

DAYANE ALVES COSTA

**IMPACTO DA INFECÇÃO INCIDENTE PELO GBV-C NA ATIVAÇÃO
CELULAR EM PESSOAS QUE VIVEM COM O VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

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

SÃO PAULO

2017

DAYANE ALVES COSTA

**IMPACTO DA INFECÇÃO INCIDENTE PELO GBV-C NA ATIVAÇÃO
CELULAR EM PESSOAS QUE VIVEM COM O VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

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

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Dayane Alves.

Impacto da infecção incidente pelo GBV-C na ativação celular em pessoas que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) / Dayane Alves Costa. -- São Paulo, 2017.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.HIV 2.Síndrome de imunodeficiência adquirida 3.Coinfecção 4.Vírus GB C 5.Ativação linfocitária 6.Imunomodulação

USP/FM/DBD-146/17

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Teresinha e Gabriel, que desde sempre me incentivaram e me apoiaram, doando-me amor e acreditando nos meus sonhos.

Aos meus Tios e Pais de amor, Maria Júlia e Edmilson.

Aos meus avós, João (*In memoriam*) e minha Mainha Otília que deram um amor incondicional e foram exemplos de dignidade.

A minha irmã, meu maior exemplo de ética e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Esper Georges Kallás, pela confiança depositada em mim. Obrigada pela grande oportunidade profissional e pessoal, só tenho que agradecer por todos os ensinamentos. Obrigada por tanta paciência.

Aos meus Pais, por tanto amor e dedicação em todos esses anos. A minha irmã, pelos conselhos e ajuda na reta final. À minha Madrinha, por todo amor doado e auxílio em todas as fases da minha vida.

Ao Raphael, por todo o carinho e ajuda nessa etapa da minha vida. Só tenho que agradecer pelos incentivos.

Aos meus familiares que me incentivaram mesmo à distância.

A todos do Laboratório de Investigação Médica- LIM-60: Carla Crude, Lucas, Karine, Cassia, Juliana, Alvino, Vinicius, Mariana, Nadila, Angelica, Carlos, Ruth, Ederson e Aline. Em especial à Cândida, Helena, Claudia, Eleni e Issler pelo apoio e ajuda, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Vivian por ter me auxiliado nas etapas de análise de dados. Muito obrigada por ter me ajudado em uma das etapas mais complicadas e difíceis desse processo.

Aos meus amigos que me ajudaram a suportar essa fase de distanciamento. Em especial ao Geyson e a Marina que me ajudaram desde o começo.

À minha companheira e amiga, Priscilla Ramos Costa, pelo auxílio ao longo desses anos, tornando meus dias mais felizes e meus experimentos mais alegres.

À minha amiga e Mãezona, Marilene Zanni, por tudo que fez por mim, só tenho que agradecer pelo acolhimento e ajuda.

Aos Mestres que foram fundamentais para minha formação acadêmica e pessoal, em especial ao Antônio Filho e Rivelilson (*In memoriam*).

Aos voluntários, por terem doado à Ciência uma parte de suas vidas com altruísmo e crença em uma melhoria de vida para todos.

À Universidade de São Paulo por ter aberto as portas para que eu pudesse sonhar e realizar uma Pós-graduação de alto nível e com excelência.

Ao Programa de Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia pela oportunidade de conviver com bons profissionais com promoção das melhores discussões científicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter apoiado esse projeto com financiamento da bolsa para minha permanência na Pós-graduação.

À Deus por abençoar essa jornada que para mim foi a mais difícil da minha vida.

Muito Obrigada.

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena

Fernando Pessoa

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	i
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de tabelas anexas	v
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	11
1.1 HIV	11
1.2 HIV e a coinfeção com o GBV-C	13
1.3 Ativação, senescência e exaustão celular na infecção causada pelo HIV	18
2. Justificativa	21
3. Hipóteses	23
4. Objetivos	25
5.1 Objetivo Geral.....	25
5.2 Objetivos específicos	25
5. Métodos	27
5.1 Seleção dos pacientes	27
5.2 Detecção do GBV-C	28
5.2.1 Extração de RNA	29
5.2.2 Síntese de cDNA	29
5.2.3 Construção de uma curva relativa para a reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT- PCR)	29
5.2.4 Construção de uma curva plasmidial para a reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT- PCR)	29
5.2.5 Quantificação do GBV-C por qPCR em tempo real	33
5.3 Padronização da marcação de superfície e intracelular para avaliação por citometria de fluxo	32

5.4 Análise estatística	36
6. Resultados	37
6.1 Descrição dos dados da coorte	38
6.2 Avaliação do perfil de ativação, senescência e exaustão celular nas células T CD4+ e CD8+	40
6.3 Avaliação do perfil de ontogenia em relação à ativação, senescência e exaustão celular nas subpopulações de células T CD4+ e CD8+	46
7. Discussão	52
8. Conclusão	58
9. Referências	59
10. Anexos	65
11. Manuscrito	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AmCyan	Proteína encontrada na <i>Anemonona magano</i>
APC	Allophycocyanin (Aloficocianina)
ART	<i>Antiretroviral Therapy</i> (Terapia antirretroviral)
BD	Becton Dickinson
CCR5	<i>Chemokine Receptor</i> da quimiocina C-C tipo 5
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CXCR4	Receptor da quimiocina C-X-C tipo 4
DENV	Vírus da dengue
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMO	Fluorescência menos um (<i>Flourescence-minus-one</i>)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBV-C	Vírus GB tipo C
GPFA	Proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C
HANK'S	Solução salina balanceada modificada
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
LIM-60	Laboratório de Investigação Médica-60
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>

MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mL	Militro
mm³	Milímetros cúbicos
MSM	<i>Men Who Have Sex With Men</i> (Homens que fazem sexos com homens)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão de salina e fosfato)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação de cadeia polimerase)
PDL-1	Ligante da molécula de morte celular programada
qRT-PCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
STARHS	Algoritmo de teste sorológico para soroconversão recente para HIV.
TARV	Tratamento antirretroviral
uL	Microlitro
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do HIV	3
Figura 2.	Genoma do GBV-C e do vírus da Hepatite C	5
Figura 3.	Figura ilustrativa dos mecanismos envolvidos na coinfeção do GBV-C e HIV-1	7
Figura 4.	Estratégia para a identificação da infecção por GBV-C.....	19
Figura 5.	Representação esquemática do plasmídeo pUC57	22
Figura 6.	Estratégia de análise da citometria de fluxo das células T CD4+ e CD8+ dos pacientes coinfectados com HIV-1 e GBV-C.....	26
Figura 7.	Análise da diferença (Δ V1-V0) de células T CD4+ e CD8+ nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C	30
Figura 8.	Análise da diferença (Δ V1-V0) da contagem de células T CD4+ e CD8+ expressando CCR5, CD38 e HLA-DR nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-	31
Figura 9.	Análise da diferença (Δ V1-V0) da contagem de células T CD4+ e CD8+ coexpressando CCR5, CD38 e HLA-DR nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-.....	32
Figura 10.	Análise da diferença (Δ V1-V0) da contagem de células T CD4+ e CD8+ coexpressando PD-1/CCR5 e PD-1/CD95 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-.....	33
Figura 11.	Análise da diferença (Δ V1-V0) da contagem de células T CD4+ e CD8+ expressando PD-1, CD57, CD95 e CD28 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-.....	34
Figura 12.	Análise da diferença de ontogenia das células T CD4+ e CD8+ expressando PD-1, CD57, CD95 e CD28 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-.....	36
Figura 13.	Análise da diferença da contagem de células T CD4+ e CD8+ naïve expressando CCR5, CD38 e PD-1 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-.....	37
Figura 14.	Análise da diferença da ontogenia das células T CD4+ e CD8+ de memória central expressando CCR5, CD38 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Painel utilizado na citometria de fluxo	24
Tabela 2.	Características dos pacientes do estudo.....	29

LISTA DE TABELAS ANEXAS

Tabela 1.	Características dos participantes à inclusão	56
Tabela 2.	Diferenças (Δ V1-V0) em marcadores celulares, conforme status do GBV-C	64

RESUMO

Costa DA. Impacto da infecção incidente pelo GBV-C na ativação celular em pessoas que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A epidemia HIV/AIDS é um grave problema de saúde enfrentado no Brasil e no mundo. Desde o surgimento do vírus, na década de 80, muitos esforços foram realizados para esclarecer o curso da infecção que resulta no comprometimento do sistema imune em indivíduos sem tratamento. A ativação imune crônica pode levar a um status de imunossenescência exacerbada, morte celular, alteração da resposta imune e uma imunodeficiência generalizada. Percebe-se que diversos fatores do hospedeiro interferem na progressão para Aids, como deleção de 32 pares de base do gene CCR5 (CCR5 Δ 32), perfis de HLA desfavoráveis (*B35) e coinfeções, principalmente citomegalovírus, tuberculose e hepatites B e C. Estudos recentes com o GBV-C, pertencente à família Flaviviridae, gênero Pegivirus, possibilitaram uma nova perspectiva no entendimento do curso da infecção causada pelo HIV, uma vez que nenhuma doença foi relacionada à presença do vírus GB tipo C, além de promover um atraso na progressão para a Aids e aumento da sobrevida dos pacientes portadores do vírus. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de ativação, senescência e exaustão celular em indivíduos recém-infectados pelo HIV-1 e coinfectados pelo GBV-C. Foram investigados a contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, razão CD4/CD8, presença do GBV-C e HIV-1, além da análise da expressão de marcadores de ativação (CCR5, CD38 e HLA-DR), senescência e exaustão celular (PD-1, CD95, CD57 e CD28). Diante dos critérios de inclusão do estudo, foram selecionados nove pacientes com infecção persistente com o vírus GBV-C para o grupo 1 (HIV-1⁺/GBV-C⁺), e oito pacientes sem viremia para GBV-C foram incluídos no grupo 2 (HIV-1⁺/GBV-C⁻), sendo a média de idade dos pacientes selecionados de 31,6 e 31,7 anos, respectivamente, sexo masculino e homens que fazem sexo com homens (HSH). Na visita de inclusão no estudo (V1) nenhum dos dados analisados (células T CD4⁺ e CD8⁺, carga viral e razão CD4/CD8) apresentou diferença estatística, assim como os marcadores de ativação, senescência e exaustão celular. Na análise longitudinal da diferença ($\Delta V_n - V_1$), percebeu-se uma diminuição dos marcadores de ativação e

senescência no grupo HIV-1+/GBV-C +, sem significância estatística entre esses dados. Foi observado, contudo, que houve uma diminuição de células T CD4+ e CD8+ naïve no grupo HIV-1+/GBV-C+, também notou-se redução na subpopulação de células T CD8+ naïve e memória central expressando CD28, houve uma diminuição das subpopulações de memória intermediária e efetora terminal, assim como na subpopulação efetora terminal expressando HLA-DR+, no grupo HIV-1+/GBV-C+. Os resultados demonstraram que a infecção pelo GBV-C reflete na diminuição da estimulação imune, ativação celular e também na redução de marcadores de senescência e exaustão celular nas subpopulações de células T, sugerindo um envolvimento na modulação da progressão do HIV.

Descritores: HIV; síndrome de imunodeficiência adquirida; coinfeção; vírus GBV-C; ativação linfocitária; imunomodulação.

ABSTRACT

Costa DA. The impact of GBV-C incident infection on cell activation in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. [PhD Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

The HIV/AIDS epidemic is a serious health problem in Brazil and in the world. Since its emergence in the 1980s, many efforts have been made to understand this infection, resulting in a compromised immune system if left untreated. Chronic immune activation may lead to exacerbated immunosenescence, cell death, altered immune response, and a generalized immunodeficiency. Several host factors play an important role in the progression to AIDS, such as the 32 base pairs deletion in the CCR5 gene (CCR5 Δ 32), unfavorable HLA molecules (*B35), and coinfections, mainly cytomegalovirus, tuberculosis, and hepatitis B and C. Recent studies with the GBV-C (*Flaviviridae* family, genus Pegivirus) have provided a new perspective in the understanding of the HIV infection natural history. GBV-C coinfection delays progression to Aids and increases patient survival. In addition, no symptoms have been associated to its occurrence. The aim of this study was to evaluate the profile of cellular activation, senescence, and exhaustion in recently HIV-infected individuals coinfecting with GBV-C. Patients were selected from a prospective cohort diagnosed with recent HIV-1 infection with known results for levels of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, CD4/CD8 ratio, GBV-C plasma levels, HIV-1 plasma viremia, and markers for cellular activation (CCR5, CD38, and HLA-DR) and senescence and exhaustion (PD-1, CD95, CD28, and CD57). Nine presented persistent GBV-C infection and were selected for group 1 (HIV-1/GBV-C⁺), mean age of 31.6 years. Another set of eight patients without GBV-C viremia were selected as controls and included in group 2 (HIV-1/GBV-C⁻), mean age of 31.7 years. All participants were male, in most cases men who have sex with men (MSM). At baseline visit (V1), no variable (levels of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, viral load, CD4/CD8 ratio, and cellular activation, senescence, and exhaustion markers) presented no statistical significant differences, suggesting that all selected patients shared similar characteristics. Longitudinal analysis (Δ , V_n-V1) revealed a non-significant decrease in activation and senescence markers for both groups. However, it was observed a decrease in naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells in group 1, and also a

reduction in the subpopulations of naïve and central memory (CD28+) CD8+ T cells. The HIV+/GBV-C+ group also presented diminished intermediate memory and terminal effector subpopulations, as well a decrease in HLA-DR+ terminal effector cells. The data demonstrate that GBV-C infection results in reduced immune stimulation, cellular senescence, and cell exhaustion, suggesting an involvement in the modulation of HIV progression.

Descriptors: HIV; acquired immunodeficiency syndrome; coinfection; GB virus C; lymphocyte activation; immunomodulation

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIV

Desde a detecção da epidemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na década de 80 diversos estudos foram realizados na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nessa infecção, que promove uma doença crônica, caracterizada por diminuição de linfócitos T auxiliares (CD4), causando uma imunodeficiência progressiva e generalizada, com presença de infecções oportunistas (1). Essa doença é denominada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (2).

A defesa contra diversos microrganismos que invadem nosso organismo é essencial para proteção de funções importantes e qualquer falha nesses mecanismos pode causar uma série de consequências danosas ao corpo humano, pois essa defesa é formada por células, tecidos, moléculas e barreiras como a pele e mucosas que em homeostase promovem uma cascata de reações que combatem essa invasão, protegendo o indivíduo (3).

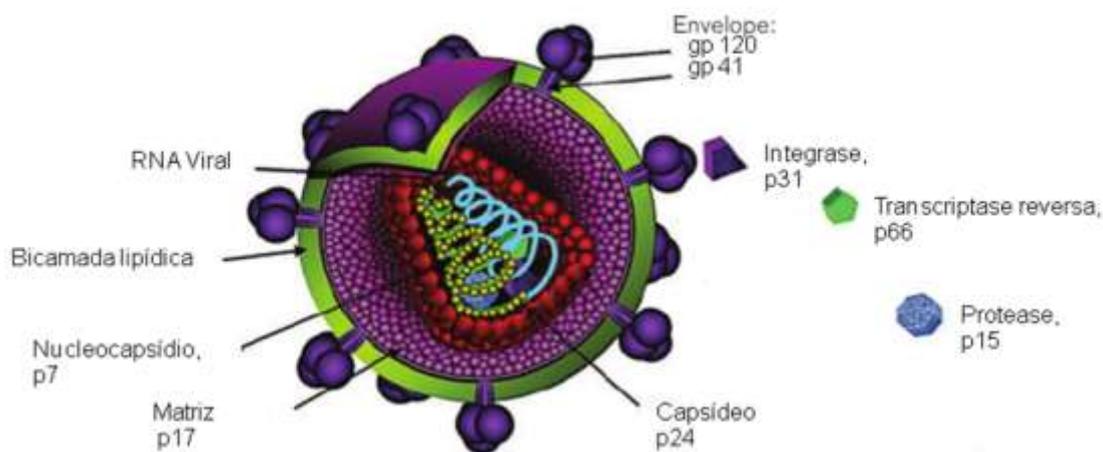
No entanto, quando há uma alteração nos processos que levam à resposta imune, seja por falhas nessa resposta, seja por mecanismos microbianos que prejudicam a resposta imune, há várias consequências ao organismo infectado pelo HIV, incluindo perda do controle da infecção, inflamação e morte de células e tecidos envolvidos (4, 5).

Diante desse grave problema de saúde pública enfrentado no Brasil e no mundo, há diversos estudos com o objetivo de esclarecer a os mecanismos envolvidos na doença e melhorar as estratégias para o combate dessa infecção, buscando uma melhor qualidade de vida de quase 40 milhões de pessoas. Segundo dados da OMS (Organização Mundial da Saúde), existem 70 milhões de pessoas foram infectadas desde o começo da epidemia no mundo, e já ocorreram mais de 35 milhões de mortes. Em 2015, foram 2,1 milhões de novas pessoas infectadas, somente no Brasil estima-se que no ano de 2015, 830.000 mil brasileiros estavam infectados com o vírus o HIV e detectados 44.000 novos casos e 15.000 mortes (6).

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *lentivírus* e possui dois tipos, quais sejam: HIV tipo 1 e HIV tipo 2, prevalece o tipo 1 como causador da epidemia global. O genoma deste vírus possui 9,2 kb, é constituído por duas fitas de RNA envolvidas por uma camada de proteínas com envelope, sendo formado por uma

sequência LTR nas suas duas extremidades, que regula a expressão genética e a integração do vírus no hospedeiro.

Além disso, a porção gag codifica as proteínas virais e a env codificam as glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope. Por outro lado, a porção pol é responsável pela transcriptase reversa, pela integrase e por enzimas importantes para a replicação viral. Os genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*, codificam proteínas regulatórias e acessórias (7) Figura 1.



Fonte: Adaptado de Steckbeck e colaboradores. J Gen Virol. 2013 Jan; 94: 1–19.

Figura 1- Estrutura do HIV.

Muitos esforços foram feitos ao longo das últimas décadas, resultado em vários avanços no combate à epidemia de HIV/AIDS. A disponibilidade de antiretrovirais mais eficazes proporcionaram melhor qualidade de vida aos indivíduos infectados pelo HIV. Apesar desses esforços, ainda não há cura para a infecção, por isso, diversas estratégias estão sendo realizadas com o intuito de diminuir o número de novas infecções, como a Profilaxia Pré-Exposição (PrEP), que tem como objetivo proteger os indivíduos que tenham maior vulnerabilidade para contrair o HIV por via sexual (8, 9). Outras formas de tratamento, prevenção e mecanismos de combate à infecção pelo HIV estão sendo exploradas.

1.2 HIV e a coinfeção com GBV-C

Diante dessa epidemia, surgiu uma nova perspectiva quando diversos trabalhos sugeriram que os pacientes coinfectados com o GBV-C tinham uma progressão mais favorável, com sobrevida maior e retardo no desenvolvimento da imunodeficiência, comparado aos indivíduos infectados somente pelo HIV sem infecção pelo GBV-C (10-13). Em 1998, Toyoda e colaboradores publicaram um estudo com pacientes hemofílicos que apresentou uma associação favorável entre GBV-C e o HIV (14). Tais estudos demonstraram que houve uma significativa melhora no prognóstico desta coinfeção em uma coorte no Japão e estes pacientes estariam se beneficiando na progressão para a AIDS. O HPgV ou GBV-C era um vírus desconhecido e passou a figurar como uma potencial nova estratégia no tratamento da epidemia HIV/AIDS.

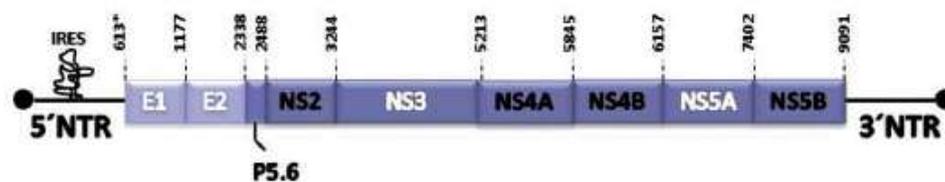
Aproximadamente duas décadas atrás, o vírus denominado *Pegivírus* humano (Atualmente HPgV, originalmente chamado de vírus GBV-C e/ou vírus da Hepatite G) foi descrito por dois laboratórios independentes em pacientes com hepatite aguda de etiologia desconhecida (15-17). Ele foi denominado vírus da hepatite G devido à semelhança genômica com o vírus da hepatite C (HCV), mostrado na figura 2 (18). A princípio, todos os estudos sobre o GBV-C tentaram associar sua infecção com patologias envolvendo doenças hepáticas (19-22). No entanto, estes estudos não demonstraram associação entre a presença do GBV-C a nenhum tipo de hepatite e também não foi associado com nenhuma doença até o momento.

Esta falta de associação foi posteriormente explicada quando Fogeda e colaboradores (1999) demonstraram que o GBV-C é um vírus linfotrópico e não hepatotrópico, como fora suposto (23, 24). Desde 1998, vários artigos descreveram efeitos positivos sobre a infecção por GBV-C em pacientes infectados pelo HIV, melhorando seu prognóstico e sua sobrevida (10, 11, 14, 25-27). Por isso, as investigações sobre o papel que a infecção por esse vírus desempenha no curso de infecção pelo HIV aumentaram significativamente, porém detalhes sobre a biologia do vírus e os mecanismos pelos quais ela interfere na infecção pelo HIV não foram totalmente esclarecidos.

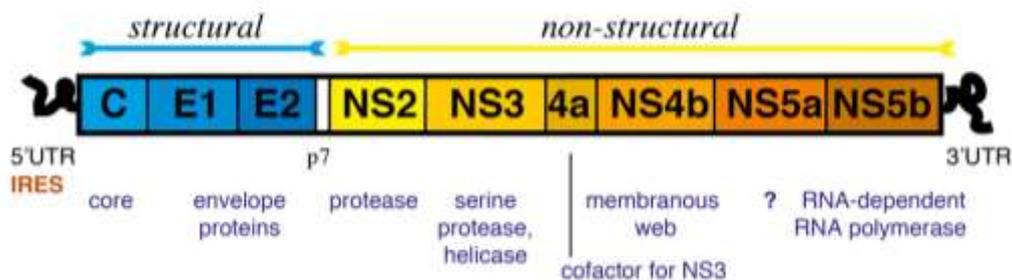
O GBV-C pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pegivírus*, que são ubíquos em mamíferos (28, 29). O seu genoma, de aproximadamente 9400 nucleotídeos, é

composto por uma única fita de RNA (ssRNA) de sentido positivo, flanqueado por regiões não traduzidas (NTR) nas extremidades 3' e 5' (16, 18). O GBV-C tem uma fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos. A poliproteína traduzida é processada por proteases hospedeiras e por proteases de vírus em nove proteínas diferentes: duas proteínas estruturais (E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (p5.6, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b) (30). Assim como no HCV, o Pegivírus humano apresenta um local de entrada ribossomal interna (IRES) em 5'NTR, que recruta subunidades ribossômicas e fatores de tradução (31) **Figura 2.**

A



B



Fonte: Adaptado de Arroyave e colaboradores. *Rev Chilena Infectol*, 2013; 30(1): 31-4.

Figura 2- (A) Estrutura do genoma do GBV-C. (B) Estrutura do genoma do vírus da Hepatite C. Essa figura mostra a semelhança entre os dois vírus.

Em relação à variabilidade genética do vírus GBV-C, há seis genótipos diferentes descritos no mundo: genótipo 1 predomina na África Ocidental, o genótipo 2 na Europa e na América, genótipo 3 na Ásia, os genótipos 4 no sudoeste da Ásia, 5 na África do Sul, o genótipo 6 foi encontrado na Indonésia (32-38).

No Brasil, os estudos genotípicos mostram os vários subtipos de GBV-C com frequência entre 8 a 50% entre os subtipos 2a e 2b (39, 40), mostrando uma variação que depende de vários fatores, como região prevalente e estado imunológico. Um estudo recente sobre a distribuição dos genótipos do GBV-C entre os pacientes brasileiros infectados pelo HIV-1 determinou que 30% dos pacientes sob terapia antirretroviral apresentam co-infecção com GBV-C com presença dos subtipos 1 (10%), 2a (41%), 2b (43%) e 3 (6%) (40).

A infecção pelo GBV-C tem uma distribuição mundial. Como demonstrado por vários estudos, é um vírus linfotrópico e sua infecção já está bem caracterizada nos linfócitos T e B (41), havendo alguns estudos que mostraram a infecção deste vírus em macrófagos, monócitos e células NK (42). Esse vírus causa uma infecção persistente e assintomática com carga viral elevada, estima-se que cerca de 30% das infecções permanecem crônicas, e que em 75% das infecções há desenvolvimento de anticorpos neutralizantes após aproximadamente dois anos de infecção (43, 44). A proteína E2 indica depuração da infecção pelo GBV-C e parece conferir proteção parcial contra novas infecções, na maioria dos casos apresenta viremia detectável após a fase aguda de anticorpos contra a proteína E2 do vírus circulante. (45, 46). A produção de anticorpos e a cinética de depuração do vírus permanecem pouco conhecidas, uma vez que poucos estudos examinaram indivíduos infectados por um longo período. No entanto, vários mecanismos foram descritos ao longo dos últimos anos justificando os motivos pelos quais um vírus de RNA (sem intermediários replicativos de DNA conhecidos) mantém uma viremia persistente, como regiões hipervariáveis de proteína E2, mutação em epítomos de células T e interferência de proteínas de vírus em sinalização celular (47, 48). Nos países desenvolvidos, o GBV-C não foi associado a qualquer doença grave até o momento e não faz parte dos testes de rotina do sangue utilizado para doação. Estima-se que 1-5% dos doadores de sangue saudáveis já tenham sido infectados pelo GBV-C (12, 49, 50). Nos EUA, estima-se que 1000 indivíduos são infectados diariamente por derivados de sangue.

