

ALÉIA FAUSTINA CAMPOS

**A influência do vírus da hepatite G (GBV-C) na evolução
da infecção pelo HIV em mulheres**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Aléia Faustina
A influência do vírus da hepatite G (GBV-C) na evolução da infecção pelo HIV
em mulheres / Aléia Faustina Campos. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Vírus GB C 2.Prevalência 3.HIV 4.Co-infecção vírus GB-C/HIV
5.Terapia antirretroviral

USP/FM/DBD-168/10

*Aos meus queridos pais, meus irmãos, meus amigos
e a Deus por tornar tudo isso possível*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, José Eduardo Levi, por acreditar e confiar à mim esse importante estudo.

À Prof. Dra. Fátima Mitiko Tengan, pela contribuição ímpar na elaboração do banco de dados e sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

À Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Correa e Dr. Celso Granato, pela importante contribuição durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ronaldo César Borges Gryscek, pela grande amizade e participação constante em minha carreira e no processo de aprendizado dessa dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Virologia pela ajuda na análise do material e coleta dos dados.

Aos amigos do serviço de arquivo médico do SEAP – HIV/aids.

Ao serviço de arquivo médico do Hospital Emílio Ribas.

À Luíza, pelo empenho em recuperar artigos científicos utilizados nesta dissertação.

Ao Rogério, pela ajuda na análise estatística dos dados coletados.

Ao amigo Gaspar, pelo companheirismo e grande colega de trabalho.

Aos amigos do Ambulatório de Moléstias Infecciosas.

Aos meus amigos por entenderem alguns momentos de ausência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelos recursos disponibilizados nessa dissertação.

Às pacientes, principal motivação desta pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de gráficos e figuras

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO

1- Histórico	1
2- Epidemiologia da infecção pelo GBV-C	8
3- Epidemiologia da infecção pelo HIV-1	10
4- Vias de transmissão do GBV-C	13
5- Virologia do GBV-C	14
6- Diagnóstico laboratorial da infecção pelo GBV-C	16
7- A interação GBV-C e HIV	19

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	27
--------------------------------------	-----------

OBJETIVOS	28
------------------------	-----------

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1- Desenho do estudo	29
2- Característica da população do estudo e casuística	29
3- Alocação das pacientes em grupos	32
4- Testes laboratoriais para determinação da infecção pelo GBV-C	
4.1- Determinação qualitativa de anticorpos anti-E2	33
4.2- Extração de GBV-C RNA da amostra	34
4.3- Reação de transcrição reversa	34
4.4- Reação PCR GBV-C convencional	34
4.5- Reação de Nested PCR GBV-C	35
4.6- Reação PCR GBV-C em tempo real	36
4.6- Calibração do ensaio e curva-padrão	37
4.7- Determinação da contagem de carga viral do HIV	38
4.8- Determinação da contagem de linfócitos T CD4	41
5- Análise dos dados coletados	42
6- Aspectos éticos	44
7- Revisão bibliográfica	44

RESULTADOS	45
-------------------------	-----------

DISCUSSÃO	66
------------------------	-----------

CONCLUSÕES	80
-------------------------	-----------

ANEXOS	81
---------------------	-----------

REFERÊNCIAS	85
--------------------------	-----------

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação da PCR GBV- C convencional.....	35
Quadro 2- Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação NESTED PCR GBV-C	36
Quadro 3- Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação da PCR em tempo real	37
Tabela 1- Características gerais da população no início do estudo estratificada pelo perfil GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas	49
Tabela 2- Frequência de doenças oportunistas na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	50
Tabela 3- Frequência de co-infecção na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	51
Tabela 4- Média e mediana dos valores de CD4, carga viral do HIV, CD4 nadir e carga viral Zênite na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	52
Tabela 5- Média e mediana de esquemas antirretrovirais utilizados no tratamento do HIV na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	53
Tabela 6- Frequência de troca de esquemas ARV's e do motivo da troca na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	54

Tabela 7- Risco relativo de óbito estratificado pelo perfil do GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	57
Tabela 8- Análise de regressão múltipla de Cox ajustado por variáveis em 248 pacientes. Modelo parcial. SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	59
Tabela 9- Análise de regressão múltipla de Cox ajustado por variáveis em 248 pacientes. Modelo final. SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	60
Tabela 10- Resultados dos testes laboratoriais para GBV-C RNA em 57 novas amostras colhidas em 2006-2008 – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	60
Tabela 11- Resultado das variáveis CD4 e carga viral do HIV do GBV-C das 57 pacientes - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	63
Tabela 12- Comparação entre a variação CD4, carga viral do HIV basal e final dos grupos PN, PP, C/I/S/II - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	64
Tabela 13- Comparação entre a variação CD4, carga viral do HIV basal e final dos grupos PN, PP - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Prevalência do GBV-C em 248 pacientes - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas	47
Gráfico 2- Análise de sobrevida entre pacientes expostas e não expostas ao GBV-C - Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas	56
Gráfico 3 - Análise de sobrevida entre pacientes GBV-C RNA-/anti-E2 - ; GBV-C RNA+/antiE2- e GBV-C RNA-/antiE2+ - Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	56
Gráfico 4 - Análise de sobrevida entre categorias de CD4. Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	58
Gráfico 5 - Análise de sobrevida entre categorias de carga viral do HIV. Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Hepatotropismo do GBV-C.....	05
Figura 2- Prevalência do GBV-C em doadores de sangue de diversas regiões do mundo.....	08
Figura 3- Esquema comparativo da organização do genoma do GBV-C e VHC mostrando as fases de leitura abertas e as regiões 5' e 3'UTR	16
Figura 4- Mecanismos propostos para explicar a ação do GBV-C nos pacientes co-infectados com HIV	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GBV-C	Vírus da hepatite G
HGV	Vírus da hepatite G
VHC	Vírus da hepatite C
VHB	Vírus da hepatite B
HTLV1/2	Vírus humano linfotrópico 1/2
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana adquirida tipo 1
CHC	Hepatocarcinoma
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
HAART	Terapia de Alta Atividade Antirretroviral
CCR5	Receptor 5 de quimiocinas (C-C)
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas (CXC)
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos - 1 α
RANTES	Regulated on Activation Normal T Cell-Expressed and Secreted
IL	Interleucina
INFγ	Interferon Gama
SDF-1	Fator derivado de estroma
ELISA	Ensaio imunoenzimático
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
RNA	Ácido ribonucléico
PBMC	Células linfomononucleares de sangue periférico
NS	Região não-estrutural
CTL	Linfócito T citotóxico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase

RESUMO

Campos A F. *A Influência do vírus da hepatite G (GBV-C) na evolução da infecção pelo HIV em mulheres* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010, 96p

INTRODUÇÃO: O vírus da hepatite G (GBV-C) foi descoberto simultaneamente por dois grupos de pesquisa que buscavam identificar um agente causador de hepatite pós-transfusional não-A, não-B e não-C. Trata-se de um vírus linfotrópico que replica primariamente em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), baço e medula óssea, sendo a replicação hepática menos importante. Sabe-se que, após um período de viremia assintomática, a maioria dos portadores virais clareia o vírus ao longo do tempo havendo surgimento do anticorpo contra a glicoproteína do envelope viral, anti-E2. Uma vez que, provavelmente, não exista nenhuma associação entre o GBV-C e qualquer doença identificada até o momento, o mesmo tem sido considerado um vírus humano não patogênico. Entretanto, alguns estudos demonstraram haver uma interação benéfica entre o GBV-C e HIV a ponto de retardar a progressão da infecção pelo HIV para aids. **OBJETIVOS:** Avaliar a prevalência da viremia e de anticorpos contra a glicoproteína anti-E2 e estudar o efeito da interação GBV-C e HIV ao longo do acompanhamento de pacientes femininas baseado em valores da média e mediana de linfócitos T CD4+ , da carga viral do HIV e da carga viral quantitativa do GBV-C RNA. **MÉTODOS:** Foram estudadas 248 pacientes femininas portadoras da infecção pelo HIV acompanhadas por um período de cerca de 10 anos, tendo como término de estudo a data limite de 01/01/2008, ou a data da última consulta no ambulatório ou a data do óbito. **RESULTADOS:** Das 115 pacientes expostas, 57 eram GBV-C RNA positivas (23%) e 58 eram anti-E2 positivas (23%). Não houve achado da presença concomitante do GBV-C RNA e do anticorpo anti-E2 nas pacientes estudadas. Com relação à contagem de linfócitos T CD4+ e de carga viral basal do HIV no início do estudo, não observamos diferença estatística entre os valores em relação aos grupos (GBV-C RNA-/anti-E2- , GBV-C RNA+/anti-E2 - e GBV-C RNA -/anti-E2+), sendo o $p=0,36$ e $0,713$, respectivamente. O risco relativo de óbito para o grupo GBV-C+/anti-E2- foi 63% menor do que para o grupo GBV-C-/anti-E2-. **CONCLUSÃO:** A prevalência da viremia por GBV-C RNA e a do anticorpo anti-E2 foi de 23%, perfazendo uma frequência de exposição ao GBV-C de 46%. Em análise multivariada, apenas a carga viral do HIV, maior que 100.000 cópias/mL, e manifestação de doença oportunística ao longo do acompanhamento das pacientes estiveram associadas à melhora da sobrevida. Provavelmente, o uso da terapia antirretroviral para o HIV foi fator limitante na análise de efeito protetor do GBV-C RNA em nossa casuística.

Descritores: 1. Vírus GBV-C 2. Prevalência 3. HIV 4. Co-infecção GBV-C/HIV 5. Terapia antirretroviral

SUMMARY

Campos A F. *Hepatitis G (GBV-C) influence in the prognosis of HIV- infected women* [Dissertation]. São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2010, 96p

INTRODUCTION: GB virus C (GBV-C) was discovered by two research groups that aimed to identify a possible agent responsible for a non-A, non-B and non-C pos-transfusion hepatitis. There is remarkable evidence that GBV-C is a lymphotropic virus that primarily replicates in PBMCs, spleen and bone marrow. This virus does not appear to be hepatotropic and does not replicate effectively in hepatocytes. After an asymptomatic viremia period, most subjects clear the virus over time with the development of antibody against a viral envelope glycoprotein (anti-E2). Since there is probably no association between GBV-C and any identify disease, this virus has been considered not pathogenic. However, according to some studies, GBV-C co-infection in HIV seropositive patients is associated with a slower disease progression and longer survival after AIDS development in HIV infected patients. **Objective:** To evaluate the prevalence of GBV-C viremia, anti-E2 antibody and assess the effect of the interaction of GBV-C and HIV in an exclusive female cohort, in a follow up period of up to 10 years. **Methodos:** Two hundred forty-eight HIV infected women were enrolled in the study. Follow-up sample was obtained from 248 patients. Laboratorial variables as mean and median of values of CD4, HIV and GBV-C quantitative viral load, and clinical parameters as HAART use, OIs influence on survival were investigated. **Results:** One hundred and fifteen subjects were exposed to GBV-C: 57 were GBV-C RNA positive (23%) and 58 were anti-E2 antibody positive (23%). Viral RNA with concomitant anti-E2 antibodies was not found in any patient. There was no statistical difference among three studied groups (GBV-C RNA-/anti-E2 - , GBV-C RNA+/anti-E2- and GBV-C RNA -/anti-E2+), regarding CD4+ and viral load baselines ($p=0,360$ and $0,713$, respectively). Relative risk of death for GBV-C RNA+/anti-E2- group was 63% lower than the GBV-C-/anti-E2 group. **Conclusion:** Forty-six percent of the enrolled individuals were exposed to GBV-C virus. Multivariate analysis demonstrated that only HIV load higher than 100.000 copies/mL and opportunistic disease during the follow-up period were associated to longer survival after AIDS development. Probably, antiretroviral therapy for HIV in our study blurred the observation of a putative protective effect related to GBV-C RNA.

Descriptors: 1. GB virus C 2. Prevalence 3. HIV 4. Co-infection GB virus C and HIV 5. Antiretroviral therapy

Introdução

1 – Histórico

As pesquisas científicas que culminaram com a descoberta do vírus GBV-C ou vírus da hepatite G tiveram início nos anos de 1960. Em 1967, Deinhardt e colaboradores, durante pesquisa para isolar o vírus da hepatite A, descobriram um novo vírus a partir do soro de um cirurgião de nome G. Barker (GB) que apresentava quadro clínico típico de hepatite aguda manifestado por aumento de enzimas hepáticas e um período de icterícia de três semanas. O sangue desse paciente foi inoculado em primatas não humanos e a hepatite manifestada em todos os animais experimentados. Os achados sugeriram que a causa dessa hepatite era de um agente viral não identificado, assim nomeado GBV¹.

Contudo, somente em meados dos anos 90, dois grupos de pesquisa, nos Estados Unidos da América^{2,3,4,5} - procurando um novo vírus que poderia ser o agente etiológico para casos considerados de hepatite não A, não B, não C e não E - isolaram um vírus RNA da família *Flaviviridae* nomeado GBV-C/HGV (GB vírus C ou vírus da hepatite G). Com os dados das pesquisas disponíveis entre estes dois grupos de pesquisadores foi possível averiguar que o GBV-C e o HGV possuíam 96% de homologia entre seus genomas, indicando que de fato tratava-se de duas denominações diferentes do mesmo agente viral. Desde então ambas as nomenclaturas passaram a ser adotadas na literatura (GBV-C/HGV)^{3,4,6,7}. Assim, devido ao fato do GBV-C ter sido encontrado durante investigações que procuravam um novo vírus causador de hepatite e porque os clones virais

provinham de pacientes ou animais com sinais e sintomas de hepatite, este vírus ficou conhecido equivocadamente como um agente causador de hepatite ⁸.

Logo após sua descoberta, o GBV-C foi intensamente estudado em diferentes populações, procurando-se determinar sua história natural. Uma vez adquirida, a infecção pelo GBV-C geralmente tende a persistir por vários anos em imunocompetentes e imunossuprimidos. Após esse período de viremia assintomática, a maioria dos carreadores virais clareiam o vírus ao longo do tempo havendo surgimento do anticorpo contra uma glicoproteína do envelope viral, o anti-E2 ⁹.

Trata-se de um vírus linfotrópico, que se replica primariamente em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) incluindo linfócitos T CD4 e linfócitos B, medula óssea e baço, sendo a replicação hepática menos importante ^{10,11}. De fato, a demonstração de que o GBV-C não sofre replicação primariamente no fígado foi feita em um estudo realizado em chimpanzés após inoculação endovenosa do vírus e não se encontrando qualquer manifestação de doença hepática ¹². Apesar da presença do GBV-C em hepatócitos a análise histológica do fígado com o vírus mostrou-se normal na maioria dos indivíduos estudados ¹³.

Uma vez que, provavelmente, não exista nenhuma associação entre o GBV-C e qualquer doença identificada até o momento, o mesmo tem sido considerado um vírus humano não patogênico. Esse vírus não é identificado mais frequentemente em hepatites criptogênicas ou em hepatites pós-transfusionais não-A, não-E ^{14,15,16,17,18}. Tampouco os níveis de transaminases se correlacionam com a viremia pelo GBV-C em doadores e receptores de sangue, pacientes em diálise, hemofílicos e usuários de drogas ¹⁹. Não foi encontrada associação entre

o GBV-C e hepatite fulminante ^{16,17,18} ou entre viremia pelo GBV-C e cirrose com insuficiência hepática terminal ¹⁴. Sabe-se ainda que o GBV-C não influencia a gravidade da hepatite pós-transplante ou a sobrevida do enxerto ^{14,15,20,21,22}. Outros estudos não lograram êxito em demonstrar qualquer associação entre o GBV-C e carcinoma hepatocelular, linfoma não-Hodgkin ^{23,24}, porfiria cutânea tarda ²⁵, líquen plano oral, crioglobulinemia, doença de Sjögren ²⁶ ou carcinoma oral ²⁷.

A co-infecção do VHC parece ser mais comum que a do VHB provavelmente por ser a via de transmissão parenteral mais importante na aquisição da hepatite C. Estudos demonstram que a prevalência da viremia do GBV-C em indivíduos co-infectados VHC é de aproximadamente 20 a 30% ²⁸.

A presença do GBV-C parece não alterar o curso da evolução de uma infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) e da hepatite B (VHB) ²⁸, ou seja, provavelmente, não existe relação de um pior desfecho ou maior risco de desenvolvimento de doença crônica na co-infecção do GBV-C/HBV e ou GBV-C/VHC. Entretanto, no que se refere à co-infecção GBV-C/VHC, o desenvolvimento de CHC tem sido investigado e os resultados dos estudos publicados ainda são conflitantes ^{29,30,31,32,33,34}. Lightfoot e colaboradores ²⁹ compararam a frequência do GBV-C RNA entre pacientes sabidamente VHC positivos negros sul-africanos com CHC e grupo sem o câncer e não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os mesmos quanto ao maior risco desse câncer. Com resultados semelhantes, um estudo brasileiro realizado por Strauss e colaboradores ³⁰ e outro por Leão-Filho e colaboradores ³¹ concluíram que a co-infecção GBV-C/VHC não induziu o surgimento de lesão hepática mais grave, favorecendo a hipótese de que o GBV-C não pareça ser um

fator relevante na etiologia do CHC. Em contrapartida, Tagger e colaboradores³² estudando 170 pacientes com hepatite C crônica e CHC e 306 pacientes no grupo controle (hepatite C crônica e sem CHC) observaram um risco relativo 7,3 vezes maior de detecção do GBV-C RNA em pacientes com o diagnóstico de CHC. Moriyama e colaboradores³³ concluíram que a co-infecção pelo GBV-C não altera o perfil sorológico da hepatite C crônica entretanto, os resultados demonstraram que a presença do GBV-C esteve associada a piora dos parâmetros histopatológicos nos indivíduos com hepatite C crônica, sugerindo que o GBV-C possa ser um risco para o desenvolvimento de CHC nessa população. Resultados semelhantes foram reportados por Yuan e colaboradores³⁴ que estudaram 144 pacientes com hepatite C crônica e CHC e 252 pacientes no grupo controle (hepatite C crônica e sem CHC), observando uma chance 5,4 vezes maior da presença da infecção pelo GBV-C RNA entre os pacientes com CHC.

Assim diante de todos os resultados conflitantes a cerca da real patogenicidade desse vírus, tem sido consenso na literatura que o GBV-C muito provavelmente não seja um organismo virulento, não causa doença hepática ou piora uma doença hepática já instalada e que, nem mesmo, tem o fígado o sítio primário de infecção²⁸. A maioria dos pacientes com a infecção apresenta o GBV-C RNA detectado por longo período, mas nenhum deles apresentará marcadores bioquímicos de hepatite crônica¹². Em conclusão, nem a replicação no fígado nem a associação com hepatite (ou outra doença associada) têm sido convincentemente definidas na infecção pelo vírus GBV-C³⁵. A Figura 1 confronta algumas conclusões de estudos já publicados que demonstram haver ou não um hepatotropismo do GBV-C³⁶.

Fig 1: Hepatotropismo do GBV-C

Hepatotropismo	Não hepatotropismo
Detecção do GBV-C RNA no soro de pacientes com hepatite aguda não- A não- E	Igual detecção da taxa de GBV-C RNA em doadores com enzima alanina aminotransferase normal ou elevada (1,7% e 1,5%, respectivamente)
Modelo histológico de hepatite na infecção pelo GBV-C	Valores normais das aminotransferases na presença do GBV-C RNA
Detecção do GBV-C RNA e antígeno NS5 no tecido hepático	Nenhuma correlação entre o nível do GBV-C RNA e da enzima alanina aminotransferase
Redução significativa do nível sérico do GBV-C RNA após transplante hepático	Nível do GBV-C RNA no tecido hepático menor que no sangue

Fonte: Adaptado Reshetnyak e colaboradores³⁶. World J Gastroenterol. 2008; 14(30): 4725-

34

Em função dessa falta de relação causa-efeito GBV-C e hepatite, há uma tendência na literatura em abolir a nomenclatura “vírus da hepatite G” (HGV) e manter apenas “vírus GB-C” (GBV-C)⁵. Também por isso, a agência americana FDA (*Food and Drugs Administration*) nunca estabeleceu triagem para estes vírus em doadores de sangue dos EUA³⁷ sendo que, aproximadamente uma em 70 unidades de hemoderivados nos Estados Unidos, contém o RNA do vírus GBV-C⁵.

Compreensivelmente, o interesse pelo GBV-C diminuiu após os primeiros anos de sua descoberta, uma vez que ele não parecia ter maior impacto clínico nos diferentes grupos de pacientes. Um trabalho brasileiro visando o estudo da prevalência do GBV-C RNA em 200 amostras de doadores sadios de bancos de sangue em São Paulo ressalta a possibilidade de que a alta prevalência desse vírus nessa população (18 doadores GBV-C RNA positivos, prevalência de 9%),

possa contribuir para a hipótese de que o GBV-C seja um agente viral benigno⁵⁹. Além disso, as taxas de prevalência do vírus descritas em pacientes sadios levantavam questões não só quanto à significância clínica do GBV-C, mas também quanto a outras possíveis rotas de transmissão - tais como a sexual e vertical – como importantes para a ampla distribuição do vírus³⁸. Ainda no que se refere à prevalência desse vírus, sabe-se que apesar da viremia poder persistir positiva por até 16 anos em indivíduos saudáveis, parece que grande parte dessas infecções agudas são clareadas, com a produção de um anticorpo neutralizante detectado no plasma. Desta forma, a infecção pelo GBV-C pode ser mais comum do que sugerem os estudos de prevalência baseados apenas na detecção do RNA do vírus^{35,39}.

Entretanto, o mundo voltou sua atenção novamente para este vírus a partir de 1998, quando estudos de Toyoda e Heringlake propuseram que a interação entre o HIV e o GBV-C seria benéfica a ponto de retardar a progressão da infecção pelo HIV para aids^{40,41}.

