Recomendações:

Os autores deverão consolidar o projeto definitivo, completando o documento final e as demais documentações para um único documento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nenhuma

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 676.008

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 05 de Junho de 2014

Assinado por:
Paulo Euripedes Marchiori
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO D – TCLE APLICADO AOS FAMILIARES DOS SUJEITOS AUTOPSIADOS PELO SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL DE SÃO PAULO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP¹

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C
2. PESQUISADOR: Esper Georges Kallás
CARGO/FUNÇÃO: Professor do Depto de Clínica Médica – FMUSP INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 67395
UNIDADE DO HCFMUSP: Centro de Pesquisa Clínica do Instituto Central – Hospital das Clínicas – FMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 1 ano

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Uma pessoa de sua família ou sob sua responsabilidade faleceu e os médicos que a atenderam solicitaram a realização de uma autópsia para esclarecer melhor todas as possíveis causas da morte. Existem diversos microrganismos que habitam nosso corpo e que, por diversos motivos, não percebemos sua presença por não causarem doenças em seres humanos. Um desses microrganismos é o vírus denominado GBV-C.

Diversos estudos mostraram que quando um indivíduo se encontra infectado com HIV (que é o vírus causador da AIDS) e com este outro vírus, esses indivíduos apresentam uma melhora no quadro clínico, mesmo sem a presença de tratamento para HIV. Dessa forma, estudos como esse que estamos propondo, que tentam descobrir como o GBV-C age inibindo a progressão para a AIDS são essenciais para determinar se poderemos imitar esses efeitos protetores para ajudar a tratar pacientes HIV positivos.

Por isso, solicitamos sua autorização para retirada de sangue e de fragmentos de cerca de 1 cm³ de órgãos para análise do tecido do baço, fígado, linfonodo, cérebro e medula óssea.

As biópsias e o sangue serão examinados para verificar a presença do vírus GBV-C apenas, em participantes não infectados pelo HIV e em participantes infectados pelo HIV. Esclarecemos que não serão causados danos maiores do que aqueles já previstos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

2

na autópsia de hoje em dia. Todos os procedimentos são feitos de tal forma que não haverá nenhuma mutilação externa, ou seja, o corpo é liberado para a família devidamente vestido, sem apresentar sinal visível de qualquer remoção.

Embora não haja benefícios diretos para a pessoa, o esclarecimento das características do vírus GBV-C pode vir a ser fundamental para ajudar as pessoas que vivem com HIV/AIDS.

Informamos ainda que não há despesas adicionais para os familiares / responsáveis em qualquer fase do estudo, incluindo os exames realizados. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Caso você não concorde em autorizar este estudo, a autópsia convencional, solicitada pelo médico será realizada conforme a rotina estabelecida.

Mesmo tendo fornecido seu consentimento, você poderá retirá-lo a qualquer momento. Nesta situação os procedimentos descritos anteriormente não serão realizados e a autópsia convencional será realizada conforme a rotina estabelecida. Caso eles já tenham sido realizados quando você retirar este consentimento eles não serão utilizados para a pesquisa.

Todos os dados serão utilizados exclusivamente para fins de pesquisa e as informações de identificação serão mantidas sob sigilo, garantindo a confidencialidade. Os dados serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente em particular que permita sua identificação. Apenas a equipe designada para essa pesquisa terá acesso às suas amostras. Isso inclui, principalmente, o investigador principal Dr. Esper Georges Kallás, os médicos Dra. Camila Sunaitis Donini, Dr. Luiz Gonzaga Francisco de Assis Barros D'Elia Zanella e o Dr. Amaro Nunes Duarte-Neto e a aluna de doutorado da Faculdade de Medicina da USP responsável pelo processamento das biópsias, Juliana Zanatta de Carvalho Dias. Após coletadas, as biópsias serão encaminhadas para o 3º andar da Faculdade de Medicina da USP onde serão realizados os testes de análises clínicas.

Os familiares/responsáveis têm direito de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais do estudo.

O material das biópsias não será armazenado após os testes e será utilizado somente neste estudo. Porém o material genético do vírus será armazenado por 1 ano e pode acontecer que futuramente seja interessante usar este material para outros trabalhos de pesquisa. Neste caso, há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material?

( ) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o material.

( ) NÃO. Eu dispense a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal, o professor Dr. Esper Georges Kallás, que é Professor Titular de Imunopatologia pode ser encontrado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar – sala 3205 nos telefones (11) 3061-8395 ou 3061-8315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética deste estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000 Tel: 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C".

Eu discuti com o Dr(a) _____ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a autorização para a inclusão de meu familiar é isenta de despesas e que tenho o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo. Concorde voluntariamente que meu familiar seja incluído neste estudo e estou ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu familiar possa ter adquirido, ou no atendimento de rotina deste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA
PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO HCFMUSP E DA
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA 46009215.6.0000.0068

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 1

CAAE: 46009215.6.3001.0061

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: National Institute of Health

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.405.900

Apresentação do Projeto:

O vírus GBV-C (família: Flaviviridae; gênero: Pegivirus) causa infecção assintomática, persistente e com alta carga viral em humanos, porém, após anos de pesquisas, pouco se sabe sobre a biologia in vivo desse vírus, devido à falta de modelos in vitro e animal. Diversos estudos encontraram associação significativa entre a infecção persistente pelo GBV-C e o aumento na sobrevivência de pacientes HIV+ ao diminuir a progressão da doença e reduzir em 2,5 vezes a taxa de mortalidade por AIDS, fenômeno denominado proteção à AIDS associado ao GBV-C (GPFA). Com mais de 34 milhões de pessoas infectadas pelo vírus HIV e como a falta de recursos para disponibilizar tratamento antirretroviral para todos ainda é um dos grandes problemas de saúde pública, entender melhor os mecanismos pelos quais a GPFA atua pode auxiliar na busca de opções de tratamento que mimetizem essa ação. Este projeto tem por objetivo principal utilizar um modelo animal, desenvolvido por esse grupo de pesquisa, e uma coorte humana de pacientes em procedimento de cirurgia ortopédica para o quadril, a fim de caracterizar os principais aspectos da coinfeção GBV-C/HIV/SIV e explorar os vários mecanismos que têm sido associados com a GPFA. Os experimentos propostos são essenciais para estabelecer um modelo animal viável que possa validar extrapolações em humanos. As proposições feitas utilizam estratégias altamente inovadoras que são essenciais para reconciliar as observações prévias conflitantes sobre a GPFA.