Por compartilharem as mesmas vias de infecção (parenteral, sexual e vertical), a coinfeção do GBV-C e HIV têm uma prevalência considerada alta, atingindo até 40% entre os soropositivos para HIV (51-53). Além da alta prevalência, em indivíduos coinfectados por GBV-C/HIV, a viremia é persistente comparativamente a indivíduos

não infectados pelo HIV, por vários mecanismos ainda não totalmente compreendidos, relacionados a um melhor prognóstico desses indivíduos (54). A presença prolongada de viremia de GBV-C em indivíduos infectados pelo HIV já foi associada a uma diminuição da carga viral do HIV, aumentando a contagem de linfócitos T CD4+, e também, uma melhor resposta ao tratamento antirretroviral (10, 11, 25, 55-57). Nos casos em que ocorreu a depuração da viremia de GBV-C todos esses efeitos protetores foram perdidos, indicando que é necessária a persistência viral para garantir a proteção da AIDS (11, 13, 26).

Embora o fenômeno de proteção GBV-C contra a AIDS tenha sido confirmado por vários estudos epidemiológicos em larga escala, o mecanismo pelo qual esse pegivirus medeia essa proteção não está totalmente esclarecido. Vários mecanismos têm sido propostos ao longo dos anos, tais como alterações nas respostas celulares, mudanças nos níveis de citocinas, bloqueio da expressão de proteínas de membrana, redução da expressão de CCR5 e CXCR4, produzindo anticorpos neutralizantes cruzados (56, 58-60). No entanto, os mecanismos exatos de interação da co-infecção do GBV-C com o HIV não são claros. Na **Figura 3** mostra-se as interações GBV-C e HIV já descritas na literatura. Os dois vírus infectam as mesmas células (linfócitos T) e utilizam as mesmas vias de entrada, interagindo com os coreceptores CCR5 e CXCR4. Esse mecanismo pode funcionar por competição e por bloqueio, como resultado da produção de quimiorreceptores.

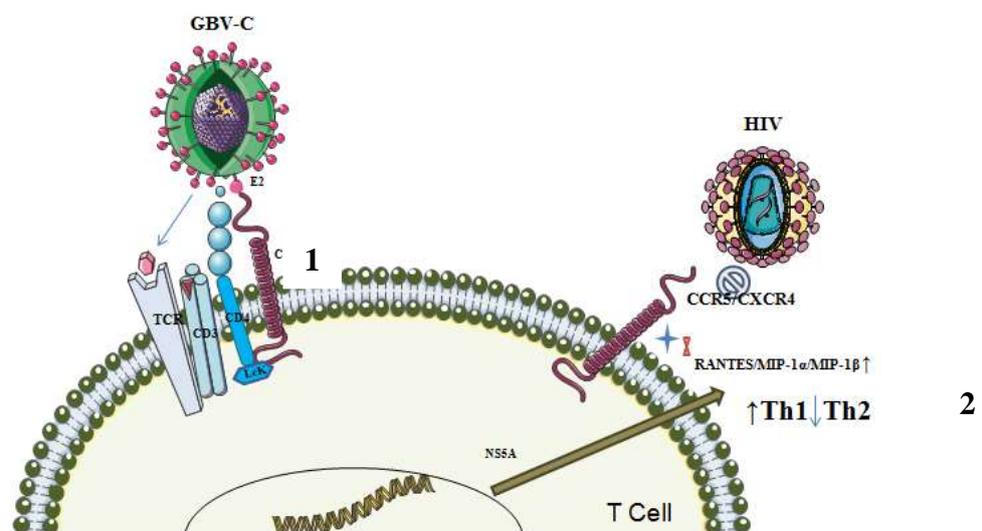


Figura 3- Figura ilustrativa dos mecanismos envolvidos na coinfeção GBV-C e HIV-1. Vários mecanismos são propostos para explicar essa interação, mas ainda não estão totalmente elucidados. No entanto, alguns estudos mostraram alguns co-receptores que podem interferir na coinfeção. **1-**O GBV-C conduz ao bloqueio de CCR5 e CXCR4, dificultando a entrada do HIV-1 **2-** O vírus GBV-C também altera o nível da razão Th1/Th2 e aumenta a produção das citocinas RANTES, MIP1- α , MIP-1 β e SDF-1 por aumento e liberação de NS5A que pode interferir na entrada do vírus HIV-1.

Vários trabalhos sugerem que há uma interação entre o GBV-C e o HIV (61-64) e muitos mecanismos foram descritos nessa interação viral. Estudos *in vitro* demonstraram diminuição do antígeno p24 de HIV na presença de várias proteínas isoladas do GBV-C, incluindo motivos de E1, E2, NS3 e NS5A, sugerindo que o GBV-C interfere diretamente com a replicação do HIV (65-68).

Xiang e colaboradores foram os primeiros a descrever uma interação entre uma proteína do GBV-C e a sua interferência na replicação do HIV. Eles demonstraram que um segmento de 85-aa da proteína NS5A foi responsável por induzir a liberação de quimiocina SDF-1 e diminuir a expressão de membrana de CXCR4, um co-receptor de HIV (65). Este mesmo grupo, alguns anos mais tarde, demonstrou que a inibição da replicação do HIV não é característica apenas para a NS5A, mas também para a NS5 da maioria dos Flavivírus, incluindo o HCV, o vírus da dengue, o vírus do Nilo Ocidental e o vírus da febre amarela.

Nesse sentido, Jung e colaboradores, também demonstraram uma diminuição da infecção pelo HIV, desta vez, por incubação com um heterodímero E1/E2 (69). Eles demonstraram que as partículas das duas cepas de HIV (R5 e X4), partículas do HIV são inibidas por essas proteínas e o efeito foi perdido quando a cultura foi incubada com anticorpos contra E2, concluindo que a inibição estava na fase de entrada viral.

Do mesmo modo, Mohr e colaboradores também descreveram anticorpos neutralizantes contra um motivo estrutural da proteína E2 do GBV-C, que interagem com partículas de retrovírus, independentemente das glicoproteínas do envelope do HIV (60). Vários estudos têm tentado elucidar os mecanismos pelos quais E2 promove a inibição da replicação do HIV, visando o desenvolvimento de um peptídeo sintético que pode mimetizar esses efeitos (60, 70). Bhattarai e colaboradores caracterizaram a viremia GBV-C no soro através da glicoproteína E2 do envelope, uma vez que a

expressão de E2 inibiu a ativação mediada por TCR de Lck nos pacientes infectados pelo HIV.

George e colaboradores descreveram que a NS3, uma serina protease que inibe a replicação do HIV que expressam em uma linhagem de células T CD4+ causa inibição significativamente dose-dependente da replicação do HIV, que foi ainda maior quando da adição do complexo NS4A ou NS4A/B, mas estes não diminuíram a expressão das moléculas CD4 ou CXCR4. Além disso, eles mostraram que quando a serina catalítica foi silenciada por uma alanina, tanto a inibição do HIV quanto a atividade da protease foram perdidas. (71). NS5A e NS3 são duas proteínas de superfície do vírus GBV-C que podem bloquear a replicação do HIV nos linfócitos T.

O NS5A também contribui para a polarização de Th1, o desequilíbrio entre Th1/Th2 é bem caracterizado na infecção pelo HIV. Nessa coinfeção, há aumento de IL-2, IL-12 e interferon γ em pacientes com infecção pelo GBV-C e diminuição de IL-4 e IL-10 (72-74), mostrando um melhor perfil clínico nesses pacientes com HIV. (75).

Está evidenciado que o GBV-C interage com o vírus HIV, promovendo respostas imunes que alteram o curso da infecção. Esses dois vírus compartilham as rotas de transmissão (contágio sexual, parenteral e endovenosa) e possuem tropismo pelas mesmas células. Por isso, houve uma aumento no interesse dessa coinfeção, e nos últimos anos muitos avanços foram feitos não apenas com a descrição de um prognóstico favorável na coinfeção, além da elucidação da infecção pelo HIV (76).

1.3 Ativação celular, senescência e exaustão na infecção causada pelo HIV.

Vários fatores do hospedeiro interferem na progressão para Aids, como alteração do gene da quimiocina CCR5 com deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32), perfis de HLA (*B57, B27 e *B35), e coinfeções, principalmente tuberculose, hepatite B e C. Alguns trabalhos mostraram que diferentes subtipos virais (como subtipo C, D e BF) podem estar associados a progressão o curso da infecção pelo HIV, levando a uma progressão mais rápida da doença (77-81). O perfil de resposta imune também pode interferir na progressão para Aids, incluindo diversos trabalhos mostrando que a resposta Th1/Th2, o grau de ativação e inflamação ao longo da progressão para Aids são

diferentes em vários estágios da infecção. É sabido, portanto, que diversos fatores podem interferir no prognóstico na infecção pelo HIV.

O nosso grupo de pesquisa demonstrou que o GBV-C reduz a frequência de células que expressam marcadores de ativação, CD38, CCR5, CD25 e CD69 (64). Assim, demonstra-se nesse trabalho, além da análise de ativação, as análises de senescência com a utilização dos marcadores celulares CCR5, CD38, HLA-DR, CD279, CD95, CD28 e CD57 em células T CD4+ e CD8+ que são marcadores envolvidos com as características celulares do envelhecimento, anergia celular e senescência. A expressão de CD95 e CD57 está associada à alteração da resposta dos linfócitos T em pacientes com HIV com morte por apoptose (82). Como preditores de uma resposta imune exagerada, o envelhecimento celular e também a exaustão da resposta imune estão associados à perda de células T CD4+ e a um pior prognóstico.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ativação, senescência e exaustão celular em indivíduos recém-infectados pelo HIV com infecção persistente pelo GBV-C, com ênfase na investigação do efeito modulador dessa coinfeção ao longo da progressão do HIV nessa coorte.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A proteção mediada pelo GBV-C foi descrita em muitos trabalhos na literatura científica. O interesse pela coinfeção GBV-C/HIV aumentou nos últimos anos. Segundo dados anteriores do nosso grupo a infecção pelo GBV-C em pacientes com HIV-1 promove uma diminuição da expressão de marcadores de ativação celular (CD38 e HLA-DR) (64, 83). Além disso, outros trabalhos descrevem que o GBV-C atua na regulação de outros marcadores celulares, citocinas e proteínas de membrana interferindo na imunidade inata e adaptativa e contribuindo para a inibição *in vitro* da replicação do HIV, tal interação conferiria proteção para os pacientes coinfectados com os dois vírus vivem com esse vírus. Ademais, outros trabalhos elucidaram a proteção contra a AIDS mediada pelo GBV-C (GPFA).

Ante o exposto, esse estudo visa identificar o perfil de ativação celular, senescência e exaustão na coinfeção do GBV-C com o HIV. Diferente de outros estudos, que analisaram as amostras apenas de forma transversal, essa pesquisa buscou analisar os pacientes coinfectados de forma longitudinal em amostras com persistência viral e análise da ativação e senescência celular.

Hipótese

3. HIPÓTESE

H1: A infecção persistente pelo GBV-C **interfere na progressão** do vírus HIV-1 em relação à ativação, senescência e exaustão celular. A infecção incidente pelo GBV-C **está associada a menor** ativação celular de linfócitos T de pessoas que vivem com o HIV.

H0: A infecção persistente pelo GBV-C **não interfere na progressão** do vírus HIV-1 em relação à ativação, senescência e exaustão celular. A infecção incidente pelo GBV-C **não está associada a menor** ativação celular de linfócitos T de pessoas que vivem com o HIV.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Identificar o perfil de ativação celular em indivíduos recém- infectados pelo HIV na presença da coinfeção pelo GBV-C.

4.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o perfil celular dos pacientes, analisando os processos de ativação, senescência e exaustão celular em linfócitos T CD4+ e CD8+;
- Caracterizar os processos de ativação, senescência e exaustão celular nas diferentes subpopulações (ontogenia) de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Métodos

5. MÉTODOS

5.1 Seleção dos pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram selecionados de uma coorte prospectiva estabelecida desde 2002 composta por 223 indivíduos com diagnóstico de infecção recente pelo HIV-1, em 2010 finalizou-se o recrutamento.

A seleção dos pacientes levou em consideração critérios de inclusão que compreenderam pacientes com soroconversão recente por HIV-1 (STARHS), ausência de tratamento antirretroviral, disponibilidade de dados referentes à contagem de células T CD4+ e CD8+, carga viral (HIV-1) e disponibilidade de amostras de PBMC e plasma. Os dados de carga viral e contagem de células T, bem como a presença de GBV-C no primeiro momento do estudo foram triados na visita inicial (V0, após o diagnóstico de infecção recente pelo HIV-1) e ao longo de aproximadamente 1 ano (média de 450 dias).

Para a avaliação do impacto da coinfeção pelo GBV-C nos pacientes com infecção recente pelo HIV foi realizado uma classificação preliminar, na qual as amostras foram agrupadas em quatro categorias conforme a presença ou ausência do GBV-C na visita inicial e um ano após a entrada no estudo. Considerando a visita V1 (entrada no estudo) e V5 (um ano após V1) as amostras foram classificadas em quatro grupos: Grupo 1 (V1 positiva (+) e V5 negativa (-), significando a perda da viremia do GBV-C, n=4); Grupo 2 (V1 negativa (-) e a V5 positiva (+), representando as infecções incidentes para o vírus GBV-C, n=10); Grupo 3 (ambas as visitas, V1(+) e V5(+)) tinham a presença da viremia, n=36); E o Grupo 4 (ambas as visitas, inicial V1(-) e V5(-)) não contraíram a infecção com GBV-C, n=135). Foram excluídos pacientes que abandonaram o estudo, que foram à óbito ou tinha a deleção de 32 pares de bases do gene de CCR5 (CCR5 Δ 32)

Com esta abordagem percebeu-se que a distribuição amostral entre os grupos mostrou-se discrepante e levantou-se a hipótese que a melhor maneira de avaliar o efeito da infecção pelo GBV-C seria entre os grupos 2 e 4, sendo que o grupo incidente seria investigado quanto a persistência viral por no mínimo um ano e o negativo para ausência de GBV-C no mesmo período, considerando como critério de inclusão somente aqueles que permaneceram sem TARV.

Com essa estratégia cinco amostras do grupo 2 apresentaram persistência viral para GBV-C, logo foram alocados no grupo HIV-1+/GBV-C+. Enquanto que os pacientes do grupo 4 foram investigados durante um período de 3 anos, aqueles que permaneceram negativos foram alocados no grupo HIV-1+/GBV-C-, n=8, e nessa abordagem foram encontrados mais quatro pacientes que apresentaram infecção do GBV-C com persistência, totalizando nove amostras no grupo HIV-1+/GBV-C+.

Figura 4

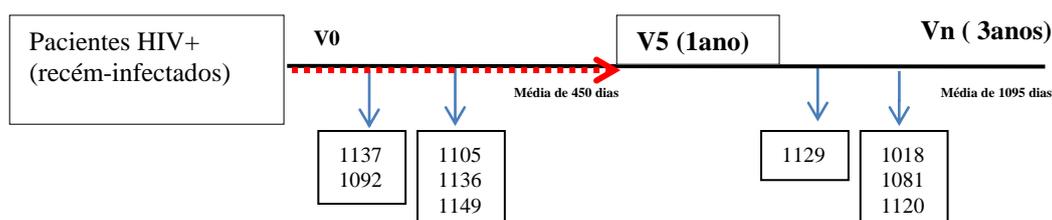


Figura 4. Estratégia da triagem para identificação da infecção persistente por GBV-C nos indivíduos HIV positivos recém-infectados. Todos os pacientes nesse estudo foram analisados em relação à presença do RNA do GBV-C.

A utilização das amostras nesse projeto foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética (Processo n° 279.139/2013) e coletadas de um banco devidamente criopreservadas no banco de amostras do laboratório de investigação médica, LIM-60 na FMUSP. Todos os voluntários leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando o uso das amostras em estudo científico.

5.2 Detecção do GBV-C

Para analisar a presença do GBV-C as amostras de plasma foram alocadas e submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA. A presença desse vírus foi determinada pela quantificação por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), em que dois métodos de quantificação foram padronizados e utilizados: no primeiro, houve a quantificação relativa por unidades arbitrárias e no segundo, houve a quantificação absoluta do GBV-C com curva plasmidial.

5.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizamos o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Em resumo, as alíquotas de 5,0 µl do RNA total (contendo ≤ 2 µg de RNA) foram transferidas para microtubos contendo 2,0 µl de iniciadores randômicos (0,1µg/µl), 0,8 µl de dNTPs (100mM), 2,0 µl de tampão de reação (10X) da transcriptase reversa, 1,0 µl de enzima transcriptase reversa e 4,2 µl de H₂O *nuclease-free*. Em seguida, a reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, e subsequentemente a enzima foi inativada a 85°C por 5 minutos.

5.2.3 Construção de uma curva relativa para a reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT- PCR).

Na etapa inicial, utilizou-se um método de quantificação por curva relativa estimada em unidades arbitrárias/mL, baseada em uma amostra de plasma com altas concentrações de RNA do GBV-C (previamente titulada em 10, 10², 10³, 10⁴ unidades arbitrárias de GBV-C por mL de plasma). Utilizou-se, também, uma amostra controle para outros vírus como o HCV, HBV, HIV e DENV com o fim de excluir detecções cruzadas. A curva, padronizada e testada em relação à sensibilidade e reprodutibilidade, foi cedida pelo laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

5.2.4 Construção de uma curva plasmidial para a reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT- PCR).

Após a realização da quantificação do GBV-C observou-se que a curva relativa mostrou limitações importantes, incluindo baixa sensibilidade e restrição do limite de detecção à concentração de 10⁴. Por esse motivo foi escolhida a construção da curva plasmidial para a obtenção de unidade de cópias virais/mL.

Esse plasmídeo foi construído com segmento gênico do GBV-C a partir de 120 pb da região 5'NCR (Non Coding Region) do vírus. O amplicon foi clonado dentro do vetor plasmidial pUC57, e a cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa foi utilizada como receptora para a transformação. Em seguida foi realizada a extração dos plasmídeos com o protocolo do *Kit Midi Prep* (Qiagen). O plasmídeo contendo a sequência de GBV-C possui 2830 pb, incluindo o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (2710 pb do plasmídeo e 120 pb do inserto) (Figura 5A). Esta etapa foi parcialmente realizada no Laboratório de Retrovirus da Johns Hopkins University (Baltimore, EUA).

O plasmídeo foi linearizado usando a enzima *Sall* e a transcrição do DNA plasmidial utilizando o Kit T7 (Qiagen). Ademais, O RNA plasmidial resultante foi conservado em solução de *RNA later* e enviado para o LIM-60, Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, onde foi realizada a recuperação e purificação do RNA com a utilização o Kit *RNeasy* (RNA clean up, Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, a concentração do RNA plasmidial foi determinada utilizando o espectrofotômetro Epoch (BioTek) para a avaliação da integridade e qualidade, as amostras de RNA plasmidial foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de *Syber Safe* (1:10000 uL de agarose) e *Blue Juice* (1:4). A visualização e fotodocumentação foram realizadas utilizando o *AlphaImager HP Imaging System* (Alpha Innotech, EUA) sob luz ultravioleta (Figura 2B).

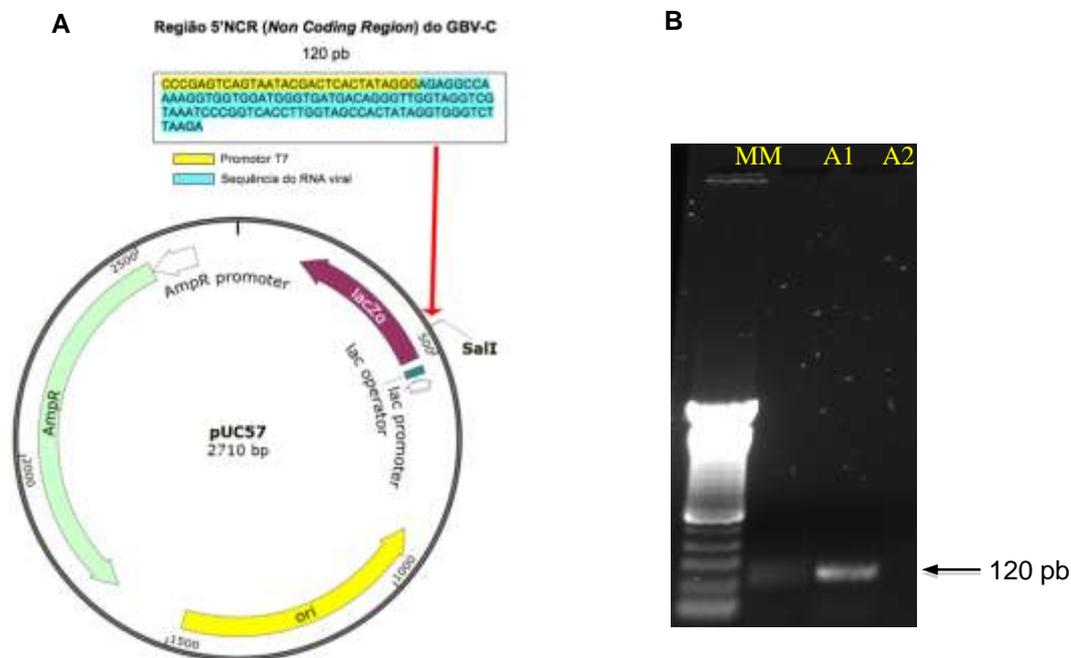


Figura 5. (A) Representação esquemática do plasmídeo pUC57 indicando o local de inserção do segmento gênico do vírus GBV-C. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os perfis de duas amostras de RNA plasmidial (A1 e A2) obtidas após purificação com *Kit RNeasy* (Qiagen). M: Marcador de peso molecular (*DNA Ladder* 50 pb, Invitrogen, Life Technologies).

O RNA plasmidial foi quantificado e determinada uma concentração de $1,2 \times 10^{12}$ ng de RNA. Essa amostra foi submetida a uma diluição seriada inicial para o preparo da curva plasmidial (10^{12} , 10^{11} , 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , diluição seriada 1) até atingir uma concentração de $1,12 \times 10^7$ ng/ μ L. Em seguida, uma segunda diluição seriada (diluição seriada 2) foi realizada partindo-se de uma concentração inicial de $1,2 \times 10^7$ ng/ μ L (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1) de RNA plasmidial. As alíquotas provenientes de cada um dos pontos da segunda diluição seriada foram submetidas à síntese de cDNA e posterior qPCR em Tempo Real para avaliar sensibilidade de detecção do teste. A reação da qPCR foi realizada conforme descrita no item 6.2.5. Todas as amostras derivadas das diluições seriadas 1 e 2 foram devidamente identificadas e estocadas a -80°C .

Na análise de quantificação absoluta, a curva plasmidial apresentou um maior poder de detecção e amplitude na quantificação da carga viral do GBV-C. Os pontos da curva foram definidos da concentração de 10^6 a 10^2 e os pontos menores que 10^2 apresentaram menor sensibilidade e reprodutibilidade. Por isso, mesmo havendo semelhanças com a quantificação relativa, em relação aos valores dos Cts (*threshold cycle*), um método comparativo foi utilizado com controles negativos e amostras com concentrações conhecidas. Por isso, optou-se pela quantificação absoluta com maior sensibilidade, em que os testes de reprodutibilidade foram realizados.

5.2.5 Quantificação do GBV-C por qPCR em tempo real

As reações de qRT-PCR foram realizadas, na primeira fase, utilizando dois passos. No primeiro, o cDNA posteriormente realizava-se o RT-PCR com o sistema Taq-man (Two step) para a quantificação com curva relativa. Para minimizar a contaminação resolvemos trocar e substituir para o sistema *One step* com *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante), utilizando 5 ul de RNA, 25 pMol/uL de GBV-C *Probe* (TAMRA-6-FAM), e 10 pMol/uL de cada *primer* específicos para o transcrito de interesse (RTG1 5'GTGGTGGATGGGTGATGACA3'-sense e RTG2 5'GACCCACCTATAGTGGCTACCA3-anti-sense primers), com volume final de 25uL por reação, validados e publicados por nosso grupo (84). Os dados obtidos foram analisados pelos valores do *Cycle Threshold (Ct)*, posteriormente convertido em expressão relativa.

Por fim, como as amostras dos pacientes haviam sido quantificadas por intermédio da curva relativa, após a definição da curva plasmidial, para a confirmação da sensibilidade e reprodutibilidade do teste, a quantificação do RNA viral do GBV-C nos indivíduos GBV-C (+) foi analisada novamente pelo método de quantificação absoluta.

5.3 Padronização da marcação de superfície e intracelular para avaliação por citometria de fluxo.

Com o objetivo de avaliar se os pacientes HIV-1 (+) coinfectados com o vírus GBV-C apresentavam diferenças no perfil de ativação, senescência e exaustão celular

das células T CD4+ e CD8+ quando comparados com o grupo HIV+ GBV-C- foi definido um painel com marcadores celulares (Tabela 1). Todos os pacientes estavam sem tratamento com antirretrovirais. A padronização deste painel foi realizada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) criopreservadas, seguindo o protocolo de descongelamento utilizado no laboratório LIM 60.

O painel utilizado incluiu marcadores específicos para a identificação de linfócitos T (CD3, CD4 e CD8), marcadores para a caracterização do perfil de ativação celular (CCR5, CD38 e HLA-DR e CD28), marcadores de ontogenia (CD27, CD45RA e CCR7) e marcadores de senescência e exaustão celular (CD279, CD95, CD28 e CD57), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Painel utilizado na citometria de fluxo

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	
CD3	PE CF594	UCHT1	
CD4	APC H7	RPA-T4	Linfócitos
CD8	BV 510	SK1	
CD45 RA	FITC	HI100	
CCR7	PE Cy7	PECy7	Subpopulações
CD 27	PE	L128	
CCR5*	BV 711	2D7	
HLA DR	Alexa fluor 700	G46-6	Ativação
CD 38	PerCP Cy 5.5	HIT2	
CD28	APC	CD28.2	
CD 279	BV 421	EH 12.1	Senescência e
CD57	BV 605	NK-1	Exaustão
CD95	PE Cy5	DX2	
Viabilidade celular	UV		

*A marcação de CCR5 foi feita com marcação intracelular.