Posteriormente outras publicações^{42,43,44,45,46,47,48}, demonstraram que os indivíduos infectados pelo HIV e co-infectados pelo GBV-C, apresentaram queda da mortalidade ou melhora nas condições clínicas (como maior nível de linfócitos T CD4 e menor uso de antirretrovirais, por exemplo).

De fato, alguns estudos epidemiológicos sugerem fortemente uma associação entre a infecção pelo GBV-C e o prolongamento da sobrevida em indivíduos com o HIV^{10,49}, não estando, contudo, comprovada a existência de causalidade entre estes dois eventos^{50,51}.

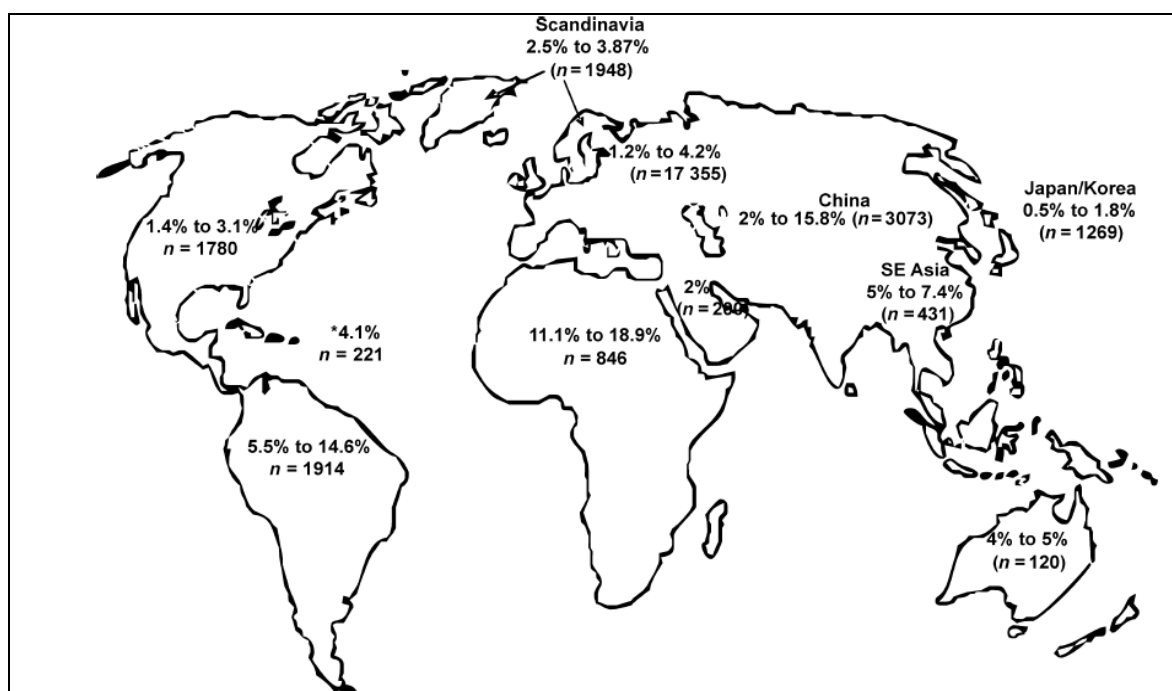
De qualquer forma, pelo fato do GBV-C e o HIV se replicarem em células linfócitos T CD4+ é razoável especular que uma interferência viral entre esses dois vírus possa ocorrer ¹¹.

2 - Epidemiologia da infecção pelo GBV-C

Dados epidemiológicos indicam que o GBV-C é altamente prevalente em populações de todo o mundo. Essa prevalência é estimada em 1 a 4% na Europa e América do Norte e 8 a 15% na América do Sul, África e Ásia ^{13,26,52,62}.

A Figura 2 mostra as taxas de prevalência do GBV-C em doadores de sangue de diversas regiões do mundo. O mapa representa as taxas de prevalência do GBV-C em 11.391 doadores de sangue compilados de 50 estudos publicados. A detecção do GBV-C foi realizada através do método da reação em cadeia da polimerase (PCR). Nota-se que em países desenvolvidos, a prevalência do GBV-C entre doadores de sangue variou de 0,5% a 5%, e nos em desenvolvimento, de 5% a 18,9% ⁵³.

Fig 2: Prevalência do GBV-C em doadores de sangue de diversas regiões do mundo



Fonte: Stapleton e colaboradores ⁵³. Journal of Viral Hepatitis. 2009; 16: 757-768

A análise filogenética de sequências genômicas do GBV-C isoladas de amostras obtidas em diversas regiões revelaram a existência de seis genótipos principais com 12% de divergência genômica entre eles e estreitamente relacionados com a região geográfica, sugerindo que o GBV-C é um vírus antigo, que acompanhou as migrações populacionais ao longo do tempo⁵⁴. O genótipo 1, com os subtipos 1a e 1b, é predominante na África Ocidental; o genótipo 2, com os subtipos 2a e 2b, na Europa e EUA; o genótipo 3 na Ásia, o genótipo 4 no Sudeste Asiático, o genótipo 5 na África do Sul e o novo genótipo 6 na Indonésia⁵⁵.

A prevalência de viremia pelo GBV-C/HGV no Brasil entre doadores de sangue e voluntários sadios está situada entre 5% a 10%. O estudo de Levi e colaboradores, publicado em 2003, revelou prevalência de 9,7% de positividade para o GBV-C RNA entre 545 doadores de sangue de São Paulo⁵⁶.

Uma pesquisa conduzida pelo grupo de Ribeiro-dos-Santos em São Paulo, publicada em 2002, demonstrou uma prevalência de 5,1% de GVB-C/HGV entre 1.039 amostras de indivíduos sadios maiores de dois anos³⁸. No mesmo ano, Oliveira e colaboradores⁵⁷ demonstraram uma frequência de viremia pelo GBV-C/HGV de 7,1% entre 241 indivíduos doadores voluntários da região central do Brasil, ou seja, uma endemicidade intermediária da infecção, sendo a via de transmissão parenteral presente em cerca de 1/3 dos casos e com maior frequência entre doadores na quarta década de vida. Nesse estudo, os pesquisadores determinaram, ainda, o genótipo do GBV-C dos 17 pacientes GBV-C RNA positivos. Foi encontrado três (17,6%) pacientes com genótipo 1 e 14 pacientes (82,4%) com o genótipo 2. Desses, quatro eram pertencentes ao

subtipo 2a e 10 ao subtipo 2b. O trabalho conclui que no Brasil, há circulação simultânea dos genótipos 1 e 2 com maior prevalência do subtipo 2b do GBV-C ⁵⁷.

Outro trabalho publicado por Nishiya e colaboradores ⁵⁸ estudaram a distribuição genotípica do GBV-C em 24 pacientes residentes em São Paulo por meio de uma análise filogenética de sequenciamento do fragmento de 728 pares de base da região 5' não-codificadora (5'NCR) do genoma viral sendo identificados os genótipos 1, 2a e 2b nas respectivas frequências: 8,3% (2/24), 50% (12/24) e 41,7% (10/24).

No que se refere à co-infecção GBV-C e HIV, parece que a aquisição do GBV-C usualmente precede a infecção pelo HIV sendo, infreqüentemente, adquirida depois que a infecção pelo HIV já se encontra estabelecida ⁶⁰. De qualquer forma, a taxa de infecção do GBV-C nesse grupo tem se mostrado extremamente alta, com taxa de até 39% de viremia positiva e 46% anti-E2 positivo em um grupo americano multicêntrico de coorte masculina ⁴².

No Brasil a prevalência de co-infecção HIV e GBV-C foi estudada por Souza e colaboradores sendo encontrada uma positividade de 24% para o RNA do GBV-C em uma coorte de 175 pacientes portadores de HIV em São Paulo ⁶¹.

3 - Epidemiologia da infecção pelo HIV

Embora inicialmente vinculado aos homens que fazem sexo com homens (HSH), particularmente nos países industrializados e na América Latina, o HIV se disseminou rapidamente entre diversos segmentos da sociedade, alcançando paulatinamente mulheres, crianças e homens com prática heterossexual ⁶³.

Assim, já no começo da década de 80, a aids atingia inicialmente, e de forma bastante intensa, os usuários de drogas ilícitas endovenosas, homens que fazem sexo com homens e os indivíduos que receberam transfusão de sangue e hemoderivados. Desde então, a epidemiologia da infecção no Brasil vem sofrendo significativa transformação, caracterizada por “heterossexualização, feminilização, pauperização e interiorização”, ou seja, tem havido persistente tendência de crescimento de casos entre heterossexuais, mulheres, populações menos favorecidas socioeconomicamente e em cidades do interior do país ⁶³.

De fato, o perfil epidemiológico do HIV vem mudando e o número de casos de portadores desse vírus está aumentando entre os heterossexuais, entre as mulheres, entre pessoas de baixa renda e saindo de grandes centros para pequenas cidades. Dados atuais da organização mundial de saúde (OMS) estimam que aproximadamente 30 milhões de pessoas vivam com a infecção pelo HIV no mundo. Segundo o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, até Junho 2008 foram identificados 506.499 casos de aids no Brasil, com um total de óbitos acumulados até 2007 de 205.409. O número de casos vem aumentando no país, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro- Oeste, em especial entre as mulheres ⁶⁴.

Foram identificados até junho de 2008 um total de 333.485 casos de aids no sexo masculino e 172.995 no sexo feminino. Observou-se também que a razão de sexo (M:F) no Brasil diminuiu bastante ao longo do tempo, passando de 15,1: 1 em 1986 para 1,5:1 em 2006 ⁶⁴.

Não resta dúvida de que a epidemia de aids é hoje um grande problema de saúde pública no Brasil e, embora até a atualidade haja muito mais casos notificados em indivíduos do sexo masculino, a velocidade de crescimento da

epidemia é, como em outros países, muito maior entre as mulheres do que entre os homens ⁶³.

Em 1999 e 2000, a aids foi a segunda causa de morte para as mulheres entre 15 e 49 anos, no Estado de São Paulo, sendo a primeira causa, as doenças cérebro-vasculares. De fato, o decréscimo da razão masculino/feminino de casos e de óbitos e o fato da aids figurar entre as principais causas de mortalidade nas mulheres em idade fértil demonstram, inequivocamente, a magnitude com que a aids tem atingido nossa população feminina ⁶³.

Em 1996, o Brasil desenvolveu um projeto que dava a todos os portadores do HIV, acesso ao tratamento ao adotar uma política de distribuição gratuita de antirretrovirais aos portadores de HIV/aids. A partir deste ano, houve respeitável redução das complicações decorrentes da infecção pelo HIV e aumento da expectativa de vida entre os indivíduos infectados. Dados do Ministério da Saúde informam que o coeficiente de mortalidade deste ano foi de 6,0 óbitos por 100 mil habitantes ⁶⁴.

Assim desde 1996, quando a terapia antirretroviral eficaz tornou-se viável, o prognóstico da infecção pelo HIV tem melhorado e os benefícios clínicos do seu uso refletem sobremaneira em menor progressão para morte em pacientes infectados. Vale ressaltar que o início dessa terapia é considerado uma das estratégias mais importantes no que se refere à mudança da história natural da progressão da infecção pelo HIV no mundo. No Brasil, um estudo realizado por Marins e colaboradores mostrou que os pacientes com diagnóstico em 1995 tiveram sobrevida mediana de 16 meses e os de 1996, 58 meses ⁶⁴.

4 - Vias de transmissão do GBV-C

A ubiquidade da presença do GBV-C pode ser atribuída aos diferentes modos de transmissão que lhe tem sido associados. A forma de transmissão mais bem documentada tem sido a via parenteral, especialmente por transfusões sanguíneas e ou hemoderivados. Devida a eficiente forma de transmissão parenteral, o vírus possui alta prevalência entre usuários de droga endovenosa, em poli-transfundidos, hemofílicos e hemodialisados ^{49,52}.

A prevalência do GBV-C varia de acordo com a população estudada, mas é certo que ela tende a ser maior em grupos de risco de transmissão sexual e parenteral. Em um estudo de indivíduos saudáveis sem fatores de risco para o GBV-C e níveis de transaminases normais, a viremia esteve presente em 1,9% casos, entretanto, o GBV-C RNA foi reportado em 6,8% de pacientes sob hemodiálise, em 18,2% de pacientes co-infectados com o vírus HIV, em 24,4% dos pacientes co-infectados com o VHC, em 21,1% entre pacientes com história de múltiplas transfusões sanguíneas, em 28,8% dos pacientes usuários de droga endovenosa e em 35,2% de pacientes hemofílicos ²⁶.

A transmissão intra-familiar do GBV-C também tem sido relatada e análises de sequências gênicas sugerem que a transmissão vertical (mãe-filho) também possa ocorrer ²⁶. Em um estudo realizado em crianças com menos de 10 anos de idade no Oeste da África, demonstrou que quase 10 a 15% apresentavam o GBV-C RNA positivo no plasma ⁵².

Existem várias evidências demonstrando que o GBV-C é transmitido por via sexual e percutânea tão bem quanto na transmissão da infecção por HIV, sendo que o grupo de risco no qual a transmissão é mais importante são os

homens que fazem sexo com homens ²⁶. Assim, devido às formas de transmissão similar do HIV e do GBV-C (sexual, vertical e parenteral) a prevalência do último entre os pacientes sabidamente HIV positivos é maior que nos indivíduos negativos para o retrovírus.

Em 2002, Ribeiro-dos-Santos e colaboradores ³⁸, estudando a prevalência da infecção pelo GBV-C e fatores de risco associados em uma população de 1.039 indivíduos residentes em São Paulo, demonstraram que a transmissão da infecção por via sexual é importante para disseminação do vírus, haja vista haver um aumento da viremia do GBV-C com a idade, uma maior prevalência da infecção em grupos sexualmente ativos e, principalmente, por haver uma associação direta de viremia do GBV-C com certas práticas sexuais de risco (maior número de parceiros sexuais e homens que fazem sexo com homens).

A transmissão intra-familiar do GBV-C também tem sido descrita e análises de sequências gênicas sugerem que ambas as formas de transmissão, vertical e horizontal, podem ocorrer ^{26,52}.

5 – Virologia do GBV-C

O GBV é um vírus RNA da família *Flaviviridae*, com três subtipos nomeados GBV-A, GBV-B e GBV-C, sendo os dois primeiros capazes de infectarem somente símios e o GBV-C o homem ^{3,8}.

O genoma do GBV-C é composto por RNA de fita simples de polaridade positiva e cerca de 9.400 nucleotídeos contendo uma única fase aberta de leitura, ORF (*Open Reading Frame*) que codifica uma grande poliproteína precursora (3.000 aminoácidos) que, clivada por peptidases do hospedeiro, dá origem a

duas proteínas do envelope viral: E1 e E2^{65,66}. Essa fase aberta de leitura se localiza entre regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3' do genoma viral. Uma característica marcante do GBV-C é a ausência da poliproteína codificadora do nucleocapsídeo ou *core* viral^{26,67}. Alguns trabalhos especulam se a ausência desse nucleocapsídeo possa ser o responsável pela menor patogenicidade desse agente viral.

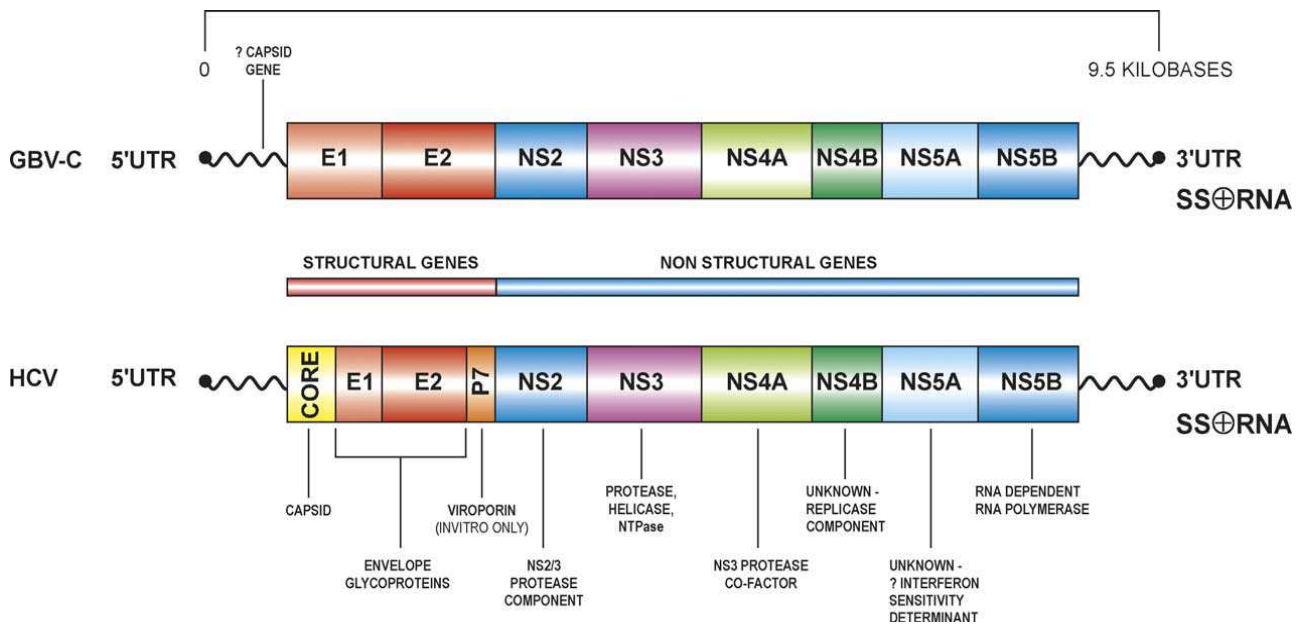
Estudos do genoma do GBV-C demonstram que a região do envelope viral codifica duas proteínas estruturais E1 e E2, sendo esta, uma glicoproteína que se localiza na superfície do vírus. Há ainda produção de duas proteases codificadas na regiões NS2 e NS3 e uma helicase codificada na região NS3 do genoma viral^{13,67}.

Baseado em comparações da organização e de sequências homólogas do genoma viral, o GBV-C é o vírus humano mais relacionado com o VHC, outro membro da família *Flaviviridae*, existindo uma homologia de cerca de 30% dos aminoácidos entre o genoma desses dois vírus^{5,26,68}. As similaridades entre os dois vírus geralmente são limitadas às regiões gênicas específicas NS3 e NS5B, havendo pouca ou nenhuma semelhança em porções gênicas que codificam proteínas do envelope viral, E1 e E2²⁶.

O esquema comparativo da organização do genoma do GBV-C e VHC, assim como as diferenças potenciais e as várias funções dos genes são mostradas na Figura 3.

Outra característica interessante do vírus GBV-C é a de apresentar pouca variabilidade em genes que codificam certas glicoproteínas do envelope, diferente do que ocorre com outros dois vírus RNA, HIV e VHC, em que tal variabilidade está relacionada com mecanismos de persistência viral²⁶.

Fig 3: Esquema comparativo da organização do genoma do GBV-C e VHC mostrando as fases de leitura abertas e as regiões 5'e 3'UTR



Fonte: Barzsenyi e colaboradores ²⁶. Journal of Clinical Virology. 2005; 33: 257-266

6 – Diagnóstico laboratorial da infecção pelo GBV-C

Inúmeras pesquisas que visaram o encontro de um marcador sorológico do GBV-C focaram regiões de homologia com o VHC. Para este, um dos mais importantes marcadores sorológicos envolve a proteína do *core*. Entretanto, no GBV-C essa proteína está ausente ou truncada, o que explica em parte a grande dificuldade de desenvolver marcadores sorológicos sensíveis e específicos para o mesmo ⁶⁹. Para detecção molecular do vírus são utilizados rotineiramente “primers” alvos de uma região muito conservada do genoma do GBV-C, a 5' não codificadora.

A detecção do RNA do GBV-C no sangue é indicativa de viremia positiva, ou seja, de infecção viral ativa. Já a detecção do anticorpo da glicoproteína do envelope viral, o anti-E2, indica soroconversão, estando, portanto, usualmente

associada à infecção progressa⁵. Assim, em estudos que objetivem determinar a exposição de uma população ao GBV-C, tanto a detecção do RNA do GBV-C como do anticorpo anti-E2 devem ser realizadas⁷⁰.

Apesar de a viremia do GBV-C poder persistir por muitos anos, 60 a 70% dos indivíduos imunocompetentes evoluem com clareamento espontâneo do vírus com concomitante desenvolvimento do anticorpo anti-E2^{13,35,71}. Especificamente, a relação entre a detecção do anticorpo anti-E2 e a viremia do GBV-C em doadores de sangue imunocompetentes é de 6:1⁵³. Sabe-se que, a maioria das pessoas depura o vírus e desenvolve anticorpos, sugerindo fortemente que a resposta imunológica humoral contra a glicoproteína E2 está associada ao controle da viremia. Esse anticorpo é detectado nos ensaios imunoenzimáticos (p.ex.: ELISA), utilizados para o diagnóstico sorológico da infecção progressa pelo GBV-C.

Em 1997, um estudo realizado por Thomas e colaboradores³⁵, comprovou que a detecção do anti-E2 pode ser definidora não só de clareamento do vírus GBV-C, mas também um marcador de resistência a re-infecções. Ou seja, os anticorpos anti-E2, uma vez formados, parecem neutralizar a infectividade do GBV-C sugerindo que, uma nova infecção deva ser um evento muito raro⁶⁹.

Portanto, indivíduos virêmicos para o GBV-C usualmente não apresentam coexistência de anticorpos anti-E2. Em estudos longitudinais envolvendo indivíduos imunocompetentes, o aparecimento desse anticorpo esteve temporalmente relacionado com a perda do RNA do GBV-C no soro, e a concomitância de viremia e de anti-E2 esteve presente em menos de 1% dos casos estudados. Assim, parece que a presença do anti-E2 pode neutralizar a infectividade do GBV-C, com consequente clareamento da viremia⁶⁰.