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER

Continuação do Parecer: 1.405.900

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

Vilma Borba Leandro Ferreira Jardim
(Coordenador)

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

ANEXO F – TCLE APLICADO AOS PACIENTES SUBMETIDOS À ARTROPLASTIA ELETIVA PELO INSTITUTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: **PROTEÇÃO CONTRA A AIDS MEDIADA PELO GBV-C**

Pesquisador principal: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

Departamento/Instituto: Departamento de Clínica Médica/Disciplina Alergia e Imunopatologia

Este é um documento para participação em um projeto de pesquisa. O(a) Sr.(a) tem plena liberdade de recusar-se a participar do estudo ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem qualquer penalização de seu sigilo, privacidade ou de seu atendimento médico. O(a) Sr.(a) receberá uma via do termo de consentimento com todas as páginas rubricadas por um dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa e poderá dispor do tempo que achar necessário para que possa refletir, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-lo na tomada de decisão livre e esclarecida.

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar desta pesquisa que busca determinar o impacto no sistema de defesa do corpo (que chamamos de resposta imune) quando as pessoas contraem um vírus chamado de GBV-C, seja nas que têm ou não infecção pelo HIV, que é o vírus causador da AIDS. Curiosamente, o GBV-C não causa qualquer problema de saúde que tenha sido identificado até hoje.

A partir de 1993, diversos estudos mostraram que quando um indivíduo se encontrava infectado com HIV e com este outro vírus denominado GBV-C, a sobrevida dos pacientes aumentava, mesmo sem a presença de tratamento para HIV. Dessa forma, os estudos sobre pessoas que têm os dois vírus (GBV-C e HIV) são essenciais para determinar se podemos utilizar os efeitos protetores do GBV-C contra a progressão para a AIDS. Estamos, portanto, convidando o(a) Sr.(a) para participar deste estudo.

Material a ser coletado

Após o seu consentimento em participar deste estudo, serão coletados uma amostra de sangue e uma amostra de medula óssea (popularmente conhecida como “tutano”) durante o procedimento cirúrgico de artroplastia ao qual o(a) Sr.(a) concordou em se submeter. É importante destacar que a medula óssea está dentro dos ossos do corpo e, devido ao procedimento cirúrgico, um pouco dela acaba saindo naturalmente durante a substituição do osso pela prótese e, em condições normais, seria descartada. A coleta dessa medula óssea que extravasa do osso e de uma pequena amostra de sangue (um tubo de 10mL, ou meio colher de sopa) serão realizadas pelo Dr. Leandro Ejnisman. O sangue será obtido através da mesma veia utilizada para acesso de soro e de medicamentos necessários durante a cirurgia.

Apenas a equipe designada para essa pesquisa terá acesso às suas amostras; isso inclui, principalmente, o médico responsável pela cirurgia, o Dr. Leandro Ejnisman, e a aluna de doutorado da Faculdade de Medicina da USP responsável pelo processamento das suas amostras, Juliana Zanatta de Carvalho Dias. Após coletadas, suas amostras serão encaminhadas para a Faculdade de Medicina da USP e farão parte de um banco de amostras, denominado biorrepositório, que será mantido pelo tempo em que durar a pesquisa e até cinco anos após o encerramento. Quando se encerrar o uso das amostras, elas serão descartadas de modo apropriado para materiais biológicos.

Além das amostras, serão coletados dados de seu prontuário médico, como, por exemplo, sexo, idade e informações sobre o hemograma anterior à cirurgia. Todas essas informações serão cadastradas em um banco de dados, que será protegido por senha, podendo ser acessado somente pelos participantes da pesquisa. A partir desse cadastro, suas amostras serão identificadas apenas por números, aumentando a garantia de confidencialidade dos seus dados.

As amostras serão utilizadas para definir se o(a) Sr.(a) está ou não infectado pelo vírus GBV-C, qual a quantidade desse vírus no seu organismo e se essa infecção tem algum impacto em seu sistema de defesa. Além disso, será realizado um teste rápido de HIV para confirmar o status informado pelo(a) Sr.(a) ao médico responsável antes da cirurgia. Os dados de seu prontuário serão utilizados para análises estatísticas. Além disso, a pesquisa também inclui a comparação entre os dados obtidos com suas amostras e os dados obtidos com amostras de macacos infectados propositalmente com o GBV-C nos Estados Unidos da América, para determinarmos se os dados obtidos em macacos são capazes de prever o que acontece em humanos.

Benefícios

Não há benefícios individuais decorrentes de sua participação, mas a pesquisa trará um novo entendimento sobre a biologia do vírus GBV-C, podendo gerar novas abordagens terapêuticas para os pacientes que vivem com o HIV. Os resultados serão publicados em revista científica e os resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e as orientações quanto às suas implicações poderão ser acessados através do contato com o pesquisador principal da pesquisa, o Dr. Esper Georges Kallás, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, Laboratório de Investigação Médica 60, bairro Cerqueira César, São Paulo-SP, pelo telefone (11)30618315 ou pelo e-mail: esper.kallas@usp.br.

Rubrica do voluntário

Página 1 de 2

Rubrica do pesquisador

Riscos

Não haverá riscos físicos para o(a) Sr.(a) diretamente ocasionados pela pesquisa, já que a medula óssea coletada seria descartada durante a cirurgia, mesmo o(a) Sr.(a) não participando da pesquisa. A coleta de sangue se dará pelo mesmo acesso utilizado durante a realização da cirurgia, sem a necessidade de colocar agulha em outra veia. Existem riscos morais referentes à manutenção de sigilo e confidencialidade durante a coleta, uso dos dados de prontuário e uso dos dados obtidos com o processamento das amostras, mas estes riscos serão minimizados através de várias medidas, como: a garantia de sigilo por parte de todos os membros da equipe de pesquisa; a identificação de suas amostras e de seus dados através de números e códigos; e o uso de senha para acesso da base de dados que estará disponível apenas para os membros da equipe de pesquisa. Além disso, o(a) Sr.(a) não será identificado pelo nome em nenhum momento, mesmo quando os resultados deste estudo forem divulgados em qualquer forma.