As CMSP's foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e transferidas para tubos de 15 mL contendo 10 mL de meio RPMI enriquecido ou R10 (10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 1mM de penicilina/estreptomicina, 55 µM de 2-Mercaptoetanol, e 10mM da solução de HEPES); estas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspenso em R10. O número de células viáveis foi então determinado em um contador automatizado (Invitrogen, automated cell counter, Modelo C10281) com a utilização do

corante azul de tripan (4%). Para a marcação das células, 1×10^6 células de cada paciente foram transferidas para uma placa de 96 poços.

As células foram lavadas com solução tampão MACS [PBS (1x) contendo albumina com soro bovino (0,5%) e EDTA (2mM)] duas vezes, respeitando o volume final de 250 μ L/poço. Em seguida, as células foram marcadas com o mix de anticorpos monoclonais CD3, CD4, CD8, CD28, CD27, CD38, CD45RA, anti-HLA-DR, anti-CCR7, CD279, CD95, CD28 e CD57, com marcador de viabilidade, e incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. As células foram então lavadas e depois foram fixadas com paraformaldeído (PFA 4%) e feita a permeabilização (4 mL de H₂O, 1 mL de FACS Lise 2,5 μ L de Tween 20%) por 10 minutos, em seguida uma centrifugação. Logo em seguida a marcação intracelular com o anticorpo anti-CCR5 por 30 minutos. As células foram então fixadas com paraformaldeído 1% e transferidas para tubos de citometria para aquisição no citômetro de fluxo FACS LSRFortessa™ X-20 (Becton Dickinson-BD Biosciences). Os dados foram analisados no programa Flowjo (TreeStar, San Carlos, Califórnia, USA). A definição dos *gates* foram baseadas na análise do FMO (*Fluorescent Minus One*) e a estratégia de análise foi feita em relação à ativação, senescência celular e ontogenia. Para uma definição mais confiável e objetiva os *gates* foram baseados na análise dos tubos do FMO's, utilizamos apenas para os marcadores que não promovem uma separação clara para análise (presença de marcação positiva para as proteínas CD45RA, CCR7, HLA DR, CD38, CCR5, CD57, CD28, CD279 e CD95). Na **Figura 6** são apresentadas as estratégias utilizadas para essa análise inicial.

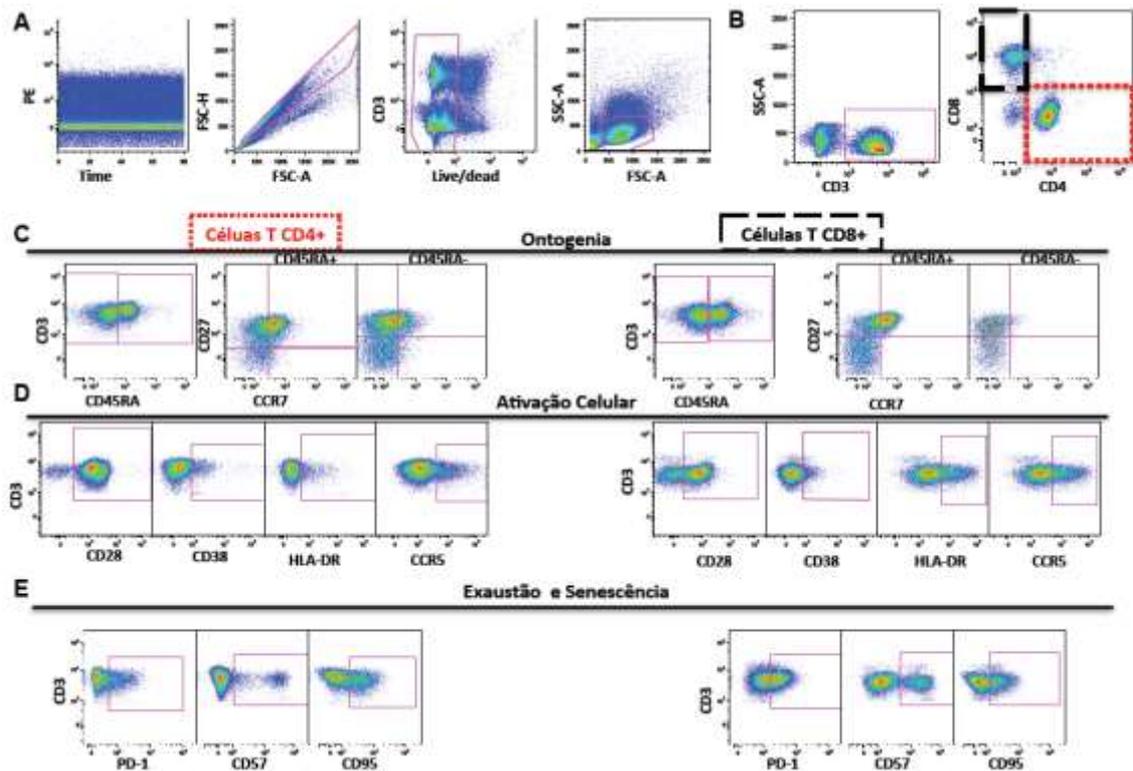


Figura 6- Estratégia de análise do painel de citometria de fluxo das células T CD4+ e CD8+ de pacientes coinfectados com HIV-1+ e GBV-C. A análise constou com critérios de qualidade na aquisição (*time*, *singlets* e *live/dead*) (A), seguida da identificação de células T (CD3+) (B). A análise foi feita para a caracterização do perfil de ontogenia (C) e também a caracterização de ativação, senescência e exaustão celular (D e E). (Time x PE) para checar o status do laser; *Singlets*- para exclusão das células que passaram pelo laser de forma duplicada; SSC-A x FSC-A para seleção da população de linfócitos; O *gate* do CD3 x SSC-A- para seleção dos linfócitos T. O perfil de ontogenia foi realizado com a expressão combinada dos marcadores CD45RA, CCR7 e CD27, ficando as seguintes classificações: células naïve (CD45RA+CD27+CCR7+); células memória central (CD45RA-CD27+CCR7+); células memória efetora (CD45RA-CD27-CCR7-); células memória transitória (CD45RA-CD27+CCR7-); células memória intermediária (CD45RA+CD27+CCR7-) e células efetora terminal (CD45RA-CD27-CCR7-). A análise de ativação foi feita baseado nas marcações de CCR5, CD38 e HLA-DR. Na análise de senescência e exaustão foram utilizados os marcadores de PD-1, CD95, CD57 e CD28.

5.4 Análise estatística

Os valores gerados a partir desses resultados foram analisados em uma planilha de dados dos programas Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA) e programas estatísticos utilizados foram Graphpad Prism (Versão 6.0) e Stata (Versão 13.0, StataCorp. College Station, TX: StataCorp LP).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Descrição dos dados da coorte.

Para avaliação dos nove pacientes alocados no grupo HIV-1+/GBV-C+ e dos oito pacientes alocados no grupo HIV-1+/GBV-C foram coletados os dados de idade, sexo, contagem de células T CD4+ e CD8+ e carga viral. A análise estatística dos dados relacionados ao perfil de ativação, senescência e exaustão celular encontrados nos grupos foi feita a partir dos valores de frequência e dos dados absolutos, porém nesse trabalho serão mostrados apenas os dados absolutos, uma vez que acreditamos que esses valores evidenciam melhor o efeito da coinfeção. Para uma melhor observação da influência do vírus GBV-C na resposta imune ao longo do tempo nos pacientes co-infectados HIV-1+/GBV-C+ foi realizada a análise da diferença ($\Delta V1-V0$) apresentada para cada variável e comparada entre os grupos. Os resultados mostraram que há um perfil diferente entre os dois grupos, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas em todas as análises. Neste trabalho serão descritos entre os grupos em relação ao efeito apresentado, considerando que o efeito da presença do GBV-C foi perceptível em todas as análises, porém não estatisticamente significativa.

Nos dados referentes à idade, a média encontrada foi de 31,6 anos no grupo GBV-C+ e 31,7 anos no grupo GBV-C- ($p=0,89$). Os pacientes avaliados neste estudo são do sexo masculino com comportamento homossexual. A análise dos dados laboratoriais mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, na visita inicial o grupo GBV-C+ apresentou uma mediana de contagem de células T CD4+ de 594,0 cels/mm³ (IQR: 585,0-698), enquanto que o grupo GBV-C- foi de 603,0 cels/mm³ (IQR: 503-761), $p=0,77$. Na análise da diferença dos valores de células T CD4+ ($\Delta V1-V0$) o grupo GBV-C+ apresentou quantidade maior de células T CD4+ (-103,3; IQR: -468,4 a -98,9,0) comparado ao grupo GBV-C- (-77,0; IQR: -193,8 a 31,9), apesar de não haver diferença significativa ($p=0,25$) (Figura 7).

Em relação à contagem das células T CD8+ na visita inicial o grupo GBV-C+ apresentou 972,0 cels/mm³ (IQR: 610,0-1203) e o grupo GBV-C- apresentou 1060 cels/mm³ (IQR: 625-1255), $p=1,00$. Na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) dessas células o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição (-154; IQR: -256 a 144), enquanto que no grupo GBV-C- houve um aumento dessas células (163; IQR: 198 a 344,5), apesar de

não haver diferença significativa ($p= 0,21$). Os dados de diferença ($\Delta V1-V0$) de CD4+ e CD8+ em cada grupo são mostrados na **Figura 7**.

Os dados da carga viral associados com os dados clínicos laboratoriais são utilizados para avaliação do prognóstico para Aids, durante muito tempo foram utilizados para a escolha do início do tratamento antirretroviral (TARV), especialmente a queda da contagem de células T CD4+. Na análise da visita inicial os dois grupos não apresentaram diferenças em relação à carga viral, $p= 0,92$. Na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) o grupo GBV-C+ apresentou um aumento na contagem de carga viral com 1821 cópias/ml (-33683 a 7797) e no grupo GBV-C- teve uma diminuição -675 cópias/ml (-36582 a 1167). Dados mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Características dos pacientes

Características*	Grupo 1 (GBV-C(+) persistente (n=9)	Grupo 2 (GBV-C (-) negativo (n=8)	Valor p
Idade mediana (IQR)	31,6 (29,6-40,6)	31,7 (28,7-35,5)	0,89
HSH (%)	8 (88,8%)	8 (100%)	1,0
Carga Viral HIV-1 log (IQ)			
Basal (V0)	4,32 (2,72-4,91)	3,91 (2,60-4,66)	0,92
Diferença ($\Delta V1-V0$) *	-0,18(-0,5-0,75)	-0,05 (-0,56- 0,32)	0,70
Células T CD4+ mediana (IQ)			
Basal (V0)	594,0 (585-698)	603 (503-761)	0,77
Diferença ($\Delta V1-V0$)	-103,3 (-468,4- 98,9)	-77,05 (-193,8-31,9)	0,25
Células T CD8+ mediana (IQ)			
Basal (V0)	972,0 (610-1203)	1060 (625-1255)	1,0
Diferença ($\Delta V1-V0$)	-62,7 (-256 - 144)	202 (-313,7 a 448)	0,21
Razão CD4/CD8 V0	0,61 (0,38-1,02)	0,72 (0,58-0,83)	0,92
Diferença da razão CD4/CD8 (Δ)	-0,11 (-0,41-0,07)	-0,16 (-0,31- 0,02)	0,85

*Variáveis contínuas apresentadas como medianas e intervalos interquartis; comparações realizadas com o teste de Wilcoxon (Rank-sum test).

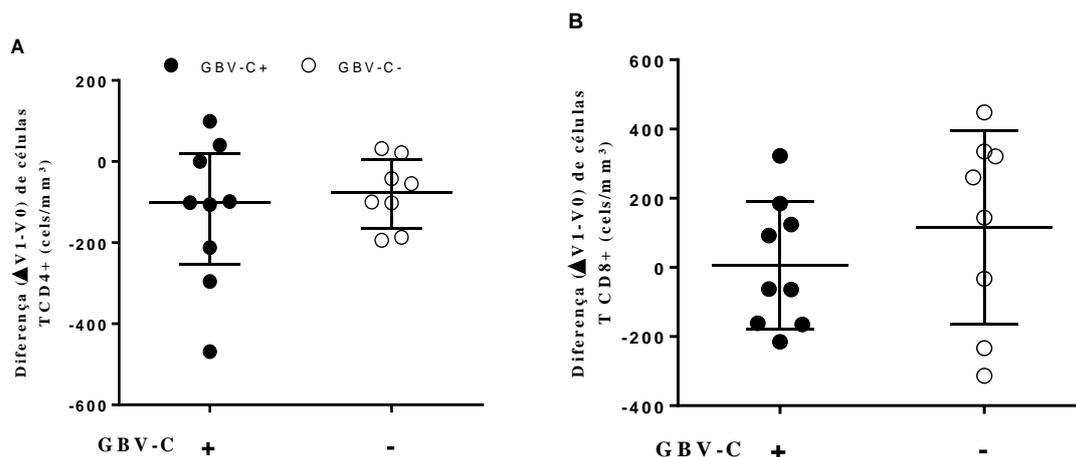


Figura 7. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da contagem de células T CD4+ e CD8+ nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e intervalos interquartis.

6.2 Avaliação do perfil de ativação, senescência e exaustão celular nas células T CD4+ e CD8+.

Apesar do pequeno número de amostras em cada grupo, percebe-se que há uma diminuição no perfil de ativação celular no grupo co-infectado HIV-1+/GBV-C+ e na análise da diferença também foi observada uma redução na quantidade de células expressando marcadores de ativação. A análise do perfil de ativação celular abrangeu a expressão dos marcadores CCR5+ CD38+ e HLA-DR+ nas células T CD4+ e CD8+ entre os grupos tanto na visita inicial, como na análise da diferença ($\Delta V1-V0$).

O perfil de ativação encontrado na população de células T CD4+ na visita inicial não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GBV-C+ e GBV-C- (células T CD4+CCR5+, $p=0,21$; CD4+CD38+, $p= 0,34$; CD4+HLA-DR+, $p=0,41$, dados não mostrados). Ao analisar a diferença na quantidade encontrada de células T CD4+ expressando CCR5+, CD38+ e HLA-DR+ entre os dois grupos, observamos uma diminuição na quantidade de células T CD4+ CCR5+ e CD38+ no grupo GBV-C+, porém ao longo do tempo foi semelhante nos dois grupos. Em relação às células T CD4+HLA-DR+ encontramos uma pequena diminuição no grupo GBV-C+ e um aumento na quantidade de células/mm³ no grupo GBV-C- ($p=0,56$ e $p=0,39$, respectivamente, Figura 8A).

Na visita inicial os dois grupos não apresentaram diferenças em relação à quantidade de células T CD8+ expressando CCR5+ ($p=0,21$), CD38+ ($p=0,34$) e HLA-DR+ ($p=0,41$, dados não mostrados). Na análise da diferença da quantidade de células T CD8+ expressando CCR5+, encontramos uma diferença de -81,2 (IQR: -94,6 a 38,6) no grupo GBV-C+, e 60,4 (IQR, -40,8 a 98,8) no grupo GBV-C-, $p=0,21$. Em relação às células T CD8+ CD38+ foi encontrada uma diferença na quantidade no grupo GBV-C+ (-13,8 (IQR, -61,8 a 47,4)) em relação ao GBV-C- (-22,6 (IQR, -208,2 a 97,5)), $p=0,77$. Sobre os achados de células T CD8+ HLA-DR+ o grupo GBV-C+ apresentou diferença de -36,9 (IQR, -65,0 a -8,2) e -18,2 (IQR, -97,2 a 97,6) no grupo GBV-C-, $p=0,50$.

Figura 8B. Apesar de não haver diferença estatística significativa, percebemos uma diminuição na quantidade de células T CD8+ expressando CCR5 no grupo GBV-C+ comparado com o perfil encontrado no grupo GBV-C, bem como houve uma percepção de um perfil diferente em relação aos dados de ativação celular no grupo GBV-C+.

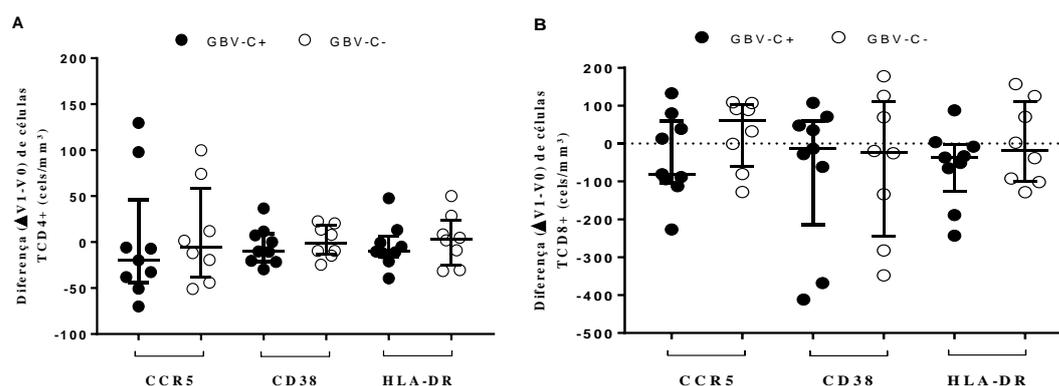


Figura 8. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da contagem de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) expressando CCR5, CD38 e HLA-DR nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

Para a caracterização do perfil de senescência e exaustão celular, foi avaliado a expressão das moléculas PD-1, CD95, CD57 e CD28. O marcador PD-1 é utilizado para a avaliação do processo de envelhecimento celular, senescência e anergia quando associado a outros marcadores na superfície das células T CD4+ e CD8+. E quando associado à expressão de CD57+ e CD95+, pode-se extrapolar como preditores de uma resposta imune exagerada, resultando em envelhecimento celular e exaustão.

Ao analisarmos a co-expressão dos marcadores clássicos de ativação celular HLA-DR, CD38 e CCR5 (**Figura 9**) observamos que no grupo GBV-C+ há uma menor quantidade de células T CD4+ com os diferentes perfis (CD38+HLA-DR+; CD38+CCR5+ e HLA-DR+CCR5+), enquanto que no grupo GBV-C- uma maior quantidade dessas células (**Figura 9A**). Na população de células T CD8+ encontramos na análise da diferença, uma diminuição na quantidade de células co-expressando HLA-DR+CCR5+ no grupo GBV-C+, encontrando o inverso no grupo GBV-C- (**Figura 9B**).

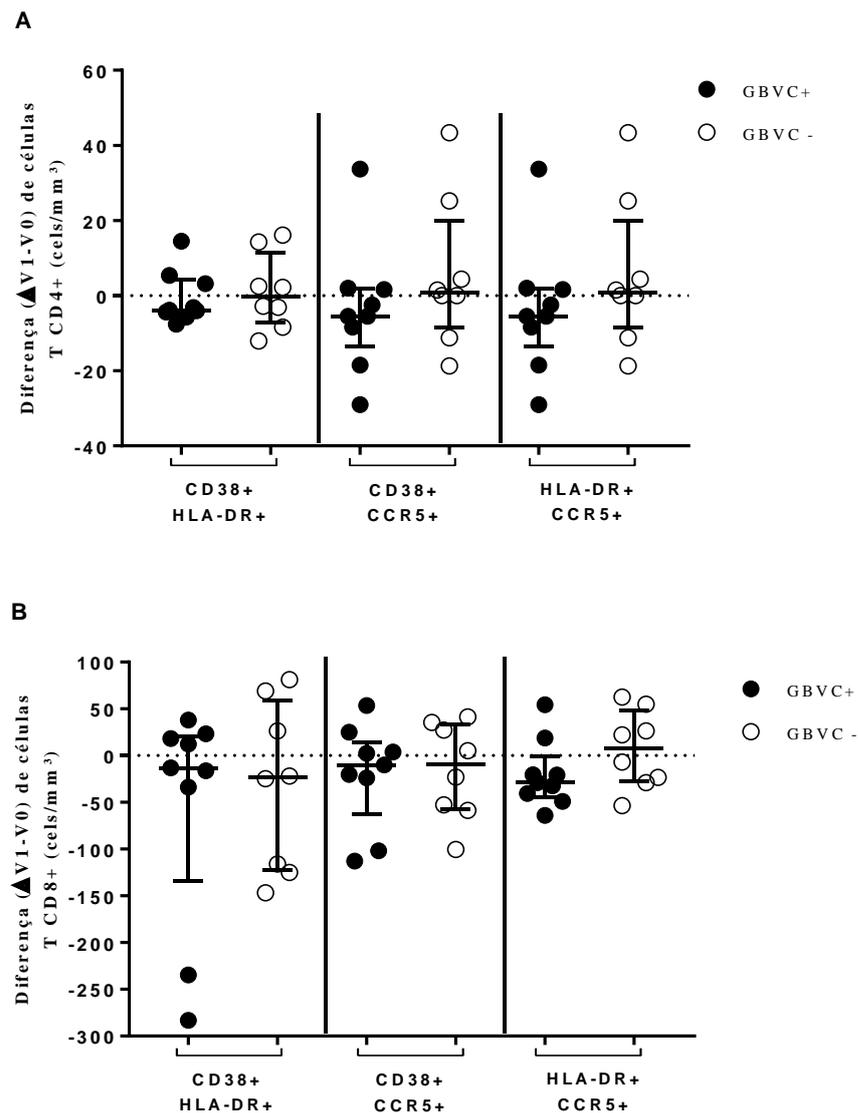


Figura 9. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da contagem de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) co-expressando CCR5, CD38 e HLA-DR nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

Na visita inicial os dois grupos não apresentaram diferenças em relação à quantidade de células T CD4+ e CD8+ expressando PD-1, enquanto que na análise da

diferença o grupo GBV-C + apresentou uma redução na quantidade de células T CD4+ PD1+, - 53,2 (IQR: -89,7 a 2,4) comparado com os valores de -8,4 (-73,5 a 58,2) no grupo GBV-C - p=0,34. Em células T CD8+ essa análise da diferença ($\Delta V1-V0$) também mostrou uma diminuição no grupo GBV-C+ (-80,7 (IQR: -169,9 a -27,0) comparado ao grupo GBV-C- (116,3 IQR: -209,5 a 256,6), p= 0,44. Porém, apesar de não ter significância estatística, há uma diferença entre os grupos. Na análise da quantidade de células T CD8+ expressando CD95 houve uma diminuição no grupo GBV-C+ (-40,6 (IQR: -146,6 a 22,8) e um aumento no GBV-C- (193,2 (IQR: -172,1 a 431,0) p=0,18.

Na análise da co-expressão de PD-1 e CD95 em células T CD4+ e CD8+ os dois grupos não apresentaram diferenças na visita inicial. No entanto na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) em células T CD8+ houve uma diminuição desses marcadores no grupo GBV-C+ (-53,1 IQR: -70,2 a 32,8) e um aumento no grupo GBV-C- (123,7 IQR: -162,9 a 269,9), **Figura 10**.

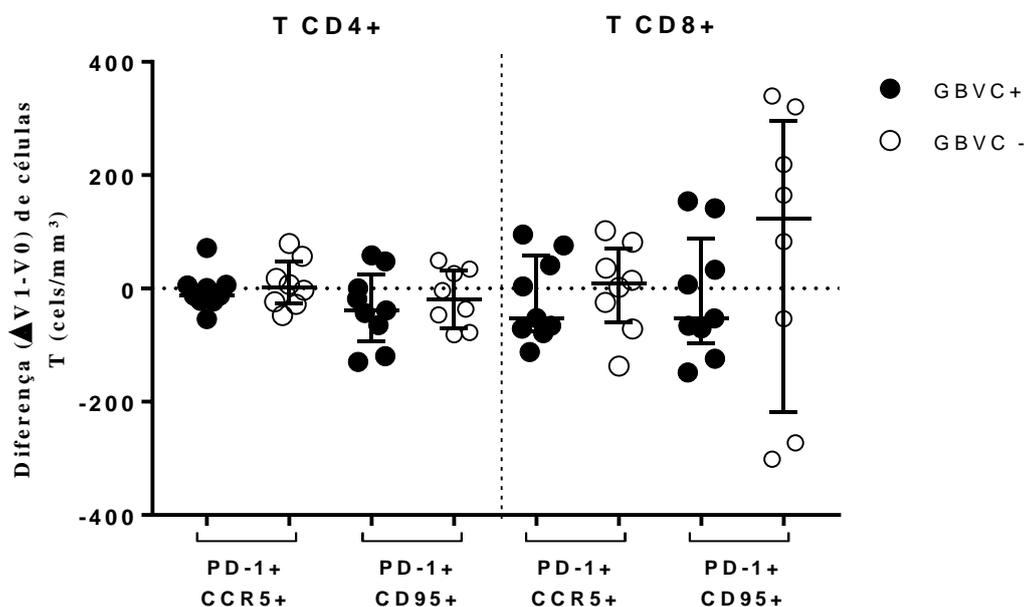


Figura 10. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da contagem de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) co- expressando PD-1+CCR5+ e PD-1+CD95+ nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

Na análise da diferença, uma menor quantidade de células T CD4+ expressando as moléculas PD-1, CD95 e CD28 foram mais acentuados no grupo GBV-C+. Nas

células T CD8⁺ foram encontradas no grupo GBV-C-, em contrapartida pode-se perceber uma diminuição nos marcadores de senescência e exaustão no grupo GBV-C+. Na análise da expressão de CD57 e CD28 em células T CD4⁺ e CD8⁺ não houve diferenças entre os grupos. Assim com também não houve na análise da co-expressão desses marcadores, **Figura 11**. Todos os dados são mostrados na **Tabela 3** (Em anexo).