Entretanto, a taxa de clareamento espontâneo do GBV-C RNA e consequente produção do anti-E2 em co-infectados HIV/GBV-C ocorre em menor proporção do que em indivíduos imunocompetentes ²⁶. Entre os indivíduos infectados pelo HIV, a relação entre a detecção do anticorpo anti-E2 e a viremia do GBV-C é geralmente menor que 2:1, sugerindo que o clareamento da viremia do GBV-C é reduzida em indivíduos com déficit da imunidade celular ⁵³. Além disso, é sabido que o anticorpo pode não ser mais detectado no plasma ao longo do tempo em 5% e 29% dos casos de pacientes HIV negativos e positivos, respectivamente ⁶⁰. Rey e colaboradores sugeriram que o déficit imune resultante da infecção por HIV poderia induzir a essa perda específica de anticorpos anti-E2 ⁷².

Em alguns casos, o GBV-C RNA pode desaparecer sem haver desenvolvimento concomitante do anticorpo anti-E2 por mecanismo ainda não explicado ^{60,26}. Stapleton em trabalho publicado em 2003 ressaltou ainda a possibilidade de a taxa de depuração espontânea do GBV-C RNA e o aparecimento de anticorpos anti-E2 em pacientes co-infectados GBV-C/HIV acontecer de forma mais lenta do que em indivíduos não infectados pelo HIV, bem como a possibilidade de haver depuração da viremia sem o desenvolvimento de anticorpos anti-E2 nesses pacientes ⁶⁰.

7 - A interação GBV - C e HIV

Em 1998, Toyoda e colaboradores ⁴⁰, ao estudarem a infecção pelo GBV-C em pacientes hemofílicos infectados pelo HIV no Japão, notaram que os co-infectados (27%) apresentavam cargas virais menores de HIV, embora não houvesse diferença na progressão para aids e mortalidade entre os dois grupos.

No mesmo ano, o grupo de Heringlake ⁴¹ demonstrou que entre 197 alemães portadores de HIV, aqueles com viremia pelo GBV-C, cerca de 17% da amostra, tinham contagens de linfócitos T CD4 significativamente maiores, progressão para aids mais lenta e melhora da sobrevida.

No ano seguinte, Sabin e colaboradores ⁴⁵ relataram que a mortalidade de 94 ingleses hemofílicos infectados pelo HIV não foi influenciada pelo GBV-C, sugerindo que não havia efeito da infecção por este vírus na mortalidade relacionada ao HIV. Porém nesse estudo, os autores não fizeram distinção entre os pacientes com viremia pelo GBV-C e aqueles com apenas anticorpos anti-E2, considerando todos como expostos ao vírus GBV-C.

Ainda em 1999, a equipe de Lefrève ⁴⁹ publicou trabalho que confirmou os achados de Toyoda e Heringlake. Amostras de sangue de 97 franceses portadores de HIV acompanhados por cinco anos foram analisadas para a presença de GBV-C RNA. Nesse trabalho, o grupo GBV-C RNA positivo apresentou contagens de linfócitos T CD4 maiores, menor progressão para aids e melhora da sobrevida. Além disso, um menor número de pacientes do grupo com viremia positiva necessitou iniciar a terapia anti-retroviral: 39%, comparados a 68% do grupo mono-infectado pelo HIV.

Tillmann e colaboradores ⁴⁴ em 2001 demonstraram em uma análise restrita ao período de pós-tratamento para o HIV, ou seja, após os pacientes já terem desenvolvido aids e estarem sob terapia antirretroviral, que a viremia pelo GBV-C permaneceu como fator preditivo de maior sobrevida. Neste estudo 197 pacientes foram acompanhados prospectivamente e os autores se propuseram a avaliar a hipótese de que se a viremia pelo GBV-C induz a um efeito benéfico na infecção pelo HIV, então a carga viral do GBV-C deveria associar-se a um aumento da contagem de linfócitos TCD4 ou a uma redução da carga viral do HIV. Os autores demonstram que a carga viral do HIV foi menor nos pacientes virêmicos para o GBV-C e que houve, ainda, uma correlação inversa entre a carga viral do GBV-C e a do HIV. O estudo, contudo, não demonstrou nenhuma correlação entre a viremia do GBV-C e a contagem de linfócitos T CD4.

Nunnari e colaboradores ⁴⁷ não só conseguiram provar que a viremia do GBV-C esteve associada à maior sobrevida mesmo após a introdução do HAART, mas também foram capazes de demonstrar que a co-infecção GBV-C/HIV melhorou a eficácia e aumentou a taxa de resposta à terapia antirretroviral.

Em 2003, Polgreen e colaboradores ⁷³ publicaram um estudo que envolveu 362 indivíduos infectados pelo HIV, em diversas faixas etárias, de ambos os sexos e sob vários fatores de risco de exposição ao GBV-C e HIV. Encontraram viremia pelo GBV-C em 39,8%, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre a contagem de linfócitos T CD4 basal dos grupos positivo e negativo para o GBV-C. Porém, após análise pela regressão de Cox, foi encontrada mortalidade expressivamente maior no grupo negativo para o vírus GBV-C (Risco Relativo de 3.7 IC95% de 2.5-5.4), mesmo quando a análise foi corrigida para o uso de terapia antirretroviral.

Em 2004, Williams e colaboradores⁴² demonstraram que a infecção pelo GBV-C não exerce efeito protetor logo após os primeiros 12 a 18 meses da soroconversão para o HIV. Entretanto, identificaram uma sobrevida significativamente maior no grupo co-infectado após cinco a seis anos de história de infecção por HIV e que o fim da viremia pelo GBV-C afetava adversamente o curso da infecção pelo HIV. Os autores concluíram que a dependência do tempo de infecção pelo HIV pode explicar os resultados contraditórios de outros estudos quanto ao efeito protetor do GBV-C. Vale ressaltar que nessa coorte os autores tiveram cuidado de excluir o fator de confusão relacionado ao uso de terapia antirretroviral potente, amplamente disponível para uso a partir de 1996, ao inserir na análise somente dados laboratoriais de contagem de linfócitos TCD4 e carga viral do HIV coletados antes desta data. Assim, fica a dúvida se estas conclusões são válidas para a era pós-HAART.

Nesse mesmo ano, um estudo retrospectivo em uma coorte de pacientes que respondeu questionários sobre a qualidade de vida, observou-se que pacientes infectados por HIV e GBV-C apresentaram uma melhor qualidade de vida quando comparados com os GBV-C negativos, indicando um curso clínico da infecção por HIV mais favorável nos pacientes co-infectados⁴⁸.

Ao mesmo tempo em que vários estudos científicos sugeriram uma relação benéfica na interação entre este dois vírus, outros não demonstraram nenhum efeito protetor.

Brumme e colaboradores⁵⁰ em estudo retrospectivo com 441 pacientes que visava avaliar a influência da viremia do GBV-C na resposta terapêutica antirretroviral, não encontraram nenhuma associação benéfica entre GBV-C e HIV no que se refere aos desfechos clínicos analisados: sucesso ou falha

virológica, falha imunológica ou mortalidade. Vale ressaltar que esse estudo foi feito baseado apenas na detecção do RNA do GBV-C, ou seja, não considerou os pacientes que eram anti-E2 positivo.

Do mesmo modo, ou seja, baseado apenas na detecção do RNA do GBV-C, não foi observada nenhuma influência clínica ou imunológica atribuída ao GBV-C em um estudo prospectivo envolvendo 157 indivíduos co-infectados seguidos por uma mediana de tempo de sete anos. Nesse estudo foi encontrado uma prevalência do GBV-C RNA de 23% (36 pacientes) e nenhuma associação significativa entre os grupos de pacientes GBV-C RNA positivos e negativos no que se refere ao primeiro CD4 basal menor que 200 células/mm³ ($p=0,9$), tempo de diagnóstico de aids ($p=0,4$) e tempo de morte relacionada a aids ($p=0,6$)⁵¹.

Souza e colaboradores⁶¹ analisaram a influência do GBV-C após a introdução da terapia antirretroviral em amostras de sangue colhidas de 175 pacientes brasileiros que participaram de um estudo prospectivo randomizado. A viremia pelo GBV-C esteve associada a uma redução de 0,48 log₁₀ cópias/mL maior da carga viral do HIV nas semanas 24, 32 e 48 semanas após o início da terapia quando comparado aos pacientes negativos para o GBV-C ($p=0,009$). Com relação à contagem de linfócitos TCD4, os pacientes virêmicos apresentaram aumento dos valores dos mesmos quando comparados aos pacientes não virêmicos, porém não houve diferença estatística significativa desses valores quando ajustados pela carga viral basal do HIV, terapia antirretroviral e idade ($p=0,70$).

Os mecanismos que explicariam o efeito protetor do GBV-C ainda não foram totalmente esclarecidos e há várias controvérsias em relação às interações entre GBV-C e HIV *in vivo*.

As hipóteses que tentam explicar os mecanismos pelos quais o GBV-C interferiria na progressão da infecção pelo HIV especulam sobre um efeito inibitório direto do GBV-C na replicação do HIV ^{11,46,74,75} ou um efeito potencializador do GBV-C na resposta imunológica ao HIV ^{47,75} ou ainda que o GBV-C seja simplesmente um marcador de outro fator não identificado ^{75,76}.

O impacto favorável da replicação do GBV-C foi demonstrado a partir de resultados de estudos *in vitro* indicando um menor nível de replicação do HIV-1 em culturas de células linfócitos T CD4+ co-infectadas com o GBV-C, e pela evidência de que a replicação do GBV-C induziria a produção de quimiocitocinas que levariam a redução de receptores para HIV-1 na superfície dessas células ^{46,77}.

A teoria do efeito inibitório direto do GBV-C sobre o HIV leva em conta que ambos os vírus replicam-se nas células mononucleares do sangue periférico, inclusive em linfócitos T CD4, T CD8 e linfócitos B ^{11,76}. A co-infecção dessas células pelo GBV-C poderia afetar vários estágios do ciclo de vida do HIV, incluindo a ligação e fusão às células-alvo, transcrição reversa, integração ao genoma da célula hospedeira, produção do pró-vírus, transcrição e morfogênese viral, diminuindo a replicação do HIV sem aumentar a toxicidade celular ^{74,46}.

Outra possibilidade seria considerar uma série de interações que envolvam o CCR5, fator importante na transmissão do HIV e progressão da infecção. Certas cepas do HIV (R5) utilizam o receptor CCR5 para entrar na célula, enquanto outras cepas usam o co-receptor CXCR4 (X4). Em um estudo *in vitro* realizado por Xiang e colaboradores ⁴⁶, a infecção de células mononucleares de sangue periférico com o GBV-C produziu diminuição da replicação de cepas isoladas de HIV que usaram CCR5 ou CXCR4 como receptores de entrada

celular. Foi demonstrado que o GBV-C induziu a secreção de citocinas que levaram a uma diminuição da expressão desses co-receptores. Essas citocinas implicadas e evidenciadas pelos seus altos níveis de mRNA, incluem RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , ligantes naturais do CCR5 e o SDF-1, único ligante do CXCR4 conhecido.

No que se refere à importância da resposta celular na progressão da infecção pelo HIV, é sabido que a presença de linfócitos T auxiliares capazes de produzir um padrão de citocinas de resposta Th1 (IL-2, IL-12 e INF γ) em detrimento ao padrão Th2 (IL-4 e IL-10) é fundamental para melhor evolução da infecção. Nunnari e colaboradores ⁴⁷ demonstraram que na co-infecção GBV-C/HIV a resposta imune celular de padrão Th1 revelou-se preservada, com níveis estáveis de citocinas características deste padrão quando comparado aos pacientes somente infectados pelo HIV. De fato, nesse estudo, os indivíduos GBV-C RNA positivos apresentaram níveis de interleucinas IL-2, IL-12, IL-4 e IL-10 mais estáveis ao longo do seguimento, ao passo que, os indivíduos GBV-C RNA negativos apresentaram diminuição dos níveis de IL-2 e IL-12 e aumento de IL-4 e IL-10. Assim, o GBV-C pode ajudar a manter o perfil de citocinas associadas à progressão lenta para aids.

Estudos recentes têm demonstrado que a glicoproteína E2 do envelope do GBV-C se liga ao receptor CD81 dos linfócitos T, resultando também em aumento da secreção da citocina RANTES. Esta citocina induz à internalização do CCR5 e diminui a expressão do mesmo na superfície celular ^{78,79,80}. Nattermann e colaboradores ⁸⁰ demonstraram haver um aumento da citocina RANTES e subsequente redução da expressão do co-receptor CCR5 em linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes GBV-C RNA positivo independente da co-

infecção pelo HIV. Neste mesmo trabalho, os autores confirmaram, em parte, os resultados encontrados por Xiang e colaboradores ⁴⁶ que demonstraram ser o GBV-C capaz de mediar supressão do HIV por induzir a redução do co-receptor CCR5 e por aumentar a expressão das citocinas RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β e SDF-1 ⁶⁵.

Assim, um potencial mecanismo que explica o efeito protetor do GBV-C em co-infectados seria o de induzir uma diminuição da expressão do quimiorreceptor 5 (CCR5) em células infectadas por esse vírus. Sendo este um co-receptor também importante para entrada do HIV na célula, o GBV-C estaria influenciando na transmissão do HIV-1 e conseqüente progressão da imunodeficiência ⁴³.

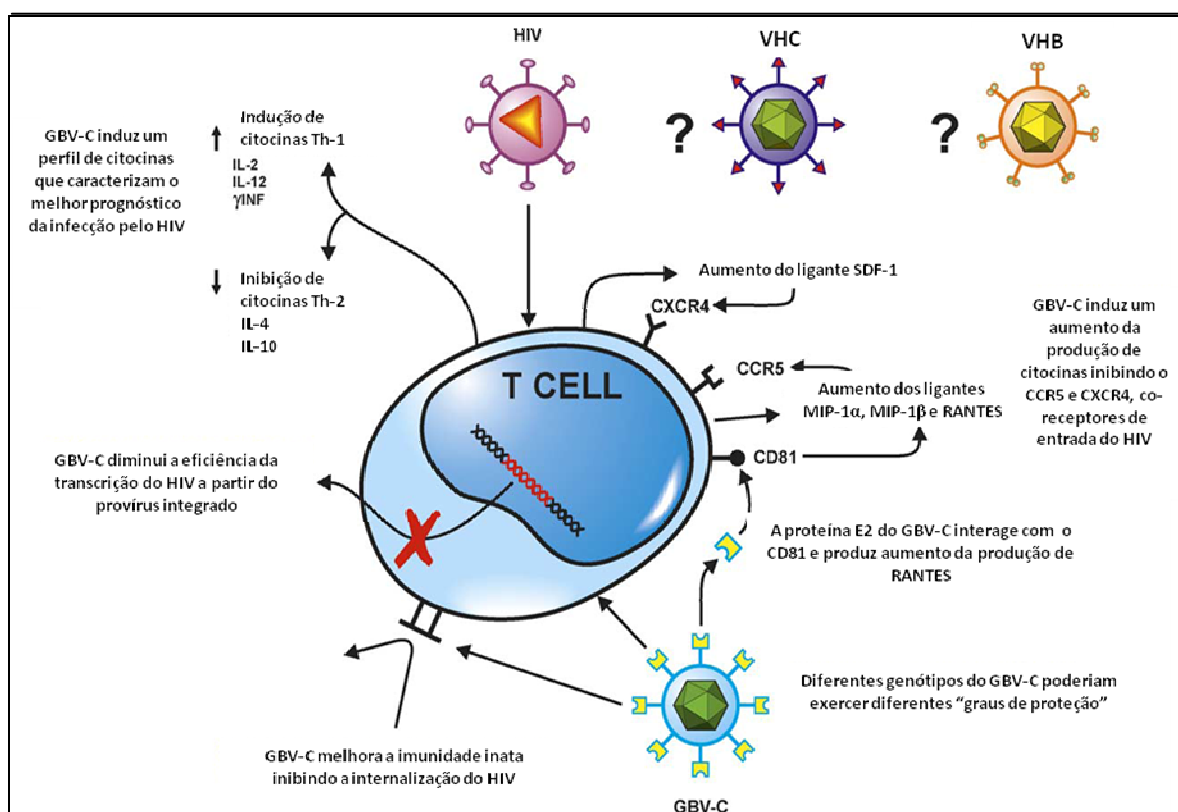
Já o efeito indireto do GBV-C sobre a progressão do HIV através da melhora da resposta imunológica seria explicado por uma reação cruzada T citotóxica. A infecção estabelecida pelo GBV-C levaria a uma resposta T citotóxica mais intensa contra o HIV, com maior controle sobre a replicação da infecção mais recente. Com efeito, nota-se que os indivíduos com melhor resposta T citotóxica direta contra o HIV são geralmente progressores mais lentos ⁷⁵.

Um recente estudo brasileiro, publicado em 2009 por Giret e colaboradores ⁴³, estudou em 48 pacientes recém infectados pelo HIV, o efeito da viremia pelo GBV-C na ativação das células T na infecção recente pelo HIV. Os autores não somente confirmaram a correlação positiva entre a carga viral do HIV-1 e a porcentagem de células T CD8+CD38+, como também observaram que a viremia pelo GBV-C esteve associada a uma diminuição da expressão de CD38 nas células T CD4+ e TCD8+ e CCR5 nas células T CD8+, independentemente da

carga viral do HIV-1, contagem de células T CD4+ e células T CD8+. Os autores concluem que essa associação entre a replicação do GBV-C e a menor ativação celular poderiam constituir um dos mecanismos chaves envolvidos na proteção conferida por esse vírus na progressão para imunodeficiência nos pacientes infectados pelo HIV.

A Figura 4 é um resumo dos mecanismos propostos para explicar a interação entre os dois vírus ²⁶.

Fig 4: Mecanismos propostos para explicar a ação do GBV-C nos pacientes coinfetados com HIV



Fonte: Adaptado Barzsenyi e colaboradores ²⁶. Journal of Clinical Virology. 2005; 33: 257-266

Justificativa

Considerando os resultados da interação entre o GBV-C e HIV ainda conflitantes na literatura, o presente estudo foi proposto para estudar o efeito da interação desses dois vírus em uma coorte exclusivamente feminina de pacientes sabidamente HIV positivas, e, através do desenvolvimento de uma técnica de PCR em tempo real de detecção quantitativa do RNA do GBV-C, fornecer informações mais completas e específicas quanto ao comportamento da carga viral de ambos os vírus na co-infecção.

Vários estudos publicados na literatura têm fornecido evidências científicas da participação do GBV-C como fator independente associado à melhor progressão para doença pelo HIV. Os mecanismos envolvidos na interação destes dois vírus ainda não são bem conhecidos, mas o que se tem observado é uma melhora do nível de linfócitos T CD4, maior redução da carga viral do HIV com conseqüente melhora na sobrevida para aids na evolução desses doentes.

Em adição, dado o número limitado de estudos epidemiológicos da co-infecção GBV-C e HIV no Brasil, surgiu nosso interesse em determinar a prevalência do GBV-C numa coorte de indivíduos sabidamente infectados pelo HIV.

Objetivos

- Avaliar a prevalência da viremia (qualitativa e quantitativa) e de anticorpos contra a glicoproteína E2 do envelope do GBV-C em amostras de plasma das pacientes femininas com infecção pelo HIV, obtidas entre 1997 e 1999.
- Analisar a evolução para óbito relacionado à aids, através de curva de sobrevida estratificada pelos marcadores GBV-C RNA e anti-E2, em todas as pacientes acompanhadas.
- Comparar a média e mediana de linfócitos TCD4+ e de carga viral do HIV das pacientes classificadas de acordo com a presença de GBV-C RNA e anti-E2, investigando a correlação da viremia do GBV-C com esses marcadores evolutivos da infecção por HIV.
- Avaliar descritivamente a persistência viral e a re-exposição ao GBV-C em nova coleta realizada entre 2006 e 2008 em 57 do total de pacientes participantes do estudo.

Casuística e Métodos

- **Desenho do estudo**

Foram realizados dois estudos observacionais: um estudo de coorte retrospectiva e um estudo transversal de soroconversão em 57 pacientes.

O primeiro tratou-se de um estudo descritivo do tipo coorte retrospectivo de início definido pela data da detecção de marcadores do GBV-C pelos métodos da PCR e de anti-E2 em amostras de sangue estocadas entre o período de 1997-1999. O estudo contou com a participação de 248 pacientes femininas sabidamente portadoras da infecção pelo HIV seguidas por um período de cerca de 10 anos, tendo como término de acompanhamento a data limite de 01/01/2008, ou a data da última consulta no ambulatório ou a data do óbito.

O segundo estudo foi do tipo transversal em que as medições foram feitas em uma única ocasião, entre 2006 a 2008, e sem um período de acompanhamento. Foi selecionada uma amostra de 57 pacientes da população e analisado a distribuição de algumas variáveis.

- **Característica da população do estudo e casuística**

As amostras de plasma foram coletadas de 265 mulheres durante a execução do projeto de estudo da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em pacientes HIV positivas, realizado anteriormente no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (LIM 52 – HCFMUSP) ⁸¹.

A coleta das amostras das pacientes foi realizada entre Novembro 1997 a Setembro 1999 no Instituto de Infectologia Emílio Ribas e no Serviço de Extensão ao Atendimento de pacientes HIV/Aids – SEAP, da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e armazenadas a -70 °C desde então.

Dessa soroteca foram utilizadas 248 amostras disponíveis em quantidade suficiente para realização dos ensaios de determinação do RNA e do anticorpo contra a glicoproteína E2 do GBV-C.

Entre 1997 a 1999, todas as 265 pacientes do estudo já apresentavam o diagnóstico definido de infecção pelo HIV pelo exame sorológico de Elisa e confirmados por Western Blot.

A partir da data da primeira coleta de sangue das 248 pacientes foi possível a determinação do perfil do GBV-C e conseqüente estratificação das pacientes em grupos: pacientes com infecção ativa ou sorologia positiva para o GBV-C e pacientes que não haviam sido expostas ao vírus. Essas pacientes foram acompanhadas até um de três desfechos pré-determinados: data limite do seguimento do estudo (01/01/2008) ou data da última consulta no ambulatório de suas respectivas instituições de acompanhamento ou a data do óbito.