Participação

O(a) Sr.(a) terá acompanhamento e assistência médica garantidos pelo tratamento que está recebendo para realização do procedimento cirúrgico ortopédico de artroplastia. Após o procedimento, não haverá coletas posteriores relacionadas a essa pesquisa. Em qualquer momento durante a pesquisa, o(a) Sr.(a) poderá ter acesso as suas amostras estocadas em biorrepositório. Caso seja necessário utilizar as amostras armazenadas para outra finalidade qualquer, diferente das explicitadas nesse projeto, a pesquisa deverá ser novamente submetida à aprovação do sistema CEP-CONEP e um novo termo de consentimento será redigido e submetido à aprovação do(a) Sr.(a).

Em qualquer etapa do estudo, o(a) Sr. (a) terá acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimento de dúvidas através do contato com o pesquisador principal, o Dr. Esper Georges Kallás. Se o(a) Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP (órgão responsável por garantir que todos os aspectos éticos relacionados à pesquisa sejam respeitados), que pode ser encontrado no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, 25, 5º andar, pelos telefones: (11)2661-6442 ramais 16, 17, 18, ou (11)2661-7585, ou pelo e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br, de segunda a sexta das 08h00 às 17h00.

Consentimento

Fui suficientemente informado(a) a respeito do estudo "Proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C". Discuti as informações acima com o pesquisador principal (Dr. Esper Georges Kallás) ou pessoa(s) por ele delegada(s) (Juliana Zanatta de Carvalho Dias, Dr. Leandro Ejnisman) sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar desse estudo, assinando este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador responsável.

Assinatura do participante/representante legal

_____

Data / / .

Assinatura do responsável pelo estudo

_____

Data / / .

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº ° _____ SEXO: ( ) M ( ) F

DATA DE NASCIMENTO __/__/__

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____

BAIRRO _____ CIDADE _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL _____

NATUREZA (grau de parentesco. Tutor, curados, etc.) _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº ° _____ SEXO: ( ) M ( ) F

DATA DE NASCIMENTO __/__/__

ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____

BAIRRO _____ CIDADE _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

_____
Rubrica do voluntário

_____
Rubrica do pesquisador

ANEXO G – TABELA DOS NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS PRÉ E PÓS-HSCT CADASTRADAS NO GENBANK

Amostra	Número de acesso GenBank	
	Pré-HSCT	Pós-HSCT
M076	SAMN10171519	SAMN10171520
M078	SAMN10171521	SAMN10171522
M086	SAMN10171523	SAMN10171524
M092	SAMN10171525	SAMN10171526
M101	SAMN10171527	SAMN10171528
M118	SAMN10171529	SAMN10171530
M123	SAMN10171531	SAMN10171532
M125	SAMN10171533	SAMN10171534
M129	SAMN10171535	SAMN10171536
M139	SAMN10171537	SAMN10171538
M144	SAMN10171539	SAMN10171540
M147	SAMN10171541	SAMN10171542

ANEXO H – TABELA DE FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS SEPARADAS DAS AMOSTRAS IOT

Amostra	Tecido	Tipo celular	% ⁽¹⁾
P1004	Sangue	Cél. T	71,75
		Cél B	9,33
		Monócito	8,07
		Cél. Dendrítica	0,74
	Medula Óssea	Cél. B imatura	6,32
		Cél. B transitória	4,44
		Cél. B memória	7,11
P1054	Sangue	Cél. T	50,09
		Cél B	11,36
		Monócito	20,10
		Cél. Dendrítica	3,93
	Medula Óssea	Cél. B imatura	7,53
		Cél. B transitória	4,08
		Cél. B memória	1,73
P1092	Sangue	Cél. T	51,79
		Cél B	9,23
		Monócito	10,93
		Cél. Dendrítica	2,86
	Medula Óssea	Cél. B imatura	21,71
		Cél. B transitória	9,10
		Cél. B memória	1,57
P1101	Sangue	Cél. T	40,61
		Cél B	3,76
		Monócito	20,42
		Cél. Dendrítica	4,16
	Medula Óssea	Cél. B imatura	6,11
		Cél. B transitória	4,01
		Cél. B memória	2,25

⁽¹⁾ porcentual do subtipo celular separado em relação à demarcação FSC-A x SSC-A.

ANEXO I – TABELA DE FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS SEPARADAS DAS AMOSTRAS SVOC

Amostra	Tecido	Tipo celular	%⁽¹⁾
C097	Cérebro	Total	0,04
	Fígado	Hepatócito	90,5
	Linfonodo	Cél. T	21,61
		Cél B	26,89
		Cél. Dendrítica	2,47
	Sangue	Cél. T	34,21
		Cél B	4,47
		Monócito	3,41
		Cél. Dendrítica	1,71
	Baço	Cél. T	1,46
		Monócito	0,13
		Cél. Dendrítica	4,6
		Cél. B imatura	0,16
	Medula Óssea	Cél. T	23,92
		Monócito	3,09
		Cél. Dendrítica	6,73
		Cél. B imatura	0,09
		Cél. B transitória	1,97
		Cél. B memória	0,86
C145	Cérebro	Total	0,03
	Fígado	Hepatócito	99,4
	Linfonodo	Cél. T	1,33
		Cél B	2,9
		Cél. Dendrítica	2,07
	Sangue	Cél. T	43,65
		Cél B	4,98
		Monócito	19,98
		Cél. Dendrítica	2,23
	Baço	Cél. T	3,15
		Monócito	88,56
		Cél. Dendrítica	0,29
		Cél. B imatura	3,3
	Medula Óssea	Cél. T	38,69
		Monócito	12,06
		Cél. Dendrítica	5,7
		Cél. B imatura	0,21
		Cél. B transitória	5,24
		Cél. B memória	1,2

Cérebro	Total	2,7
Fígado	Hepatócito	96,2
Linfonodo	Cél. T	57,34
	Cél B	24,92
	Cel. Dendrítica	0,96
Sangue	Cél. T	67
	Cél B	5,4
	Monócito	7,94
	Cél. Dendrítica	1,32
C219	Cél. T	4,56
Baço	Monócito	0,05
	Cél. Dendrítica	2,88
	Cél. B imatura	30,23
Medula Óssea	Cél. T	56,49
	Monócito	4,36
	Cél. Dendrítica	6,02
	Cél. B imatura	1,47
	Cél. B transitória	5,63
	Cél. B memória	1,45

⁽¹⁾ percentual do subtipo celular separado em relação à demarcação FSC-A x SSC-A.