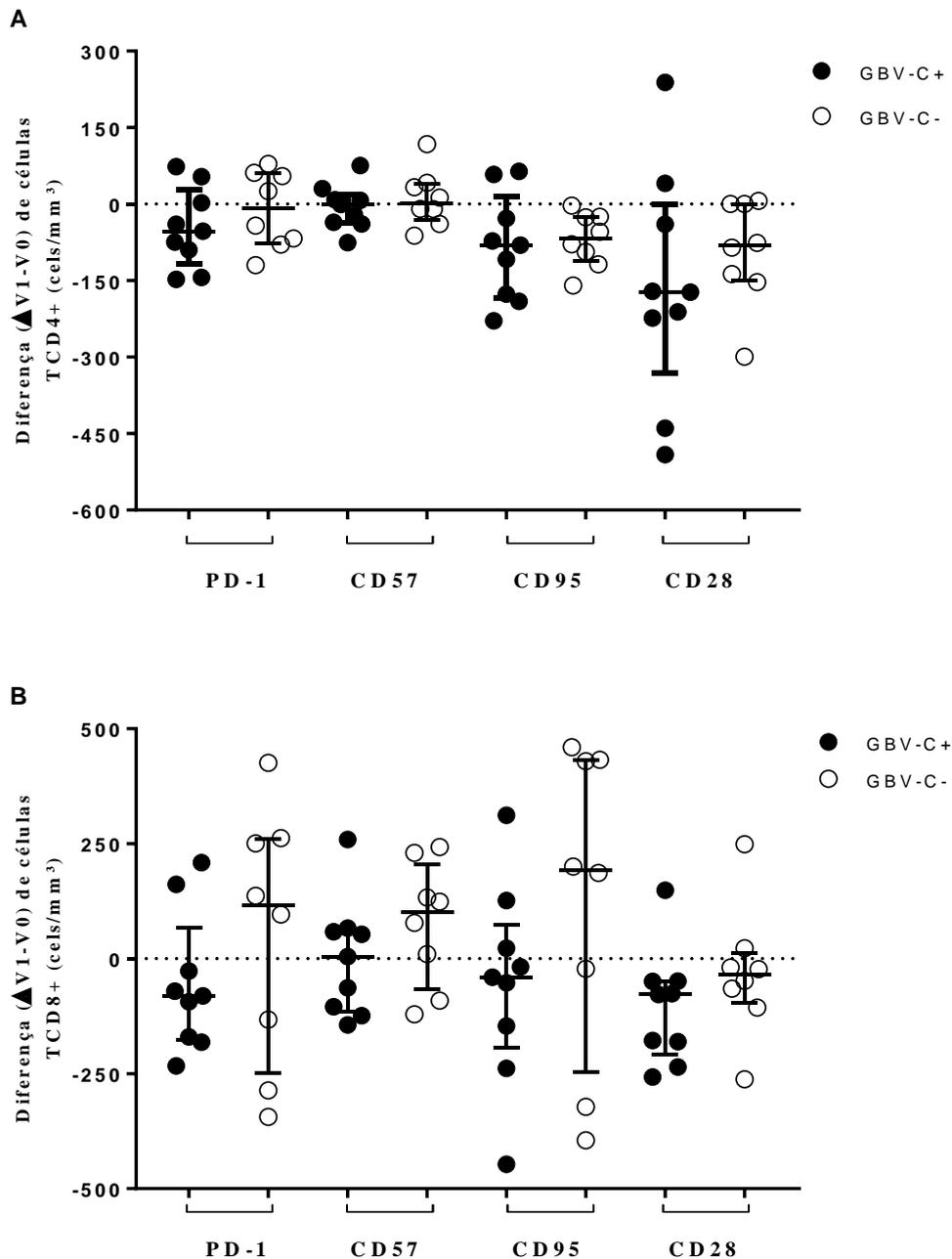


Figura 11. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da contagem de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) expressando PD-1, CD57, CD95 e CD28 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

6.3 Avaliação do perfil de ontogenia em relação à ativação celular, senescência e exaustão celular nas subpopulações das células T CD4+ e CD8+.

A diferenciação ontogênica é essencial na resposta imune adaptativa. A formação de células de memória é uma característica dessa resposta imune, diferente da imunidade inata que não tem essa capacidade de reconhecimento de antígenos oriunda de uma infecção prévia.

Na visita inicial não houve diferença na quantidade das subpopulações de memória das células T CD4+ e CD8+. Entretanto, ao analisar a diferença do perfil de diferenciação das células T CD4+ de memória ao longo do tempo encontramos uma diferença com significância estatística “*boderline*”, sendo que o grupo GBV-C- apresentou uma maior quantidade de células T CD4+ com fenótipo naíve comparado com o grupo GBV-C+ ($p=0,05$), um aumento não estatisticamente significativo na quantidade de células de memória central e transitória e leve diminuição de memória efetora, **Figura 12 A**.

Em relação à população de células T CD8+ encontramos uma diminuição estatisticamente significativa na quantidade de células circulantes com fenótipo naíve ($p=0,02$) no grupo GBV-C+ comparado com GBV-C-, houve também diminuição na quantidade de células de memória transitória ($p=0,04$), enquanto que a subpopulação de células de memória efetora aumentou no grupo GBV-C+ porém o grupo GBV-C- apresentou uma maior quantidade dessas células ($p=0,03$). No grupo GBV-C- comparado com o grupo GBV-C+, **Figura 12 B**.

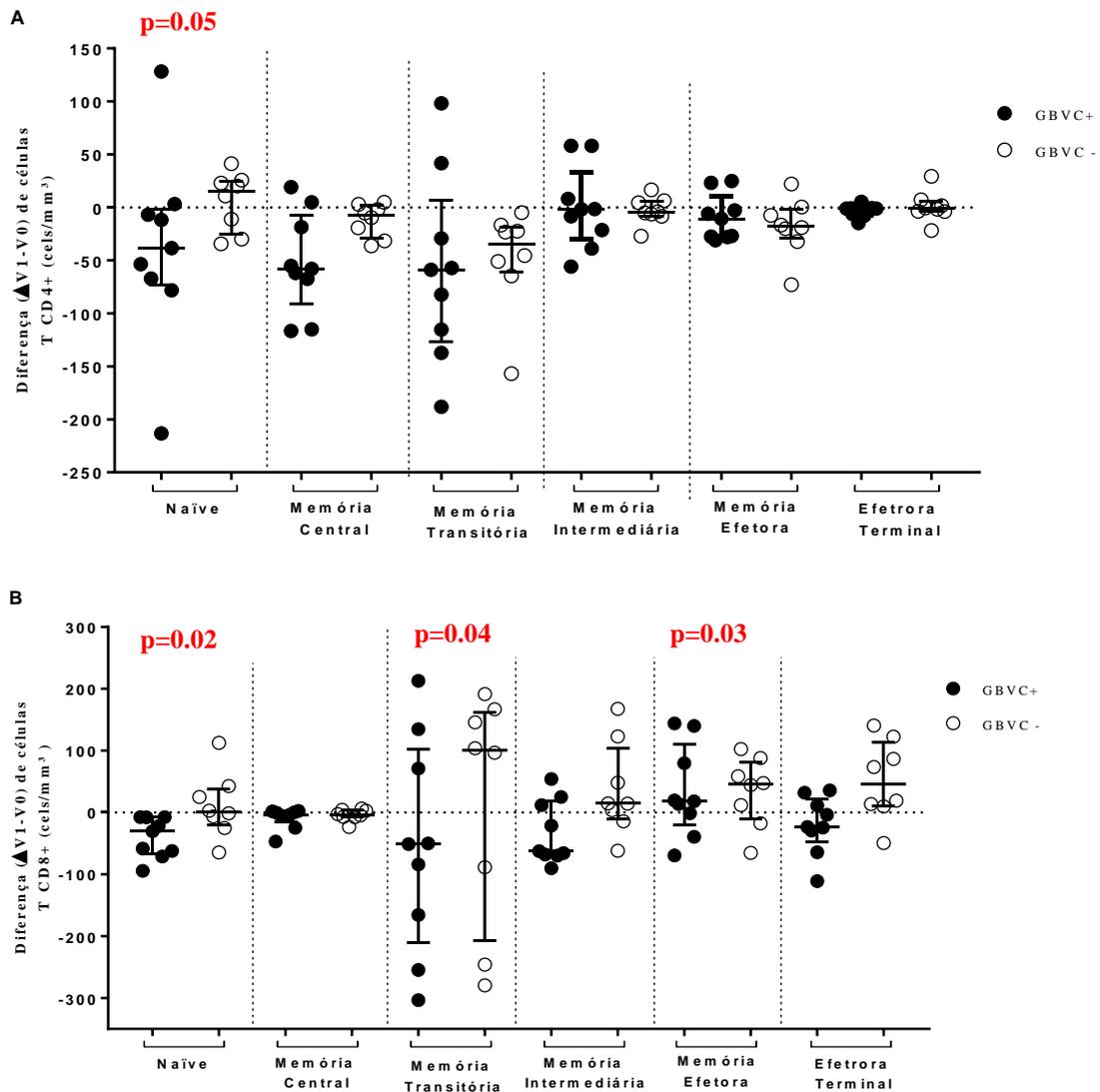


Figura 12. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) de ontogenia das células T CD4+ (A) e CD8+ (B) nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

Avaliando o perfil de ativação de cada subpopulação de memória na visita inicial o grupo GBV-C + apresentou uma menor quantidade de células expressando as moléculas CCR5 e CD38 quando comparado ao grupo GBV-C-, tanto nas células T CD4+ naïve ($p=0,04$), também observado nas células de memória central ($p=0.02$), dados não mostrados. Na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) da quantidade de células T CD4+ naïve expressando CCR5, CD38 e PD-1 os grupos não apresentaram diferenças na análise ao longo do tempo. Quanto à análise da diferença de células T CD8+ o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição na quantidade de células naïve

expressando a molécula CCR5 e PD-1 comparado com o grupo GBV-C- ao longo do tempo, **Figura 13B**.

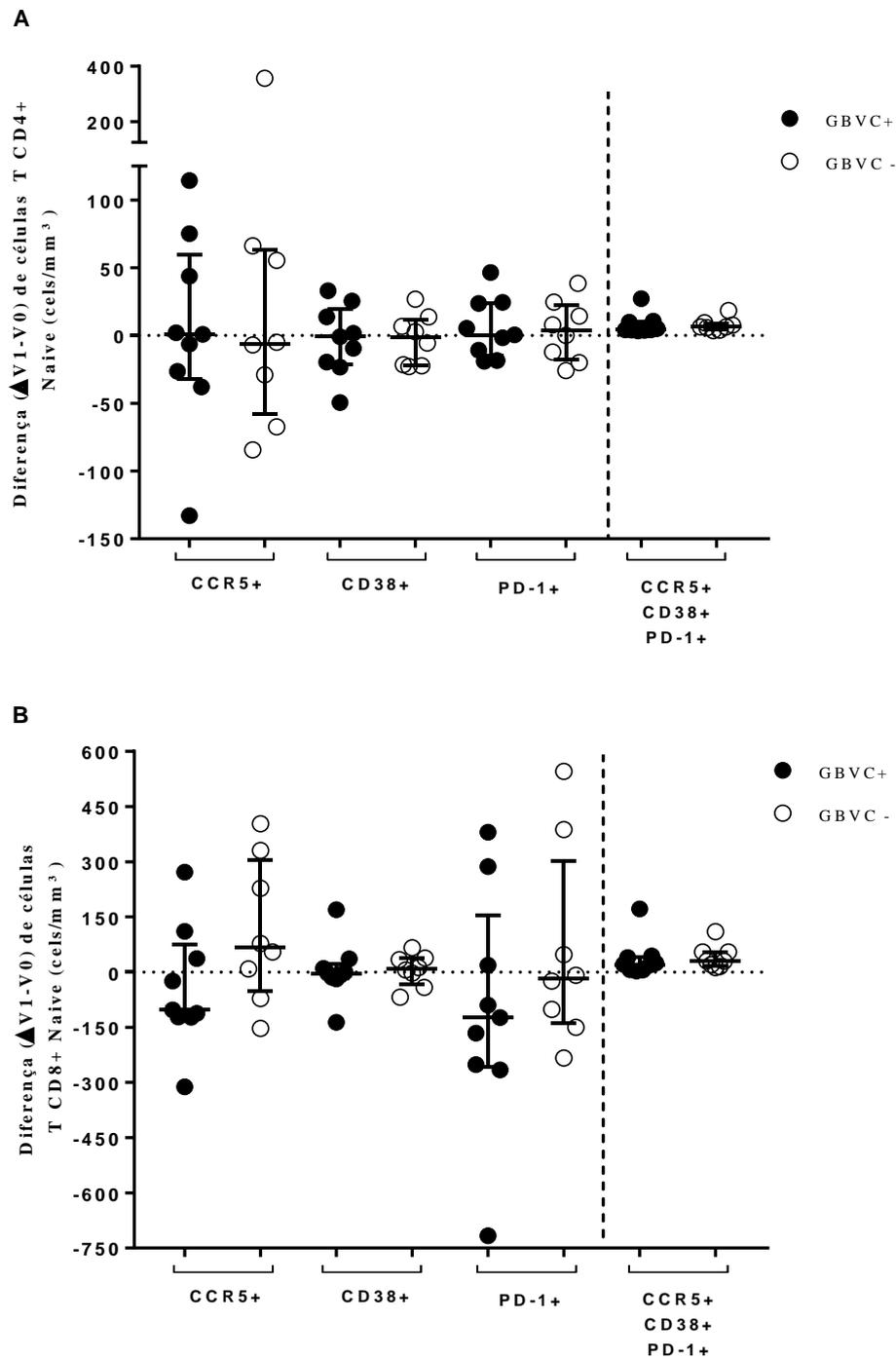


Figura 13. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) de ontogenia das células T CD4+ (A) e CD8+ (B) naive expressando CCR5, CD38, PD-1 e co-expressão deles nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos *scatter plot* com medianas e interquartis.

Na visita inicial o grupo GBV-C+ apresentou uma menor quantidade de células T CD4+ de memória central expressando simultaneamente CCR5, CD38 e PD-1 ($p=0,02$) e também nesse grupo há uma menor expressão das células T CD4+ naïve CCR5, CD38, PD-1 e CD95 no grupo GBV-C+ ($p=0,03$). Na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) das células T CD4+ de memória central o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição em comparação ao grupo GBV-C- ($p=0,08$).

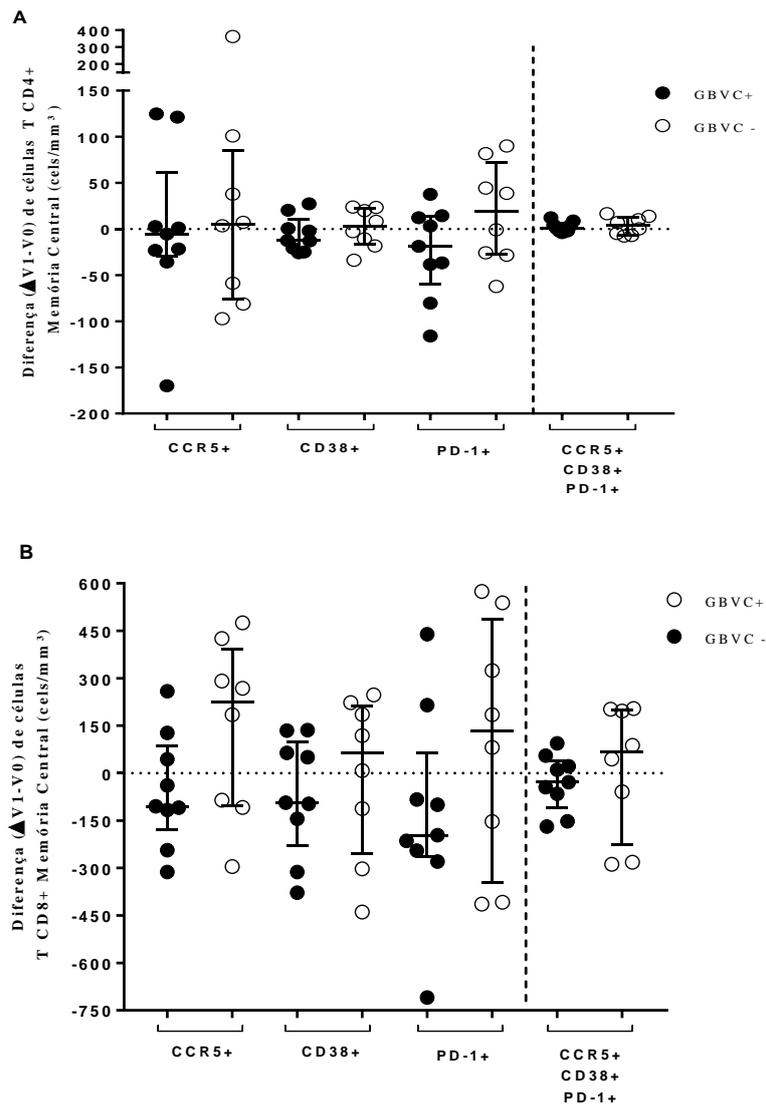


Figura 14. Análise da diferença ($\Delta V1-V0$) de ontogenia das células T CD4+ (A) e CD8+ (B) de memória central expressando CCR5, CD38 e PD-1 nos grupos HIV-1+/GBV-C+ e HIV-1+/GBV-C-. Gráficos scatter plot com medianas e interquartis.

Na análise da visita inicial das células T CD4+ de memória efetora expressando HLA-DR (p=0,01) e co-expressando HLA-DR+ PD-1+ (p=0,05) o grupo GBV-C+ apresentou uma maior quantidade comparado ao grupo GBV-C-. No entanto, na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) houve uma diminuição das células T CD4+ memória efetora expressando CCR5 e PD-1 no grupo GBV-C+ (p=0,07). Na análise da diferença ($\Delta V1-V0$) o grupo GBV-C + também apresentou uma queda das células T CD4+ efectoras terminal expressando HLA-DR (p=0,08).

Houve uma diminuição na análise da diferença das células T CD8+ naïve no grupo GBV-C+ comparado ao grupo GBV-C- (p=0,02). Também no grupo GBV-C + teve uma diminuição das células T CD8+ naïve expressando CD28 (p=0,03). Na análise da diferença também foi observado uma diminuição das células T CD8+ de memória central no grupo GBV-C+ expressando CCR5 (p=0,08) e CD28 (p=0,04) comparado ao grupo GBV-C-.

Na análise da diferença das células T CD8+ efectoras terminal o grupo GBV-C apresentou uma diminuição comparada ao grupo GBV-C- (p=0,03), também foi observado essa diminuição nessas células expressando HLA-DR (p=0,03). Em relação a análise da diferença dos outros marcadores de ativação e senescência (CCR5, CD38, PD-1, CD95) o grupo GBV-C + mostrou uma diminuição, mas não houve diferença estatística significativa. **Tabela 3** (Em anexo). Na **Figura 12**, pode-ser perceber a diferença na subpopulação de memória central nos dois grupos em relação as células T CD4+.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Atualmente aproximadamente 40 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV e no mundo são mais de 35 milhões de mortes como consequência da epidemia HIV/AIDS. Está entre as maiores causas de morte no mundo.

Como demonstrado por Stapleton e colaboradores em indivíduos HIV+ coinfectados com GBV-C há uma melhora no prognóstico comparado aos indivíduos sem viremia para GBV-C (54). A prolongada presença do GBV-C em indivíduos infectados pelo HIV tem sido associado a uma diminuição da carga viral do HIV, aumento da contagem das células T CD4+ e uma melhor resposta ao tratamento antirretroviral. Por outro lado, quando ocorre o clearance de GBV-C todos os efeitos são perdidos, mostrando que para garantir a proteção contra AIDS é necessária a replicação viral do GBV-C (11, 13, 26).

Embora o fenômeno associado ao GBV-C tenha sido confirmado por vários estudos epidemiológicos de larga escala, os mecanismos exatos pelo qual o GBV-C medeia esta proteção ainda não estão totalmente esclarecidos (13). Várias hipóteses foram propostas ao longo dos anos, como alterações nos níveis de citocinas, bloqueio da expressão de proteínas de membrana, redução de CCR5 e CXCR4 e produção de anticorpos neutralizantes cruzados. Muitos mecanismos têm sido associados a essa proteção. No entanto, não há um total conhecimento dessa interação.

Considerando que a maior parte dos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, os resultados encontrados tendem a evidenciar o efeito do GBV-C na expressão dos perfis de ativação exaustão e senescência comparado com o grupo GBV-C-. Para maior detalhamento das análises e melhor visualização dos dados encontradas ver Anexo A-L.

Assim como outros achados, nossos resultados também sugerem um papel protetor do GBV-C. Embora o número de amostras seja limitado, há uma diferença em relação a esses dados na comparação entre os dois grupos. Considerando que Stapleton et al (93) também demonstraram essa diminuição em uma coorte com 65 amostras com pacientes virêmicos para GBV-C. Os dados aqui relatados devem ser considerados importantes. Na análise comparativa, tanto na visita inicial, como na análise da diferença não houve diferença dos valores da carga viral, bem como não houve

diferença na contagem de células T CD4+ e CD8+. Apesar de não ter uma diferença estatisticamente significativa, houve um aumento das células T CD4+ no grupo GBV-C+. A infecção pelo HIV causa uma infecção crônica progressiva que leva a depleção de células T CD4+ e na fase aguda há um declínio dessas células associada à presença de uma grande quantidade de partículas virais, é nessa fase inicial que há alterações no sistema imune que levam a uma perda de resposta, mesmo em pacientes com TARV.

O perfil dos linfócitos T retratam a integridade da resposta imune e suas funções. As células T CD4+ exercem a ação protetora e auxilia na resposta a diferentes microrganismos e essa importante célula é o principal alvo da infecção pelo HIV. Por outro lado, as células T CD8+ exercem um importante papel no controle das infecções virais, com uma ação citotóxica.

A infecção causada pelo HIV é caracterizada por uma agressão crônica, sistêmica e gradual da resposta imune, com diminuição de células T CD4+, aumento das células T CD8+ e perda da capacidade de eliminação dos microorganismos. Essa perda progressiva da resposta imune leva a um comprometimento da função protetora com geração de uma imunodeficiência generalizada.

Vários mecanismos são propostos para explicar como o HIV esgota o repertório imunológico, principalmente células T CD4+. A replicação do HIV pode ser diretamente citopática, embora não explique toda o comprometido imune dessa infecção, especialmente na infecção crônica. Além da replicação constante do vírus que gera transcritos incompletos (DNA do HIV) que estimula uma intensa resposta inflamatória e morte de células não infectadas que poderiam auxiliar na resposta imune. A infecção pelo HIV causa dano de forma direta e indireta, já que esse vírus altera a capacidade de turnover do sistema imune.

Na fase inicial da infecção causada pelo HIV ocorrem danos ao sistema imune que são considerados críticos para a progressão para Aids. O papel da ativação celular é fundamental nessa resposta sendo indispensável à apresentação de uma defesa frente à invasão de microrganismos, essencial para a sobrevivência celular, manutenção da homeostase e proteção do organismo.

A ativação do sistema imune está associada a um pior prognóstico em pacientes com a infecção pelo HIV, levando a uma progressão mais rápida, Aids e morte. Portanto, compreender os mecanismos envolvidos na progressão dessa infecção é um desafio desde o começo da epidemia do HIV (85-88). Muitos estudos mostraram que a

ativação celular do sistema imune pode ser usada como preditor na geração da cronicidade e pior prognóstico na infecção causada pelo HIV (86, 89, 90). A expressão desses marcadores de ativação é essencial na resposta imune e é indispensável para a promoção de uma defesa eficaz contra a invasão do organismo, tornando-se indispensável para a sobrevivência celular e manutenção da homeostase (91, 92). No entanto um exagero nessa resposta é prejudicial para o sistema imune.

O vírus HIV causa um impacto na resposta imune, de forma complexa e crônica. Esse vírus infecta preferencialmente células T CD4+ ativadas, por isso essa infecção crônica pode estimular respostas imunomoduladoras que bloqueiam a função das células T e também podem prejudicar a formação de novas células e capacidade de resposta imune.

Ernst e colaboradores avaliaram níveis de mortalidade e morbidade em longo prazo em uma coorte de pacientes coinfectados com HIV-1 e GBV-C e demonstraram que os pacientes coinfectados tem taxas melhores de sobrevida e maiores contagens de células T CD4+ (94). Porém o efeito foi perdido na entrada da terapia antiretroviral. Maidana e colaboradores demonstraram que a presença do GBV-C promove melhora o prognóstico dos pacientes com HIV, com diminuição dos marcadores de ativação, independente das contagens de células T CD4+ e CD8+ e carga viral (64).

No presente estudo na análise da visita inicial não houve diferenças entre os grupos em relação aos dados de ativação celular na análise da expressão de CCR5, CD38 e HLA-DR, tanto em células T CD4+, como nas células T CD8+. No entanto, na análise de diferença há uma percepção que há uma progressão diferente entre os dois grupos, onde a expressão dos marcadores de ativação e senescência são menos expressos no grupo GBV-C+ nas células T CD4+ e CD8+.

Maidana e colaboradores demonstraram uma redução na frequência de células expressando marcadores de ativação celular. Utilizando CCR5, CD38, CD25 e CD69 demonstrou-se que havia uma diminuição no grupo HIV+ coinfectados com GVC-C (64). A interação entre o GBV-C e HIV pode ser por interação viral das mesmas vias utilizando coreceptores, na via que utiliza CCR5 pode levar a uma diminuição das citocinas e também pode interferir na via que utiliza CXCR4 diminuindo a expressão de SDF-1.