No período de 2006 a 2008, todas as pacientes que mantinham o acompanhamento ambulatorial foram convocadas por telefone pelo médico pesquisador a comparecer às suas respectivas instituições com intuito de informar sobre a pesquisa e aplicar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Feito isso, eram realizadas novas coletas de sangue e enviado o material ao Laboratório de Virologia, LIM 52 – HCFMUSP. Apenas cinquenta e sete das 248 pacientes que iniciaram o estudo estiveram presentes para essa

segunda coleta de sangue com o objetivo de determinar novamente o perfil de GBV-C.

Foi realizada a coleta de informações da história clínica através de revisão detalhada do prontuário médico de cada participante em data pré-agendada no Serviço de Arquivo Médico - SAME das instituições de seguimento por meio de impresso padronizado (Anexo 1) bem como de exames laboratoriais referentes a valores de linfócitos TCD4+ e carga viral do HIV-1 usando o programa SISCEL, Sistema de Informação de Exames Laboratoriais, das respectivas instituições de acompanhamento.

O diagnóstico das doenças oportunistas levou em consideração a presença de exame laboratorial confirmando a presença do agente seja por sorologia, cultura ou biologia molecular ou por método de imagem sugestivo da lesão mais associada ao agente infeccioso. Todas estas informações foram consideradas mediante o laudo do exame laboratorial no prontuário médico ou se estavam relatadas na evolução das mesmas pelo médico assistente.

A busca de informações de óbitos das 248 pacientes participantes do estudo foi feita através de informações extraídas do Programa de Aprimoramento das Informações de Mortalidade no Município de São Paulo (PRO-AIM) da Prefeitura do Município de São Paulo. Esse programa consiste em banco de dados de registro de todos os óbitos no Município de São Paulo. A pesquisa das pacientes no referido Programa foi realizada introduzindo como comando de busca o primeiro nome, seguido do último sobrenome e data de nascimento, delimitando-se o período de 1996 até 2007. Para as pacientes que evoluíram para óbito, obtiveram-se ainda informações quanto à data e causa do desfecho (Anexo 2).

- **Alocação das pacientes em grupos**

A partir das 248 amostras de sangue estocadas da primeira coleta foi possível dividir as participantes em três grupos assim nomeados, conforme o resultado laboratorial da pesquisa de anticorpos anti-E2 e GBV-C RNA no plasma. Em todas as amostras foram pesquisados anticorpos por ELISA e de material genético do vírus através de PCR, Nested PCR e PCR-RT para o GBV-C.

- **Grupo 1:** GBV-C RNA+ /anti-E2- → **Expostas ou virêmicas**
- **Grupo 2:** GBV-C RNA- /anti-E2+ → **Imunes**
- **Grupo 3:** GBV-C RNA- /anti-E2- → **Não expostas**

Foi realizada novamente a pesquisa de anticorpos contra a glicoproteína E2 do GBV-C por ELISA, por PCR, por Nested PCR e por PCR- RT em uma segunda amostra coletada de 57 pacientes participantes da primeira análise que mantiveram acompanhamento ambulatorial entre o período de 2006 a 2008, sendo assim agrupadas, levando-se em conta o resultado do perfil do GBV-C já obtido na primeira coleta:

- **Grupo 4:** 1ª amostra negativa e 2ª amostra negativa (GBV-C RNA- /anti-E2 - e GBV-C RNA- /anti-E2 -): **Persistentemente negativas**
- **Grupo 5:** 1ª amostra e 2ª amostra GBV-C RNA positiva (GBV-C RNA+ /anti-E2 - e GBV-C RNA+ /anti-E2 -): **Persistentemente positivas**

- **Grupo 6:** 1ª amostra anti-E2 positiva e 2ª amostra anti-E2 positiva ou negativa (GBV-C RNA- /anti-E2 + e GBV-C RNA- /anti-E2 + ou -): **Imunes**
 - **Grupo 7:** 1ª amostra GBV-C RNA positiva e 2ª amostra GBV-C RNA negativa (GBV-C RNA+ /anti-E2 - e GBV-C RNA- /anti-E2 + ou -): **Clareadoras**
 - **Grupo 8:** 1ª amostra GBV-C RNA negativa e 2ª amostra GBV-C RNA positiva (GBV-C RNA- /anti-E2 - e GBV-C RNA+ /anti-E2 -): **Infecções incidentes**
 - **Grupo 9:** 1ª amostra GBV-C RNA negativa e 2ª amostra anti-E2 positiva: (GBV-C RNA- /anti-E2 - e GBV-C RNA- /anti-E2 +): **Soroconversoras**
-
- **Testes laboratoriais para determinação da infecção por GBV-C**

1 – Determinação qualitativa de anticorpos anti-E2

Realizamos a importação dos “kits” de detecção de anticorpo específico anti-E2 por meio de um ensaio imunoenzimático comercial (μ Plate antiHGenV teste, Roche Diagnostics, Penzburg – Alemanha). Estes “kits” foram doados pelo Dr. Dietmar Zdunek da empresa Roche Diagnostics, Penzburg – Alemanha. A reação de ELISA foi realizada conforme indicação do fabricante do “kit”.

2– Extração de GBV-C RNA da amostra

Para extração do GBV-C RNA nas amostras de plasma foi realizada utilizando o “kit” de extração QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen®,Chattlesworth, EUA). Ao final obteve-se um eluato de GBV-C RNA de 60 µL de cada amostra.

3 – Reação de Transcrição Reversa

Previamente à pesquisa do GBV-C RNA por PCR, realizou-se a etapa de síntese do cDNA, utilizando o protocolo “in-house” com hexâmeros randômicos (N6) e a enzima transcriptase reversa de M-MLV (Applied Biosystems®, EUA). Após sua síntese o cDNA ficou a 4º C no termociclador, sendo removido e estocado no freezer a -20º C.

4 – Reação da PCR GBV-C convencional

A PCR convencional para detecção de GBV-C RNA nas amostras foi feita utilizando “primers” previamente publicados, que amplificam uma porção da região 5'NCR por esta ser a parte mais conservada do vírus.

O procedimento partiu de 5 µL de cDNA em uma reação de PCR, usando o “primer” anti-sense LG1 (5' CACTGGTCCTTGTCAACTCGC 3'), o “primer” sense LG2 (5' CACTGGGTGCAAGCCCCAGAA 3') e os reagentes como indicado no Quadro 1.

Quadro 1: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação da PCR GBV-C convencional

Reagentes	Volume (μL)	[Final]
Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x
dNTPs (2,5mM)	2,0	200 μM
MgCl ₂ (50mM)	1,5	3,0mM
LG 1 (10 μM)	0,5	200 ηM
LG 2 (10 μM)	0,5	200 ηM
Taq Platinum (5U/ μL)	0,25	1,25U
H ₂ O DEPEC	7,75	-
Glicerol 57%	2,5	5,70%
Cresol Red (1 μg / μL)	2,5	0.1 μg / μL
Volume Final	20,0	
cDNA	5,0	
Volume de Reação	25 μL	

5 – Reação de NESTED PCR GBV-C

A reação de Nested PCR GBV-C foi padronizada utilizando os “primers” publicados por Andonov e colaboradores e realizada em dois tempos.

Para o primeiro tempo utilizamos 5 μL de cDNA que foi submetido a PCR usando os “primers” G58 sense (5’ CAGGGTTGGTAGGTCGTAATCC 3’) e G75 anti-sense (5’ CCTATTGGTCAAGAGAGACAT 3’) e para o segundo tempo utilizamos 2,5 μL do produto da PCR do primeiro tempo que foi amplificado pelos “primers” G134 sense (5’ GGTCAYCYTGGTAGCCACTATAGG 3’) e G131 anti-sense (5’ AAGAGAGACATTG WAGGGCGACGT 3’) e reagentes nas concentrações e volumes mostrados no Quadro 2.

Quadro 2: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na reação NESTED PCR GBV-C

Reagentes	Volume(μ L)	[Final]	Reagentes	Volume(μ L)	[Final]
1º PCR			2º PCR		
Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x	Tampão de PCR 10X minus Mg	2,5	1x
dNTPs (2,5mM)	2,0	200 μ M	dNTPs (2,5mM)	2,0	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	1,25	2,5mM	MgCl ₂ (50mM)	1,25	2,5mM
G58 (10 μ M)	0,5	200 η M	G134 (10 μ M)	0,5	200 η M
G75 (10 μ M)	0,5	200 η M	G131 (10 μ M)	0,5	200 η M
Taq Platinum (5U/ μ L)	0,25	1,25U	Taq Platinum (5U/ μ L)	0,25	1,25U
H ₂ O	8,0		H ₂ O	10,5	
Glicerol 57%	2,5		Glicerol 57%	2,5	
Cresol Red 1 μ g/ μ L	2,5		Cresol Red 1 μ g/ μ L	2,5	
Volume Final	20,0		Volume Final	22,5	
cDNA	5,0		1st round	2,5	
Volume de Reação	25,0		Volume de Reação	25,0	

6 – Reação da PCR em tempo real para GBV-C

Adicionou-se à mistura o cDNA e a colocou no equipamento de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 – Applied Biosystems). Esse procedimento utilizou o “primer” sense RTG1 (5' GTGGTG GATGGGTGATGACA 3'), o “primer” anti-sense RTG2 (5' GACCCACCTATAGTGGCTACCA 3') e a sonda anti-sense (5' FAM-CCGGGATTTACGACCTACC-NFQ 3'), onde FAM é o composto fluorescente ou “*reporter*”, e NFQ significa “*non-fluorescent quencher*”. Quadro 3.

Quadro 3: Reagentes, volumes e concentrações utilizados na PCR em tempo real

Reagente	Volume (µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X	10,0
20X Assay Mix	1,0
cDNA	9,0
Volume Final	20,0
Conc. Primers	18 µM
Probe Conc.	5µM

7 – Calibração do ensaio e curva – padrão

Para obter dados quantitativos (carga viral) sempre é necessário haver em cada corrida alguns tubos/poços que contém cDNAs derivados de concentrações previamente conhecidas de uma amostra-padrão. Estas diluições da amostra-padrão são colocadas para o “software” de gerenciamento da reação como controles (Qc) aos quais se atribuí um valor quantitativo em qualquer unidade estabelecida, cópias/mL, unidades internacionais/mL, genoma-equivalentes/mL etc. Como não há até este momento, uma padronização quanto ao GBV-C RNA, optamos por criar um padrão interno do laboratório, para o qual existe material abundante e que possa ser analisado muitas vezes. Obtivemos uma bolsa de plasma já previamente determinado por conter GBV-C RNA e estar livre de outros agentes infecciosos como VHB, VHC e HIV. Esta bolsa de cerca de 350 mL de plasma foi gentilmente doada pelo Banco de Sangue do Hospital Sírio-Libanês.

Ao chegar ao Laboratório de Virologia do IMT a bolsa foi descongelada e o plasma imediatamente aliquoteado em microtubos contendo 0,5 mL de plasma cada um. Uma alíquota foi então diluída com plasma normal GBV-C RNA negativo, de forma a gerar uma curva de titulação, partindo-se do plasma puro

até uma diluição de 1:100.000. Triplicatas de cada ponto (puro-1:5 - 1:10 - 1:100 - 1:1.000 - 1:10.000 - 1:100.000) foram extraídas e processadas conforme descrito anteriormente. Os cDNAs foram submetidos à reação da PCR em tempo real. Observamos que até a diluição de 1:10.000 havia uma amplificação consistente e reprodutível. Determinamos assim a carga viral da bolsa-padrão em unidades-aleatórias de GBV-C RNA por mililitro de soro. Então, em cada ensaio foram incluídos como calibradores os cDNAs desta curva, e os valores obtidos das amostras são expressos em unidades-aleatórias/mL.

8 - Determinação da contagem de carga viral do HIV

A quantificação da carga viral do HIV-1 foi determinada por três testes diferentes ⁸²:

- bDNA : QUANTIPLEX HIV-1 RNA 3.0 Assay (BAYER DIAGNOSTICS)
- NASBA : NUCLISENS HIV-1 QT (BioMérieux)
- RT-PCR : AMPLICOR HIV-1 MONITOR (ROCHE)

Das três metodologias disponíveis, duas fazem a amplificação de forma direta, amplificando alvo e uma de forma indireta, amplificando sinal. Comparações estatísticas revelaram estreita correlação (superior a 90%) entre os três ensaios. A análise da variação intra-teste não revelou diferenças sistemáticas entre as duplicatas com nenhuma das três metodologias citadas, sugerindo boa reprodutibilidade das mesmas.

Entretanto, como elas são baseadas em princípios diferentes, sugere-se que os resultados sejam comparados dentro do mesmo método.

1. bDNA (branched DNA)

A tecnologia do *branched DNA* é um ensaio de hibridação em fase sólida tipo sanduíche de ácidos nucléicos usando moléculas de DNA ramificadas (bDNA). A amostra é tratada com reagente de lise e o material nucléico do vírus liberado é então hibridado em solução usando dois conjuntos de sondas oligonucleotídeas. Uma das sondas serve como sonda de captura (localizada na superfície dos poços da placa) que hibrida especificamente com o RNA do HIV e faz com que o RNA do HIV fique ligado à placa. A segunda sonda serve para fixar o RNA do HIV à placa e também para hibridar com um outro conjunto de sondas: pré-amplificadora e amplificadora (bDNA), a essa última se atribui a função de aumentar o nível de sinal da hibridação. As moléculas de bDNA atuam como amplificadoras por se ligar a uma sonda marcada com fosfatase alcalina. Desta maneira, o sinal gerado pelo complexo HIV RNA-sondas é amplificado para detecção e quantificação do RNA viral. Finalmente, a adição de um substrato quimioluminescente reage com a última sonda e o sinal é lido em um luminômetro. A unidade relativa de luz (RLU) gerada é proporcional à quantidade de RNA do HIV na amostra. As cópias de RNA do HIV são calculadas usando uma curva padrão gerada por um conjunto de seis calibradores e três controles HIV externos. A faixa de detecção de 50 a 500.000 cópias/mL apresenta linearidade em todo o intervalo.

2. NASBA – Amplificação baseada na sequência de ácidos nucleotídeos

A técnica NASBA permite a amplificação isotérmica do RNA do HIV-1 de filamento simples, utilizando três enzimas: a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, uma RNase H, e a RNA polimerase do fago T7. A técnica permite a obtenção de 10^6 a 10^9 cópias em menos de uma hora. Seu limite de detecção é de 80 cópias do RNA viral por mL de plasma.

3. RT-PCR – Amplicor

O teste baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra para extração do material genético do HIV-1; transcrição reversa do RNA – alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA-alvo, usando iniciadores específicos complementares para o HIV-1; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica e com auxílio de um sistema analisador automatizado. Trata-se de metodologia RT-PCR, que utiliza a região genômica GAG do HIV-1, com faixa de detecção de 400 a 750.000 cópias/mL.

9 - Determinação da contagem de linfócitos T CD4+

A fenotipagem da população linfocitária foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, através do citômetro de fluxo ⁸². Inicialmente, o sangue total foi incubado com anticorpo monoclonal marcado contra o antígeno CD45 com intuito de separar a população linfocitária do restante dos leucócitos do sangue circulante. Em seguida o sangue foi analisado pelo citômetro, que agrupou os variados tipos de leucócitos em um histograma (“gating” eletrônico). Os linfócitos assim agrupados (“gated”) foram separados em sub-populações, após incubação com painel adequado de anticorpos monoclonais marcados.

- **Análise dos dados coletados**

Os dados coletados foram codificados e digitados em banco de dados onde tiveram sua consistência averiguada. Os dados nominais e ordinais foram descritos através de suas frequências absolutas e relativas. Os dados contínuos tiveram suas médias e medianas calculadas como medidas de tendência central, juntamente com os respectivos intervalos interquartis como medidas de dispersão. Assim, o primeiro quartil (P_{25}) representa o valor abaixo do qual estão os 25% valores menores, e o terceiro (P_{75}) o valor abaixo do qual estão 75% dos resultados. Quando se descreve um conjunto de dados de distribuição assimétrica, a distância entre quartis representa melhor a variação do que a amplitude ou o desvio padrão, porque não é afetada pelos valores extremos⁸³.

Como provas de significância estatística para comparação de proporções foram utilizados os testes qui-quadrado de Pearson ou razão de verossimilhança para as seguintes variáveis categóricas: modo de transmissão do HIV, estratificação da contagem de linfócitos T CD4 e da carga viral do HIV, doenças oportunistas, co-infecção (VHB, VHC e HTLV), número e motivo de troca dos antirretrovirais.

A comparação da média da idade entre os grupos foi feita pelo teste estatístico ANOVA⁸³ por se tratar de uma variável com distribuição normal com mais de dois grupos.

Utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das seguintes variáveis contínuas entre os grupos: tempo de acompanhamento, tempo entre o diagnóstico do HIV e determinação do perfil do GBV-C, contagem de linfócitos TCD4 e carga viral do HIV basais e durante o seguimento, nadir de CD4 e zênite de carga viral do HIV e número de esquemas antirretrovirais. O

teste de Wilcoxon⁸³ foi utilizado para comparar as variáveis pareadas distribuídas em dois momentos: linfócito T CD4 Basal/ linfócito T CD4 Final, carga viral HIV Basal/ carga viral HIV Final e carga viral GBV-C Basal/ carga viral GBV-C Final.

Para verificar o grau de relação entre variáveis contínuas foi utilizada a correlação de Spearman quando pelo menos uma das variáveis apresentou distribuição não normal⁸³.

Para a análise da sobrevida foi utilizado o método de estimativa de Kaplan-Meier. A variável tempo de sobrevida foi criada a partir da data da determinação do perfil do GBV-C RNA e da data do óbito para as pacientes que faleceram e, da data da determinação do perfil do GBV-C RNA e da última consulta no serviço ou da data final de seguimento, 01 de janeiro de 2008, para as pacientes que sobreviveram. Para comparação da diferença de sobrevida entre as categorias foi utilizado o teste *log-rank*, dada a proporcionalidade dos riscos⁸³.

Para a determinação de possibilidade de óbito quanto à infecção pelo GBV-C na coorte estudada, foi realizado o cálculo do risco relativo como medida de associação e seus respectivos intervalos de confiança a 95%. O tempo de sobrevida juntamente com as variáveis CD4 e carga viral do HIV basais, número de esquemas antirretrovirais, doença oportunística e perfil do GBV-C foi modelado usando a regressão múltipla de Cox e estimado os riscos relativos de óbito com os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Os testes foram calculados com “p” bicaudal, sendo considerado o valor menor que 0,05 estatisticamente significativo.

Para construção do banco de dados foi utilizado o programa *Microsoft Excel*. A análise dos dados foi realizada com o *software* SPSS versão 15.0 (*SPSS Inc, 2006*).

- **Aspectos éticos do estudo**

O estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, do SEAP e da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 029/06).

As pacientes que participaram da segunda coleta de sangue para determinação do GBV-C entre 2006 a 2008, foram convocadas por telefone pelo pesquisador executante, agendando local para visita em suas respectivas instituições de acompanhamento para aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3) e, se autorizado, coleta de amostra de sangue para envio ao Laboratório.

- **Revisão bibliográfica**

Para pesquisa bibliográfica de periódicos foram utilizados os principais bancos e bases de dados disponíveis eletronicamente, além de literatura corrente disponibilizada em livros texto. Visando uma maior eficiência na obtenção dos resultados, além do uso de palavras-chave relevantes ao assunto abordado, foram utilizados descritores MESH e DeCS indexados respectivamente pelas bases MEDLINE e LILACS. Também foram revistas algumas publicações citadas por autores em suas referências. A estrutura dos elementos textuais contidos nessa dissertação respeitou os preceitos contidos no Guia Oficial do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ⁹⁰.

Resultados

Os resultados deste estudo serão demonstrados em três momentos. Primeiramente, foram analisadas as características das pacientes na primeira coleta, entre 1996 e 1998, considerada a basal, em que se determinou o perfil do GBV-C com estratificação das pacientes em três grupos (GBV-C RNA+ /anti-E2 - , GBV-C RNA - /anti-E2 + e GBV-C RNA - /anti-E2 -). Neste momento analisamos também outras variáveis tais como: a idade, o tempo de acompanhamento no estudo, o modo de transmissão do HIV e a contagem de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV basais.

As pacientes foram acompanhadas e os resultados das seguintes variáveis clínicas e laboratoriais, estratificadas pelo perfil do GBV-C, estudadas: co-infecção VHB, VHC e HTLV1/2, presença de doença oportunistas, número de esquemas antirretrovirais usados e trocas dos mesmos, motivo da troca e mediana do nadir e zênite da contagem de linfócitos CD4 e carga viral do HIV, respectivamente.