8 REFERÊNCIAS

1. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 1967;125:673-88.
2. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995;69:5621-30.
3. Schaluder GG, Dawson GJ, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Gutierrez RA, Heynen CA, et al. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol* 1995;46:81-90.
4. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995a;1:564-9.
5. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995b;92:3401-5.
6. Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-8.
7. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996;48:60-7.
8. Kapoor A, Simmonds P, Cullen JM, Scheel TK, Medina JL, Giannitti F, et al. Identification of a pegivirus (GB virus-like virus) that infects horses. *J Virol* 2013a;87:7185-90.
9. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TK, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, et al. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* 2013b;4:e00216-13.
10. Quan P-L, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:8194-9.
11. Lauck M, Sibley SD, Lara J, Purdy MA, Khudyakov Y, Hyeroba D, et al. A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. *J Virol* 2013;87:8971-81.
12. Lyons S, Kapoor A, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, Corcoran B, et al. Viraemic frequencies and seroprevalence of non-primate hepacivirus and equine pegiviruses in horses and other mammalian species. *J Gen Virol* 2014;95(Pt 8):1701-11.
13. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff S, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, HPGV (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol* 2011;92(Pt 2):233-46.
14. Stapleton JT, Bukh J, Muerhoff AS, Fong S, Simmonds P. Assignment of human, simian and bat pegiviruses (previously described as GBV-A, GBV-C, and GBV-D) as members of a new genus (Pegivirus) within the Flaviviridae. 2012a. Available from: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/4486.
15. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* 2017;98,2-3.

16. 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 medicine* 2006;7:173-80.
17. Sibley SD, Lauck M, Bailey AL, Hyeroba D, Tumukunde A, Wenq G, et al. Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. *PLoS One* 2014;9:e98569.
18. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, 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.
19. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Nakano T, Kato T, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection among Colombian native Indians. *Am J Trop Med Hyg* 1998a;59:462-7.
20. Oubiña JR, Mathet V, Feld M, Della Latta MP, Ferrario D, Verdun R, et al. Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina. *Virus Res* 1999;65:121-9.
21. Tucker TJ, Smuts HE. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1–5. *J Med Virol* 2000a;62:82-3.
22. Mison L, Hyland C, Poidinger M, Borthwick I, Faoagali J, Aeno U, et al. Hepatitis G virus genotypes in Australia, Papua New Guinea and the Solomon Islands: a possible new Pacific type identified. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:952-6.
23. Al-Ahdal MN, Rezeig MA, Kessie G, Chaudhry F, Al-Shammary FJ. GB virus C/hepatitis G virus infection in Saudi Arabian blood donors and patients with cryptogenic hepatitis. *Arch Virol* 2000;145:73-84.
24. Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J Virol Methods* 2001;91:3-9.
25. Loureiro CL, Alonso R, Pacheco BA, Uzcátegui MG, Villegas L, León G, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus genotype 3 among autochthonous Venezuelan populations. *J Med Virol* 2002;68:357-62.
26. Schleicher SB, Flehmig BF. Genotyping of GB virus C by restriction pattern analysis of the 5' untranslated region. *J Med Virol* 2003;71:226-32.
27. Abu Odeh RO, Al-Moslih MI, Al-Jokhdar MW, Ezzeddine SA. Detection and genotyping of GBV-C virus in the United Arab Emirates. *J Med Virol* 2005;76:534-40.
28. Muerhoff AS, Leary TP, Sathar MA, Dawson GJ, Desai SM. African origin of GB virus C determined by phylogenetic analysis of a complete genotype 5 genome from South Africa. *J Gen Virol* 2005;86:1729-35.
29. Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 50' untranslated region sequences. *J Med Virol* 2006;78:105-11.
30. Hekmat S, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Bahramali G, Banifazl M, et al. Frequency and genotype of GB virus C among Iranian patients infected with HIV. *J Med Virol* 2008;80:1941-6.
31. Odeh RA, Yasin S, Nasrallah G, Babi Y. Rates of infection and phylogenetic analysis of GB virus-C among Kuwaiti and Jordanian blood donors. *Intervirology* 2010;53:402-7.
32. Feng Y, Zhao W, Feng Y, Dai J, Li Z, Zhang X, et al. A Novel Genotype of GB Virus C: Its Identification and Predominance among Injecting Drug Users in Yunnan, China. *PLoS One* 2011;6:e21151.
33. Giret MTM, Miraglia JL, Sucupira MCA, Nishiya A, Levi JE, Diaz RS, et al. Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011;6:e18407.