A expressão do CCR5 tem sido reportada em diversos trabalhos como um preditor de ativação celular e um bom marcador do prognóstico do HIV. Ele é um

importante coreceptor na infecção pelo HIV, utilizado por esse vírus para a entrada nas células T CD4+ receptor de quimiocinas (RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) envolvidas no início da resposta inflamatória (95). Essa molécula desempenha um papel importante na infecção pelo HIV, uma vez que esse vírus interage com essa molécula para completar o processo de fusão na membrana das células do hospedeiro. Tanto o HIV, como o GBV-C utilizam o co-receptor CCR5 para a entrada na célula. Na análise dos dados desse estudo não houve diferença em relação a esse marcador.

Portanto, a avaliação e acompanhamento do sistema imunológico na progressão do HIV são essenciais (96-100). Neste estudo, também analisamos a co-infecção por HIV e GBV-C em relação à senescência e à exaustão celular. A fim de esclarecer o papel da ativação que levam a um processo de senescência e exaustão celular na infecção pelo HIV.

Trabalhos recentes mostram uma associação entre a ativação imune crônica e um pior desfecho na infecção pelo HIV. Essa estimulação persistente leva a um esgotamento, capacidade de resposta imune satisfatória e uma perda dos recursos imunológicos.

Diversos estudos associam a baixa expressão de PD-1, CD95+ e CD57 a uma menor taxa de morte celular e proteção do sistema imune. E nesse sentido entende-se que a infecção pelo GBV-C pode conferir proteção a estes indivíduos contra a Aids. Uma vez que a ativação persistente promove uma depleção destas células do sistema imune comprometendo a integridade e resposta dessas células.

A ativação persistente durante a infecção crônica pelo HIV pode levar a um esgotamento dos recursos imunológicos (101). Assim, nessa análise foi constatado que a presença do GBV-C pode alterar os perfis de diferenciação celular e ativação, dados percebidos quando feita uma observação da diferença no grupo GBV-C + mostrando uma diminuição de PD-1, CD95 e CD57.

A análise da senescência e análise de exaustão também mostrou um perfil benéfico no grupo GBV-C+ em comparação ao grupo GBV-C-. Talvez, essa diminuição possa ser observada nesta população coinfetada pela proteção mediada pelo GBV-C (91, 102). Essa ativação exagerada leva à senescência do sistema imune, sendo uma das principais preocupações na era HAART, uma vez que o tratamento não elimina outros problemas relacionados a doenças cardiovasculares, câncer, doenças hepáticas, renais, declínio neurocognitivo e outras comorbidades (103-105).

Essa ativação exagerada ou descontrolada na infecção pelo vírus HIV é importante na patogênese da doença e a persistência dessa ativação causa uma imunodeficiência que compromete a resposta imune e sobrevivência do indivíduo. Um trabalho recente relatou a diminuição da ativação em indivíduos GBV-C positivo, que reforça os achados desse estudo e corroboram com a hipótese de proteção associada ao GBV-C (106).

A ativação celular que leva à exaustão imune na infecção pelo HIV vai além da perda simples de células T CD4+ e CD8+ específicas contra o vírus. Já que na infecção causada por esse vírus podem ser encontradas células altamente diferenciadas, dependente do estágio da infecção. A falta de controle da replicação do HIV e a progressão da infecção podem ser a consequência do esgotamento dessas células. Isso pode acontecer em decorrência da exaustão clonal das células T CD8+ e também de mecanismos das respostas primárias.

A avaliação da senescência celular já está bem caracterizada e explorada na infecção pelo HIV, a ativação celular de forma exacerbada é seguida por exaustão e morte celular. Esse envelhecimento resulta em outros defeitos funcionais, bem como: diminuição do repertório de células T e produção de interleucinas, diminuição da população de células T de memória comprometendo a resposta imune.

Até o momento, as consequências da presença do vírus HIV na homeostase do sistema imunológico ainda não foram totalmente elucidadas. A compreensão das moléculas envolvidas no envelhecimento do sistema imunológico pode auxiliar no esclarecimento dessa infecção. A alta expressão de CD95/ Fas e o aumento da expressão da molécula PD1 e CD57 relacionou-se a um perfil apoptótico em pacientes infectados com HIV [21]. Westendorp e colaboradores demonstram que a apoptose está relacionada a uma alta expressão de CD95. Nesse estudo fez-se uma relação entre a apoptose utilizando o receptor CD95 (APO-1/Fas) (107).

A diferenciação ontogênica dos linfócitos T com a presença de células de memória proporciona uma resposta distinta levando à imediata proteção. Na infecção pelo HIV há uma maior diferenciação com presença de células de memória central e efetora, comparado aos indivíduos saudáveis (108). Aqui nesse estudo, percebeu-se que no grupo HIV-1+/GBV-C há uma diminuição das células naïve e de memória central.

As subpopulações de células T naïve e de memória demonstraram uma menor expressão dos marcadores de ativação no grupo GBV-C+, assim como houve uma

diminuição nesse grupo dos marcadores de senescência e exaustão celular. Houve também uma diminuição da subpopulação de células efetora terminal expressando HLA-DR no grupo GBV-C+. Além da diminuição das células naïve e memória central expressando CD28 no grupo GBV-C+. Essa molécula exerce uma função coestimulatória necessária na geração da resposta imune.

Os estudos da resposta imune exacerbada em relação à ativação e senescência visam uma ampliação nessa avaliação da interação do vírus GBV-C e HIV, uma relação não bem entendida e caracterizada. Apesar do pequeno número nesta coorte, não houve diferenças significativas. Mas o impacto do estudo na co-infecção com HIV é importante no contexto atual de novas abordagens para combater a epidemia de HIV / AIDS.

A infecção pelo GBV-C está associada a uma sobrevivência prolongada e a uma diminuição da ativação de células T em indivíduos infectados pelo HIV que não recebem ART. [Stapleton e colaboradores \(REF plus one, 2012\)](#). Nesse trabalho foi avaliado em relação entre a presença do GBV-C a ativação celular em indivíduos infectados pelo HIV, também avaliaram a ativação celular com os marcadores CD38+ e HLA-DR+, além de proliferação e co-receptores. Concluiu-se nesse estudo que houve redução na ativação nas células naïve, memória central, memória efetora e células efetoras. A presença do GBV-C foi associada à redução da expressão dos marcadores de ativação e proliferação, independente da carga viral do HIV

A ativação crônica associada à senescência e exaustão celular vai além da perda simples de células T, por isso compreender outros mecanismos envolvidos se faz necessário para elucidar a infecção causada pelo HIV. Uma vez que a patogênese do HIV é influenciada pelo processo de ativação crônica das células T esses achados podem contribuir para o entendimento do processo de sobrevivência prolongada nesses indivíduos coinfectados.

Conclusão

8.CONCLUSÃO

Apesar da limitação no tamanho da amostra nos dois grupos estudados, nosso estudo sugere que a infecção persistente por GBV-C está associada à redução da ativação imune, senescência e exaustão nas subpopulações de células T CD4+ e CD8+. Estes achados ajudam a esclarecer o papel da coinfeção com HIV na presença dos marcadores de ativação, senescência e exaustão celular.

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com estudos anteriores publicados, inclusive dados do nosso grupo. O estudo tentou responder aos objetivos propostos, corroborando com as evidências relatadas na literatura, que sugerem o provável papel protetor da co-infecção pelo GBV-C em indivíduos recém-infectados pelo HIV.

Neste estudo, observou-se que há diferenças no perfil de ativação celular e senescência na infecção pelo GBV-C persistente e foi associada a um perfil diferente com diminuição desses marcadores nos indivíduos coinfectados com HIV.

9.REFERÊNCIAS

1. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*. 2008;22(4):439-46.
2. Burger S, Poles MA. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Semin Liver Dis*. 2003;23(2):115-24.
3. K. AA, H. LA, PILLAI S. *Imunologia celular e molecular* 2ed. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER; 2008. 560 p.
4. Highleyman L. Inflammation, immune activation, and HIV. *BETA*. 2010;22(2):12-26.
5. Nixon DE, Landay AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):498-503.
6. UNAIDS. Global AIDS Response Progress Reporting 2015. 2015 [cited 14/04/2016]. www.unaids.org/en/dataanalysis/Knowyourresponde/globalaidsprogressreporting, [cited 14/04/2016].
7. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999;285(1):1-32.
8. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2587-99.
9. McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, et al. Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet*. 2016;387(10013):53-60.
10. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis*. 1998;177(6):1723-6.
11. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2001;345(10):715-24.
12. Lefrère JJ, Loiseau P, Maury J, Lasserre J, Mariotti M, Ravera N, et al. Natural history of GBV-C/hepatitis G virus infection through the follow-up of GBV-C/hepatitis G virus-infected blood donors and recipients studied by RNA polymerase chain reaction and anti-E2 serology. *Blood*. 1997;90(9):3776-80.
13. Lefrère JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*. 1999;179(4):783-9.
14. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;17(3):209-13.
15. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3401-5.
16. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*. 1995;1(6):564-9.
17. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 1996;271(5248):505-8.
18. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*. 1996;48(1):60-7.

19. Saito S, Tanaka K, Kondo M, Morita K, Kitamura T, Kiba T, et al. Plus- and minus-stranded hepatitis G virus RNA in liver tissue and in peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(2):288-91.
20. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med.* 1997;336(11):747-54.
21. Schaluder GG, Dawson GJ, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Gutierrez RA, Heynen CA, et al. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol.* 1995;46(1):81-90.
22. Fiordalisi G, Zanella I, Mantero G, Bettinardi A, Stellini R, Paraninfo G, et al. High prevalence of GB virus C infection in a group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. *J Infect Dis.* 1996;174(1):181-3.
23. Fogeda M, Navas S, Martín J, Casqueiro M, Rodríguez E, Arocena C, et al. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus. *J Virol.* 1999;73(5):4052-61.
24. Xiang J, Wünschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol.* 2000;74(19):9125-33.
25. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2000;132(12):959-63.
26. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2001;345(10):707-14.
27. Devereux H, Sabin CA, Kinson Z, Brown D, Griffioen A, Dusheiko GM, et al. Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *J Med Virol.* 1998;56(4):316-20.
28. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 2):233-46.
29. Adams MJ, King AM, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol.* 2013;158(9):2023-30.
30. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat.* 2009;16(11):757-68.
31. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol.* 1995;69(9):5621-30.
32. Oubina J, Mathet V, Feld M, Della Latta M, Ferrario D, Verdun R, et al. Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina. *Virus Research.* 1999;65(2):121-9.
33. Noguchi S, Sata M, Suzuki H, Ohba K, Mizokami M, Tanikawa K. GB virus C (GBV-C) hepatitis G virus (HGV) infection among intravenous drug users in Japan. *Virus Research.* 1997;49(2):155-62.
34. Kaneko T, Hayashi S, Arakawa Y, Abe K. Molecular cloning of full-length sequence of hepatitis G virus genome isolated from a Japanese patient with liver disease. *Hepatology Research.* 1998;12(3):207-16.
35. Saito T, Ishikawa K, Osei-Kwasi M, Kaneko T, Brandful J, Nuvor V, et al. Prevalence of hepatitis G virus and characterization of viral genome in Ghana. *Hepatology Research.* 1999;13(3):221-31.

36. Tribl B, Schoniger-Hekele M, Petermann D, Bakos S, Penner E, Muller C. Prevalence of GBV-C/HGV-RNA, virus genotypes, and anti-E2 antibodies in autoimmune hepatitis. *American Journal of Gastroenterology*. 1999;94(11):3336-40.
37. Lu L, Ng M, Zhou B, Luo H, Nakano T, Robertson B, et al. Detection and genotyping of GBV-C/HGV variants in China. *Virus Research*. 2001;73(2):131-44.
38. Ebadi M, Yaghoobi R, Geramizadeh B, Bahmani M, Malek-Hosseini S, Nemayandeh M. Prevalence of HCV and HGV Infections in Iranian Liver Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 2011;43(2):618-20.
39. Lampe E, de Oliveira J, Pereira J, Saback F, Yoshida C, Niel C. Hepatitis G virus (GBV-C) infection among Brazilian patients with chronic liver disease and blood donors. *Clinical and Diagnostic Virology*. 1998;9(1):1-7.
40. Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocencio L, Fonseca L, Duarte A. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Research*. 2010;151(2):148-52.
41. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis*. 2006;193(3):451-4.
42. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton J. Human Pegivirus (HPgV or GB virus C) RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA containing particles are infectious in vitro. *J Gen Virol*. 2014.
43. Gutierrez RA, Dawson GJ, Knigge MF, Melvin SL, Heynen CA, Kyrk CR, et al. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J Med Virol*. 1997;53(2):167-73.
44. Tanaka E, Kiyosawa K, Shimoda K, Hino K, Tacke M, Schmolke S, et al. Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepat*. 1998;5(3):153-9.
45. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*. 1998;28(2):379-84.
46. Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Anal Biochem*. 2010;396(1):51-8.
47. Keck ZY, Li SH, Xia J, von Hahn T, Balfe P, McKeating JA, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol*. 2009;83(12):6149-60.
48. Keck ZY, Angus AG, Wang W, Lau P, Wang Y, Gatherer D, et al. Non-random escape pathways from a broadly neutralizing human monoclonal antibody map to a highly conserved region on the hepatitis C virus E2 glycoprotein encompassing amino acids 412-423. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):e1004297.
49. Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Sauleda S, Esteban JI, Tanaka E, et al. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology*. 1997;26(6):1626-33.
50. Ramezani A, Gachkar L, Eslamifar A, Khoshbaten M, Jalilvand S, Adibi L, et al. Detection of hepatitis G virus envelope protein E2 antibody in blood donors. *Int J Infect Dis*. 2008;12(1):57-61.
51. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, Schmitt C, Fritsch S, Lang JM, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(9):721-4.
52. Jarvis LM, Davidson F, Hanley JP, Yap PL, Ludlam CA, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet*. 1996;348(9038):1352-5.

53. Menéndez C, Sánchez-Tapias JM, Alonso PL, Giménez-Barcons M, Kahigwa E, Aponte JJ, et al. Molecular evidence of mother-to-infant transmission of hepatitis G virus among women without known risk factors for parenteral infections. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2333-6.
54. Stapleton JT, Xiang J, McLinden JH, Bhattarai N, Chivero ET, Klinzman D, et al. A novel T cell evasion mechanism in persistent RNA virus infection. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2014;125:14-24; discussion -6.
55. Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 2003;187(3):504-7.
56. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med.* 2004;350(10):981-90.
57. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med.* 2006;7(1):25-31.
58. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS.* 2003;17(10):1457-62.
59. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, Tural C, Clotet B, Blackard JT, et al. GB virus C coinfection in advanced HIV type-1 disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4(+) T-cells. *Antivir Ther.* 2010;15(5):745-52.
60. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol.* 2010;185(7):4496-505.
61. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, et al. GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS.* 2009;23(5):605-10.
62. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(5):563-72.
63. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, Chang Q, Kaufman TM, Klinzman D, et al. Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol.* 2009;183(12):7860-9.
64. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS.* 2009;23(17):2277-87.
65. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(42):15570-5.
66. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 12):3341-6.
67. Ranjbar MM, Ghorban K, Alavian SM, Keyvani H, Dadmanesh M, Roayaei Ardakany A, et al. GB Virus C/Hepatitis G Virus Envelope Glycoprotein E2: Computational Molecular Features and Immunoinformatics Study. *Hepat Mon.* 2013;13(12):e15342.
68. Eissmann K, Mueller S, Sticht H, Jung S, Zou P, Jiang S, et al. HIV-1 fusion is blocked through binding of GB Virus C E2-derived peptides to the HIV-1 gp41 disulfide loop [corrected]. *PLoS One.* 2013;8(1):e54452.
69. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS.* 2007;21(5):645-7.

70. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol*. 2011;85(14):7037-47.
71. George SL, Varmaz D, Tavis JE, Chowdhury A. The GB virus C (GBV-C) NS3 serine protease inhibits HIV-1 replication in a CD4+ T lymphocyte cell line without decreasing HIV receptor expression. *PLoS One*. 2012;7(1):e30653.
72. Bhattarai N, Stapleton JT. Study design may explain discrepancies in GB virus C effects on interferon- γ and interleukin-2 production and CD38 expression in T lymphocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(4):568-9; author reply 9.
73. Sacchi A, Lalle E, Martini F, Abbate I, Castilletti C, D'Offizi G, et al. GB-Virus type C effect on HIV infection, interferon system, and dendritic cells. *Archives of Medical Research*. 2008;39(3):362-3.
74. Romagnani S, Del Prete G, Manetti R, Ravina A, Annunziato F, De Carli M, et al. Role of TH1/TH2 cytokines in HIV infection. *Immunol Rev*. 1994;140:73-92.
75. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Kaufman TM, Stapleton JT. GB virus C envelope protein E2 inhibits TCR-induced IL-2 production and alters IL-2-signaling pathways. *J Immunol*. 2012;189(5):2211-6.
76. Keyvani H, Mohammadi A, Sabouri Ghannad M, Hajabdolbaghi M. The Effect of GBV-C Infection on CD4 Count and Viral Loads in Patients Infected With HIV. *Hepat Mon*. 2012;12(1):39-42.
77. Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien S, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *American Journal of Human Genetics*. 1997;61(6):1261-7.
78. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol*. 1999;162(11):6942-6.
79. Tomiyama H, Miwa K, Shiga H, Moore YI, Oka S, Iwamoto A, et al. Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol*. 1997;158(10):5026-34.
80. Bévilacqua S, Rabaud C, May T. [HIV-tuberculosis coinfection]. *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153(2):113-8.
81. Chun HM, Roediger MP, Hullsiek KH, Thio CL, Agan BK, Bradley WP, et al. Hepatitis B virus coinfection negatively impacts HIV outcomes in HIV seroconverters. *J Infect Dis*. 2012;205(2):185-93.
82. Cobos Jiménez V, Wit FW, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis*. 2016;214(2):216-25.
83. Maidana MT, Sabino EC, Kallas EG. GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(2):122-5.
84. Giret MT, Miraglia JL, Sucupira MC, Nishiya A, Levi JE, Diaz RS, et al. Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(4):e18407.
85. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1534-43.
86. Kovacs A, Karim R, Mack WJ, Xu J, Chen Z, Operskalski E, et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2010;201(6):823-34.
87. Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012;9(2):139-47.

88. Huson MA, Wouters D, van Mierlo G, Grobusch MP, Zeerleder SS, van der Poll T. HIV Coinfection Enhances Complement Activation During Sepsis. *J Infect Dis.* 2015.
89. Bansal A, Sterrett S, Erdmann N, Westfall AO, Dionne-Odom J, Overton ET, et al. Normal T-cell activation in elite controllers with preserved CD4+ T-cell counts. *AIDS.* 2015;29(17):2245-54.
90. Sajadi MM, Pulijala R, Redfield RR, Talwani R. Chronic immune activation and decreased CD4 cell counts associated with hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. *AIDS.* 2012;26(15):1879-84.
91. Rydze RT, Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther.* 2012;17(7):1271-9.
92. Bhattarai N, Rydze RT, Chivero ET, Stapleton JT. GB virus C viremia is associated with higher levels of double-negative T cells and lower T-cell activation in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2012;206(9):1469-72.
93. Ernst D, Greer M, Akmatova R, Pischke S, Wedemeyer H, Heiken H, et al. Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: a 20-year follow-up study. *HIV Med.* 2014;15(4):245-50.
94. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20(1):111-26.
95. Bastard JP, Fellahi S, Couffignal C, Raffi F, Gras G, Hardel L, et al. Increased systemic immune activation and inflammatory profile of long-term HIV-infected ART-controlled patients is related to personal factors, but not to markers of HIV infection severity. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1816-24.
96. Borges Á, Weitz JI, Collins G, Baker JV, Lévy Y, Davey RT, et al. Markers of inflammation and activation of coagulation are associated with anaemia in antiretroviral-treated HIV disease. *AIDS.* 2014;28(12):1791-6.
97. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno A, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med.* 2015;16(4):240-8.
98. Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, et al. T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis.* 2011;203(4):452-63.
99. Yao ZQ, Moorman JP. Immune exhaustion and immune senescence: two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(3):193-201.
100. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol.* 2007;42(5):432-7.
101. Baggio-Zappia GL, Barbosa AeJ, Brunialti MK, Salomão R, Granato CF. Influence of GB virus C on IFN- γ and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):662-9.
102. Yoshimura K. Current status of HIV/AIDS in the ART era. *J Infect Chemother.* 2017;23(1):12-6.
103. Patel N, Veve M, Kwon S, McNutt LA, Fish D, Miller CD. Frequency of electrocardiogram testing among HIV-infected patients at risk for medication-induced QTc prolongation. *HIV Med.* 2013;14(8):463-71.
104. Tan-Tam C, Liao P, Montaner JS, Hull MW, Scudamore CH, Erb SR, et al. HIV and liver transplantation: The British Columbia experience, 2004 to 2013. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2014;25(3):159-62.

105. Chivero ET, Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Stapleton JT. Human Pegivirus (HPgV; formerly known as GBV-C) inhibits IL-12 dependent natural killer cell function. *Virology*. 2015;485:116-27.
106. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995;375(6531):497-500.
107. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.

Anexos

10.ANEXOS

Anexo A- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ (*Naïve*, memória central, memória transitória, memória intermediária, memória efetora e efetora terminal) expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Alguns resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos $p < 0,05$			
CD8+Naïve	-30,4 (-62,1 a -8,0)	0,8 (-15,7 a 33,9)	0,02
CD8+Naïve CD28+	-223,7 (-234,0 a -48,1)	184,5 (-112,8 a 230,8)	0,03
CD8+M. Central CD28+	-146,9 (-259,1 a -38,6)	87,6 (-122,2 a 151,5)	0,04
CD8+Efetora Terminal	-23,3 (-29,3 a 11,2)	46,4 (11,7 a 104,5)	0,03
CD8+Efetora Terminal HLA-DR+	-27,8 (-73,0 a -14,9)	26,6 (-13,6 a 80,6)	0,03
(Vn-V0) Diferença entre os grupos $p < 0,09$			
CD4+M. Transitória CCR5+HLA-DR+	-4,3 (-8,2 a -2,2)	7,9 (-0,6 a 19,8)	0,08
CD4+ Naïve	-38,4 (-67,1 a -7,0)	15,5 (-20,5 a 24,4)	0,05
CD4+M. Central	-57,9 (-67,3 a -18,5)	-7,4 (-25,4 a 0,5)	0,08
CD4+M. Efetora CCR5+PD1+	-18,1 (-53,6 a -2,2)	23,2 (2,3 a 89,3)	0,07
CD4+Efetora Terminal HLA-DR+	-36,1 (-92,6 a 9,4)	16,6 (-20,2 a 51,6)	0,08
CD8+M. Central CCR5+	-105,1 (-116,0 a 44,2)	226,6 (-96,8 a 358,3)	0,08

Anexo B- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Total, Naïve e Memória central, expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em GBV-C+ e Aumento em GBV-C-			
<i>Células TCD4+ Total</i>			
CD4+CD57+	-1,0 (-35,8 a 8,4)	1,5 (-24,7 a 37,3)	0,56
CD4+ HLA DR+	-10,3 (-11,9 a -0,8)	3,4 (-19,8 a 18,5)	0,39
CD4+ CCR5+ PD1+	-12,7 (-22,0 a 5,3)	1,9 (-25,6 a 37,4)	0,63
CD4+PD1+ CD38+	-2,2 (-6,4 a 4,3)	4,6 (-13,1 a 14,8)	0,85
CD4+ CCR5+ HLA DR+	-5,5 (-8,4 a 1,6)	0,8 (-5,6 a 14,8)	0,34
CD4+ PD1+ HLA DR+	-5,9 (-11,0 a 12,8)	2,6 (-17,2 a 20,3)	0,81
CD4+CCR5+ CD38+	-2,5 (-5,4 a 5,6)	0,5 (-6,0 a 11,3)	0,77
CD4+CD38+ HLA DR+ CCR5+	-1,9 (-3,6 a 2,7)	0,2 (-3,6 a 6,9)	0,6
CD4+CCR5+ PD1+ CD38+	-2,4 (-4,1 a 3,9)	1,9 (-5,6 a 10,3)	0,77
CD4+CCR5+ PD1+ HLA DR+	-5,3 (-6,4 a -0,9)	2,5 (-10,6 a 15,9)	0,63
CD4+CCR5+ PD1+HLA DR+	-0,6 (-2,5 a 7,0)	0,0 (-2,8 a 4,9)	0,85
CD4+PD1+ CD38+ HLA DR+	-1,7 (-3,7 a 2,6)	0,4 (-7,6 a 7,7)	0,92
CD4+ CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-3,2 (-3,7 a 4,1)	1,4 (-6,6 a 8,3)	0,85
<i>Células T CD4+ Naïve</i>			
CD4 Naïve CCR5+ PD1+	-2,7 (-3,9 a 24,0)	4,2 (-9,7 a 23,2)	0,92
CD4 Naïve PD1+ HLA DR+	-0,8 (-2,7 a 7,5)	0,1 (-3,2 a 3,5)	0,77
CD4 Naïve CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-0,5 (-1,0 a 1,6)	0,4 (-1,3 a 1,7)	0,92
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+Memória CentralCCR5+	-5,4 (-23,2 a 2,5)	5,4 (-70,0 a 69,3)	0,7
CD4+Memória Central CD57+	-5,4 (-8,4 a 4,3)	3,7 (-7,0 a 22,0)	0,5
CD4+Memória Central HLA DR+	-5,8 (-8,2 a 10,3)	2,2 (-6,7 a 12,3)	0,56
CD4+Memória Central PD1+	-18,9 (-38,4 a 12,3)	18,9 (-27,1 a 63,0)	0,15
CD4+Memória Central CD38+	-12,5 (-20,8 a 0,4)	2,7 (-14,5 a 21,7)	0,5
CD4+Memória Central PD1+ CD95+	-13,1 (-60,9 a 9,5)	16,7 (-31,1 a 56,8)	0,21
CD4+Memória Central PD1+ CD38+	-2,7 (-5,7 a 3,7)	10,9 (-11,0 a 16,5)	0,39
CD4+Memória Central CCR5+ PD1+	-3,0 (-13,8 a 0,5)	9,3 (-2,2 a 34,8)	0,18
CD4+Memória Central CCR5+ CD38+	-1,8 (-4,7 a 6,1)	1,7 (-1,5 a 19,6)	0,29
CD4+Memória Central CCR5+ HLA DR+	-3,1 (-4,9 a -2,4)	5,2 (-1,4 a 9,6)	0,25
CD4+Memória Central CD38+ HLA DR+	-0,4 (-0,8 a 1,5)	1,7 (-5,4 a 5,6)	0,77
CD4+Memória Central CCR5+ PD1+ HLA DR+	-1,0 (-3,4 a 6,8)	3,7 (-3,0 a 8,4)	0,56
CD4+Memória Central CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-1,9 (-2,4 a 8,1)	2,3 (-3,2 a 6,1)	0,92