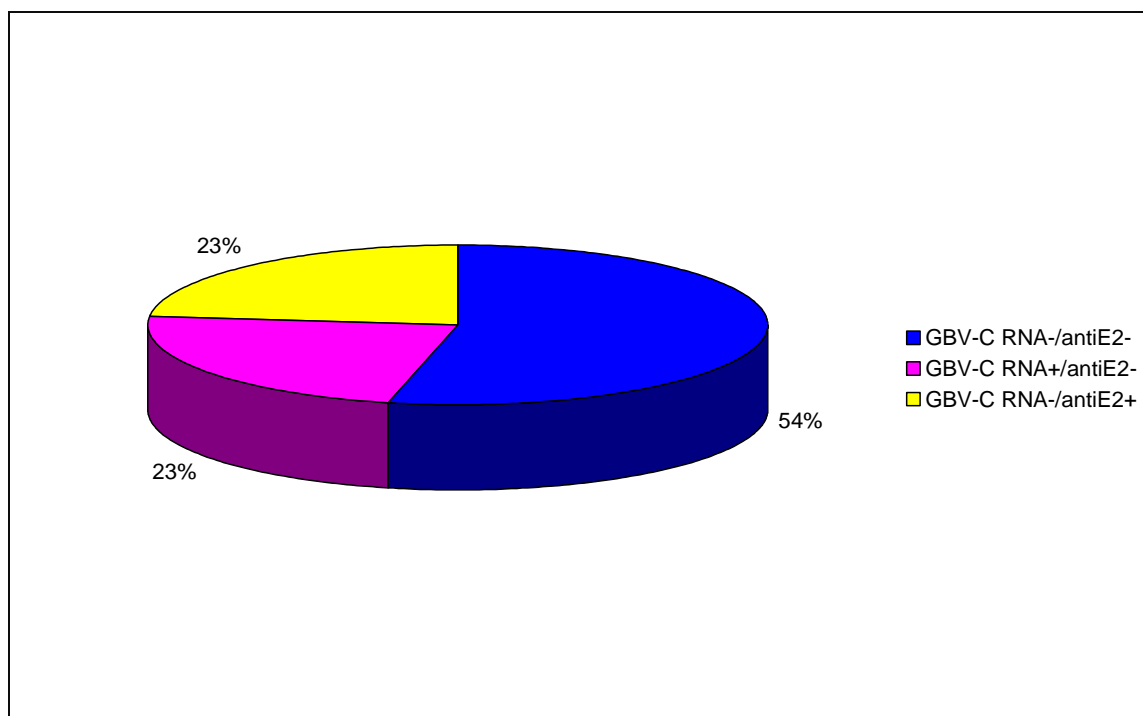
Por fim, demonstraremos ainda os resultados descritivos obtidos de variáveis estratificadas pelo perfil do GBV-C na segunda coleta de um grupo de 57 pacientes participantes da primeira análise.

Foram incluídas 248 amostras de pacientes femininas no estudo, com média de idade no momento da determinação do GBV-C RNA de 32,41anos (DP 7,1 anos) e mediana de 31,6 anos (P_{25-75} 27 – 38,1 anos). Não houve diferença estatística na mediana de idade entre os três grupos: pacientes GBV-C RNA+ /anti-E2 - 31,8 anos, pacientes GBV-C RNA- /anti-E2 + 33,23 anos e pacientes GBV-C RNA- /anti-E2 - 30,64 ; sendo $p=0,331$. Tabela 1.

Considerando a data da detecção do perfil do GBV-C a de início do estudo, as 248 pacientes foram acompanhadas em média 7,49 anos (DP 2,89 anos) ou 89,94 meses (DP 34,67 meses) com mediana de 9 anos (P_{25-75} 6,25 - 9 anos) ou 108 meses (P_{25-75} 75 -108 meses). Não houve diferença estatística no tempo de acompanhamento entre os grupos como mostra a Tabela 1.

Das 248 pacientes, 198 tinham informação quanto à data do diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV (Elisa e Western Blot positivos) em prontuário. A média de tempo em meses entre o diagnóstico do HIV e da determinação do perfil do GBV-C foi de 29,37 meses (DP 34,02 meses) e a mediana de 21 meses (P_{25-75} 8 - 41,25) para as pacientes analisadas, sendo 17,5 meses (P_{25-75} 3 - 31,25) para o grupo GBV-C RNA+ /anti-E2 - , 23 meses (P_{25-75} 4 - 43,25) para o grupo GBV-C- /anti-E2 + e de 23,5 meses (P_{25-75} 11,75 - 45,25) para o grupo GBV-C- /anti-E2 - . Não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,079$). Não pudemos determinar, contudo, se a exposição ao vírus do HIV antecedeu à do GBV-C, uma vez que não é rotina a detecção do GBV-C na avaliação e acompanhamento dos pacientes HIV positivos recém diagnosticados em nossos serviços.

Em relação à exposição ao GBV-C obtivemos uma prevalência de 46%. Das 115 pacientes expostas, 57 eram GBV-C RNA positivas (23%) e 58 eram anti-E2 positivas (23%). As pacientes consideradas expostas ao vírus GBV-C tinham como marcador o PCR RNA positivo para o vírus ou apresentavam o anticorpo anti-E2. Não houve achado da presença concomitante do GBV-C RNA e do anticorpo anti-E2 nas 248 pacientes estudadas. Gráfico 1.

Gráfico 1- Prevalência do GBV-C em 248 pacientes - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Foi realizada a contagem da carga viral do GBV-C RNA pelo método quantitativo da PCR em tempo real. Encontrou-se uma média de 1.396,30 UA/mL e mediana de 458,9 UA/mL (P_{25-75} 42,1- 1.614,3 UA/mL).

Com relação à contagem de linfócitos T CD4 e de carga viral basal do HIV no momento da determinação do perfil do GBV-C, observamos que não houve diferença estatística entre os valores em relação aos grupos ($p=0,36$ e $p=0,713$, respectivamente), como mostra a Tabela 1. Utilizando o coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman para determinar a associação entre as variáveis contagem de linfócitos TCD4, carga viral do HIV e carga viral do GBV-C, observou-se que não houve correlação entre a contagem basal de linfócitos T CD4 e da carga viral do GBV-C, sendo $r_s=0,097$ e $p=0,129$. No que se refere à carga viral basal do HIV e à carga viral do GBV-C também não houve correlação, sendo $r_s= -0,058$ e $p=0,366$.

Em relação à forma de transmissão do HIV, a maior parte das pacientes (67,2%) relatou possuir parceiros sexuais fixos (maridos), sabidamente portadores da doença aids. Não houve associação estatisticamente significativa entre o modo de transmissão do HIV estratificado pelo perfil do GBV-C, sendo $p > 0,05$, como mostra a Tabela 1.

Baseado em apenas informações de prontuários médicos no momento em que foi iniciado este estudo observamos que nenhuma paciente apresentava sorologia positiva para os vírus da hepatite B, C ou HTLV1/2. Não podemos, entretanto, afirmar categoricamente que as pacientes eram negativas para estes vírus uma vez que o presente estudo não realizou sorologia das mesmas no momento da determinação do perfil do GBV-C.

As características gerais das pacientes são demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais da população no início do estudo estratificada pelo perfil GBV-C – SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

<i>Características Gerais</i>	<i>N</i>	<i>Total</i>	<i>GBV-C RNA + / Anti-E2 – (n=57)</i>	<i>GBV-C RNA - / Anti-E2 + (n=58)</i>	<i>GBV-C RNA - / Anti-E2 – (n=133)</i>	<i>p</i>
Idade em anos (mediana)	248	31,6 (27-38,1)	31,8 (27,93-38,41)	33,23 (28,30-39,30)	30,64 (26,42-36,44)	0,331 ^a
Tempo de acompanhamento em meses (mediana)	248	108 (75-108)	108 (90-108)	108 (84-120)	108 (72-108)	0,371 ^a
Modo Transmissão HIV Sexual	186	125(67,2%)	28(63,6%)	29(63%)	68(70,8%)	0,552 ^c
Uso de droga EV	186	7(3,8%)	2(4,5%)	2(4,3%)	3(3,1%)	0,893 ^b
Tx sanguínea	186	6(3,2%)	3(6,8%)	1(2,2%)	2(2,1%)	0,362 ^b
CD4 Basal (cels/mm³) (mediana)	247	286 (163 - 391)	305 (223,5-394,5)	287 (168,75-418,75)	277 (148,5-390)	0,36 ^a
CD4 Basal categorizado						
<200 cels/mm ³		77	12(21,1%)	20(34,5%)	45(34,1%)	0,411 ^c
200-350 cels/mm ³		84	24(42,1%)	18(31,0%)	42(31,8%)	
>350 cels/mm ³		86	21(36,8%)	20(34,5%)	45(34,1%)	
Carga Viral HIV Basal cópias/mm³ (mediana)	246	3.497,50 (100-38.180,25)	4.153 (288,50-25.562)	2.996,50 (100-66.241,50)	3.492 (405-44.920)	0,713 ^a
Carga Viral HIV Basal categorizada						
100-999 cópias/mm ³		90	21(36,8%)	24(41,4%)	45(34,4%)	0,36 ^c
1.000-9.999 cópias/mm ³		60	15(26,3%)	13(22,4%)	32(24,4%)	
10.000-99.999 cópias/mm ³		58	17(29,8%)	11(19%)	30(22,9%)	
>100.000 cópias/mm ³		38	4(7%)	10(17,2%)	24(18,3%)	

*Mediana (P_{25%}-75%)^aTeste de Kruskal Wallis^bRazão de verossimilhança^cTeste Qui-quadrado de Pearson

Por meio de revisão do prontuário das pacientes obtivemos informações de variáveis clínicas e laboratoriais desde o início da primeira consulta. As pacientes foram acompanhadas até o desfecho final, que foi definido como: data da última consulta ambulatorial, ou a data limite do estudo considerado 01/01/2008, ou a data do óbito.

Em relação às doenças oportunistas referidas por essas pacientes em prontuário médico desde o diagnóstico da infecção pelo HIV, observamos uma maior prevalência de casos de tuberculose (22,2%), seguida de monilíase oro-esofágica (19%) e toxoplasmose cerebral (17,3%). Apenas a monilíase oro-esofágica e a pneumocistose foram mais frequentes no grupo não exposto ao GBV-C, sendo $p= 0,016$ e $0,048$, respectivamente. Para as demais doenças oportunistas avaliadas neste estudo não houve diferença estatística entre os grupos estratificados pelo perfil do GBV-C, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência de doenças oportunistas na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C perfil do GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Características	n	GBV-C			p
		RNA+/anti-E2-	RNA-/anti-E2+	RNA-/anti-E2-	
Doença Oportunistas					
Tuberculose (pulm, gangl, dissem)	35/185	9 (20%)	7 (15,2%)	19(20,2%)	0,760 ^a
Monilíase oro-esofágica	26/185	2 (4,4%)	7 (15,2%)	17(18,1%)	0,093 ^a
CMV ocular/esofágica	17/185	2 (4,4%)	4 (8,7%)	11(11,7%)	0,342 ^b
Herpes Zoster	18/185	2 (4,4%)	5 (10,9%)	11(11,6%)	0,337 ^b
PCP	14/185	0 (0%)	3 (6,5%)	11(11,7%)	0,010 ^b
Criptococose SNC	4/185	2 (4,4%)	1 (2,2%)	1(1,1%)	0,470 ^b
Toxoplasmose SNC	32/185	4 (8,9%)	7 (15,2%)	21(22,3%)	0,133 ^a
Micro/Isosporidiose	8/185	3 (6,7%)	2 (4,3%)	3(3,2%)	0,659 ^b

^a Teste Qui-Quadrado

^b Razão de Verossimilhança

Na pesquisa sorológica de vírus causadores de hepatite crônica (B, e C) e do HTLV 1/2 ao longo do acompanhamento das pacientes, encontramos a presença do vírus da hepatite C em 19 (11,7%) pacientes, sendo a viremia nesses casos confirmada pela presença do RNA do VHC detectado pelo método da RT-PCR. Em menor proporção, três (1,8%) pacientes apresentaram hepatite B e cinco (3,8%) HTLV1/2. Não houve diferença estatística destas infecções de acordo com a estratificação pelo perfil do GBV-C (VHB $p=0,864$, VHC $p=0,987$ e HTLV $p=0,39$), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Frequência de co-infecção na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Características	n	GBV-C RNA+/anti-E2-	GBV-C RNA-/anti-E2+	GBV-C RNA-/anti-E2-	p*
Co-infecção					
Presença do HbsAg	3/164	1 (2,4%)	1 (2,4%)	1 (1,3%)	0,864
Presença do anti-VHC	19/163	5 (11,9%)	5 (12,2%)	9 (11,3%)	0,987
Presença de anti- HTLV1/2	5/133	0 (0%)	2(5,9%)	3 (4,6%)	0,39

* Teste de Kruskal Wallis

Durante o período de acompanhamento foi avaliada a mediana da contagem de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV das pacientes que tinham informação dessas variáveis no sistema SISCEL. Não houve diferença estatística entre os grupos. Foi feita também a comparação dos menores valores medianos de contagem de linfócitos TCD4 (nadir) e os maiores valores medianos de carga viral do HIV (zênite) entre os grupos, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Estas análises encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Média e mediana dos valores medianos de CD4, carga viral do HIV, CD4 nadir e da carga viral zênite do HIV na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C- SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

	n	Total	GBV-C RNA+/anti-E2-	GBV-C RNA-/anti- E2+	GBV-C RNA-/anti- E2-	p*
CD4 mediano	83/248					0,241
Média		444,3	392,1	450,1	487,5	
(DP)		232,4	225,5	243,6	263,4	
Mediana		425	303,5	407	435,0	
(P₂₅₋₇₅)		283,4 - 612,1	244 - 483,5	272 - 620,5	300 - 632,5	
CV mediano	83/248					0,17
Média		11.196,20	25.697,10	19.750,60	28.617,60	
(DP)		24.172,90	91.026,20	74.058,10	107.303,1 0	
Mediana		676	517	399	399	
(P₂₅₋₇₅)		399 - 4.604,3	399 - 11.491,5	399 - 4.137	399 - 1.080	
CD4 Nadir mediano	115/248					0,324
Média		386,2	357,5	399,2	434,5	
(DP)		211,9	224,1	225,7	240,6	
Mediana		395	280,5	361,5	395	
(P₂₅₋₇₅)		255,9 - 523,4	226,9 - 445,4	252 - 488	266,5 - 607,5	
HIV Zênite mediano	115/248					0,181
Média		25.798,20	30.276,30	29.356,20	34.811,80	
(DP)		54.345,50	92.740,60	83.067,20	112.797,5 0	
Mediana		2.950	2.350	1.188	399	
(P₂₅₋₇₅)		399 - 20.535,5	399 - 16.350	399 - 15.600	399 - 6.025	

* Teste de Kruskal-Wallis

Em relação ao uso de esquemas terapêuticos para o tratamento da infecção pelo HIV, a mediana de troca de antirretrovirais durante o período de seguimento foi de quatro trocas, ou seja, semelhante para todas as pacientes estratificadas pelo perfil do GBV-C. Os intervalos P_{25-75} , foram de 2 - 5 trocas para as pacientes com GBV-C RNA+/anti-E2 -, de 3 - 6 trocas para as pacientes GBV-C RNA- /anti-E2+, e de 2,8 - 6 trocas para as pacientes GBV-C RNA- /anti-E2 -, e sendo o $p=0,583$ pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis. (Tabela 5)

Tabela 5 – Média e mediana de esquema antirretrovirais utilizados no tratamento do HIV na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

	n	Total	GBV-C RNA+/anti-E2-	GBV-C RNA-/anti-E2+	GBV-C RNA-/anti-E2-	p*
Nº esquemas antirretrovirais	203					0,583
Média(DP)		4,5(2,8)	4,2(2,8)	4,4 (2,5)	4,7 (3)	
Mediana(P_{25-75})		4 (2 - 6)	4 (2 - 5)	4 (3 - 6)	4 (2,8 - 6)	

* Teste de Kruskal Wallis

Na Tabela 6 apresentamos o número de trocas de esquemas antirretrovirais categorizados pela freqüência das mesmas. As informações quanto à freqüência do número de trocas e quais esquemas antirretroviral utilizados durante todo tempo de acompanhamento das pacientes foram obtidas de 203 pacientes. Apenas as pacientes que iniciaram e mantiveram terapia antirretroviral até o fim do acompanhamento do estudo foram consideradas elegíveis para esta análise.

Não observamos diferença entre os grupos com relação ao número de trocas estratificada pelo perfil de exposição ao vírus GBV-C, sendo $p=0,209$.

Ainda, no que se refere às trocas de antirretrovirais ao longo do acompanhamento das pacientes, foram coletadas informações quanto ao motivo

de troca dos mesmos em prontuário médico. Apenas 129 pacientes tiveram esta informação documentada no prontuário. Consideraram-se motivos pelo qual o médico assistente optou-se por troca da terapia a falência imunológica ou virológica aos antirretrovirais e a manifestação de qualquer evento adverso atribuível ao uso dessas medicações. Não houve diferença estatística entre motivo da troca estratificada pelo perfil do GBV-C, sendo $p=0,104$.

Tabela 6 – Frequência de troca e motivo de troca de esquemas antirretrovirais na população durante o acompanhamento estratificada pelo perfil do GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Característica	n	GBV-C RNA+/anti-E2-	GBV-C RNA-/anti-E2+	GBV-C RNA-/anti-E2-	P
Troca de esquema antirretrovirais	203				0,209 ^a
0-3	87	23 (47,9%)	22 (44,9%)	42 (39,6%)	
4-7	84	19 (39,6%)	21 (42,9%)	44 (41,5%)	
8-11	28	5 (10,4%)	6 (12,2%)	17 (16%)	
12-15	4	1 (2,1%)	0 (0%)	3 (2,8%)	
Motivo da troca	129/203				0,104 ^b
Falência Viroológica/Imunológica	78	19 (70,4%)	15 (45,5%)	44 (63,8%)	
Evento Adverso	51	8 (29,6%)	18 (54,5%)	25 (36,2%)	

^a Razão de Verossimilhança

^b Teste de Kruskal Wallis

Foi verificado um total de 43 óbitos ao longo de 10 anos de observação. Houve cinco óbitos no grupo de pacientes com GBV-C RNA positivo, sete óbitos no grupo de pacientes anti-E2 positivas e 31 óbitos no grupo de pacientes GBV-C RNA e anti-E2 negativas. Todos os óbitos foram causados pela aids e/ou relacionados à aids. (Anexo 3)

O tempo médio de sobrevida realizado pelo método de Kaplan-Meier das 248 pacientes do estudo estratificada pelo perfil sorológico do vírus GBV-C, tendo como desfecho final o óbito relacionado à aids, foi de **9,45 anos** IC95% 8,95 - 9,95 para o grupo GBV-C RNA+ /anti-E2 - ; de **9,32 anos** IC95% 8,78 - 9,85 para GBV-C RNA- /anti-E2 + ; e de **8,65 anos** IC95% 8,19 - 9,10 para o grupo GBV-C RNA- /anti-E2 - .

Quando se analisa o grupo não exposto ao vírus, GBV-C RNA- /anti-E2 - , e o grupo exposto, GBV-C RNA + e/ou anti-E2 + , encontramos um *log-rank* com $p=0,010$ demonstrando haver uma diferença estatística significativa nas taxas de sobrevida nos 10 anos de acompanhamento entre esses dois grupos (Gráfico 2). Essa diferença estatística na análise de sobrevida também foi demonstrada, ainda que com menor significância, sendo $p=0,034$, quando se analisa separadamente as pacientes GBV-C RNA+ /anti-E2 - , GBV-C RNA- /anti-E2 + e GBV-C RNA- /anti-E2 - . (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Análise de sobrevida entre pacientes expostas e não expostas ao GBV-C Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

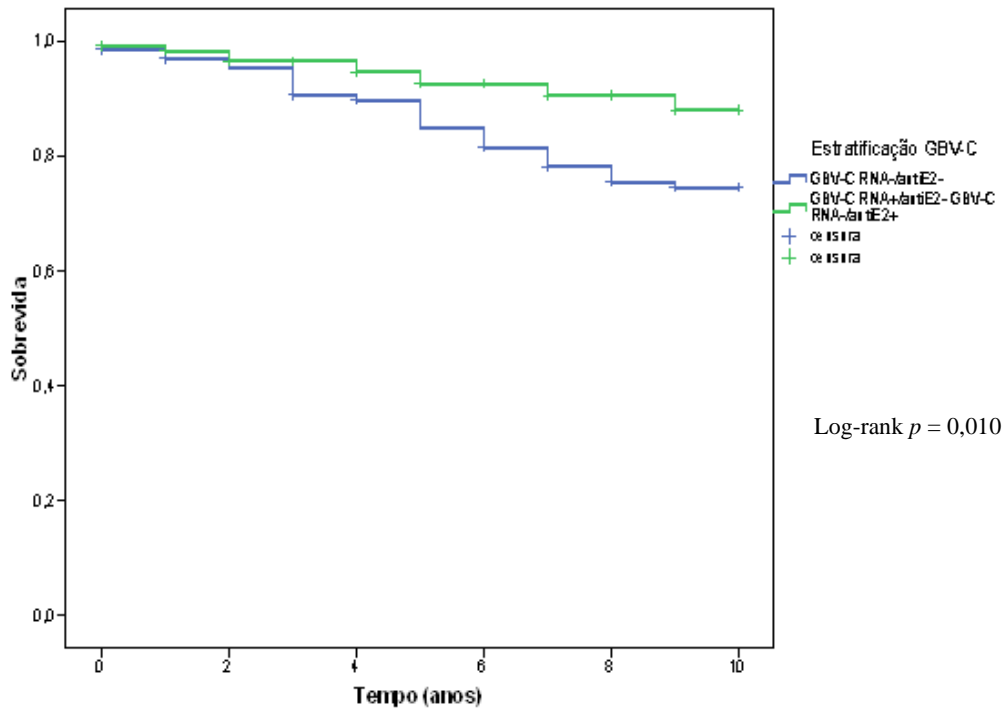
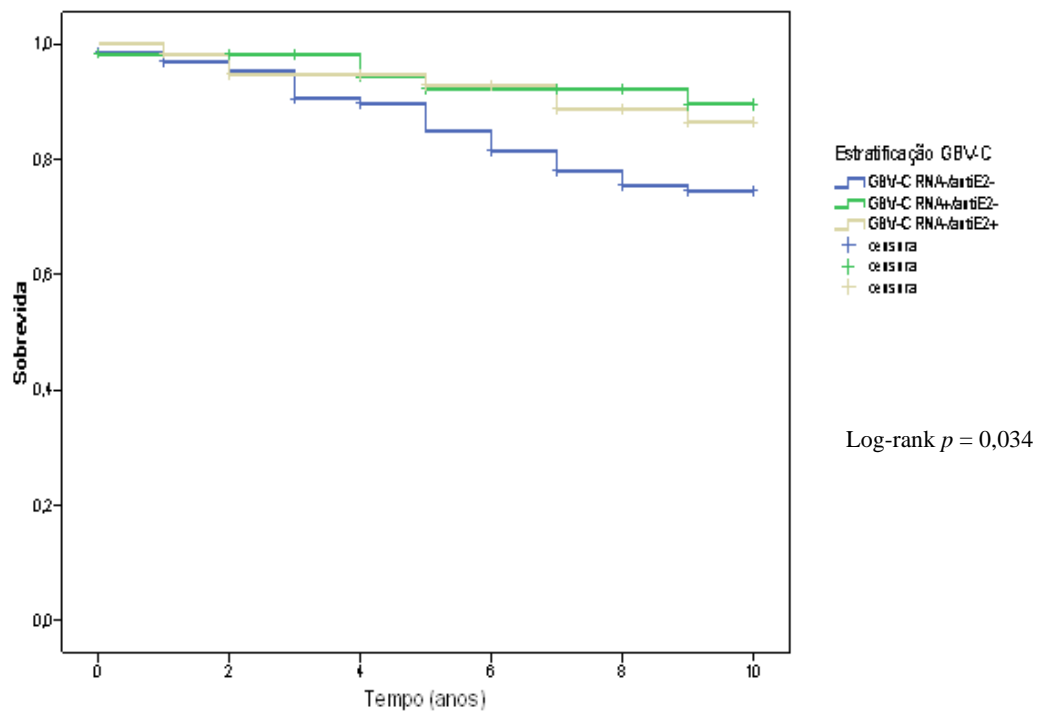


Gráfico 3 - Análise de sobrevida entre pacientes GBV-C RNA-/anti-E2 - ; GBV-C RNA+/antiE2- e GBV-C RNA-/antiE2+ - Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas



Foram calculados os riscos relativos de óbito utilizando o modelo de Cox tendo como variável de estratificação o perfil do GBV-C. Houve diferença estatística na comparação entre as categorias GBV-C RNA- /anti-E2 - e GBV-C RNA+ /anti-E2 - , $p=0,038$, sendo o risco relativo de morte para o grupo GBV-C RNA positivo 63% menor do que nos não expostos. Para o grupo GBV-C RNA- /anti-E2 - e GBV-C RNA- /anti-E2 + , não houve diferença estatística, porém o risco de morte foi de 51% menor para o grupo GBV-C RNA- /anti-E2+ em comparação aos não expostos, sendo $p= 0,089$, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Risco relativo de óbito estratificado pelo perfil do GBV-C - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Estratificação GBV-C	RR	IC (95%)		P
		Inferior	Superior	
GBV-C RNA-/anti-E2-	1,00			
GBV-C RNA+/anti-E2-	0,37	0,14	0,95	0,038
GBV-C RNA-/anti-E2+	0,49	0,22	1,11	0,089

A contagem de linfócitos T CD4 basais e carga viral do HIV foram categorizadas e criadas funções Kaplan-Meier para o tempo de sobrevivência segundo essas categorias. Foram testados os tempos de sobrevivência com o uso do teste *log-rank*. Houve diferença estatística nesta análise para o valor de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV independente do perfil do GBV-C, sendo o $p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente.