34. Singh S, Blackard JT. Human pegivirus (HPgV) infection in subSaharan Africa-A call for a renewed research agenda. *Rev Med Virol* 2017;27:e1951.
35. Lampe E, de Oliveira J, Pereira J, Saback F, Yoshida C, Niel C, Hepatitis G virus (GBV-C) infection among Brazilian patients with chronic liver disease and blood donors. *Clin Diagn Virol* 1998;9:1-7.
36. Alcade R, Nishiya A, Casseb J, Inocencio L, Fonseca L, Duarte A. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Res* 2010;151:148-52.
37. Kapoor A, Kumar A, Simmonds P, Bhuva N, Singh Chauhan L, Lee B, Sall AA, Jin Z, Morse SS, Shaz B, Burbelo PD, Lipkin WI. Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses. *MBio* 2015;6:e01466-15.
38. Berg MG, Lee D, Collier K, Frankel M, Aronsohn A, Cheng K, et al. Discovery of a Novel Human Pegivirus in Blood Associated with Hepatitis C Virus Co-Infection. *PLoS Pathog* 2015;11:e1005325.
39. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *Journal of viral hepatitis* 2009;16:757-68.
40. Fan X, Xu Y, Solomon H, Ramrakhiani S, Neuschwander-Tetri BA, Di Bisceglie AM. Is hepatitis G/GB virus-C virus hepatotropic? Detection of hepatitis G/GB virus-C viral RNA in liver and serum. *J Med Virol* 1999;58:160-4.
41. Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, et al. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 1998;27:877-80.
42. Tucker TJ, Smuts HEM, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC et al. Evidence that the HPGV/ hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol* 2000b;61:52-8.
43. Fogeda M, Navas S, Martín J, Casqueiro M, Rodríguez E, Arocena C, et al. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus. *J Virol* 1999;73:4052-61.
44. Bartolome J, Fogeda M, Lo JM, Arocena C, Marti MA. Existence of distinct GB virus C/hepatitis G virus variants with different tropism. *J Virol* 2000;74:7936-42.
45. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis* 2006;193:451-4.
46. Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1998;79:705-14.
47. Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E, Cianciara J, Nowicki M, Rakela J, et al. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* 2000;95:3986-9.
48. Kriesel JD, Hobbs MR, Jones BB, Milash B, Nagra RM, Fischer KF. Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. *PLoS One*. 2012;7:e31886.
49. Kisiel E, Cortez KC, Pawełczyk A, Ośko IB, Kubisa N, Laskus T, et al. Hepatitis G virus/GBV-C in serum, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow in patients with hematological malignancies. *Infect Genet Evol* 2013;19:195-9.
50. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton JT. 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* 2014;95:1307-19.
51. Bukowska-Ośko, I, Perlejewski, K, Pawełczyk, A, Rydzanicz, M, Pollak, A, Popiel, M, et al. Human Pegivirus in Patients with Encephalitis of Unclear Etiology, Poland. *Emerg Infect Dis* 2018;24:1785-94.

52. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1998;72:3072.
53. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Virol* 1997;71:7804-6.
54. Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, et al. Dynamics of GB virus C viremia early after orthotopic liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C replication. *Hepatology* 1999;29:245-9.
55. Laras A, Zacharakis G, Hadziyannis SJ. Absence of the negative strand of GBV-C/HGV RNA from the liver. *J Hepatol* 1999;30:383-8.
56. Xiang J, Wünschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells *J Virol* 2000;74:9125-33.
57. Xiang JH, 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;345:707-14.
58. George SL, Xiang J, Stapleton JT. Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virology* 2003;316:191.
59. Ruiz V, Giordano M, Rivero CW, Minassian ML, Cuestas ML, Trinks J, et al. GB virus C quasispecies detected in plasma and lymphocyte subsets in a natural human infection. *J Gen Virol* 2010;91:1687-92.
60. Rydze RT, Bhattarai 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. *Antiviral therapy* 2012a;17:1271-79.
61. Bailey AL, Lauck M, Mohns M, Peterson EJ, Beheler K, Brunner KG, et al. Durable sequence stability and bone marrow tropism in a macaque model of human pegivirus infection. *Sci Transl Med* 2015;7:305ra144.
62. 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-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet* 2004;363:2040-6.
63. Reshetnyak VI, Karlovich TI, Ilchenko LU. Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol* 2008;14:4725-34.
64. Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Analytical Biochem* 2010;396:51-8.
65. Gutierrez RA, Dawson GJ, Knigge MF, Melvin SL, Heynen CA, Kyrk CR, et al. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J Med Virol* 1997;53:167-73.
66. Tanaka E, Kiyosawa K, Shimoda K, Hino K, Tacke M, Schmolke S, et al. Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepat* 1998b;5:153-9.
67. Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Sauleda S, Esteban JI, Tanaka E, et al. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology* 1997;26:1626-33.
68. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology* 1998;28:379-84.

69. Elkayam O, Hassoba HM, Ferrell LD, Garcia-Kennedy R, Gish RG, Wright TL, et al. GB virus C (HPGV/HGV) and E2 antibodies in children preliver and postliver transplant. *Pediatr Res* 1999;45:795-8.
70. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278:20358–66.
71. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al., Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-5.
72. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-63.
73. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya V A, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-6.
74. Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012;18:281-5.
75. Martin DN, Uprichard, SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:10777-82.
76. Zeisel MB, Felmlee, DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;369:87-112.
77. Zona L, Tawar RG, Zeisel MB, Xiao F, Schuster C, Lupberger J, Baumert TF. CD81-receptor associations – impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies. *Viruses* 2014;6:875-92.
78. Keck ZY, Li SH, Xia J, von Hahn T, Balfe P, McKeating JA, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol* 2009;83:6149-60.
79. Keck ZY, Angus AG, Wang W, Lau P, Wang Y, Gatherer D, et al. Non-random escape pathways from a broadly neutralizing human monoclonal antibody map to a highly conserved region on the hepatitis C virus E2 glycoprotein encompassing amino acids 412–423. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004297.
80. Burke KP, Cox AL. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunol Res* 2010;47:216-27.
81. Lemon SM. Induction and evasion of innate antiviral responses by hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2010;285:22741-7.
82. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS* 2009;23:2277-87.
83. Stapleton JT, Chaloner K, Martenson JA, Zhang JY, Klinzman D, Xiang JH, et al. GB virus C infection is associated with altered lymphocyte subset distribution and reduced T cell activation and proliferation in HIV-infected individuals. *PLoS One* 2012b;7:e50563.
84. Worobey M, Holmes EC. Homologous recombination in GB virus C/hepatitis G virus. *Mol Biol Evol* 2001;18:254-61.
85. Neibecker M, Schwarze-Zander C, Rockstroh JK, Spengler U, Blackard JT. Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol* 2011;83:685-94.
86. Blackard JT, Ma G, Polen C, DuBois JC, Gast J, Radens CM, et al. Recombination among GB virus C (GBV-C) isolates in the United States. *J Gen Virol* 2016;97:1537-44.
87. Stapleton JT, Xiang J, McLinden JH, Bhattarai N, Chivero ET, Klinzman D, et al. A novel T cell evasion mechanism in persistent RNA virus infection. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2014;125:14-24.