Anexo C- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Memória Transitória e Intermediária, expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em GBV-C+ e Aumento em GBV-C-			
<i>Células T CD4+ Memória Transitória</i>			
CD4+M. Transitória CD38+	-6,3 (-9,6 a -3,7)	3,7 (-10,6 a 20,5)	0,63
CD4+M. Transitória CCR5+	-11,7 (-47,2 a -4,8)	6,0 (-50,2 a 69,9)	0,44
CD4+M. Transitória HLA DR+	-13,0 (-15,8 a 1,5)	6,9 (-11,4 a 19,7)	0,25
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+	-9,8 (-19,3 a 4,5)	12,3 (3,6 a 47,8)	0,1
CD4+M. Transitória CCR5+ CD38+	-0,7 (-3,8 a 0,6)	4,6 (-2,1 a 19,2)	0,21
CD4+M. Transitória PD1+ HLA DR+	-4,0 (-11,4 a 0,0)	3,8 (-10,1 a 17,7)	0,63
CD4+M. Transitória CD38+ HLA DR+	-2,2 (-4,5 a -1,1)	0,2 (-6,3 a 7,8)	0,63
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+ CD38+	-0,4 (-3,8 a 4,8)	3,5 (-3,9 a 17,4)	0,56
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+ HLA DR+	-1,8 (-4,3 a 0,4)	5,6 (-2,2 a 16,3)	0,29
CD4+M. Transitória CD38+ HLA DR+ CCR5+	-2,6 (-4,3 a 1,6)	1,9 (-1,9 a 7,9)	0,25
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+ CD38+ CD95+	-0,9 (-3,7 a 5,0)	3,8 (-1,8 a 15,6)	0,44
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	-1,1 (-2,5 a 0,1)	2,0 (-3,4 a 5,8)	0,7
CD4+M. Transitória CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-2,5 (-4,5 a 5,3)	4,8 (-2,5 a 12,0)	0,34
<i>Células T CD4+ Memória Intermediária</i>			
CD4+M. Intermediária CD38+	-30,8 (-44,6 a 4,1)	1,00 (-22,9 a 5,1)	0,29
CD4+M. Intermediária CD57+	-45,9 (-68,9 a 10,2)	7,5 (-28,2 a 42,1)	0,29
CD4+M. Intermediária HLA DR+	-20,5 (-55,8 a -5,5)	0,8 (-10,9 a 20,7)	0,12
CD4+M. Intermediária CCR5+ CD38+	-3,7 (-14,6 a 3,3)	4,3 (-6,6 a 16,5)	0,29
CD4+M. Intermediária CCR5+ HLA DR+	-7,8 (-35,7 a -3,2)	2,6 (-11,8 a 25,5)	0,15
CD4+M. Intermediária CCR5+ PD1+	-21,2 (-44,1 a 7,3)	8,7 (-43,4 a 28,7)	0,44
CD4+M. Intermediária PD1+ CD95+	-10,5 (-33,7 a 3,4)	8,1 (-38,5 a 33,4)	0,56
CD4+M. Intermediária PD1+ HLA DR+	-13,8 (-35,2 a -2,7)	2,7 (-8,3 a 14,0)	0,21
CD4+M. Intermediária PD1+ CD38+	-9,1 (-13,3 a -0,5)	5,7 (-4,4 a 9,6)	0,29
CD4+M. Intermediária CD38+ HLA DR+	-8,7 (-10,1 a -0,6)	0,8 (-2,6 a 14,0)	0,12
CD4+M. Intermediária CCR5+ PD1+ HLA DR+	-11,2 (-26,2 a -0,7)	2,0 (-8,5 a 12,0)	0,12
CD4+M. Intermediária CCR5+ PD1+ CD38+	-6,0 (-10,6 a 0,5)	5,8 (-4,5 a 8,1)	0,29
CD4+M. Intermediária CD38+ HLA DR+ CCR5+	-2,5 (-9,8 a 2,2)	2,6 (-4,1 a 18,7)	0,15
CD4+M. Intermediária PD1+ CD38+ HLA DR+	-3,7 (-10,9 a -2,5)	2,0 (-2,6 a 7,0)	0,18
CD4+M. Intermediária CCR5+ PD1+ CD38+ CD95+	-1,5 (-2,8 a 1,0)	1,5 (-3,4 a 5,7)	0,5
CD4+M. Intermediária CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	-3,0 (-7,7 a -0,4)	1,6 (-2,5 a 7,1)	0,12

Anexo D- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Memória Efetora e Efetora Terminal, expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em GBV-C+ e Aumento em GBV-C-			
<i>Células T CD4+ Memória Efetora</i>			
CD4+M. Efetora PD1+	-119,8 (-207,0 a -37,0)	18,9 (-73,9 a 94,4)	0,1
CD4+M. Efetora CCR5+	-28,1 (-62,0 a 14,4)	5,1 (-27,3 a 75,6)	0,44
CD4+M. Efetora HLA DR+	-20,8 (-27,9 a 14,6)	9,2 (-9,0 a 26,0)	0,29
CD4+M. Efetora CCR5+ CD38+	-1,3 (-6,3 a 16,4)	2,5 (-8,5 a 14,8)	0,85
CD4+M. Efetora CCR5+ HLA-DR+	-1,9 (-21,9 a 3,2)	14,8 (-2,6 a 19,0)	0,12
CD4+M. Efetora PD1+ HLA DR+	-4,8 (-16,4 a 5,2)	7,6 (-11,6 a 27,5)	0,34
CD4+M. Efetora CCR5+ PD1+ CD38+	-1,8 (-4,5 a 15,4)	3,4 (-7,3 a 14,6)	0,92
CD4+M. Efetora CCR5+ PD1+ HLA DR+	-1,1 (-18,5 a 1,1)	11,0 (-2,9 a 18,6)	0,12
<i>Células T CD4+ Efetora Terminal</i>			
CD4+E. Terminal CD57+	-211,0 (-232,9 a 42,4)	17,2 (-40,9 a 89,8)	0,25
CD4+E. Terminal CCR5+	-42,9 (-133,4 a -32,0)	26,7 (-40,7 a 78,5)	0,1
CD4+E. Terminal CD38+	-18,8 (-41,6 a 13,6)	27,3 (-20,5 a 31,9)	0,39
CD4+E. Terminal CD38+HLA DR+	-6,8 (-38,6 a 23,5)	12,8 (-3,1 a 24,9)	0,44
CD4+E. Terminal CCR5+PD1+	-75,7 (-145,5 a 2,6)	4,8 (-33,1 a 65,1)	0,25
CD4+E. Terminal CCR5+CD38+	-12,6 (-30,2 a 28,7)	20,4 (-5,1 a 30,9)	0,56
CD4+E. Terminal CCR5+HLA DR+	-24,8 (-61,9 a 23,3)	31,2 (-13,6 a 62,9)	0,12
CD4+E. Terminal PD1+CD95+	-49,1 (-85,7 a -7,8)	10,5 (-90,7 a 33,8)	0,44
CD4+E. Terminal PD1+HLA DR+	-33,7 (-67,9 a 6,0)	10,7 (-14,3 a 32,6)	0,25
CD4+E. Terminal PD1+CD38+	-17,7 (-28,4 a 33,9)	4,5 (-24,4 a 28,5)	1
CD4+E. Terminal CD38+HLA DR+CCR5+	-3,6 (-26,0 a 13,1)	10,2 (-0,7 a 19,3)	0,29
CD4+E. Terminal PD1+CD38+HLA DR+	-7,7 (-35,0 a 9,1)	7,9 (-7,8 a 15,5)	0,5
CD4+E. Terminal CCR5+PD1+CD38+	-11,9 (-14,1 a 24,8)	6,3 (-16,7 a 26,3)	0,92
CD4+E. Terminal CCR5+PD1+HLA DR+	-11,1 (-56,0 a 17,5)	15,7 (-7,7 a 39,0)	0,21
CD4+E. Terminal CCR5+PD1+CD95+HLA-DR+	-6,4 (-11,5 a 18,6)	7,8 (-6,5 a 14,6)	0,56

Anexo E- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD8+ Total e Naïve expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em GBV-C+ e Aumento em GBV-C-			
<i>Células TCD8+ Total</i>			
Contagem de linfócitos T CD8+	-154 (-256 a 144)	163 (-198 a 344,5)	0,21
CD8+ PD1+	-80,7 (-169,9 a -27,0)	116,3 (-209,5 a 256,6)	0,44
CD8+ CCR5+	-81,2 (-94,6 a 38,6)	60,4 (-40,8 a 98,8)	0,21
CD8+CD95+	-40,6 (-146,6 a 22,8)	193,2 (-172,1 a 431,0)	0,18
CD8+ CCR5+ HLA DR+	-28,9 (-40,5 a -20,6)	7,7 (-26,2 a 40,7)	0,15
CD8+ CCR5+ PD1+	-52,2 (-71,0 a 40,8)	8,1 (-47,9 a 58,8)	0,63
CD8+PD1+ CD95+	-53,1 (-70,2 a 32,8)	123,7 (-162,9 a 269,9)	0,29
CD8+ CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-13,9 (-17,6 a -5,3)	4,9 (-25,3 a 16,3)	0,6
<i>Células T CD8+ Naïve</i>			
CD8+Naïve CD38+	-2,5 (-13,9 a 10,3)	9,1 (-22,5 a 36,1)	0,56
CD8+Naïve HLA DR+	-11,0 (-26,1 a 6,5)	15,9 (-5,2 a 30,3)	0,25
CD8+Naïve CD57+	-39,4 (-100,8 a 20,2)	44,5 (-7,2 a 67,9)	0,29
CD8+Naïve CCR5+	-102,9 (-122,2 a 37,0)	66,5 (-31,7 a 279,3)	0,12
CD8+Naïve CCR5+ CD38+	-1,9 (-6,7 a 3,0)	11,3 (-9,9 a 23,3)	0,77
CD8+Naïve CCR5+ HLA DR+	-3,2 (-33,7 a 10,4)	15,2 (-4,5 a 29,7)	0,25
CD8+Naïve PD1+ HLA DR+	-6,4 (-20,0 a 12,3)	5,6 (-14,2 a 11,0)	0,77
CD8+Naïve CCR5+ PD1+ HLA DR+	-1,3 (-23,9 a 20,1)	4,2 (-13,6 a 11,7)	0,85

Anexo F- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD8+ Memória Central e Efetora eexpressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em GBV-C+ e Aumento em GBV-C-			
<i>Células T CD8+ Memória Central</i>			
CD8+M. Central CD57+	-64,8 (-200,9 a 11,6)	155,2 (-133,2 a 330,0)	0,29
CD8+M. Central PD1+	-196,2 (-245,3 a -83,4)	133,1 (-280,6 a 431,6)	0,29
CD8+M. Central CD38	-93,4 (-144,1 a 63,8)	63,4 (-207,1 a 204,4)	0,44
CD8+M. Central CD95+	-123,6 (-318,4 a 60,4)	145,8 (-276,2 a 404,3)	0,25
CD8+M. Central HLA DR+	-78,9 (-156,5 a 12,3)	20,1 (-151,3 a 199,1)	0,44
CD8+M. Central CCR5+ CD38+	-30,1 (-65,3 a 29,7)	83,2 (-156,6 a 187,3)	0,25
CD8+M. Central CCR5+ HLA DR+	-39,9 (-98,0 a -24,1)	94,2 (-98,4 a 177,1)	0,33
CD8+M. Central CCR5+ PD1+	-89,6 (-112,4 a 65,5)	171,0 (-195,6 a 362,4)	0,34
CD8+M. Central PD1+ CD38+	-81,7 (-162,8 a 45,8)	34,1 (-213,6 a 216,9)	0,5
CD8+M. Central PD1+ HLA DR+	-71,2 (-115,8 a -1,8)	34,2 (-169,9 a 204,2)	0,44
CD8+M. Central PD1+ CD95+	-139,7 (-257,6 a 56,7)	78,6 (-284,7 a 439,8)	0,34
CD8+M. Central CCR5+ PD1+ HLA DR+	-38,7 (-64,0 a -26,8)	73,6 (-119,3 a 170,0)	0,34
CD8+M. Central CCR5+ PD1+ CD38+	-28,3 (-65,3 a 22,0)	66,3 (-170,1 a 199,2)	0,39
CD8+M. Central CCR5+ CD38+ HLA DR+	-23,8 (-72,7 a 16,0)	45,7 (-110,9 a 110,3)	0,29
CD8+M. Central CCR5+ PD1+ CD38+ CD95+	-27,8 (-63,2 a 25,2)	53,2 (-147,3 a 191,6)	0,29
CD8+M. Central CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	-22,1 (-72,7 a 13,0)	34,9 (-115,7 a 115,6)	0,29
CD8+M. Central CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	-44,5 (-78,8 a -7,7)	40,9 (-104,0 a 175,0)	0,25
<i>Células T CD8+ Memória Efetora</i>			
CD8+M. Efetora CCR5+	-55,0 (-79,4 a 65,6)	119,6 (-37,4 a 309,2)	0,12
CD8+M. Efetora PD1+	-175,8 (-248,3 a -62,4)	154,6 (-244,8 a 429,8)	0,25

Anexo G- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: carga viral, valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Total, Naïve, Memória Central e Transitória expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição mais proeminente na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com a também diminuição na quantidade de células encontrada no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em ambos, porém em GBV-C+ foi MAIOR do que em GBV-C-			
Parâmetros de Seguimento			
Carga viral do HIV, log	-0,18 (-0,58 a 0,75)	-0,05 (-0,56 a 0,32)	0,7
Contagem de linfócitos T CD4 ⁺	-207 (-251 a -37)	-46,5 (-115,5 a 12,5)	0,25
Células T CD4+ Total			
CD4+ CD38+	-10,2 (-20,4 a 7,3)	-0,8 (-12,2 a 16,9)	0,39
CD4+ CCR5+	-19,8 (-38,0 a -6,0)	-5,2 (-31,7 a 43)	0,56
CD4+ PD1+	-53,2 (-89,7 a 2,4)	-8,4 (-73,5 a 58,2)	0,34
CD4+ CD28+	-172,6 (-223,6 a -39,4)	-80,6 (-145,1 a 0,4)	0,29
CD4+ CD95+	-80,7 (-176,3 a -28,0)	-66,6 (-105,7 a -25,3)	0,56
CD4+ PD1+ CD95+	-38,9 (-64,8 a 0,1)	-20,3 (-62,2 a 30,5)	0,7
Células T CD4+ Naïve			
CD4 Naïve CD95+	-4,3 (-5,2 a 10,3)	-1,0 (-10,3 a 6,1)	0,56
CD4 Naïve CD28+	-214,2 (-245,2 a -36,6)	-47,7 (-124,5 a -12,7)	0,34
Células T CD4+ Memória Central			
CD4+M. Central CD28+	-217,7 (-245,7 a -37,1)	-52,2 (-122,0 a -9,1)	0,21
CD4+M. Central CD95+	-84,3 (-132,6 a -21,7)	-21,0 (-81,5 a 15,4)	0,18
Células T CD4+ Memória Transitória			
CD4+M. Transitória	-58,9 (-115,3 a -29,2)	-34,4 (-57,9 a -19,6)	0,39
CD4+M. Transitória CD95+	-140,6 (-213,7 a -44,0)	-43,3 (-127,0 a -2,9)	0,21
CD4+M. Transitória PD1+	-86,8 (-128,2 a 10,0)	-5,3 (-75,5 a 93,7)	0,18
CD4+M. Transitória CD28+	-195,7 (-231,1 a -45,4)	-80,4 (-124,2 a -42,2)	0,34
CD4+M. Transitória PD1+ CD95+	-38,0 (-143,6 a 31,6)	-18,5 (-69,9 a 91,7)	0,25
CD4+M. Transitória PD1+ CD38+ HLA DR+	-1,8 (-3,9 a 0,8)	-0,5 (-5,5 a 6,5)	0,85

Anexo H- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: valores absolutos das subpopulações de células T CD8+ Total, Naïve e Memória Central expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição mais proeminente na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com a também diminuição na quantidade de células encontrada no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em ambos, porém em GBV-C+ foi MAIOR do que em GBV-C-			
<i>Células T CD8+ Total</i>			
CD8+ CD28+	-77,8 (-180,2 a -49,5)	-35,4 (-85,8 a 1,9)	0,15
CD8+ HLA DR+	-36,9 (-65,0 a -8,2)	-18,2 (-97,2 a 97,6)	0,5
CD8+ CCR5+ CD38+	-10,0 (-24,0 a 3,8)	-8,9 (-55,6 a 31,4)	0,7
CD8+ PD1 HLA DR	-29,2 (-43,0 a -12,2)	-6,8 (-65,5 a 37,9)	0,44
CD8+ CCR5 PD1 HLA DR	-20,9 (-28,6 a -14,4)	-0,5 (-27,6 a 20,6)	0,56
<i>Células T CD8+ Naïve</i>			
CD8+Naïve PD1+	-123,9 (-251,4 a 18,6)	-16,3 (-125,7 a 217,6)	0,21
CD8+Naïve CCR5+ PD1+	-59,9 (-81,4 a -13,8)	-23,8 (-69,7 a 195,3)	0,39
CD8+Naïve PD1+ CD38+	-1,3 (-10,2 a 6,2)	-1,2 (-28,6 a 19,0)	0,92
<i>Células T CD8+ Memória Central</i>			
CD8+M. Central CD38+ HLA DR+	-59,6 (-126,7 a 52,3)	-13,9 (-147,9 a 119,0)	0,39
CD8+M. Centra PD1+ CD38+ HLA DR+	-57,6 (-135,8 a 42,7)	-12,8 (-149,2 a 127,5)	0,5

Anexo I- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: relação de CD4+/CD8+, valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Total, Naïve, Intermediária, Memória Efetora e Efetora Terminal expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição mais proeminente na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com a também diminuição na quantidade de células encontrada no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em ambos, porém em GBV-C+ foi MENOR do que em GBV-C-			
Parâmetros de Seguimento			
Relação CD4 ⁺ / CD8 ⁺	-0,11 (-0,41 a -0,07)	-0,16 (-0,31 a 0,02)	0,85
% linfócitos T CD4	-3,9 (-21,4 a 2,6)	-8,8 (-16,1 a 2,1)	0,85
Células T CD4+ Total			
CD4+CD38+ HLA DR+	-3,9 (-4,4 a 3,2)	-0,3 (-5,8 a 8,4)	0,63
Células T CD4+ Naïve			
CD4 Naïve CD38+	-0,9 (-19,6 a 13,7)	-1,4 (-22,0 a 10,2)	0,92
CD4Naïve HLA DR+	-1,4 (-8,0 a 12,9)	-3,2 (-6,4 a 16,5)	0,77
CD4 Naïve CCR5+ HLA DR+	-0,9 (-5,7 a 11,2)	-2,6 (-3,8 a 16,4)	0,77
CD4 Naïve PD1+ CD95+	(-2,4 (-3,4 a 1,8)	-2,3 (-7,3 a 4,1)	0,63
Células T CD4+ Memória Intermediária			
CD4+M. Intermediária	-1,7 (-21,3 a 8,1)	-4,6 (-7,3 a 5,4)	1,00
Células T CD4+ Memória Efetora			
CD4+M. Efetora	-10,8 (-27,5 a -2,9)	-17,8 (-26,1 a -3,6)	0,63
Células T CD4+ Efetora Terminal			
CD4+E.Terminal	-1,2 (-6,2 a -0,9)	-1,2 (-3,8 a 4,4)	0,5
CD4+E.Terminal CD28+	-47,6 (-136,5 a 71,5)	-70,0 (-120,7 a 13,5)	0,63

Anexo J- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: relação de CD4+/CD8+, valores absolutos das subpopulações de células T CD8+ Total, Naïve, Memória Central e Efetora expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou uma diminuição mais proeminente na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com a também diminuição na quantidade de células encontrada no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Diminuição em ambos, porém em GBV-C+ foi MENOR do que em GBV-C-			
<i>Células T CD8+ Total</i>			
CD8+ CD38+	-13,8 (-61,8 a 47,4)	-22,6 (-208,2 a 97,5)	0,77
CD8+ CD38+ HLA DR+	-13,0 (-33,8 a 18,2)	-23,3 (-120,6 a 47,9)	0,85
CD8+ CCR5+ PD1+ CD38+	-2,9 (-20,8 a 2,7)	-9,0 (-47,2 a 15,0)	1
CD8+ PD1+ CD38+ HLA DR+	-11,5 (-23,5 a 16,5)	-18,1 (-72,2 a 22,1)	1
CD8+ CCR5+ PD1+ CD38+ CD95+	-0,7 (-19,5 a 7,7)	-6,1 (-37,3 a 14,5)	1
CD8+ CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	-4,4 (12,7 a 2,5)	-7,2 (-30,7 a 9,2)	0,92
CD8+ CD38+ HLA DR+ CCR5+	-5,4 (-16,3 a 4,6)	-7,6 (-38,9 a 20,1)	0,74
<i>Células T CD8+ Naïve</i>			
CD8+Naïve CCR5+ PD1+ CD38+HLA DR+	-0,3 (-2,8 a 7,7)	-0,7 (-12,8 a 3,1)	0,5
<i>Células T CD8+ Memória Central</i>			
CD8+M. Central	-3,6 (-6,1 a -0,1)	-3,8 (-7,4 a 3,5)	0,56
<i>Células T CD8+ Memória Efetora</i>			
CD8+M. Efetora CD28+	-31,8 (-145,7 a -26,5)	-32,3 (-101,5 a -19,7)	0,85

Anexo K- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: relação de CD4+/CD8+, valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Total, Naïve, Intermediária, Memória Efetora e Efetora Terminal expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou aumento na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com a diminuição na quantidade de células encontrada no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Aumento em GBV-C+ e Diminuição em GBV-C-			
Parâmetros de Seguimento			
Carga viral do HIV, cópias/ml	1821 (-33683 a 7797)	-675 (-36582 a 1167)	0,56
Células T CD4+ Total			
CD4+ Naïve CCR5+	0,8 (-2,6,4 a 43,8)	-6,0 (-48,1 a 60,8)	0,85
CD4+ Naïve CCR5+ CD38+	4,1 (-5,1 a 11,7)	-2,0 (-5,2 a 16,3)	0,92
CD4+ Naïve CD38+ HLA DR+	0,4 (-3,0 a 5,4)	-1,7 (-2,9 a 7,7)	0,92
CD4+ Naïve CD38+ HLA DR+ CCR5+	1,4 (-2,2 a 5,0)	-0,9 (-2,6 a 8,2)	0,92
CD4+ Naïve PD1+ CD38+ HLA DR+	0,9 (-0,9 a 4,5)	-0,1 (-2,5 a 0,7)	0,56
CD4+ Naïve CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	0,9 (-0,9 a 4,5)	-0,1 (-1,5 a 0,6)	0,56
Células T CD4+ Memória Efetora			
CD4+M.Efetora CD38+ HLA DR+	1,2 (-2,8 a 7,8)	-1,4 (-3,4 a 3,9)	0,7
CD4+M.Efetora PD1+ CD38+ HLA DR+	1,2 (-2,1 a 11,0)	-1,1 (-4,3 a 4,8)	0,63
Células T CD4+Memória Transitória			
CD4+M.Transitória CD57+	1,5 (-32,1 a 12,6)	-1,3 (-20,8 a 66,9)	0,56
Células T CD8+ Total			
CD8+ PD1+ CD38+	10,1 (-41,2 a 10,1)	-25,2 (-129,2 a 49,3)	1

Anexo L- Informações detalhada das análises estatísticas dos parâmetros: relação de CD4+/CD8+, valores absolutos das subpopulações de células T CD4+ Total, Naïve, Intermediária, Memória Efetora e Efetora Terminal expressando marcadores relacionados aos perfis de ativação e exaustão/senescência. Tabela contendo resultados da análise da diferença encontrada entre os grupos, em que o grupo GBV-C+ apresentou diminuição na quantidade de células com os perfis abaixo, comparado com o aumento na quantidade de células no grupo GBV-C-. Apesar dos resultados não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