Gráfico 4 - Análise de sobrevida das pacientes classificadas segundo a contagem de linfócitos T CD4. Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

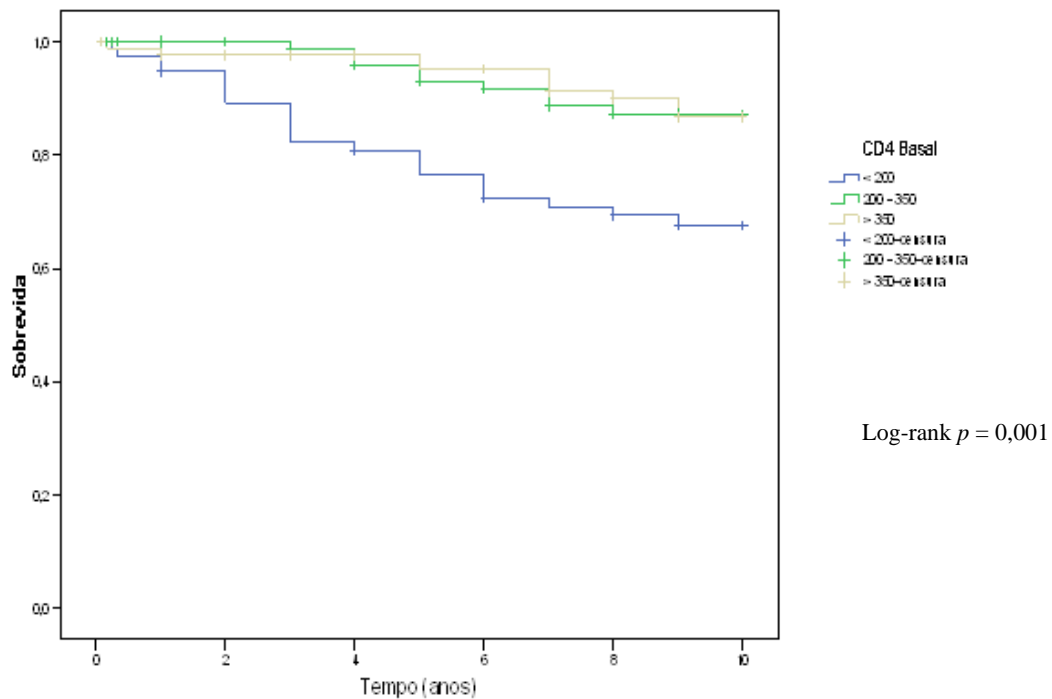
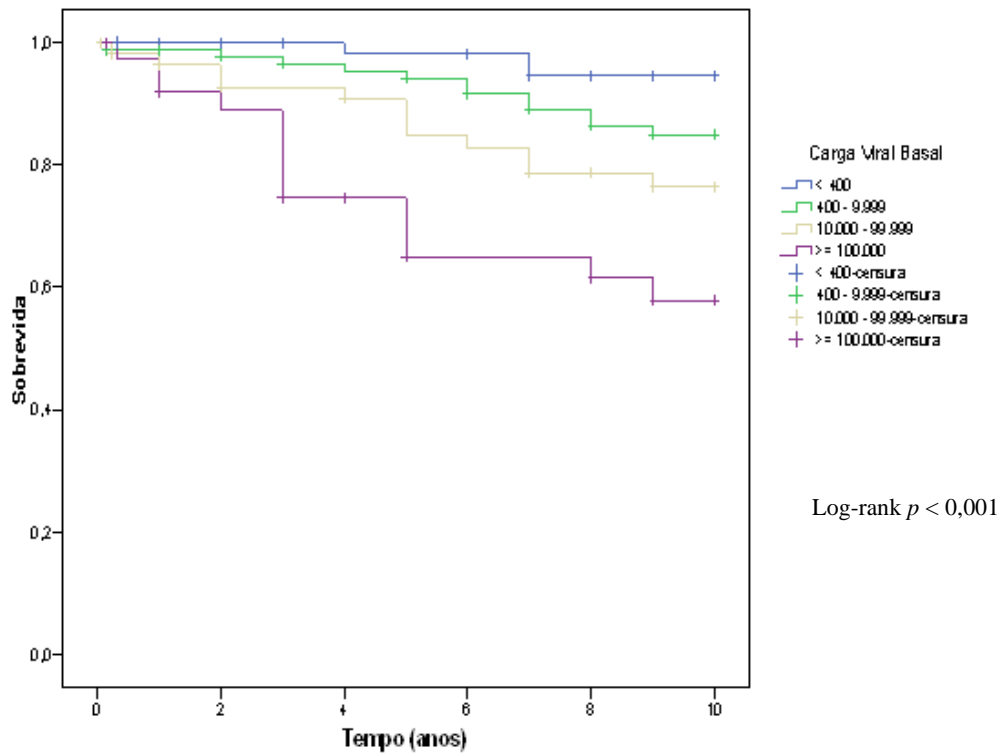


Gráfico 5 - Análise de sobrevida das pacientes classificadas segundo a carga viral do HIV. Curva de Kaplan-Meier - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas



Foi realizada a análise de regressão múltipla de Cox com as variáveis contagem de linfócitos TCD4 e carga viral do HIV basais, número de esquemas antirretrovirais, doença definidora de aids e o perfil do GBV-C, como mostra a Tabela 8. O resultado da análise de regressão de Cox demonstrou que somente as variáveis carga viral do HIV maior ou igual a 100.000 cópias/mL e presença de doença definidora ao longo do seguimento dessas pacientes demonstraram associação estatística significativa com a sobrevida. Curiosamente, o mesmo não ocorreu com a variável perfil do GBV-C. Ou seja, ter carga viral do HIV maior ou igual a 100.000 cópias/mL em relação aos pacientes com baixa carga viral basal (<400 cópias/mL), e/ou ter apresentado alguma doença definidora de aids ao longo do seguimento, esteve relacionado a um risco relativo de 7,63 e 2,87 vezes de óbito, respectivamente, independente do perfil do GBV-C ($p > 0,05$).

Tabela 8 - Análise de regressão múltipla de Cox ajustado por variáveis em 248 pacientes. Modelo parcial. SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Variável	RR	IC (95%)		p*
		Inferior	Superior	
CD4 basal				
< 200	1,00			
200 – 350	0,60	0,24	1,51	0,280
> 350	0,57	0,22	1,50	0,253
CV basal				
< 400	1,00			
400 - 9.999	2,21	0,59	8,28	0,239
10.000 - 99.999	1,92	0,47	7,80	0,364
\geq 100.000	7,63	2,01	28,93	0,003
Número de esquemas ARV				
	1,02	0,91	1,14	0,743
Doença definidora				
Não	1,00			
Sim	2,87	1,15	7,16	0,024
Perfil GBV-C				
GBV-C RNA-/antiE2-	1,00			
GBV-C RNA+/antiE2-	0,75	0,24	2,32	0,613
GBV-C RNA-/antiE2+	0,66	0,26	1,65	0,370

* Teste Qui-Quadrado

A Tabela 9 reafirma os resultados obtidos na análise de regressão múltipla de Cox ajustado apenas pelas variáveis que demonstraram significância estatística, denominado modelo final.

Tabela 9 - Análise de regressão múltipla de Cox ajustado por variáveis em 248 pacientes. Modelo final. SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Variável	RR	IC (95%)		p*
		Inferior	Superior	
CV basal				
< 400	1,00			
400 - 9.999	2,31	0,63	8,54	0,209
10.000 - 99.999	2,10	0,52	8,47	0,296
>= 100.000	9,34	2,60	33,53	0,001
Doença definidora				
Não	1,00			
Sim	3,76	1,65	8,56	0,002

* Teste Qui-Quadrado

Das 248 pacientes cuja primeira amostra foi incluída na análise acima, conseguimos obter uma 2ª amostra, coletada entre 2006 e 2008, de 57 pacientes.

Nestas 57 pacientes verificamos os seguintes resultados quanto ao perfil do GBV-C.

Tabela 10 - Resultados dos testes laboratoriais para GBV-C RNA nas 57 novas amostras colhidas em 2006-2008 - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Perfil do GBV-C 2ª amostra	n	%
GBV-C RNA +/-anti-E2 +	0	0%
GBV-C RNA - /anti-E2 +	15	26%
GBV-C RNA +/-anti-E2 -	12	21%
GBV-C RNA -/anti-E2 -	30	53%
Total	57	100%

O resultado da análise do perfil do GBV-C da segunda coleta realizada entre 2006 e 2007 em amostras de 57 pacientes demonstrou presença do GBV-C RNA em 12 pacientes (21%).

Foi realizada a contagem da carga viral do GBV-C RNA pelo método quantitativo da PCR em tempo real nas pacientes virêmicas nesta segunda coleta. Encontrou-se uma média de 3.609,70 UA/mL e mediana de 428,6 UA/mL (P₂₅₋₇₅ 219 - 3.259,4 UA/mL).

Comparando as 12 pacientes virêmicas na primeira e segunda amostra, observamos que nove pacientes persistiam com o vírus GBV-C positivo (**persistentemente positivas**), e apenas três pacientes tiveram contato com o vírus entre o período da primeira e segunda coleta mantendo-se virêmicas, conforme demonstrado pela presença do GBV-C RNA apenas na segunda coleta (**infecção incidente**).

Ainda com relação à exposição ao vírus durante o intervalo entre as determinações do perfil do GBV-C, encontramos uma paciente que apresentou contato com o vírus seguida de soroconversão demonstrada pela produção do anti-E2 na segunda amostra (**soroconversão**).

Houve clareamento do GBV-C RNA em quatro amostras (9%). Ou seja, essas pacientes apresentavam na primeira coleta GBV-C RNA+ /anti-E2 - e na segunda, GBV-C RNA - /anti-E2 + ou anti-E2 - (**clareadoras virais**).

As pacientes que na análise da segunda coleta apresentaram um perfil compatível com clareamento viral, determinado pela detecção do anti-E2 e que também o foram na primeira coleta, foram consideradas **imunes**. Das 19 (33%) pacientes imunes, 13 apresentaram GBV-C RNA- /anti-E2 + nas análises da primeira e segunda amostras. Seis pacientes apresentaram GBV-C RNA- /anti-

E2+ na primeira mas GBV-C RNA- /anti-E2 - na segunda análise demonstrando que houve perda do anti-E2, mas persistência de viremia negativa ao longo do seguimento.

Por fim, 21 pacientes (35%) continuaram não sendo expostas ao vírus durante todo o seguimento apresentando como perfil GBV-C RNA- /anti-E2 - em ambas as coletas (**persistentemente negativas**).

A incidência foi calculada com a população de 57 pacientes das quais foram excluídas para este estudo as pacientes que não estavam sob risco, sendo estas as persistentemente positivas (9), as imunes (19) e as clareadoras (4). Dessa forma, as 25 pacientes restantes que estavam sob risco de adquirir a infecção pelo GBV-C - grupos das persistentemente negativas (21), infecção incidente (3) e soroconversão (1) - foram observadas por 226 anos. Neste universo observamos quatro novas infecções. Portanto a incidência nesse grupo de mulheres HIV positivas é de 17,7 pessoas por 1.000 anos.

A Tabela 11 mostra os resultados das variáveis contagem de linfócitos TCD4 e carga viral do HIV e do GBV-C da primeira coleta (basal) e segunda coleta (final).

Tabela 11 - Resultado das variáveis CD4 e carga viral do HIV do GBV-C das 57 pacientes - SEAP/
Hospital Emílio Ribas

Pacientes	CD4 Basal	CV HIV Basal	CV GBV-C Basal	CD4 Final	CV HIV Final	CV GBV-C Final	Perfil GBV-C Basal	Perfil GBV-C Final	Classificação
1	437	2.115	0	495	51.705	0	0	0	PN
2	306	100	0	707	399	0	0	0	PN
3	132	31.655	0	340	399	0	0	0	PN
4	439	306.885	0	440	399	0	0	0	PN
5	130	5.975	0	14	183.000	0	0	0	PN
6	379	100	0	593	399	0	0	0	PN
7	708	35.505	0	172	399	0	0	0	PN
8	150	100	0	426	399	0	0	0	PN
9	220	53.835	0	328	130.000	0	0	0	PN
10	417	100	0	815	399	0	0	0	PN
11	277	1.903	0	210	7.645	0	0	0	PN
12	329	100	0	351	211.000	0	0	0	PN
13	278	100	0	325	323	0	0	0	PN
14	474	7.234	0	374	399	0	0	0	PN
15	277	291.982	0	245	51.600	0	0	0	PN
16	237	100	0	782	399	0	0	0	PN
17	544	100	0	737	399	0	0	0	PN
18	392	2.305	0	757	399	0	0	0	PN
19	307	4.667	0	373	9.986	0	0	0	PN
20	409	11.203	0	1.213	51.105	0	0	0	PN
21	198	1.691	0	167	1.975	0	0	0	PN
22	228	33.951	820,29	298	49	0	1	0	C
23	89	100	619,80	508	399	0	1	0	C
24	74	942	23,43	70	399	0	1	0	C
25	245	9.936	0	399	399	0	2	0	I
26	67	3.503	0	238	1.259	0	2	0	I
27	312	182.274	0	701	77	0	2	0	I
28	89	677	0	362	3.493	0	2	0	I
29	359	7.163	0	295	5.075	0	2	0	I
30	123	414	0	177	145.000	0	2	0	I
31	155	195.500	0	548	399	3.900,62	0	1	II
32	253	100	0	629	399	1.335,81	0	1	II
33	534	118.421	0	307	9.700	28.235,4	0	1	II
34	135	100	285,92	618	399	211,79	1	1	PP
35	355	1.411	3.974,57	571	49	495,01	1	1	PP
36	365	13.042	812,89	463	1.580	269,96	1	1	PP
37	146	29.006	4,63	209	94.100	109,73	1	1	PP
38	676	2.404	438,7	1.334	399	488,34	1	1	PP
39	108	100	1.895,83	568	399	368,84	1	1	PP
40	655	1.165	4.511,69	724	399	151,91	1	1	PP
41	108	47.420	9,32			240,69	1	1	PP
42	317	16.878	637,06	370	79	7.508,10	1	1	PP
43	375	191.362	0	878	49	0	0	2	S
44	235	100	4.318,85	393	399	0	1	2	C
45	143	100	0	418	399	0	2	2	I
46	241	766	0	757	399	0	2	2	I
47	308	100	0	447	399	0	2	2	I
48	253	5.327	0	309	522	0	2	2	I
49	232	100	0	1.219	399	0	2	2	I
50	181	100	0	162	1.810	0	2	2	I
51	424	100	0	776	399	0	2	2	I
52	543	469	0	542	49	0	2	2	I
53	297	10.169	0			0	2	2	I
54	170	76.792	0	199	55.500	0	2	2	I
55	169	93.743	0	348	49	0	2	2	I
56	219	100	0	425	731	0	2	2	I
57	521	14.117	0	295	33.400	0	2	2	I

PP= Persistentemente positivas PN= Persistentemente negativas II= Infecção Incidente
C= Clareadoras S=Soroconversão I= Imunes

Avaliando a variação do valor de contagem de linfócitos TCD4 e da carga viral do HIV obtida ao final menos a basal dos grupos de pacientes persistentemente negativas, persistentemente positivas e grupo de pacientes clareadoras, imunes, soroconversoras e infecção incidente não se observou diferença estatística entre os valores da média e mediana dos grupos, sendo $p=0,372$ e $p=0,338$, respectivamente. Não se pode concluir, portanto, que as pacientes persistentemente virêmicas para o GBV-C apresentaram uma variação de contagem de CD4 e ou uma variação de carga viral do HIV superior aquelas persistentemente não virêmicas para esse vírus, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação entre a variação CD4, carga viral do HIV basal e final dos grupos PN, PP, C/I/S/II - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Variável	Classificação	Média	DP	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	n	p*
Variação CD4 (final - basal)	PN	134	279	66	-31,5	320,5	21	0,372
	PP	263	237	157	64,5	477,3	8	
	C/I/S/II	198	257	164,5	21,5	379,3	26	
	Total	183	262	154	22,0	376,0	55	
Variação CV HIV (final - basal)	PN	-2.620	109.445	299	-4.370,5	22.822,0	21	0,338
	PP	4.162	25.408	-1.064	-9.097,8	299,0	8	
	C/I/S/II	-25.966	73.197	-393,5	-24.444,5	299,0	26	
	Total	-12.670	84.657	299	-9.537,0	299,0	55	

PP= Persistentemente positivas Incidente
C= Clareadoras

PN= Persistentemente negativas
S=Soroconversão

II = Infecção
I= Imunes

* Teste de Wilcoxon

Foi realizada também a comparação do valor de contagem de linfócitos TCD4 final menos o basal somente entre os grupos de pacientes persistentemente negativas e as persistentemente positivas, como mostra a Tabela 13. Da mesma forma, não houve diferença estatística na comparação dos valores de contagem de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV entre os dois grupos, sendo $p=0,153$ e $p=0,374$, respectivamente.

Tabela 13 – Comparação entre a variação CD4, carga viral do HIV basal e final dos grupos PN, PP - SEAP/USP e Hospital Emílio Ribas

Variável	Classificação	Média	DP	Mediana	P₂₅	P₇₅	n	p*
Variação CD4 (final - basal)	PN	134	279	66	-31,5	320,5	21	0,153
	PP	263	237	157	64,5	477,3	8	
	Total	179	266	139	22,0	352,0	29	
Variação CV HIV (final - basal)	PN	-2620	109445	299	-4370,5	22822,0	21	0,374
	PP	4162	25408	-1064	-9097,8	299,0	8	
	Total	-3578	81774	299	-4805,0	1710,0	29	

PP= Persistentemente positivas PN= Persistentemente negativas

* Teste de Wilcoxon

Discussão

O presente estudo teve como interesse principal a determinação da prevalência de GBV-C em uma população de mulheres sabidamente HIV positivas. Consideramos ser esse um trabalho relevante uma vez que dados de estudos de prevalência realizados em coortes de população exclusivamente femininas e HIV positivas ainda são escassos na literatura nacional e internacional. No Brasil existem ainda poucos inquéritos em população de pacientes infectados por HIV para presença da infecção por GBV-C. Portanto, o primeiro objetivo desse estudo foi determinar a prevalência do RNA do vírus GBV-C e do anticorpo anti-E2 em uma coorte de 248 pacientes femininas sabidamente portadoras de HIV-1.

O estudo também propôs demonstrar e discutir, nessa população brasileira, o curioso impacto de GBV-C sobre a evolução da infecção pelo HIV quanto ao efeito protetor da interação entre esses dois vírus, tendo como base a análise de algumas variáveis clínicas e laboratoriais importantes na evolução da doença por HIV.

Nosso estudo se distinguiu da maioria dos publicados na literatura por duas peculiaridades: ter casuística exclusivamente composta de mulheres, e determinar a carga viral de GBV-C por um teste quantitativo, não apenas qualitativo, permitindo comparar variáveis quantitativas como a contagem de linfócitos T CD4 e da carga viral de HIV com uma variável também quantitativa, e não apenas categórica, à carga viral de GBV-C.