88. Wu H, Padhi A, Xu J, Gong X, Tien P. Evidence for Within-Host Genetic Recombination among the Human Pegiviral Strains in HIV Infected Subjects. *PLoS One* 2016;11:e0161880.
89. Thomas DL, Nakatsuji Y, Shih JW, Alter HJ, Nelson KE, Astemborski JA, et al. Persistence and clinical significance of hepatitis G virus infections in injecting drug users. *J Infect Dis* 1997;176:586-92.
90. Ohto H, Ujiie N, Sato A, Okamoto H, Mayumi M. Vertical Transmission of Hepatitis Viruses Collaborative Study Group Mother-to-infant transmission of GB virus type C/HGV. *Transfusion* 2000;40:725-30.
91. Bhanich Supapol W, Remis RS, Raboud J, Millson M, Tappero J, Kaul R, et al. Mother-to-child transmission of GB virus C in a cohort of women coinfecting with GB virus C and HIV in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* 2009;200:227-35.
92. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45:75-8.
93. Arroyave JC, Pujol FH, Navas MC, Cortés-Mancera FM. Interacción entre el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus GB tipo-C durante el estado de co-infección. *Rev Chilena Infectol* 2013;30:31-41.
94. Skidmore SJ, Collingham KE, Harrison P, Neilson JR, Pillay D, Milligan DW. High prevalence of hepatitis G virus in bone marrow transplant recipients and patients treated for acute leukemia. *Blood* 1997;89:3853.
95. Brown KE, Wong S, Young NS. Prevalence of GBV-C/HGV, a novel 'hepatitis' virus, in patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 1997;97:492-6.
96. Prati D, Zanella A, Bosoni P, Rebulli P, Farma E, De Mattei C, et al. The incidence and natural course of transfusion-associated GB virus C/hepatitis G virus infection in a cohort of thalassemic patients. The CooleyCare Cooperative Group. *Blood* 1998;91:774-7.
97. Yamada-Osaki M, Sumazaki R, Tsuchida M, Koike K, Fukushima T, Matsui A. Persistence and clinical outcome of hepatitis G virus infection in pediatric bone marrow transplant recipients and children treated for hematological malignancy. *Blood* 1999;93:721-7.
98. 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. *Haematologica* 2002;87:714-8.
99. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, Schmitt C, Fritsch S, Lang JM, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:721-4.
100. Stapleton JT. GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis* 2003;23:137-48.
101. Corbi C, Traineau R, Esperou H, Ravera N, Portelet E, Benbunan M, et al. Prevalence and clinical features of hepatitis G virus infection in bone marrow allograft recipients. *BMT* 1997;20:965-8.
102. Zemel R, Ben-Ari Z, Aravot D, Dickman R, Yaniv I, Lewis NJ, et al. Hepatitis GBV-C Viremia in Liver, Heart, and Bone Marrow Recipients. *Transplant Proc* 1997;29:2653-4.
103. Rodriguez-Iñigo E, Tomas J-F, de Soria VG-G, Bartolome J, Pinilla I, Amaro M-J, et al. Hepatitis C and G virus infection and liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: Results from a prospective study. *Blood* 1997;90:1326.
104. Akiyama H, Nakamura N, Tanikawa S, Sakamaki H, Onozawa Y, Shibayama T, et al. Incidence and influence of GB virus C and hepatitis C virus infection in patients undergoing bone marrow transplantation. *BMT* 1998;21:1131-5.
105. Heuft HG, Berg T, Schreier E, Künkel U, Tacke M, Schwella N, et al. Epidemiological and clinical aspects of hepatitis G virus infection in blood donors

- and immunocompromised recipients of HGV-contaminated blood. *Vox Sang* 1998;74:161-7.
106. Vu DL, Cordey S, Simonetta F, Brito F, Docquier M, Turin L, et al. Human pegivirus persistence in the human blood virome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Clin Microbiol Infect*; epub ahead of print 2018 May 19.
  107. Nakamura S, Takagi T, Matsuda T. Hepatitis G virus RNA in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1997;98:1051-2.
  108. Civardi G, Tanzi E, Ferrari B, Vallisa D, Zanetti A, Cavanna L. High prevalence of anti-HGV/E2 antibodies in HCV-positive patients with non Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 1998;83:957-8.
  109. Ellenrieder V, Weidenbach H, Frickhofen N, Michel D, Prümmer O, Klatt S, et al. HCV and HGV in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Hepatol* 1998;28:34-9.
  110. Keresztes K, Takács M, Horányi M, Miltényi Z, Illés A. HCV and HGV infection in Hodgkin's disease. *Pathol Oncol Res* 2003;9:222-5.
  111. Michaelis S, Kazakov DV, Schmid M, Dummer R, Burg G, Kempf W. Hepatitis C and G viruses in B-cell lymphomas of the skin. *J Cutan Pathol* 2003;30:369-72.
  112. 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.
  113. Wiwanitkit V. Individuals with HGV-RNA are at High Risk of B Cell Non - Hodgkin's Lymphoma Development. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005;6:215-6.
  114. Krajden M, Yu A, Braybrook H, La AS, Mak A, Chow R, et al. HPGV/hepatitis G virus infection and non-Hodgkin lymphoma: a case control study. *Int J Cancer* 2010;126:2885-92.
  115. Guidicelli SN, Lopez-Guillermo A, Falcone U, Conconi A, Christinat A, Rodriguez-Abreu D, et al. Hepatitis C virus and HPGV virus prevalence among patients with B-cell lymphoma in different European regions : a case-control study of the International Extranodal Lymphoma Study Group. *Hematol Oncol* 2012;137-42.
  116. Chang CM, Stapleton JT, Klinzman D, McLinden JH, Purdue MP, Katki HA, et al. GBV-C infection and risk of NHL among U.S. adults. *Cancer Res* 2014;74:5553-60.
  117. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000;356:1800-5.
  118. Tovo CV, de Mattos AA, de Souza AR, Rigo JFO, de Almeida PRL, Galperim B, Santos BR. Impact of human immunodeficiency virus infection in patients infected with the hepatitis C virus. *Liver Int* 2007;27:40-6.
  119. Sulkowski MS. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* 2008;48:353-67.
  120. Grint D, Peters L, Rockstroh JK, Rakmanova A, Trofimova T, Lacombe K, et al. Liver-related death among HIV/hepatitis C virus-co-infected individuals: implications for the era of directly acting antivirals. *AIDS* 2015;29:1205-15.
  121. Luetkemeyer AF, Wyles DL. CROI 2018: Highlights of Viral Hepatitis. *Top Antivir Med* 2018;26:30-8.
  122. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis* 1998;177:1723-6.
  123. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;17:209-13.
  124. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001;345:715-24.

125. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med* 2003;139:26-30.
126. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med* 2004;350:981-90.
127. Vahidnia F, Petersen M, Stapleton JT, Rutherford GW, Busch M, Custer B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. *Clin Infect Dis* 2012;55:1012-9.
128. Lefrère JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, 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. *J Infect Dis* 1999;179:783-9.
129. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med* 2000;132:959-63.
130. Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003;187:504-7.
131. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV medicine* 2006;7:25-31.
132. Stapleton JT, Martinson JA, Klinzman D, Xiang J, Desai SN, Landay A. GB virus C infection and B-cell, natural killer cell, and monocyte activation markers in HIV-infected individuals. *AIDS* 2013;27:1829-32.
133. Lauck M, Bailey AL, Andersen KG, Goldberg TL, Sabeti PC, O'Connor DH. GB virus C coinfections in West African Ebola patients. *J Virol* 2014;89:2425-29.
134. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS* 2003;17:1457-62.
135. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, Tural C, Clotet B, Blackard JT, 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.
136. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol* 2010;185:4496-505.
137. Lanteri MC, Vahidnia F, Tan S, Stapleton JT, Norris PJ, Heitman J, et al. Downregulation of cytokines and chemokines by GB virus C after transfusion-transmission in HIV+ blood recipients. *J Infect Dis* 2015;211:1585-96.
138. 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;89:1904-11.
139. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Ávila-Ríos S, García-Morales C, Reyes-Terán G, et al. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One* 2017;12:e0184494.
140. 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 USA* 2006;103:15570-5.

141. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol* 2007;88:3341-6.
142. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J virol* 2011;85:7037-47.
143. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Landay AL, Chivero ET, Stapleton JT. GB virus C particles inhibit T cell activation via envelope E2 protein-mediated inhibition of TCR signaling. *J Immunol* 2013;190:6351-9.
144. Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Mohr EL, Bhattarai N, Chang Q, et al. Characterization of a peptide domain within the GB virus C envelope glycoprotein (E2) that inhibits HIV replication. *Virology* 2012;430:53-62.
145. Eissmann K, Mueller S, Sticht H, Jung S, Zou P, Jiang S, et al. HIV-1 Fusion Is Blocked through Binding of GB Virus C E2D Peptides to the HIV-1 gp41 Disulfide Loop. *PLoS One* 2013;8:e54452.
146. McLinden JH, Stapleton JT, Klinzman D, Murthy KK, Chang Q, Kaufman TM, et al. Chimpanzee GB virus C and GB virus A E2 envelope glycoproteins contain a peptide motif that inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in human CD4+ T-cells. *J Gen Virol* 2013;94:774-82.
147. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG. T cell activation is associated with lower CD4(+) T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003;187:1534-43.
148. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 2008;22:439-46.
149. Rydze RT, Xiang J, McLinden JH, Stapleton JT. GB virus type C infection polarizes T-cell cytokine gene expression toward a Th1 cytokine profile via NS5A protein expression. *J Infect Dis* 2012b;206:69-72.
150. Alter HJ. G-pers creepers, where'd you get those papers? A reassessment of the literature on the hepatitis G virus. *Transfusion* 1997;37:569-72.
151. Lefrère JJ, Loiseau P, Maury J, Lasserre J, Mariotti M, Ravera N, et al. Natural history of HPGV/hepatitis G virus infection through the follow-up of HPGV/hepatitis G virus-infected blood donors and recipients studied by RNA polymerase chain reaction and anti-E2 serology. *Blood* 1997;90:3776-80.
152. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborski J, et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Infect Dis* 1998;177:539-42.
153. Sathar M, Soni P, York D. GB virus C/hepatitis G virus (HPGV/HGV): still looking for a disease. *Int J Exp Pathol* 2000;81:305-22.
154. Berzsényi MD, Woollard DJ, McLean CA, Preiss S, Perreau VM, Beard MR, et al. Down-regulation of intra-hepatic T-cell signaling associated with GB virus C in a HCV/HIV co-infected group with reduced liver disease. *J Hepatol* 2011;55:536.
155. Bhattarai N, Rydze RT, Chivero ET, Stapleton JT. GB Virus C Viremia Is Associated With Higher Levels of Double-Negative T Cells and Lower T-Cell Activation in HIV-Infected Individuals Receiving Antiretroviral Therapy. *The J Infect Dis* 2012b;206:1469-72.
156. Feng Y, Liu L, Feng YM, Zhao W, Li Z, Zhang AM, et al. GB Virus C infection in Patients With HIV/Hepatitis C Virus Coinfection: Improvement of the Liver Function in Chronic Hepatitis C *Hepat Mon* 2014;14:e14169.
157. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Kaufman TM, Stapleton JT. GB Virus C Envelope Protein E2 Inhibits TCR-Induced IL-2 Production and Alters IL-2-Signaling Pathways. *J Immunol* 2012a;189:2211-6.