População Celular	Indivíduos com GBV-C+	Indivíduos sem GBV-C	Valor de p
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Aumento em ambos, porém em GBV-C+ foi MAIOR do que em GBV-C-			
<i>Células T CD4+ Naïve</i>			
CD4 Naïve PD1+ CD38+	3,3 (-3,9 a 4,3)	0,8 (-3,7 a 2,8)	0,63
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+M. Central CCR5 +PD1+ CD38+ CD95+	2,6 (-3,0 a 3,9)	2,0 (-3,3 a 10,3)	0,56
<i>Células T CD4+ Memória Efetora</i>			
CD4+M.Efetora CD38+	4,0 (-4,3 a 16,1)	0,6 (-13,5 a 13,3)	0,85
CD4+M.Efetora PD1+ CD38+	4,5 (-2,8 a 20,4)	1,7 (-11,7 a 14,7)	0,85
CD4+M.Efetora CCR5+ PD1+ CD38+ CD95 +	2,6 (0,3 a 10,0)	1,8 (-2,2 a 13,7)	0,7
(Vn-V0) Diferença entre os grupos: Aumento em ambos, porém em GBV-C+ foi MENOR do que em GBV-C-			
<i>Células T CD4+ Memória Efetora</i>			
CD4+ CCR5 PD1 CD38 CD95	0,4 (-2,1 a 1,9)	1,5 (-2,2 a 4,5)	0,6
CD4+ CCR5 PD1 CD38 HLA DR	6,3 (3,3 a 10,0)	7,7 (1,3 a 9,7)	0,77
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+ Naïve PD1+	0,5 (-10,8 a 23,6)	3,9 (-16,1 a 19,5)	0,85
CD4+Naïve CD57+	1,6 (-3,3 a 4,4)	2,1 (-7,3 a 14,1)	0,92
CD4+Naïve CCR5+ PD1+ CD38+	54,3 (27,9 a 60,4)	72,0 (46,4 a 103,8)	0,25
CD4+Naïve CCR5+ PD1+ CD38+ CD95+	0,0 (-0,8 a 1,5)	0,1 (-1,0 a 2,5)	0,92
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+M. Central PD1+ HLA DR+	0,3 (-5,1 a 4,7)	2,4 (-6,5 a 8,6)	0,92
CD4+M. Central CCR5+ PD1+ CD38+	0,6 (-2,1 a 4,2)	3,6 (-5,8 a 11,9)	0,92
CD4+M. Central PD1+ CD38+ HLA DR+	0,9 (-0,5 a 2,5)	1,9 (-5,9 a 4,3)	1
CD4+M. Central CD38+ HLA DR+ CCR5+	0,1 (-0,8 a 2,4)	1,0 (-2,3 a 5,4)	0,92
CD4+M. Central CCR5+ PD1 +CD38+ HLA DR+	0,1 (0,0 a 3,0)	1,5 (-3,9 a 3,7)	0,7
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+M. Transitória PD1+CD38+	1,2 (-8,4 a 4,5)	5,7 (-12,1 a 18,0)	0,7
<i>Células T CD4+ Memória Central</i>			
CD4+M.Efetora CD38+ HLA DR+ CCR5+	0,2 (-4,9 a 8,7)	0,2 (-0,9 a 2,8)	1
CD4+M.Efetora CCR5+ PD1+ CD38+ HLA DR+	0,0 (-4,6 a 9,9)	0,2 (-2,5 a 3,2)	0,92
CD4+M.Efetora CCR5+ PD1+ CD95+ HLA DR+	0,6 (-2,6 a 5,1)	1,2 (-2,3 a 14,5)	0,77
<i>Células T CD8+ Total</i>			
CD8+ CD57+	4,4 (-104,5 a 58,2)	100,8 (-40,5 a 181,5)	0,18
%l infócitos T CD8	4,5 (-2,1 a 20,5)	6,8 (-4,5 a 17,7)	0,77

Variáveis contínuas apresentadas como medianas e intervalos interquartis; comparações realizadas com o teste da soma dos postos de Wilcoxon (Ranksum test)

Variáveis categóricas apresentadas como frequências e porcentagens; comparações realizadas com teste exato de Fisher

Tabela 2: Diferenças (Δ V1-V0) em marcadores celulares, conforme status do GBV-C:

	<i>Indivíduos com GBV-C incidente,</i> <i>N=9</i>	<i>Indivíduos sem GBV-C incidente,</i> <i>N=8</i>	<i>Valor p</i>
Contagem de linfócitos T CD4 ⁺	-207 (-251 a -37)	-46,5 (-115,5 a 12,5)	0,25
% linfócitos T CD4	-3,9 (-21,4 a 2,6)	-8,8 (-16,1 a 2,1)	0,85
Contagem de linfócitos T CD8 ⁺	-154 (-256 a 144)	163 (-198 a 344,5)	0,21
% linfócitos T CD8	4,5 (-2,1 a 20,5)	6,8 (-4,5 a 17,7)	0,77
Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0,11 (-0,41 a -0,07)	-0,16 (-0,31 a 0,02)	0,85
Carga viral do HIV, cópias/ml	1821 (-33683 a 7797)	-675 (-36582 a 1167)	0,56
Carga viral do HIV, log	-,18 (-0,58 a 0,75)	-0,05 (-0,56 a 0,32)	0,70
Marcadores de ativação e senescência: T CD4⁺ (valores absolutos)			
CCR5	-19,8 (-38,0 a -6,0)	-5,2 (-31,7 a 43)	0,56
PD1	-53,2 (-89,7 a 2,4)	-8,4 (-73,5 a 58,2)	0,34
CD28	-172,6 (-223,6 a -39,4)	-80,6 (-145,1 a 0,4)	0,29
CD38	-10,2 (-20,4 a 7,3)	-0,8 (-12,2 a 16,9)	0,39
CD57	-1,0 (-35,8 a 8,4)	1,5 (-24,7 a 37,3)	0,56
CD95	-80,7 (-176,3 a -28,0)	-66,6 (-105,7 a -25,3)	0,56
HLA DR	-10,3 (-11,9 a -0,8)	3,4 (-19,8 a 18,5)	0,39
CCR5 PD1	-12,7 (-22,0 a 5,3)	1,9 (-25,6 a 37,4)	0,63
CCR5 CD38	-2,5 (-5,4 a 5,6)	0,5 (-6,0 a 11,3)	0,77
CCR5 HLA DR	-5,5 (-8,4 a 1,6)	0,8 (-5,6 a 14,8)	0,34
PD1 CD38	-2,2 (-6,4 a 4,3)	4,6 (-13,1 a 14,8)	0,85
PD1 CD95	-38,9 (-64,8 a 0,1)	-20,3 (-62,2 a 30,5)	0,70
PD1 HLA DR	-5,9 (-11,0 a 12,8)	2,6 (-17,2 a 20,3)	0,81
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-3,9 (-4,4 a 3,2)	-0,3 (-5,8 a 8,4)	0,63
CCR5 PD1 CD38	-2,4 (-4,1 a 3,9)	1,9 (-5,6 a 10,3)	0,77
CCR5 PD1 HLA DR	-5,3 (-6,4 a -0,9)	2,5 (-10,6 a 15,9)	0,63
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-1,9 (-3,6 a 2,7)	0,2 (-3,6 a 6,9)	0,60
PD1 CD38 HLA DR	-1,7 (-3,7 a 2,6)	0,4 (-7,6 a 7,7)	0,92
CCR5 PD1 CD38 CD95	0,4 (-2,1 a 1,9)	1,5 (-2,2 a 4,5)	0,60
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	6,3 (3,3 a 10,0)	7,7 (1,3 a 9,7)	0,77
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-3,2 (-3,7 a 4,1)	1,4 (-6,6 a 8,3)	0,85
Marcadores de ativação e senescência: T CD8⁺ (valores absolutos)			
CCR5	-81,2 (-94,6 a 38,6)	60,4 (-40,8 a 98,8)	0,21
PD1	-80,7 (-169,9 a -27,0)	116,3 (-209,5 a 256,6)	0,44
CD28	-77,8 (-180,2 a -49,5)	-35,4 (-85,8 a 1,9)	0,15
CD38	-13,8 (-61,8 a 47,4)	-22,6 (-208,2 a 97,5)	0,77
CD57	4,4 (-104,5 a 58,2)	100,8 (-40,5 a 181,5)	0,18
CD95	-40,6 (-146,6 a 22,8)	193,2 (-172,1 a 431,0)	0,18
HLA DR	-36,9 (-65,0 a -8,2)	-18,2 (-97,2 a 97,6)	0,50
CCR5 PD1	-52,2 (-71,0 a 40,8)	8,1 (-47,9 a 58,8)	0,63

CCR5 CD38	-10,0 (-24,0 a 3,8)	-8,9 (-55,6 a 31,4)	0,70
CCR5 HLA DR	-28,9 (-40,5 a -20,6)	7,7 (-26,2 a 40,7)	0,15
PD1 CD38	10,1 (-41,2 a 10,1)	-25,2 (-129,2 a 49,3)	1,00
PD1 CD95	-53,1 (-70,2 a 32,8)	123,7 (-162,9 a 269,9)	0,29
PD1 HLA DR	-29,2 (-43,0 a -12,2)	-6,8 (-65,5 a 37,9)	0,44
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-13,0 (-33,8 a 18,2)	-23,3 (-120,6 a 47,9)	0,85
CCR5 PD1 CD38	-2,9 (-20,8 a 2,7)	-9,0 (-47,2 a 15,0)	1,00
CCR5 PD1 HLA DR	-20,9 (-28,6 a -14,4)	-0,5 (-27,6 a 20,6)	0,56
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-5,4 (-16,3 a 4,6)	-7,6 (-38,9 a 20,1)	0,74
PD1 CD38 HLA DR	-11,5 (-23,5 a 16,5)	-18,1 (-72,2 a 22,1)	1,00
CCR5 PD1 CD38 CD95	-0,7 (-19,5 a 7,7)	-6,1 (-37,3 a 14,5)	1,00
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-4,4 (12,7 a 2,5)	-7,2 (-30,7 a 9,2)	0,92
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-13,9 (-17,6 a -5,3)	4,9 (-25,3 a 16,3)	0,60
Subpopulações de linfócitos T CD4+ (valores absolutos)			
<i>Naïve</i>	-38,4 (-67,1 a -7,0)	15,5 (-20,5 a 24,4)	0,05
CCR5	0,8 (-2,6,4 a 43,8)	-6,0 (-48,1 a 60,8)	0,85
PD1	0,5 (-10,8 a 23,6)	3,9 (-16,1 a 19,5)	0,85
CD28	-214,2 (-245,2 a -36,6)	-47,7 (-124,5 a -12,7)	0,34
CD38	-0,9 (-19,6 a 13,7)	-1,4 (-22,0 a 10,2)	0,92
CD57	1,6 (-3,3 a 4,4)	2,1 (-7,3 a 14,1)	0,92
CD95	-4,3 (-5,2 a 10,3)	-1,0 (-10,3 a 6,1)	0,56
HLA DR	-1,4 (-8,0 a 12,9)	-3,2 (-6,4 a 16,5)	0,77
CCR5 PD1	-2,7 (-3,9 a 24,0)	4,2 (-9,7 a 23,2)	0,92
CCR5 CD38	4,1 (-5,1 a 11,7)	-2,0 (-5,2 a 16,3)	0,92
CCR5 HLA DR	-0,9 (-5,7 a 11,2)	-2,6 (-3,8 a 16,4)	0,77
PD1 CD38	3,3 (-3,9 a 4,3)	0,8 (-3,7 a 2,8)	0,63
PD1 CD95	-2,4 (-3,4 a 1,8)	-2,3 (-7,3 a 4,1)	0,63
PD1 HLA DR	-0,8 (-2,7 a 7,5)	0,1 (-3,2 a 3,5)	0,77
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	0,4 (-3,0 a 5,4)	-1,7 (-2,9 a 7,7)	0,92
CCR5 PD1 CD38	54,3 (27,9 a 60,4)	72,0 (46,4 a 103,8)	0,25
CCR5 PD1 HLA DR	-0,6 (-2,5 a 7,0)	0,0 (-2,8 a 4,9)	0,85
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	1,4 (-2,2 a 5,0)	-0,9 (-2,6 a 8,2)	0,92
PD1 CD38 HLA DR	0,9 (-0,9 a 4,5)	-0,1 (-2,5 a 0,7)	0,56
CCR5 PD1 CD38 CD95	0,0 (-0,8 a 1,5)	0,1 (-1,0 a 2,5)	0,92
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	0,9 (-0,9 a 4,5)	-0,1 (-1,5 a 0,6)	0,56
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-0,5 (-1,0 a 1,6)	0,4 (-1,3 a 1,7)	0,92
<i>Memória central</i>	-57,9 (-67,3 a -18,5)	-7,4 (-25,4 a 0,5)	0,08
CCR5	-5,4 (-23,2 a 2,5)	5,4 (-70,0 a 69,3)	0,70
PD1	-18,9 (-38,4 a 12,3)	18,9 (-27,1 a 63,0)	0,15
CD28	-217,7 (-245,7 a -37,1)	-52,2 (-122,0 a -9,1)	0,21
CD38	-12,5 (-20,8 a 0,4)	2,7 (-14,5 a 21,7)	0,50
CD57	-5,4 (-8,4 a 4,3)	3,7 (-7,0 a 22,0)	0,50
CD95	-84,3 (-132,6 a -21,7)	-21,0 (-81,5 a 15,4)	0,18

HLA DR	-5,8 (-8,2 a 10,3)	2,2 (-6,7 a 12,3)	0,56
CCR5 PD1	-3,0 (-13,8 a 0,5)	9,3 (-2,2 a 34,8)	0,18
CCR5 CD38	-1,8 (-4,7 a 6,1)	1,7 (-1,5 a 19,6)	0,29
CCR5 HLA DR	-3,1 (-4,9 a -2,4)	5,2 (-1,4 a 9,6)	0,25
PD1 CD38	-2,7 (-5,7 a 3,7)	10,9 (-11,0 a 16,5)	0,39
PD1 CD95	-13,1 (-60,9 a 9,5)	16,7 (-31,1 a 56,8)	0,21
PD1 HLA DR	0,3 (-5,1 a 4,7)	2,4 (-6,5 a 8,6)	0,92
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-0,4 (-0,8 a 1,5)	1,7 (-5,4 a 5,6)	0,77
CCR5 PD1 CD38	0,6 (-2,1 a 4,2)	3,6 (-5,8 a 11,9)	0,92
CCR5 PD1 HLA DR	-1,0 (-3,4 a 6,8)	3,7 (-3,0 a 8,4)	0,56
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	0,1 (-0,8 a 2,4)	1,0 (-2,3 a 5,4)	0,92
PD1 CD38 HLA DR	0,9 (-0,5 a 2,5)	1,9 (-5,9 a 4,3)	1,00
CCR5 PD1 CD38 CD95	2,6 (-3,0 a 3,9)	2,0 (-3,3 a 10,3)	0,56
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	0,1 (0,0 a 3,0)	1,5 (-3,9 a 3,7)	0,70
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-1,9 (-2,4 a 8,1)	2,3 (-3,2 a 6,1)	0,92
Memória efetora	-10,8 (-27,5 a -2,9)	-17,8 (-26,1 a -3,6)	0,63
CCR5	-28,1 (-62,0 a 14,4)	5,1 (-27,3 a 75,6)	0,44
PD1	-119,8 (-207,0 a -37,0)	18,9 (-73,9 a 94,4)	0,10
CD28	-173,9 (-236,6 a -68,1)	-143,5 (-187,6 a -53,7)	0,63
CD38	4,0 (-4,3 a 16,1)	0,6 (-13,5 a 13,3)	0,85
CD57	-29,9 (-126,4 a 29,3)	43,6 (-28,9 a 127,8)	0,15
CD95	-119,2 (-176,1 a -69,7)	-79,2 (-139,6 a -21,1)	0,34
HLA DR	-20,8 (-27,9 a 14,6)	9,2 (-9,0 a 26,0)	0,29
CCR5 PD1	-18,1 (-53,6 a -2,2)	23,2 (2,3 a 89,3)	0,07
CCR5 CD38	-1,3 (-6,3 a 16,4)	2,5 (-8,5 a 14,8)	0,85
CCR5 HLA DR	-1,9 (-21,9 a 3,2)	14,8 (-2,6 a 19,0)	0,12
PD1 CD38	4,5 (-2,8 a 20,4)	1,7 (-11,7 a 14,7)	0,85
PD1 CD95	-63,0 (-137,8 a 5,2)	-35,8 (-74,0 a 83,6)	0,34
PD1 HLA DR	-4,8 (-16,4 a 5,2)	7,6 (-11,6 a 27,5)	0,34
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	1,2 (-2,8 a 7,8)	-1,4 (-3,4 a 3,9)	0,70
CCR5 PD1 CD38	-1,8 (-4,5 a 15,4)	3,4 (-7,3 a 14,6)	0,92
CCR5 PD1 HLA DR	-1,1 (-18,5 a 1,1)	11,0 (-2,9 a 18,6)	0,12
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	0,2 (-4,9 a 8,7)	0,2 (-0,9 a 2,8)	1,00
PD1 CD38 HLA DR	1,2 (-2,1 a 11,0)	-1,1 (-4,3 a 4,8)	0,63
CCR5 PD1 CD38 CD95	2,6 (0,3 a 10,0)	1,8 (-2,2 a 13,7)	0,70
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	0,0 (-4,6 a 9,9)	0,2 (-2,5 a 3,2)	0,92
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	0,6 (-2,6 a 5,1)	1,2 (-2,3 a 14,5)	0,77
Memória intermediária	-1,7 (-21,3 a 8,1)	-4,6 (-7,3 a 5,4)	1,00
CCR5	-25,7 (-64,3 a 30,2)	-9,0 (-48,4 a 65,2)	0,56
PD1	-47,2 (-84,6 a -1,8)	-0,9 (-56,6 a 47,9)	0,44
CD28	-165,7 (-184,0 a -46,5)	-75,7 (-179,2 a 1,7)	0,50
CD38	-30,8 (-44,6 a 4,1)	1,00 (-22,9 a 5,1)	0,29
CD57	-45,9 (-68,9 a 10,2)	7,5 (-28,2 a 42,1)	0,29

CD95	-31,6 (-53,3 a -13,0)	-17,7 (-52,0 a 29,9)	0,85
HLA DR	-20,5 (-55,8 a -5,5)	0,8 (-10,9 a 20,7)	0,12
CCR5 PD1	-21,2 (-44,1 a 7,3)	8,7 (-43,4 a 28,7)	0,44
CCR5 CD38	-3,7 (-14,6 a 3,3)	4,3 (-6,6 a 16,5)	0,29
CCR5 HLA DR	-7,8 (-35,7 a -3,2)	2,6 (-11,8 a 25,5)	0,15
PD1 CD38	-9,1 (-13,3 a -0,5)	5,7 (-4,4 a 9,6)	0,29
PD1 CD95	-10,5 (-33,7 a 3,4)	8,1 (-38,5 a 33,4)	0,56
PD1 HLA DR	-13,8 (-35,2 a -2,7)	2,7 (-8,3 a 14,0)	0,21
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-8,7 (-10,1 a -0,6)	0,8 (-2,6 a 14,0)	0,12
CCR5 PD1 CD38	-6,0 (-10,6 a 0,5)	5,8 (-4,5 a 8,1)	0,29
CCR5 PD1 HLA DR	-11,2 (-26,2 a -0,7)	2,0 (-8,5 a 12,0)	0,12
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-2,5 (-9,8 a 2,2)	2,6 (-4,1 a 18,7)	0,15
PD1 CD38 HLA DR	-3,7 (-10,9 a -2,5)	2,0 (-2,6 a 7,0)	0,18
CCR5 PD1 CD38 CD95	-1,5 (-2,8 a 1,0)	1,5 (-3,4 a 5,7)	0,50
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-3,0 (-7,7 a -0,4)	1,6 (-2,5 a 7,1)	0,12
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-3,6 (-5,2 a -1,8)	-3,0 (-7,8 a 8,8)	0,85
Memória transitória	-58,9 (-115,3 a -29,2)	-34,4 (-57,9 a -19,6)	0,39
CCR5	-11,7 (-47,2 a -4,8)	6,0 (-50,2 a 69,9)	0,44
PD1	-86,8 (-128,2 a 10,0)	-5,3 (-75,5 a 93,7)	0,18
CD28	-195,7 (-231,1 a -45,4)	-80,4 (-124,2 a -42,2)	0,34
CD38	-6,3 (-9,6 a -3,7)	3,7 (-10,6 a 20,5)	0,63
CD57	1,5 (-32,1 a 12,6)	-1,3 (-20,8 a 66,9)	0,56
CD95	-140,6 (-213,7 a -44,0)	-43,3 (-127,0 a -2,9)	0,21
HLA DR	-13,0 (-15,8 a 1,5)	6,9 (-11,4 a 19,7)	0,25
CCR5 PD1	-9,8 (-19,3 a 4,5)	12,3 (3,6 a 47,8)	0,10
CCR5 CD38	-0,7 (-3,8 a 0,6)	4,6 (-2,1 a 19,2)	0,21
CCR5 HLA DR	-4,3 (-8,2 a -2,2)	7,9 (-0,6 a 19,8)	0,08
PD1 CD38	1,2 (-8,4 a 4,5)	5,7 (-12,1 a 18,0)	0,70
PD1 CD95	-38,0 (-143,6 a 31,6)	-18,5 (-69,9 a 91,7)	0,25
PD1 HLA DR	-4,0 (-11,4 a 0,0)	3,8 (-10,1 a 17,7)	0,63
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-2,2 (-4,5 a -1,1)	0,2 (-6,3 a 7,8)	0,63
CCR5 PD1 CD38	-0,4 (-3,8 a 4,8)	3,5 (-3,9 a 17,4)	0,56
CCR5 PD1 HLA DR	-1,8 (-4,3 a 0,4)	5,6 (-2,2 a 16,3)	0,29
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-2,6 (-4,3 a 1,6)	1,9 (-1,9 a 7,9)	0,25
PD1 CD38 HLA DR	-1,8 (-3,9 a 0,8)	-0,5 (-5,5 a 6,5)	0,85
CCR5 PD1 CD38 CD95	-0,9 (-3,7 a 5,0)	3,8 (-1,8 a 15,6)	0,44
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-1,1 (-2,5 a 0,1)	2,0 (-3,4 a 5,8)	0,70
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-2,5 (-4,5 a 5,3)	4,8 (-2,5 a 12,0)	0,34
Efetora terminal	-1,2 (-6,2 a -0,9)	-1,2 (-3,8 a 4,4)	0,50
CCR5	-42,9 (-133,4 a -32,0)	26,7 (-40,7 a 78,5)	0,10
PD1	-178,9 (-266,3 a 32,6)	-7,4 (-103,6 a 74,0)	0,18
CD28	-47,6 (-136,5 a 71,5)	-70,0 (-120,7 a 13,5)	0,63
CD38	-18,8 (-41,6 a 13,6)	27,3 (-20,5 a 31,9)	0,39

CD57	-211,0 (-232,9 a 42,4)	17,2 (-40,9 a 89,8)	0,25
CD95	-77,6 (-142,9 a -12,9)	-42,1 (-134,9 a 8,7)	0,63
HLA DR	-36,1 (-92,6 a 9,4)	16,6 (-20,2 a 51,6)	0,08
CCR5 PD1	-75,7 (-145,5 a 2,6)	4,8 (-33,1 a 65,1)	0,25
CCR5 CD38	-12,6 (-30,2 a 28,7)	20,4 (-5,1 a 30,9)	0,56
CCR5 HLA DR	-24,8 (-61,9 a 23,3)	31,2 (-13,6 a 62,9)	0,12
PD1 CD38	-17,7 (-28,4 a 33,9)	4,5 (-24,4 a 28,5)	1,00
PD1 CD95	-49,1 (-85,7 a -7,8)	10,5 (-90,7 a 33,8)	0,44
PD1 HLA DR	-33,7 (-67,9 a 6,0)	10,7 (-14,3 a 32,6)	0,25
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-6,8 (-38,6 a 23,5)	12,8 (-3,1 a 24,9)	0,44
CCR5 PD1 CD38	-11,9 (-14,1 a 24,8)	6,3 (-16,7 a 26,3)	0,92
CCR5 PD1 HLA DR	-11,1 (-56,0 a 17,5)	15,7 (-7,7 a 39,0)	0,21
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-3,6 (-26,0 a 13,1)	10,2 (-0,7 a 19,3)	0,29
PD1 CD38 HLA DR	-7,7 (-35,0 a 9,1)	7,9 (-7,8 a 15,5)	0,50
CCR5 PD1 CD38 CD95	2,8 (-7,8 a 19,6)	1,0 (-10,1 a 10,2)	0,63
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	2,8 (-17,7 a 23,0)	8,1 (-10,0 a 22,2)	0,77
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-6,4 (-11,5 a 18,6)	7,8 (-6,5 a 14,6)	0,56
Subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (valores absolutos)			
<i>Naïve</i>	-30,4 (-62,1 a -8,0)	0,8 (-15,7 a 33,9)	0,02
CCR5	-102,9 (-122,2 a 37,0)	66,5 (-31,7 a 279,3)	0,12
PD1	-123,9 (-251,4 a 18,6)	-16,3 (-125,7 a 217,6)	0,21
CD28	-223,7 (-234,0 a -48,1)	184,5 (-112,8 a 230,8)	0,03
CD38	-2,5 (-13,9 a 10,3)	9,1 (-22,5 a 36,1)	0,56
CD57	-39,4 (-100,8 a 20,2)	44,5 (-7,2 a 67,9)	0,29
CD95	14,8 (-17,0 a 21,1)	11,6 (-39,1 a 44,1)	0,85
HLA DR	-11,0 (-26,1 a 6,5)	15,9 (-5,2 a 30,3)	0,25
CCR5 PD1	-59,9 (-81,4 a -13,8)	-23,8 (-69,7 a 195,3)	0,39
CCR5 CD38	-1,9 (-6,7 a 3,0)	11,3 (-9,9 a 23,3)	0,77
CCR5 HLA DR	-3,2 (-33,7 a 10,4)	15,2 (-4,5 a 29,7)	0,25
PD1 CD38	-1,3 (-10,2 a 6,2)	-1,2 (-28,6 a 19,0)	0,92
PD1 CD95	6,1 (-11,1 a 16,1)	0,2 (-26,3 a 28,9)	1,00
PD1 HLA DR	-6,4 (-20,0 a 12,3)	5,6 (-14,2 a 11,0)	0,77
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	1,5 (-4,4 a 4,8)	-1,4 (-11,7 a 11,6)	1,00
CCR5 PD1 CD38	0,6 (-3,4 a 2,9)	5,3 (-25,3 a 15,0)	1,00
CCR5 PD1 HLA DR	-1,3 (-23,9 a 20,1)	4,2 (-13,6 a 11,7)	0,85
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	6,5 (-1,7 a 17,8)	10,7 (-3,4 a 18,2)	0,77
PD1 CD38 HLA DR	1,0 (-3,1 a 4,7)	-0,4 (-13,1 a 3,8)	0,63
CCR5 PD1 CD38 CD95	1,5 (-1,5 a 10,9)	-2,2 (-9,4 a 4,8)	0,10
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-0,3 (-2,8 a 7,7)	-0,7 (-12,8 a 3,1)	0,50
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	3,1 (-1,4 a 5,9)	1,7 (-9,5 a 5,8)	0,63
<i>Memória central</i>	-3,6 (-6,1 a -0,1)	-3,8 (-7,4 a 3,5)	0,56
CCR5	-105,1 (-116,0 a 44,2)	226,6 (-96,8 a 358,3)	0,08
PD1	-196,2 (-245,3 a -83,4)	133,1 (-280,6 a 431,6)	0,29