O desenvolvimento do método da PCR em tempo real para a determinação da viremia de GBV-C no estudo e consequentes resultados foram

apresentados e discutidos em dissertação de mestrado de outro pesquisador. Dessa forma, não foi discutida em detalhes a metodologia para quantificação do vírus neste trabalho.

A prevalência da viremia de GBV-C encontrada em nossa população, foi similar a descrita em norte americanos e europeus. Um estudo brasileiro realizado por Souza e colaboradores ⁶¹ também demonstrou resultados semelhantes, com uma prevalência de GBV-C RNA de 24% em 175 pacientes co-infectados por HIV. No que se refere prevalência de GBV-C RNA em doadores saudáveis de bancos de sangue, dois estudos brasileiros realizados por Ribeiro-dos-Santos e colaboradores ⁵⁶ e Levi e colaboradores ³⁸ demonstraram uma prevalência próxima de 10%. O curioso é que os estudos de prevalência de GBV-C demonstram ser esse um vírus mais presente em indivíduos co-infectados por HIV que nos doadores de sangue saudáveis. Esse fato pode ser explicado pela coexistência de mesma via de transmissão entre esses dois vírus, sendo a via parenteral e sexual as principais relacionadas à aquisição dos mesmos.

Nossa casuística foi composta exclusivamente de mulheres com idade média de 32 anos, cuja exposição ao HIV foi principalmente sexual (67,2%). Os trabalhos publicados na literatura confirmam o predomínio da via parenteral e sexual como principais meios de transmissão de HIV. De fato, no Estado de São Paulo, desde 1983, tem-se observado que a maioria das mulheres contaminam-se pelas relações heterossexuais, sendo o uso de drogas injetáveis a segunda categoria de transmissão mais prevalente entre os casos femininos notificados ⁶³. Em nossa casuística encontramos uma predominância da transmissão de HIV por via sexual, provavelmente por se tratar de uma coorte de pacientes femininas, em que o uso de droga endovenosa ocorre com menor frequência. Vale ressaltar,

que a maioria das pacientes relataram ter parceiros sexuais fixos, maridos, sabidamente soropositivos para HIV.

Nossa casuística foi composta de pacientes com tempo de diagnóstico por HIV bastante longo, em média de 7,49 anos. O longo tempo de acompanhamento dessas pacientes certamente reflete o impacto da melhora da sobrevida após a era HAART, com a introdução de medicamentos altamente potentes. Consideramos que o nosso estudo apresentou um tempo de seguimento razoável, 10 anos, já que as pacientes sob terapia tendem a viver por mais tempo com infecção por HIV.

Estudamos algumas variáveis clínicas e laboratoriais referentes à evolução da doença por HIV em nossa população. A contagem de linfócitos T CD4 colhida na inclusão do estudo de 247 pacientes estudadas, resultou em mediana de 286 células/mm³. Em relação à contagem da carga viral de HIV na inclusão de 246 pacientes a mediana foi 3.497,50 cópias/mL.

As variáveis quantitativas, contagem de linfócitos T CD4 basal e carga viral basal de HIV, bem como a variável quantitativa de carga viral de GBV-C basal, foram também estudadas quanto à determinação da presença de algum grau de correlação entre as mesmas. Nosso trabalho não encontrou associação significativa entre a contagem de linfócitos T CD4 e carga viral de GBV-C basais nem tão pouco entre a contagem da carga viral de HIV e carga viral de GBV-C basais, uma vez que o p revelou-se $\geq 0,05$, indicando uma probabilidade do resultado do nosso estudo ter sido ao acaso, isto é, ser devido a variabilidade da amostra.

Do mesmo modo, Giret e colaboradores⁴³ estudaram esse tipo correlação entre essas variáveis em uma coorte brasileira de 175 pacientes e também não

encontraram correlação linear positiva significativa entre a carga viral de GBV-C e a contagem de linfócitos T CD4. No que diz respeito a correlação da carga viral de GBV-C e carga viral de HIV, apesar do nosso estudo ter demonstrado um valor inverso esperado, ou seja, valores maiores de carga viral de GBV-C associaram-se com valores menores de carga viral de HIV, essa diferença não foi significativa ($r_s = -0,058$ e $p = 0,366$).

Entretanto, nossos resultados não se assemelharam aos encontrados em um estudo realizado por Toyoda e colaboradores ⁴⁰, especialmente no que se refere à correlação entre a carga viral quantitativa de HIV e de GBV-C. Nesse estudo, os autores encontraram valores menores da carga viral de HIV nos 11 pacientes GBV-C RNA positivos (média de carga viral do HIV de $3,53 \times 10^4$ cópias/mL) quando comparado aos 30 pacientes GBV-C RNA negativos (média da carga viral do HIV de $5,76 \times 10^4$ cópias/mL). Entretanto, é interessante ressaltar que nesse estudo os autores não conseguiram demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre carga viral de HIV e carga viral de GBV-C com desfecho clínico de diagnóstico mais tardio de aids ou óbito entre os pacientes. Ou seja, ter tido GBV-C RNA positivo e menor média de carga viral de HIV não esteve associado a maior sobrevida nos pacientes infectados por HIV nesse estudo.

Já Lefréve e colaboradores ⁴⁹ também estudando a correlação da carga viral desses dois vírus após cinco anos de acompanhamento de 95 pacientes infectados por HIV, encontraram um média de carga viral de HIV de $3,4 \log_{10}$ no grupo GBV-C RNA positivo comparado com a média de $4,0 \log_{10}$ no grupo GBV-C RNA negativo, sendo $p = 0,009$.

Da mesma forma que HIV, por compartilharem da mesma via de transmissão, é comum a concomitância de hepatite B e C com GBV-C. Em nossa amostra não tivemos informação sobre presença dos vírus das hepatites B e C no momento do diagnóstico da infecção por HIV ou da determinação de GBV-C. Dessa forma, não podemos afirmar quantas pacientes eram portadoras de tais vírus no momento em que iniciamos o acompanhamento das mesmas.

Sabe-se que a via parenteral, principalmente para a hepatite C, e a sexual, mais importante na hepatite B, são altamente efetivas para a transmissão das mesmas, embora 30 a 35% dos casos de hepatite B e até 40% dos casos de hepatite C, não possuam uma via de transmissão bem determinada^{84,85,86}.

Pudemos, no entanto, observar a aquisição dessas hepatites virais ao longo do acompanhamento das pacientes. Houve maior predominância de VHC (11,7%) sobre VHB (1,8%) durante o acompanhamento das pacientes. Encontramos três casos de hepatite B distribuídos igualmente entre os perfis de GBV-C. Em relação à hepatite C, encontramos nove casos para o grupo de pacientes expostas e 10 casos para as não expostas. Não houve predomínio de casos de hepatite B e C entre os indivíduos expostos e não expostos a GBV-C em nossa casuística. Portanto, apesar de esses vírus terem a mesma via de aquisição parece não haver relação da presença da viremia de um sobre o outro.

Como observado na co-infecção VHC e HIV, a interação entre diferentes vírus, com modificação na virulência de um ou de ambos, tem sido descrita na literatura^{84,87}. Entretanto, ainda que por estudos com resultados conflitantes, o que se tem sido observado no caso da co-infecção GBV-C e HIV é de benefício em relação à progressão da doença por HIV.

Dado o rigor adotado para a determinação da presença das doenças oportunistas em prontuário médico um número expressivamente menor de pacientes foi analisado. Dos 185 prontuários revisados encontramos uma maior frequência de tuberculose disseminada, monilíase oro-esofágica e toxoplasmose cerebral. Esperaríamos encontrar menor frequência de doenças associadas à infecção por HIV uma vez que alguns trabalhos levantam a hipótese de que a viremia de GBV-C levaria a um aumento do número de células T CD4 e uma redução da carga viral de HIV. No entanto, não foi possível confirmar tal hipótese, já que o grupo de pacientes sabidamente GBV-C RNA positivo não diferiu dos demais grupos no que se refere à frequência de infecções oportunistas durante o acompanhamento. Entretanto, esse resultado deve ser analisado cautelosamente uma vez que comparamos uma variável laboratorial (perfil de GBV-C), cuja determinação foi pontual em amostras colhidas entre 1996 a 1997, com a variável manifestação de doenças oportunistas, ou seja um desfecho clínico, ocorridas ao longo do acompanhamento dessas pacientes. Além disso, há que se considerar que a maioria das pacientes estudadas encontrava-se em uso de TARV o que por si só, pode ter influência benéfica no controle das infecções oportunistas. Devemos levar em consideração também que não sabemos quantas pacientes permaneceram com a viremia persistente e conseqüente proteção quanto ao risco de desenvolvimento de infecções relacionadas a HIV, uma vez que não é rotina a determinação da PCR para GBV-C no momento da primeira sorologia Elisa positiva para HIV e ou no acompanhamento dessas pacientes. Nossa análise foi baseada em apenas duas medidas pontuais da carga viral de GBV-C, não sendo possível, dessa forma, determinar o momento mais exato do clareamento desse vírus.

Relativamente pouco é sabido sobre o efeito da co-infecção GBV-C e HIV na resposta ao tratamento antirretroviral. O estudo brasileiro publicado em 2006 por Souza e colaboradores ⁶¹, avaliou o efeito de GBV-C RNA na resposta a terapia antirretroviral em indivíduos HIV positivos virgens de tratamento antirretroviral que tiveram suas amostras de plasma colhidas e estocadas -70 °C antes do início da terapia. Foi encontrado uma maior redução da carga viral de HIV para o grupo com GBV-C RNA positivo medido na semana 24, 32 e 48 após o início do tratamento antirretroviral em comparação ao grupo GBV-C RNA negativo, sendo $p=0,009$. Porém, no que se refere à avaliação da resposta imunológica, não houve diferença entre os grupos nas respectivas semanas após o tratamento. Os autores concluíram que provavelmente esse resultado decorreu de um efeito direto da viremia de GBV-C sobre a replicação de HIV, sendo esse um mecanismo provável de interação benéfica entre esses dois vírus.

Dos 203 pacientes dos quais obtivemos informações quanto ao tratamento, apenas três pacientes não tinham usado nenhum esquema terapêutico desde o diagnóstico de HIV. A grande maioria das pacientes foi amplamente experimentada no que se refere ao uso de antirretrovirais, com uma mediana de troca de quatro esquemas durante o tempo de acompanhamento deste estudo. Na análise por categoria de trocas de antirretrovirais, observamos que a maior parte das pacientes apresentava de 0-3 e 4-7 trocas, ou seja, uma população de pacientes bastante experimentada ao longo do acompanhamento da infecção por HIV.

As trocas de esquemas terapêuticos têm como objetivo o alcance de um controle virológico e imunológico ótimo das pacientes ou amenização da toxicidade relacionada ao uso dos mesmos. Para a análise do motivo de troca da

terapia, obtivemos informações em prontuários médicos de apenas 129 pacientes uma vez que foi bastante frequente a anotação da troca do esquema sem, contudo, o registro do motivo da mesma. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o motivo da troca e o perfil do GBV-C. Ou seja, não podemos a partir desses resultados, atribuir uma maior frequência da variável clínica-laboratorial falência aos antirretrovirais, a um determinado perfil de GBV-C. O que se pretendia com o estudo da variável tratamento antirretroviral estratificada pelo perfil de GBV-C era demonstrar a possibilidade de evitar alterações na terapêutica antirretroviral no grupo exposto a GBV-C, uma vez que partimos do pressuposto de que nesse grupo haveria pacientes com menor necessidade de troca dos esquemas antirretrovirais, baseado na hipótese de que a exposição a GBV-C conduz a um aumento da contagem de linfócitos T CD4 e redução de carga viral de HIV, e conseqüente maior chance de sucesso terapêutico.

De fato, alguns poucos estudos conseguiram comprovar tal associação. Os resultados de dois estudos de coorte observacional publicados em 2003 por Nunnari e colaboradores ⁴⁷ e Rodriguez e colaboradores ⁸⁸ concluíram que os indivíduos infectados com GBV-C em uso de HAART apresentaram maior chance de uma resposta virológica completa e um aumento sustentado da contagem de linfócitos T CD4. Contudo, a metodologia de ambos os estudos é sujeita a críticas. Por exemplo, no estudo de Rodriguez e colaboradores ⁸⁸, a determinação do perfil de GBV-C de algumas amostras foi feita após a introdução do HAART e, à semelhança do que pode ter ocorrido em nosso estudo, os autores ressaltam a possibilidade de alguns pacientes terem sido expostos ao GBV-C durante o seguimento do estudo. Ou seja, a comparação entre os grupos GBV-C RNA

positivo e negativo no que se refere à resposta da terapia antirretroviral medida por aumento dos valores da contagem de linfócitos T CD4 e redução de carga viral ao longo do seguimento ficou prejudicada, uma vez que indivíduos negativos poderiam ter se tornado GBV-C RNA positivos ou vice versa. Já no estudo de Nunnari e colaboradores ⁴⁷, a principal crítica é que a grande maioria dos pacientes já havia sido exposta à terapia antirretroviral previamente a determinação do perfil de GBV-C.

Brumme e colaboradores ⁵⁰, em um estudo de coorte retrospectiva para avaliar a influência do GBV-C RNA na resposta à terapia antirretroviral, não demonstraram efeito benéfico na viremia de HIV em 40 meses, cerca de três anos de acompanhamento dos pacientes. Houve apenas uma menor mediana de carga viral de HIV no grupo GBV-C RNA positivo e uma tendência, ou seja, uma diferença não estatística de maior mediana na contagem de linfócitos T CD4 nesse mesmo grupo. Porém, vale ressaltar ainda que o trabalho não fez diferença entre o grupo que apresentava anti-E2 positivo, o que indicaria uma exposição prévia ao RNA desse vírus. Sabemos que, uma eventual vantagem na sobrevida nos pacientes anti-E2 positivos quando comparados com os indivíduos não expostos a GBV-C pode ser explicada pela exposição prévia a GBV-C em algum momento na evolução da doença por HIV.

O que tem sido demonstrado na literatura, é que a infecção persistente por GBV-C parece ser necessária para os efeitos benéficos e o clareamento da infecção por esse vírus precocemente no curso da infecção por HIV não promove manutenção desses efeitos. Corroborando tal achado, Williams e colaboradores ⁴² demonstraram em estudo que os pacientes HIV positivos cujo RNA de GBV-C é clareado durante o seguimento, apresentaram uma maior taxa de mortalidade

do que aqueles com infecção ativa persistente por GBV-C, ou seja, GBV-C RNA persistentemente positivo. Em conclusão, os trabalhos ressaltam que talvez a persistência da infecção por GBV-C seja a chave para associação entre GBV-C e a melhora da sobrevida em pacientes co-infectados.

Quanto à determinação do número de óbitos na nossa população ao longo do acompanhamento das mesmas, utilizamos informações provenientes do banco de dados sobre mortalidade por aids do Programa de Aprimoramento das Informações de Mortalidade no Município de São Paulo (PRO-AIM). Bronhara e colaboradores ⁸⁹, avaliando o desempenho da vinculação determinística no banco de óbito por aids desse programa, concluíram que o mesmo proporcionou a maior cobertura dos casos estimados de óbitos por aids ocorridos no período estudado, com maior quantidade de informações completas e melhor localização geográfica dos casos. Os autores atribuíram a melhor eficácia desse banco ao fato de utilizar um procedimento de busca ativa realizada a partir das declarações de óbito a qual resulta em melhor informação. Consideramos, portanto, que as informações obtidas por esse banco de dados em nosso estudo foram consideravelmente confiáveis.

Analisando o risco relativo de óbito entre os grupos, encontramos diferença estatística apenas entre o grupo GBV-C RNA-/anti-E2- e GBV-C RNA+/anti-E2-, sendo o risco relativo de morte 63% menor nesse último. Na análise uni-variada de sobrevida média utilizando o método de Kaplan-Meier conseguimos demonstrar que o grupo GBV-C RNA positivo apresentou uma maior sobrevida ao longo de 10 anos de acompanhamento do nosso estudo. Do mesmo modo, a análise de sobrevida tendo como variáveis a contagem de

linfócitos T CD4 e carga viral de HIV, separadas por categorias, também demonstrou diferença estatística.

Utilizando-se de uma análise regressão múltipla de Cox, na qual associamos variáveis clínicas e laboratoriais, fomos capazes de definir que apenas as variáveis carga viral maior ou igual a 100.00 cópias/mL e/ou ter tido doença definidora de aids no acompanhamento do estudo tiveram risco relativo maior de óbito, independente da viremia de GBV-C. Em outras palavras, a partir desse resultado, podemos concluir que o efeito protetor de GBV-C na sobrevivência das pacientes demonstrado na análise de Kaplan-Meier, não foi um fator independente de alteração dos valores da contagem de linfócitos T CD4 e da carga viral de HIV, sugerindo que a viremia de GBV-C não esteve associada à mudanças nessas duas variáveis laboratoriais, amplamente utilizadas no manejo clínicos de doentes com a infecção por HIV como indicadores e preditores confiáveis de progressão da doença.

Em conclusão, alguns estudos publicados conseguiram demonstrar que poderia existir uma associação entre a infecção por GBV-C e a maior sobrevivência em pacientes HIV positivos, porém não demonstraram uma relação de causalidade entre estes eventos. Os mecanismos de tal efeito protetor permanecem por ser investigados. O fato é que ambos os vírus infectam e se replicam em células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) sugerindo que possam interagir direta ou indiretamente no ciclo celular ¹¹.

Entre o período de 2006 a 2008, realizamos novamente a determinação do perfil de GBV-C. Porém, a coleta foi realizada em apenas 57 pacientes das 248 incluídas no início do estudo. Considerando-se que houve 43 óbitos durante o acompanhamento das pacientes, obtém-se uma taxa de retorno de $57/205 = 28\%$,

muito abaixo do esperado. As razões para essa baixa anuência foram: um número significativo de pacientes desligou-se do atendimento de suas instituições, algumas pacientes recusaram em participar da segunda análise do estudo ou não compareceram à entrevista agendada pelo médico infectologista após contato via telefone para processar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e então coleta da amostra de sangue.

Encontramos apenas quatro novos casos de infecção por GBV-C ao longo de 10 anos de acompanhamento (três pacientes GBV-C RNA - / anti-E2 - na primeira coleta e GBV-C RNA +/- anti-E2 - na segunda coleta e um paciente GBV-C RNA -/anti-E2- na primeira coleta e GBV-C RNA -/anti-E2+ na segunda coleta).

Entretanto, parece que a incidência de GBV-C RNA seja mesmo pequena. No estudo de Nunnari e colaboradores ⁴⁷, no que se refere a determinação do perfil de GBV-C, os autores realizaram nesse estudo duas medidas de GBV-C, uma no início e outra no final de oito anos de seguimento e não encontraram nenhuma exposição a GBV-C durante esse período. Segundo Stapleton e colaboradores ⁹¹, a aquisição de GBV-C usualmente precede a aquisição de HIV, sendo infrequente a aquisição de GBV-C após uma infecção por HIV já bem estabelecida.

O resultado da comparação dos valores médios e medianos entre a variação (final menos basal) da contagem de linfócitos TCD4 e da carga viral do HIV de pacientes persistentemente positivas e negativas (em relação a presença de GBV-C RNA), não demonstrou um maior aumento na contagem de linfócitos T CD4 e ou uma maior redução de carga viral do HIV no grupo GBV-C RNA persistentemente positivo, o que representaria um efeito protetor de progressão da doença por HIV, comparado ao grupo GBV-C RNA persistentemente negativo.

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Foi conduzido em pacientes com diagnóstico de infecção por HIV já definido, sendo a grande maioria já sob uso de terapia antirretroviral. Dessa forma, não conseguimos determinar o momento da soroconversão para HIV, nem tão pouco de GBV-C e, principalmente, excluir o uso da terapia antirretroviral como importante fator contribuidor de melhora de sobrevida entre os grupos.

Uma crítica ao nosso estudo é que a análise de sobrevida das 248 pacientes iniciou-se em 1996, período marcado pela introdução do HAART em diversos centros de referência e tratamento em DST/aids no Brasil. Nosso trabalho de coorte retrospectiva iniciou-se no momento da determinação do perfil de GBV-C em amostras de pacientes coletadas entre 1996 a 1998. Desde essa data, a maioria das pacientes já havia sido exposta à terapia antirretroviral seja a monoterapia, terapia dupla e ou ao esquema HAART, caracterizado por compor um esquema antirretroviral de alta potência com no mínimo três drogas, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleos(t)ídeo (ITRN), associados a um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeos (ITRNN) ou a um inibidor de protease (IP) no esquema terapêutico. Assim, nosso estudo tem como viés o uso de terapia antirretroviral como um importante fator determinante de melhor sobrevida como já foi discutido, e, não necessariamente, devido à presença de RNA GBV-C como fator protetor como visto em alguns trabalhos. É possível que GBV-C seja um marcador da presença de outros fatores que resultam em retardo na progressão da infecção por HIV ou que GBV-C atue diretamente como causador da redução da replicação de HIV.

Além disso, temos que admitir que estudamos uma população feminina selecionada, por se tratar de pacientes seguidas em dois grandes centros

acadêmicos de referência em tratamento de DST/aids no Estado de São Paulo. Ora, não resta dúvida que estes centros dispõem de acompanhamento laboratorial e manejo clínico cuidadoso e adequado dos pacientes HIV positivos por médicos especialistas bem treinados e eficientes, além de grande possibilidade de investigação e detecção de doenças oportunistas, e de acompanhamento psicológico dos pacientes por pessoal treinado presente amiúde nesses centros. Certamente essa disponibilidade de serviços oferecidos aos pacientes nesses centros de atendimento, altera de forma considerável a sobrevida dos mesmos. Reconhecemos, portanto, que todos os recursos humanos e laboratoriais para o atendimento destas pacientes nesses centros são fundamentais, sem os quais, a administração pura e simples da terapêutica antirretroviral e ou até mesmo a viremia persistente de GBV-C, não seriam suficientes para mudar o prognóstico da infecção por HIV.