158. Chivero ET, Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Stapleton JT. Human Pegivirus (HPgV; formerly known as GBV-C) inhibits IL-12 dependent natural killer cell function. *Virology* 2015a;485:116-27.
159. Chivero ET, Stapleton JT. 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* 2015b;96(Pt 7):1521-32.
160. Banda NK, Simon GR, Sipple JD, Terrell KL, Archer P, Shpall EJ, et al. Depletion of CD34+ CD4+ cells in bone marrow from HIV-1-infected individuals. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:162-72.
161. Redd AD, Avalos A, Essex M. Infection of hematopoietic progenitor cells by HIV-1 subtype C, and its association with anemia in southern Africa. *Blood* 2007;110:3143-9.
162. Isgro A, Leti W, De Santis W, Marziali M, Esposito A, Fimiani C, et al. Altered clonogenic capability and stromal cell function characterize bone marrow of HIV-infected subjects with low CD4+ T cell counts despite viral suppression during HAART. *Clin Infect Dis* 2008;46:1902-10.
163. McNamara LA, Collins KL. Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs. *Curr Opin HIV AIDS* 2011;6:43-8.
164. McNamara LA, Onafuwa-Nuga A, Sebastian NT, Riddell J, Bixby D, Collins KL. CD133+ hematopoietic progenitor cells harbor HIV genomes in a subset of optimally treated people with long-term viral suppression. *J Infect Dis* 2013;207:1807-16.
165. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:692-8.
166. Henrich TJ, Hanhauser E, Marty FM, Sirignano MN, Keating S, Lee TH, et al. Antiretroviral-Free HIV-1 Remission and Viral Rebound After Allogeneic Stem Cell Transplantation: Report of 2 Cases. *Ann Intern Med* 2014;161:319-27.
167. Vu DL, Kaiser L. The concept of commensal viruses almost 20 years later: redefining borders in clinical virology. *Clin Microbiol Infect* 2017;23(10):688-90.
168. Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 2014;157:142-50.
169. Ljungman P, Johansson N, Aschan J, Glaumann H, Lonnqvist B, Ringden O, et al. Long-term effects of hepatitis C virus infection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood* 1995;86:1614.
170. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours, and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *BMT* 2006;37:439-49.
171. Antoine C, Muller S, Cant A. Long term survival and transplantation of haematopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the european experience 1968-1999. *Lancet* 2003;361:553-60.
172. Steward CG, Jarisch A. Haemopoietic stem cell transplantation for genetic disorders. *Arch Dis Child* 2005;90:1259-63.
173. Bregni M. HSCT for solid tumours cap. 31; 464-471 in Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T. *The EBMT Hand Book - Haematopoietic Stem Cell Transplantation - EBMT/ESH*, Forum Service Editore Italia 5a. ed. 2008, 592 p.
174. Saccardi R, Farge D; HSCT for autoimmune diseases in adults cap. 32: 473 in Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T. *The EBMT Hand Book - Haematopoietic Stem Cell Transplantation - EBMT/ESH*, Forum Service Editore Italia 5a. ed. 2008, 592 p.

175. Tyndall A, Saccardi R. Haematological stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies prospective randomized trials and future directions. *Clin Exp Immunol* 2005;141:1-9.
176. Pavletic SZ, Fowler DH. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:251-64.
177. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2014;374-84.
178. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-56.
179. Markey K, MacDonald KP, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 2014;354-62.
180. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2012;158:30-45.
181. Gretch D. Editorial commentary: advocating the concept of GB virus C biotherapy against AIDS. *Clin Infect Dis* 2012;55:1020-1.
182. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-80.
183. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1951;62:293-300.
184. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792-7.
185. Caselmann TTT, Cruvinel WM, Mesquita Junior D, Araújo JAP, de Souza AWS, Andrade LEC, et al. Linfócito B: da imunologia aos imunobiológicos. *Sinopse de Reumatologia* 200;82:35-57.
186. BD Biosciences. *B-Cell Research: Flow cytometry tools for the study of B-cell biology*; 2014.
187. Bailey AL, Buechler CR, Matson DR, et al. Pegivirus avoids immune recognition but does not attenuate acute-phase disease in a macaque model of HIV infection. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006692.
188. Fridholm H, Østergaard Sørensen L, Rosenstjerne MW, Nielsen H, Sellebjerg F, Bengård Andersen Å, Fomsgaard A. Human pegivirus detected in a patient with severe encephalitis using a metagenomic pan-virus array. *J Clin Virol* 2016;77:5-8.
189. Balcom EF, Doan MAL, Branton WG, Jovel J, Blevins G, Edguer B, et al. Human pegivirus-1 associated leukoencephalitis: Clinical and molecular features. *Ann Neurol* 2018;84:781-7.
190. Liu Z, Zhang Y, Wei F, Xu M, Mou D, Zhang T, et al. Detection of GB virus C genomic sequence in the cerebrospinal fluid of a HIV-infected patient in China: a case report and literature review. *Epidemiol Infect* 2016;144:106-12.
191. Lalle E, Sacchi A, Abbate I, Vitale A, Martini F, D'Offizi G, et al. Activation of Interferon Response Genes and of Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-1 Positive Subjects with GB Virus C Co-Infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21:161-71.
192. Schmid MA, Diamond MS, Harris E. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. *Front Immunol* 2014;5:647.
193. Martínez Jahnnyer, Hernández Juan C, Urcuqui-Inchima Silvio. Papel de las células dendríticas en la infección por el virus dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. *Rev chil infectol* 2017;34:249-56.
194. Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, Manié S, Le Deist F, Azocar O, et al. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 2000;164,1753-60.

195. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 2001;75:3501-8.
196. Pollara G, Speidel K, Samady L, Rajpopat M, McGrath Y, Ledermann J, et al. Herpes simplex virus infection of dendritic cells: balance among activation, inhibition, and immunity. *J Infect Dis* 2003;187:165-78.
197. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics Jr L, et al. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and antiinflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003;170:5615-24.
198. Cuceanu N, Tuplin A, Simmonds PJ. Evolutionarily conserved RNA secondary structures in coding and non-coding sequences at the 3' end of the hepatitis G virus/GB-virus C genome. *J Gen Virol* 2001;82:713-22.
199. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:35.
200. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:387-94.
201. Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol* 2011;2011:601953.