Uma outra importante limitação do nosso estudo é o seu caráter retrospectivo e a possibilidade de vieses. Os dados registrados foram obtidos da transcrição de prontuários médicos proporcionando perda da qualidade de aferição das informações. De fato, houve uma grande variação na qualidade das informações colhidas, pois muitos prontuários avaliados estavam incompletos, sendo alguns excluídos por completo durante o processo de amostragem. Ainda, não foi possível descartar possíveis vieses do observador, decorrentes da interpretação subjetiva desses registros, principalmente em relação aos dados epidemiológicos.

Conclusões

- A prevalência da viremia por GBV-C é de 23% e a do anticorpo anti-E2 é 23%, perfazendo uma frequência de exposição ao GBV-C de 46%.
- A melhora da sobrevida entre as mulheres expostas ao GBV-C em relação as não expostas na análise uni-variada demonstrou provável associação com a presença do RNA do GBV-C, contudo, a análise multi-variada demonstrou que apenas a carga viral maior de 100.000 cópias/mL e ou manifestações de doenças oportunistas ao longo do seguimento estiveram associadas à melhora da sobrevida.
- O risco relativo de óbito para o grupo GBV-C RNA +/- anti-E2 - é 63% menor do que para o grupo GBV-C RNA- / anti-E2 - .
- Não houve correlação entre a carga viral do GBV-C e as contagens de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV.
- A população estudada foi bastante experimentada no que se refere ao uso de antirretrovirais para o tratamento da infecção do HIV.
- Provavelmente a terapia antirretroviral foi fator limitante na análise de efeito protetor do GBV-C RNA em pacientes infectadas pelo HIV.
- A análise de associação do GBV-C com o VHB e VHC durante o acompanhamento do estudo ficou prejudicada pois não dispusemos de dados quanto a presença desses vírus no início do estudo.
- Os mecanismos do efeito protetor da co-infecção GBV-C e HIV permanecem por ser investigados.

Anexo 1: Impresso de Pesquisa

PROJETO DE PESQUISA “A INFLUÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE G (GBV-C) NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV EM MULHERES”

1. IDNUM:_____ Iniciais:_____
2. Status GBV-C: Coleta 1:_____ Coleta 2:_____
3. Data da 1ª sorologia positiva para HIV: _____
4. Exposição so HIV: Parenteral: - Uso de drogas injetáveis: 1
- Transfusão sanguínea : 2
Sexual: 3
Ignorado: 4
5. Doença definidora de aids: Sim: 1 Não: 2

-
6. Uso de terapia antirretroviral:
 7. Data início da TARV:_____
 8. Número de trocas de ARV's: _____
 9. Motivo de trocas de ARV's: - Falência 1
- Efeito adverso 2
- Ignorado 3
 10. ARV's usados:

-
-
-
11. Sorologias:
-Hepatite B: AgHbs + : 1 AgHbs - : 2
-Hepatite C: antiVHC + : 1 antiVHC - : 2
-HTLV1/2: + : 1 - : 2

Anexo 2: Classificação internacional de doenças (CID) das causas de óbitos

E-872: Acidose

B-202: Doença pelo HIV resultando em doença citomegálica

B-238: Doença pelo HIV resultando em outra afecção não especificada

B-207: Doença pelo HIV resultando em infecções múltiplas

B-208: Doença pelo HIV resultando em outras doenças infecciosas e parasitárias

B-203: Doença pelo HIV resultando em outras infecções virais

A-169: Tuberculose respiratória, não especificada, sem menção de confirmação bacteriológica ou histológica

B-201: Doença pelo HIV resultando em outras infecções bacterianas

B-227: Doença pelo HIV resultando em doenças múltiplas classificadas em outra parte

B-206: Doença pelo HIV resultando em pneumonia por pneumocistis carinni

E-149: Diabetes melito não especificado, sem complicações

B-200: Doença pelo HIV resultando em infecções micobacterianas

C-211: Neoplasia de canal anal

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO NºAPTO:.....
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 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.- “A influência da infecção pelo vírus da hepatite G (HGV) na evolução da doença pelo HIV em mulheres”

PESQUISADOR: .José Eduardo Levi

CARGO/FUNÇÃO: Biologista Molecular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 23.407/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

A Sra. está sendo convidada a participar de um estudo sobre a infecção pelo **HGV (Vírus da Hepatite G Humano)**. Embora este vírus tenha este nome, ele não causa hepatite, e até o momento não se conhece nenhuma outra doença causada por ele. O que se descobriu é que o HGV parece ter uma influência benéfica nas pessoas infectadas pelo HIV, aumentando a sobrevida e retardando a evolução da AIDS. Essa informação ainda é debatida entre os pesquisadores e nós queremos verificar se isso, a “proteção” pelo HGV, acontece também em uma população de mulheres infectadas pelo HIV.

Para poder efetuar este estudo precisamos investigar mulheres com HIV que venham sendo acompanhadas há um longo tempo, > 5 anos, com informações precisas de sua evolução clínica, e exames laboratoriais documentados (Carga Viral HIV e CD4), além da existência de amostras coletadas há mais de 5 anos e estocadas corretamente.

Como a Sra. participou em 1997-1999 de um estudo sobre o Papilomavírus Humano (HPV, vírus de infecção genital) existem amostras de seu sangue que foram estocadas e servem para verificar se na época o vírus da hepatite G estava presente. Pretendemos também fazer um teste de seu sangue atualmente, para assim compararmos sua evolução clínica e laboratorial em relação à Aids e se houve alguma influência do HGV nesta evolução.

Sua participação ou recusa em participar deste estudo, ou sua decisão de abandonar o estudo em qualquer momento, não implicará em qualquer alteração na qualidade de seu atendimento médico. Nenhum exame a mais será solicitado ou colhido sem que seja solicitado pelo médico lhe atendendo. Você terá livre acesso a todas informações relativas a esta pesquisa e à sua participação nela, em qualquer momento que desejar. Os dados desta pesquisa serão mantidos em sigilo, sendo disponíveis apenas para o próprio paciente, o médico lhe assistindo e os pesquisadores envolvidos.

Consinto que seja utilizado material de meu sangue colhido no passado e na data atual no estudo científico acima descrito. Entendo que não será realizada nenhuma coleta de exame adicional ao necessário para meu acompanhamento normal. Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200 .

Nome _____

Assinatura _____

Data ___/___/___

(carimbo ou nome Legível) Médico responsável:

Coordenador do Estudo: Dr. José Eduardo Levi – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, fone 11 3062 2645, e-mail : dudilevi@usp.br

Referências:

1. Deinhardt F, Homes 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. Nübling CM, Bialleck H, Fürsch AJ, Scharrer I, Schramm W, Seifried E, Schmidt U, Staszewski S, Löwer J. Frequencies of GB Virus C/Hepatitis G Virus Genomes and Specific Antibodies in German Risk and Non-Risk Populations. *J Med Virol.*1997;53:218-24.
3. Simons JN; Pilot-Matias TJ; Leary TP; Dawson GL; Desai SM; Schlauder GG; Muerhoff AS; Erker JC; Buijk SL; Chalmers ML. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1995;92:3401-5.
4. Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SK, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science.*1996;271:505-8.
5. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, 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.
6. Linnen JM, Fung K, Fry KE, Mizokami M, Ohba K, Wages JM Jr, Zhang-Keck ZY, Song K, Kim JP. Sequence variation and phylogenetic analysis of 5'terminus of hepatitis G virus. *J Virol Hepat.*1997;4:293-302.

7. Lim MY, Fry K, Yun A, Chong S, Linnen JM, Fung K, Kim JP. Sequence variation and phylogenetic analysis of envelope glycoprotein of hepatitis G virus. *J Gen Virol.*1997;78:2771-7.
8. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new member of the *Flaviviridae* associated with GB agent hepatitis. *J Virol.*1995;69:5621-5630.
9. Lefrère JJ, Férec C, Roudot-Thoraval F, Cantaloube JF, Biagini P, Mariotti M, LeGac G, Mercier B. GBV-C/Hepatitis G Virus (HGV) RNA load in immunodeficient Individuals and in Immunocompetent Individuals. *J Med Virol.*1999;59:32-7.
10. Li C, Collini P, Danso K, Owusu-Ofori S, Dompereh A, Candotti D, Opare-Sem O, Allain J-P. GB virus C and HIV-1 RNA load in single virus and co-infected West African individuals. *Aids.*2006;20:379-86.
11. Tucker TJ, Smuts HE, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC, Kirsch RE. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol.*2000;61:52-8.
12. Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, Moyer LA, Meeks EL, Krawczynski K, Kim JP, Margolis HS. Acute non-A-E Hepatitis in the United States and the role of Hepatitis G Virus Infection. *N Engl J Med.*1997;336:741-6.
13. Halasz R; Weiland O; Sällberg M. GBV virus C/hepatitis G virus. *Scand J Infect Dis.* 2001;33:572-80.
14. 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.
15. Fried MW, Khudyakov YE, Smallwood GA, Cong M, Nichols B, Diaz E, Siefert P, Gutekunst K, Gordon RD, Boyer TD, Fields HA. Hepatitis G virus

-
- co-infection in liver transplant recipients with chronic hepatitis C and non-viral chronic liver disease. *Hepatology*.1997;25:1271-5.
16. Kuroki T, Nishiguchi S, Tanaka M, Enomoto M, Kobayashi K. Does GBV-C cause fulminant hepatitis in Japan? *Lancet*.1996;347:908.
 17. Sallie R, Shaw J, Mutimer D. GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet*.1996;347:1552.
 18. Kanda T, Yokosuka O, Ehata T, Maru Y, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y, Omata M. Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*.1997;25:1261-5.
 19. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, Kim JP. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med*.1997;336:741-54.
 20. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, Kratochvil J, Hunt J, Qiu X, Lou SC, Pichlmayr R, Manns MP. Antibodies against GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*.1998;28:379-84.
 21. Pessoa MG, Terrault NA, Ferrell LD, Kim JP, Kolberg J, Detmer J, Collins ML, Yun AJ, Viele M, Lake JR, Roberts JP, Ascher NL, Wright TL. Hepatitis G virus in patients with cryptogenic liver disease undergoing liver transplantation. *Hepatology*.1997;25:1266-70.
 22. Hassoba HM, Pessoa MG, Terrault NA, Lewis NJ, Hayden M, Hunt JC, Qiu X, Lou SC, Wright TL. Anti-envelope antibodies are protective against GBV-C reinfection: evidence from the liver transplant model. *J Med Virol*.1998;56:253-8.

-
23. Simons JN, Desai SM, Mushahwar IK. The GB viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;242: 341-75.
 24. Bertoletti A, D'Elia MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Could HGV infection be implicated in lymphoma genesis? *Br J Haematol.*1997;98:778-9.
 25. Fargion S, Sampietro M, Francanzani AL, et al. Hepatitis G virus in patients with porphyria cutanea tarda (PCT). *J Hepatol.*1997; 26(Suppl): 207.
 26. Berzsényi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: Insights into co-infection. *J Clin Virol.*2005;33:257-66.
 27. Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Suzuki H, Mizokami M, Kameyama T, Tanikawa K. GB virus infection in patients with oral cancer and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.*1997;26:138-41.
 28. Frey SE, Homan SM, Sokol-Anderson M, Cayco MT, Cortorreal P, Musial CE, Di Bisceglie A. Evidence for Probable Sexual Transmission of the Hepatitis G Virus. *Clin Inf Dis.*2002;34:1033-8.
 29. Lightfoot K, Sketon M, Kew MC, Yu MC, Kedda MA, Coppin A. Does hepatitis GB virus-C infection cause hepatocellular carcinoma in black Africans? *Hepatology.*1997;26:740-2.
 30. Strauss E, Gayotto LCC, Fay F, Fay O, Fernandes HS, Chamone DAF. Liver histology in co-infection of hepatitis C virus (HCV) and hepatitis G virus (HGV). *Rev Inst Med Trop S Paulo.*2002;44:67-70.
 31. Leão-Filho GC, Lopes EPA, Ferraz AAB, Moura I, Pernambuco JR, Reis C, Silva AEB, Ferraz MLG. Hepatitis G Virus Infection in Patients with Hepatocellular Carcinoma in Recife, Brazil. *Jpn J Clin Oncol.*2007;37:632-6.

-
32. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Tomasoni V, Portera G. A case-control study on GB virus C/hepatitis G virus infection and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*.1997;26:1653-7.
 33. Moriyama M, Matsumura H, Shimizu T, Shioda A, Kaneko M, Saito H, Miyazawa K, Tanaka N, Sugitani M, Komiyama K, Arakawa Y. Hepatitis G virus coinfection influences the liver histology of patients with chronic hepatitis C. *Liver*.2000;20:397-404.
 34. Yuan JM, Govindarajan S, Gao YT, Ross RK, Yu MC. Prospective evaluation of infection with hepatitis G virus in relation to hepatocellular carcinoma in Shanghai, China. *J Infect Dis*.2000;182:1300-3.
 35. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, Marshall R, Astemborski J, Nelson KE. Association of antibody to GB Virus C (Hepatitis G Virus) with viral clearance and protection from reinfection. *J Inf Dis*.1998;177:539-42.
 36. Reshentnyak VI, Karlovich TI, Ilchenko LU. Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol*.2008;14:4725-34.
 37. Goodnough LT. Medical Progress: Transfusion Medicine. *N Engl J Med*. 1999;340:438-47.
 38. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CM, Bassit L, Chamone DF, Focaccia R, Eluf-Neto J, Sabino EC. Prevalence of GB virus C (hepatitis C virus) and risk factors for infection in Sao Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:438-43.
 39. Bisceglie AM. Hepatitis G Virus Infection: a work in Progress. *Ann Intern Med*.1996;125:772-3.
 40. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus co-infection on the course of HIV infection in Hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr*.1998;17:209-13.

-
41. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, Hunt J, Jou C, Solomon N, Schmidt RE, Manns MP. GB virus C/hepatitis G virus Infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis.*1998;177:1723-6.
 42. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, Liu C, Phair J, Margolick JB, Zdunek D, Hess G, Stapleton JT. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV Infected Men. *N Engl J Med.*2004;350:981-90.
 43. Giret MTM, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, Nishiya A, Diaz RS, Sabino EC, Palacios R, Kallas EG. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS.*2009;23:1-11.
 44. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, Goeren B, Detmer J, McMorrow M, Stoll M, Schmidt RE, Manns MP. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001;345:715-24.
 45. Sabin CA, Devereux H, Kinson Z, et al. Effect of co-infection with hepatitis G virus on HIV disease progression in hemophilic men. *J Acquir Immune Defic Syndr.*1999;19:546-7.
 46. Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta and SDF-1. *Lancet.*2004;363(9426):2040-6.
 47. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, Pomerantz RJ, Cacopardo B. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med.*2003;139:26-30.

-
48. Tillmann HL, Manns MP, Claes C, Heiken H, Schmidt RE, Stoll M. GB virus C infection and quality of life in HIV-positive patients. *AIDS Care*.2004;16:736-43.
 49. 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.
 50. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WWY, Mo T, Wynhoven B, Hogg RS, Montaner JSG, O'Shaughnessy MV, Harrigan R. No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS*.2002;16:1929-33.
 51. Birk M, Lindbäck S, Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS*.2002;16:2482-5.
 52. Abe K. GB virus-C/hepatitis G virus. *Jpn J Infect Dis*.2001;54:55-63.
 53. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepatitis*.2009;16:757-68.
 54. Berzsenyi MD, Roberts SK. What Is The Role of GB Virus C Infection in Hepatitis C Virus/HIV Coinfection? *J Infec Dis*.2006;194:407-9.
 55. Tucker TJ, Smuts HE. GBV-C/HGV Genotypes: Proposed Nomenclature for Genotypes 1-5. *J Med Virol*.2000;62:82-3.
 56. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, Fachini R. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop São Paulo*.2003;45:75-8.

-
57. Oliveira LA, Martins RM, Carneiro MA, Teles SA, Silva SA, Cardoso DD, Lampe E, Yoshida CF. Prevalence and genotypes of GB vírus C/hepatitis G vírus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2002;97:953-7.
 58. Nishiya AS, Ribeiro-dos-Santos G, Bassit L, Focaccia R, Chamone DF, Sabino EC. Genotype distribution of the GB vírus C in citizens of São Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.2003;45:213-6.
 59. Bassit L, Kleter B, Ribeiro-dos-Santos G, Maertens G, Sabino E, Chamone D, Quint W, Saéz-Alquézar A. Hepatitis G virus: Prevalence and Sequence Analysis in Blood Donors of São Paulo, Brazil. *Vox Sang*.1997;74: 83-7.
 60. Stapleton JT. GB Virus Type C/Hepatitis G Virus. *Sem Liver Dis*.2003; 23:137-48.
 61. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB vírus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Medicine*.2006;7:25-31.
 62. Dawson GF, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Thiele D, Leary TP, Murphy P, Rosenblatt JE, Simons JN, Martinson FEA, Gutierrez RA, Lentino JR, Pachucki C, Merhoff AS, Widell A, Tegtmeier G, Desai S, Mushahwar IK. Prevalence Studies of GB Virus-C Infection Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol*.1996;50:97-103.
 63. Santos NJS, Tayra A, Silva SR, Buchalla CM, Laurenti R. A aids no Estado de São Paulo. As mudanças no perfil da epidemia e perspectivas da vigilância epidemiológica. *Rev Bras Epidemiol*.2002;5:286-310.
 64. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Boletim Epidemiológico – Aids*. Ano V nº 01-27^a a 52^a semanas epidemiológicas – Janeiro a Julho de 2008.

-
65. Jung S, Knauer O, Donhauser N, Eichenmüller M, Helm M, Fleckenstein B, Reil H. Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS*.2005;19:1267-72.
 66. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN 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.
 67. Xiang J, Daniels KJ, Soll DR, Schimidt WN, LaBrecque DR, Stapleton JT. Visualization and characterization of GB virus-C particles: evidence for a nucleocapsid. *J Vir Hep*.2002;6(Sup1):16-22.
 68. Maidana MT, Sabino EC, Kallas EG. GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *T Braz J Infect Dis*.2005;9:122-5.
 69. Hassoba HM, Pessoa MG, Terrault NA, Lewis NJ, Hayden M, Hunt JC, Qiu X, Lou SC, Wright TL. Anti-envelope Antibodies Are Protective Against GBV-C Reinfection: Evidence From the Liver Transplant Model. *J Med Virol*.1998;56: 253-8.
 70. Gutierrez RA, Dawson GJ, Knigge MF, Melvin SL, Heynen CA, Kyrk CR, Young CE, Carrick RJ, Schlauder GG, Surowy TK, Dille BJ, Coleman PF, Thiele DL, Lentino JR, Pachucki C, Mushhwar IK. Seroprevalence of GB Virus C and Persistence of RNA and Antibody. *J Med Virol*.1997;53:167-73.
 71. Björkman P, Flamholc L, Nauclicr A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS*.2004;18:877-86.
 72. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, Schmitt C, Fritsch S, Lang JM, Stoll-Keller F. 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

-
73. Polgreen PM, Xiang J, Chang Q, Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individual. *Microbes Infect.*2003;5:1255-61.
 74. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, Stapleton JT. Effect of co-infection with GB virus C (hepatitis G virus) on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med.*2001;345:707-14.
 75. Moiser DE, Chisari FV. GB virus C and mortality from HIV infection. *N Engl J Med.*2002;346:377-9.
 76. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis.*2006;193:451-4.
 77. Li C, Collini P, Danso K, Owusu-Ofori S, Dompok A, Candotti D, Opare-Sem O, Allain J-P. GB virus C and HIV-1 RNA load in single virus and co-infected West African individuals. *AIDS.*2006;20:379-86
 78. Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization. *J Biol Chem.*2002;277:17291-9.
 79. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor down modulation. *Virology.*1997;234:340-8.
 80. Nattermann J, Nischalke H-D, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in Hepatitis G virus infection. *AIDS.*2003;17:1457-62.
 81. Levi JE, Fink MCS, Canto CLM, Carretiero N, Matsubara R, Linhares I, Dores GB, Castelo A, Segurado A, Uip DE, Neto JE. Human Papillomavirus Prevalence Viral Load and Cervical Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Women. *Braz J Infect Dis.*2002;6:129-34.

-
82. Machado AA, Costa JC. Métodos Laboratoriais para o Diagnóstico da Infecção Pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). *Medicina* (Ribeirão Preto).1999;32:138-46.
 83. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica*. 3ed. Porto Alegre:Artmed; 2008.
 84. Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. Hepatitis B and C in HIV-infected patients. *J Hepatol*.1997;27:18-24.
 85. Baggio-Zappia GL, Granato CFH. HIV-GB virus C co-infection: an overview. *Clin Chem Lab Med*.2009;47(1):12-19.
 86. Barbosa AJ, Baggio-Zappia GL, Dobo C, Alves-Sousa VK, Lanzara GA, Guerreiro da Silva IDC, Lanzoni VP, Granato CFH. Analysis of GB virus C infection among HIV-HCV coinfecting patients. *Rev Soc Bras Med Trop*.2009; 42(5):591-3.
 87. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, Burgisser P, Erb P, Boggian K, Piffaretti J-C, Hirschel B, Janin P, Francioli P, Flepp M, Telenti A. 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.
 88. Rodrigues 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.
 89. Bronhara B, Conde WL, Liciardi DC, França-Junior I. Vinculação determinística de banco de dados sobre mortalidade por aids. *Rev Bras Epidemiol*.2008;11:709-13.

90. Cunha AC; Freddi MJAL; Crestana MF; Aragão MS; Cardoso SC; Lombardi VV. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. 2. ed. São Paulo: SBD-FMUSP. 2005.

91. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB Virus Type C: a Beneficial Infection? *J Clin Microbiol*.2004;42:3915-19.