CD28	-146,9 (-259,1 a -38,6)	87,6 (-122,2 a 151,5)	0,04
CD38	-93,4 (-144,1 a 63,8)	63,4 (-207,1 a 204,4)	0,44
CD57	-64,8 (-200,9 a 11,6)	155,2 (-133,2 a 330,0)	0,29
CD95	-123,6 (-318,4 a 60,4)	145,8 (-276,2 a 404,3)	0,25
HLA DR	-78,9 (-156,5 a 12,3)	20,1 (-151,3 a 199,1)	0,44
CCR5 PD1	-89,6 (-112,4 a 65,5)	171,0 (-195,6 a 362,4)	0,34
CCR5 CD38	-30,1 (-65,3 a 29,7)	83,2 (-156,6 a 187,3)	0,25
CCR5 HLA DR	-39,9 (-98,0 a -24,1)	94,2 (-98,4 a 177,1)	0,33
PD1 CD38	-81,7 (-162,8 a 45,8)	34,1 (-213,6 a 216,9)	0,50
PD1 CD95	-139,7 (-257,6 a 56,7)	78,6 (-284,7 a 439,8)	0,34
PD1 HLA DR	-71,2 (-115,8 a -1,8)	34,2 (-169,9 a 204,2)	0,44
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-59,6 (-126,7 a 52,3)	-13,9 (-147,9 a 119,0)	0,39
CCR5 PD1 CD38	-28,3 (-65,3 a 22,0)	66,3 (-170,1 a 199,2)	0,39
CCR5 PD1 HLA DR	-38,7 (-64,0 a -26,8)	73,6 (-119,3 a 170,0)	0,34
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-23,8 (-72,7 a 16,0)	45,7 (-110,9 a 110,3)	0,29
PD1 CD38 HLA DR	-57,6 (-135,8 a 42,7)	-12,8 (-149,2 a 127,5)	0,50
CCR5 PD1 CD38 CD95	-27,8 (-63,2 a 25,2)	53,2 (-147,3 a 191,6)	0,29
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-22,1 (-72,7 a 13,0)	34,9 (-115,7 a 115,6)	0,29
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-44,5 (-78,8 a -7,7)	40,9 (-104,0 a 175,0)	0,25
Memória efetora	18,1 (-1,1 a 79,7)	46,0 (-2,8 a 73,4)	0,85
CCR5	-55,0 (-79,4 a 65,6)	119,6 (-37,4 a 309,2)	0,12
PD1	-175,8 (-248,3 a -62,4)	154,6 (-244,8 a 429,8)	0,25
CD28	-31,8 (-145,7 a -26,5)	-32,3 (-101,5 a -19,7)	0,85
CD38	14,0 (-47,8 a 82,5)	-22,0 (-125,9 a 117,0)	0,92
CD57	-104,4 (-158,6 a 1,8)	169,6 (-100,0 a 169,6)	0,10
CD95	34,3 (-234,8 a 47,4)	163,3 (-102,5 a 486,2)	0,18
HLA DR	-28,6 (-75,3 a -8,9)	-5,6 (-63,2 a 117,3)	0,50
CCR5 PD1	-59,7 (-78,4 a 68,2)	95,1 (-107,9 a 236,6)	0,34
CCR5 CD38	1,8 (-13,1 a 16,5)	-13,3 (-75,3 a 88,8)	0,92
CCR5 HLA DR	-10,0 (-27,4 a 4,2)	0,6 (-34,5 a 87,2)	0,56
PD1 CD38	17,3 (-48,2 a 60,2)	-17,8 (-93,1 a 83,2)	0,92
PD1 CD95	56,8 (-202,4 a 77,4)	117,9 (-119,2 a 408,7)	0,21
PD1 HLA DR	231,9 (89,2 a 266,8)	-0,3 (-196,2 a 244,2)	0,18
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	1,5 (-33,3 a 31,6)	-16,3 (-76,6 a 60,9)	0,85
CCR5 PD1 CD38	2,8 (-12,4 a 18,3)	-2,4 (-55,3 a 62,2)	1,00
CCR5 PD1 HLA DR	-11,3 (-23,1 a 7,9)	2,7 (-33,2 a 55,3)	0,63
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-2,5 (-8,5 a 6,2)	-8,1 (-34,2 a 42,8)	0,85
PD1 CD38 HLA DR	1,8 (-30,6 a 16,4)	-16,1 (-56,1 a 37,7)	0,92
CCR5 PD1 CD38 CD95	10,3 (-8,5 a 15,2)	6,9 (-42,1 a 77,3)	0,77
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-0,6 (-9,1 a 7,2)	-7,3 (-37,3 a 28,2)	0,70
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-3,5 (-11,9 a 6,6)	10,8 (-27,3 a 50,1)	0,56
Memória intermediária	-62,4 (-67,9 a 11,9)	14,5 (-5,4 a 85,6)	0,04
CCR5	-88,6 (-98,4 a 90,8)	108,0 (-54,6 a 244,7)	0,18

PD1	-143,5 (-253,1 a -103,8)	121,6 (-255,9 a 310,3)	0,39
CD28	-39,9 (-111,3 a -24,3)	-1,4 (-34,7 a 53,7)	0,18
CD38	-8,2 (-45,6 a 55,2)	-23,2 (-205,4 a 89,8)	1,00
CD57	-138,6 (-172,7 a 5,0)	140,6 (-124,2 a 276,0)	0,18
CD95	-26,7 (-193,1 a 22,2)	166,4 (-180,6 a 446,8)	0,25
HLA DR	-35,0 (-52,9 a -16,8)	-21,7 (-45,0 a 88,3)	0,29
CCR5 PD1	-80, (-91,9 a 11,5)	73,7 (-100,9 a 213,3)	0,63
CCR5 CD38	-10,1 (-13,7 a -0,6)	-11,4 (-106,9 a 70,4)	0,92
CCR5 HLA DR	-21,2 (-32,8 a 32,1)	3,3 (-30,6a 60,8)	0,56
PD1 CD38	-25,4 (-47,2 a 57,9)	-32,2 (-157,2 a 65,0)	0,85
PD1 CD95	-26,8 (-147,9 a 9,3)	97,3 (-156,4 a 325,6)	0,34
PD1 HLA DR	-29,9 (-55,4 a -22,2)	-19,7 (-34,0 a 39,0)	0,34
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-6,6 (-22,1 a 8,8)	-18,4 (-64,5 a 38,7)	0,92
CCR5 PD1 CD38	-7,5 (-10,4 a 0,5)	-14,3 (-103,0 a 45,0)	0,92
CCR5 PD1 HLA DR	-22,7 (-26,3 a 26,2)	-2,6 (-39,4 a 27,0)	0,85
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-5,9 (-10,0 a -4,5)	-6,9 (-39,1 a 32,8)	0,85
PD1 CD38 HLA DR	-5,0 (-19,5 a 12,7)	-17,5 (-59,1 a 20,2)	0,85
CCR5 PD1 CD38 CD95	2,0 (-13,8 a 9,6)	-8,0 (-50,3 a 42,4)	0,77
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	20,9 (9,2 a 55,6)	32,5 (10,6 a 74,7)	0,50
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-10,6 (-19,7 a 30,4)	-1,0 (-30,5 a 27,4)	0,70
Memória transitória	-51,2 (-165,6 a 71,0)	100,2 (-167,3 a 156,4)	0,44
CCR5	-78,0 (-92,7 a 11,8)	133,1 (-76,8 a 321,0)	0,10
PD1	-201,5 (-297,3 a -88,9)	214,0 (-228,4 a 421,7)	0,18
CD28	-98,7 (-272,6 a -43,6)	-38,7 (-145,3 a -22,6)	0,15
CD38	-42,2 (-86,5 a 42,6)	-32,4 (-257,2 a 120,4)	0,63
CD57	-36,4 (-217,4 a 43,7)	225,7 (-93,9 a 293,3)	0,15
CD95	-61,0 (-251,1 a -5,9)	203,3 (-166,8 a 452,9)	0,10
HLA DR	-68,2 (-100,2 a 4,0)	-27,7 (-133,3 a 107,3)	0,39
CCR5 PD1	-82,0 (-89,9 a 11,9)	125,0 (-100,7 a 305,7)	0,18
CCR5 CD38	-18,7 (-57,2 a 10,2)	-8,8 (-134,0 a 90,4)	0,92
CCR5 HLA DR	-31,1 (-50,6 a -28,2)	-1,2 (-87,1 a 82,0)	0,56
PD1 CD38	-55,2 (-85,6 a 45,5)	-30,9 (-216,0 a 94,6)	0,63
PD1 CD95	-21,0 (-258,5 a -1,3)	187,2 (-162,6 a 464,9)	0,12
PD1 HLA DR	-65,9 (-102,9 a -8,3)	-21,0(-113,1 a 85,7)	0,39
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-36,0 (-54,9 a 15,9)	-31,5 (-161,6 a 61,7)	0,63
CCR5 PD1 CD38	-18,1 (-55,7 a 11,5)	08,1 (-104,4 a 72,3)	0,77
CCR5 PD1 HLA DR	-31,6 (-51,8 a -23,4)	0,2 (-77,4 a 61,7)	0,50
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-12,4 (-39,9 a 7,6)	-9,6 (-100,7 a 47,0)	0,77
PD1 CD38 HLA DR	-36,7 (-59,8 a 17,0)	-28,8 (-139,4 a 46,3)	0,63
CCR5 PD1 CD38 CD95	-16,4 (-52,4 a 18,8)	-6,4 (-71,2 a 69,0)	0,63
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-12,0 (-37,3 a 8,9)	-8,9(-100,5 a 35,9)	0,77
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-28,5 (-36,7 a -11,4)	2,5 (-69,1 a 59,6)	0,50
Efetora terminal	-23,3 (-29,3 a 11,2)	46,4 (11,7 a 104,5)	0,03

CCR5	-56,7 (-85,2 a 92,7)	80,3 (-50,3 a 228,2)	0,12
PD1	-450,6 (-722,2 a -343,0)	-240,6 (-515,1 a 103,6)	0,21
CD28	-8,4 (-12,1 a -0,4)	-11,0 (-16,3 a 6,1)	0,85
CD38	1,7 (-49,2 a 100,2)	19,2 (-121,3 a 108,0)	0,85
CD57	-91,4 (-173,4 a 110,6)	39,1 (-150,3 a 237,2)	0,29
CD95	-52,1 (-127,9 a 34,6)	226,0 (-84,4 a 432,2)	0,12
HLA DR	-27,8 (-73,0 a -14,9)	26,6 (-13,6 a 80,6)	0,03
CCR5 PD1	-59,4 (-78,2 a 86,4)	28,9 (-70,8 a 183,2)	0,77
CCR5 CD38	1,6 (-11,8 a 31,8)	0,9 (-28,7 a 63,6)	0,85
CCR5 HLA DR	-13,6 (-15,7 a 8,4)	16,9 (-2,9 a 47,6)	0,10
PD1 CD38	16,1 (-41,5 a 67,7)	16,9 (-90,4 a 66,2)	0,92
PD1 CD95	7,0 (-168,5 a 66,5)	126,7 (-71,0 a 282,7)	0,25
PD1 HLA DR	-15,1 (-23,4 a 5,7)	27,8 (-3,2 a 44,7)	0,12
CD38 ⁺ HLA DR ⁺	-2,1 (-26,7 a 21,6)	-8,2 (-31,4 a 41,4)	1,00
CCR5 PD1 CD38	1,2 (-9,5 a 28,9)	11,3 (-26,1 a 41,7)	0,85
CCR5 PD1 HLA DR	-10,7 (-22,8 a 22,0)	10,3 (-4,9 a 19,6)	0,63
CD38 ⁺ HLA DR ⁺ CCR5 ⁺	-2,5 (-4,6 a 11,6)	2,1 (-13,3 a 27,2)	0,63
PD1 CD38 HLA DR	3,4 (-19,6 a 20,2)	-2,7 (-17,6 a 17,4)	0,92
CCR5 PD1 CD38 CD95	-17,0 (-17,9 a -1,8)	-12,5 (-66,1 a 2,7)	0,77
CCR5 PD1 CD38 HLA DR	-0,5 (-4,5 a 10,4)	0,7 (-10,8 a 12,7)	0,92
CCR5 PD1 CD95 HLA DR	-3,8 (-8,9 a 15,0)	6,2 (-4,1 a 21,1)	0,63

*Variáveis contínuas apresentadas como medianas e intervalos interquartis; comparações realizadas com o teste da soma dos postos de Wilcoxon (Ranksum test)

Variáveis categóricas apresentadas como frequências e porcentagens; comparações realizadas com teste exato de Fisher



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: IMPACTO DA INFECÇÃO INCIDENTE PELO GBV-C NA ATIVAÇÃO CELULAR EM PESSOAS QUE VIVEM COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV).

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallás

Versão: 1

Pesquisador Executante: Dayane Alves Costa

CAAE: 12829213.1.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10360

Número do Parecer: 279.139

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto: O projeto para doutorado proposto pelos pesquisadores avaliará o impacto da infecção incidente pelo GBV-C na ativação celular em pessoas que vivem com o vírus da Imunodeficiência Humana. Os objetivos estão bem desenhados e os métodos pertinentes às perguntas a serem respondidas. O grupo de pesquisa possui experiência para desenvolver o projeto e analisar os resultados obtidos.

Objetivo da Pesquisa: Os pesquisadores pretendem realizar a avaliação entre a infecção incidente pelo GBV-C e diminuição da expressão de marcadores de ativação de pessoas que vivem com o HIV. Se propõe a determinar quais os melhores marcadores de ativação que retratam o papel modulador do GBV-C2. Pretendem observar se a infecção pelo GBV-C interfere na conversão do HIV e se o tempo entre a soroconversão e a infecção pelo GBV-C interfere no efeito modulador de ativação celular. Os objetivos são claros e possuem relevância científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos para o sujeito da pesquisa. Os fluidos fisiológicos utilizados serão alvo de investigação clínica e laboratorial. A pesquisa não trará benefícios diretos ao paciente, mas é relevante para implantação de futuras terapêuticas nesta população de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é de grande importância, pois o desenvolvimento de novos fármacos será de grande valia para estes pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE já aprovado de projetos anteriores pode ser dispensado, pois o material foi coletado anteriormente e atualmente está armazenado no laboratório.

Recomendações: Abertura de Biorepositório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto é recomendado para aprovação.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br



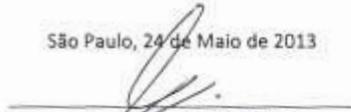
Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 24 de Maio de 2013


Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Manuscrito

11. Manuscrito

Imunnoactivation, senescence and cellular exhaustion associates with HIV infection, and Human Pegivirus (HPgV) coinfecting patients.

Dayane Alves Costa¹, Priscilla Ramos Costa¹, Vivian I. Avelino-Silva^{2,3}, Lucio Gama⁴, Esper Georges Kallas¹.

¹ Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

² Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

³ Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore.

Corresponding author this work: Esper G. Kallas, esper.kallas@gmail.com; dayane.biomedica@gmail.com

Running header: Coinfection HPgV/HIV associated the lower activation, exhaustion. and senescence.

Presented in part: SBI (Brazilian Society of Immunology, in XLI Annual Congress, October 29th to November 2nd of 2016) [abstract CE003].

Financial support: FAPESP project number 2013/05246-8

ABSTRACT

Background: Human pegivirus (HPgV) belongs to the *Flaviviridae* family, although it is not credibly linked to any clinical condition. Among HIV-infected individuals, persistent HPgV coinfection has been associated with favorable outcomes, including delayed progression to AIDS and survival. In this study we analyzed the immune activation, immunosenescence and cellular ontogeny.

Methods: Patients recently infected with HIV were screened for the presence of HPgV infection. Patients with persistent HPgV+ for at least one year (group 1, 9 subjects) and patients HPgV- (group 2, 8 subjects) were analyzed in two time points. Immunophenotyping was performed to investigate in the two groups regarding cellular activation (CCR5, CD38 and, HLA-DR), and senescence/exhaustion (PD-1, CD95, CD28, and CD57).

Results: Two groups presented similar CD4+ and CD8+ T cells, CD4/CD8 ratio, and HIV viral load at the baseline, and some differences were observed at the follow-up visit. Persistent HPgV infection was associated with overall reduction in immunosenescence markers in both CD4+ and CD8+ T cells. The data demonstrate that HPgV infection results in reduced immune stimulation cellular senescence, and cell exhaustion.

Conclusions: Our results suggest that persistent HPgV infection is involved in immune senescence since it can modulate pathways that lead to immunosenescence to AIDS progression.

Keywords: immune activation; exhaustion; HIV; HPgV coinfection; AIDS.

INTRODUCTION

The HPgV (*Human Pegivirus*) known as GBV-C/Hepatitis G belongs to *Flaviviridae* family, which also includes Yellow fever, Dengue fever, Japanese encephalitis, West Nile virus, and Zika virus. HPgV was described for the first time in 1995 by two independent labs in patients with acute hepatitis from unknown etiology (15, 31). Until now no study has shown association the presence of HPgV with any disease (18, 20, 109).

The major relevance of HPgV infection was found in individuals infected with HIV. Prevalence of HPgV infection in the whole population is low, thereabout 10% (20, 110). However in HIV+ individuals, prevalence can reach 40% (10, 51, 111), probably due to similar routes of transmission. HPgV viremia can persist for at least one year or more in these individuals. Several studies have shown the favorable association in the coinfection suggesting new tools to combat the HIV/AIDS epidemic (10, 13, 91).

It has been previously described that this coinfection involves mechanisms of cellular response. But until now, it is not fully understood. And it is known that cellular

activation remains been key hallmark of HIV infection and is implicated in immunodeficiency progression and development of AIDS. Multiple features can drive the evolution to more aggressive or less aggressive clinical disease. HPgV coinfection has been associated with slower disease progression (11, 26). Considering the HIV infection as an inflammatory disease, the exhaustion of the immune system characterized by an exacerbation and persistent cellular activation, lead to apoptosis of both CD4 + and CD8 + T cells resulting in immunosuppression (112).

Thus the majorities of the benefits induced by HPgV infection has been associated in decrease the cellular activation status, leading to favorable levels of the Th1 related Th1/Th2 cytokine profile, beyond the decreased expression of CCR5, CXCR4 and interferons levels, resulting in changes in the cellular responses followed by decrease HIV viral load (113-116).

Several studies exploring CD38, HLA-DR and CCR5 expression and the survival capacity in HIV patients have shown that the presence of HPgV alter the mechanisms that lead to further progression to AIDS (64, 91). Parameters related to exhaustion and immunosenescence like PD-1, CD95/*Fas* and CD57 have been well characterized in the HIV infection (82, 117). However, in the presence of HPgV it is not yet characterized. Although some studies show that there are diminished expression of exhaustion markers was also observed in the presence that virus (118).

This study aimed to explore the effect of HPgV presence of the activation, senescence, exhaustion mechanisms and the cellular differentiation, in HIV infection patients. Perhaps, clarifying the understanding of this coinfection may help thousands of people living with HIV in the world.

METHODS

Study participants Design of Study

For this study, Individuals diagnosed with HIV recent infection enrolled in a Brazilian's cohort were analyzed firstly with respect to be patients recently HIV seroconversion diagnosed (STARHS), absence of antiretroviral treatment, follow up clinical for at least 3 years and availability of PBMC and plasma samples and laboratory data (CD4 + and CD8 + T cells counts and viral load (HIV-VL). This study received approval by the Ethics Committee (Process no. 279.139/2013).

After this initial screening, 185 patients were selected to investigate HPgV coinfection, the presence of HPgV was screened at the initial visit (V1, first visit after diagnosis of HIV infection), and at four subsequent visits performed between intervals of approximately 3 months each visit, covering the first year of HIV infection (V2, V3, V4 and V5). Samples negatives for HPgV infection during the first year of HIV infection were submitted to additional analyses, the screening for the HPgV infection in a third year visit after HIV infection diagnosis.

In order to better monitor the presence and the effects of HPgV throughout the infection, we considered the incident visit of HPgV as baseline (V1) and the samples who remain positive for HPgV for minimal one year after diagnoses for coinfection was considered Vn, follow-up visit (persistent HPgV). Finally nine patients with persistent HPgV were allocated to group 1 and eight patients who remained negative HPgV infection during the same period that other group were allocated in group 2.

Process for obtaining viral load of HPgV by quantitative real time-PCR (qRT-PCR)

The plasmid was constructed with HPgV virus gene segment from 120 bp of the 5'NCR (Non Coding Region) region of the virus. The amplicon was cloned into pUC57 and the strain of *Escherichia coli* DH5 alpha was used as the receptor for transformation. Then, the plasmid was extracted with the protocol of the Midi Prep Kit (Qiagen). The plasmid containing the HPgV sequence has 2830 bp including the ampicillin antibiotic resistance gene (2710 bp of the plasmid and 120 bp of the insert).

The plasmid was linearized using Sal1 enzyme and plasmid DNA transcription performed using the T7 Kit (Qiagen). The resulting plasmid RNA was stored in a later RNA solution and the RNA recovery and purification was performed using the RNeasy kit (RNA clean up, Qiagen), according to the manufacturer's instructions. In order to evaluate the integrity and quality, the plasmidial RNA samples were submitted to 1% agarose gel electrophoresis in the presence of Syber Safe (1: 10,000 uL agarose) and Blue Juice (1: 4). Viewing and photo documentation were performed using the Alpha Imager System (Alpha Innotech, USA) under ultraviolet light.

RNA extraction was performed by the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The protocol was changed in this step: cDNA synthesis and qRT-PCR were performed in a single reaction using the SuperScrip III Platinum Kit (One-Step qRT-PCR with Rox) (Invitrogen).

Flow Cytometer

Frozen PBMCs were thawed rapidly in 37°C water bath, and 10⁶ cells were re-suspended to stained using the following fluorochromes - conjugated antibodies: PE CF594- CD3 (clone UCHT1); APCH7- CD4 (clone RPA-T4); BV510- CD8 (clone SK1); FITC- CD45RA (HI100); PECy7- CCR7 (3D12); PE- CD27 (clone L128); PerCPCy5.5- CD38 (clone HIT2); Alexa Fluor 700- HLA-DR (clone G46-6); APC- CD28 (clone CD28.2); BV421- CD297/PD-1 (clone EH 12.1); BV 605- CD57 (clone NK-1), PECy5- CD95 (clone DX2) and the viability marker (a live dead blue fluorescent reactive dye). Cells were incubated with antibodies for 20 minutes at room temperature and protected from light. After labelling two washes were performed with the MACS buffer to remove unstained antibodies. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes, washed and then permeabilized (4 mL H₂O, 1 mL FACS Lise and 2.5 µl Tween 20%) for 10 minutes followed by centrifugation and then intracellular labelling with the anti-CCR5 conjugated with BV711 for 30 minutes, washes were performed with the MACS buffer and the cells were fixed with 1% paraformaldehyde and acquired on a FACS LSRFortessa™ X-20 flow cytometry (Becton Dickinson-BD Biosciences).

Fluorescence-minus-one (FMO) controls were used (CD45RA, CCR7, HLA DR, CD38, CCR5, CD57, CD28, CD279 and CD95, to determine positive and negative boundaries. The analysis was processed using FlowJo software (Tree Star Inc., v9.8.3).

Statistical analysis

Data were generated using FlowJo software, version 9.8.3 (TreestarInc, Ashland, OR), Pestle and SPICE. The generated values were analyzed in a spreadsheet of data analysis of the programs Excel (Microsoft Corporation, Seathe, WA, USA), and statistical programs used were Graphpad Prism (version 6.0), and Stata (Version 13.0 StataCorp College Station, TX: StataCorp LP). Differences between each group in both visits were analysed, but to evaluate the HPgV effect in the coinfecting group was choosed to analyze the difference ($\Delta V_n - V_1$) within the group by making the difference. P-values were considered statistically significant when <0.05 .

RESULTS

Study cohort

9 patients belonging from HIV newly infected cohort were selected with persistent infection and 8 without viremia samples were matched for follow up time. At the baseline, the HPgV coinfecting patients and controls had similar age (31,6 and 31,7; $p=0,89$), CD4+ T cell count (594 and 603; $p=0,77$), CD8+ T cell count (972 and 1060; $p=1,00$), CD4/CD8 ratio (0,61 and 0,72; $p=0,92$), and HIV viral load (4,32 and 3,91; $p=0,38$) and the one year persistent HPgV infection showed a difference (Δ) of the CD4+ T cell count (-207 and -46,5, $p=0,25$), CD8 +T cell count (-154 and 163, $p=0,21$) CD4/CD8 ratio (-0,11 and -0,16, $p=0,85$) and HIV viral load (average 1821 and -675, $p=0,56$), the data represents the median. All data are described in **Table 1**.

Differences in the expression of the cell activation and senescence markers in CD4 + and CD8 + T lymphocytes.

Was compared both groups in relation to CD4 +, and CD8 + T lymphocytes and with classic markers of activation and senescence. In baseline visit, CD4, and CD8 T cells was no statistical difference between the groups showing that initially the patients did not present differences in relation to the activation and senescence. The CCR5, CD38, and HLA-DR data did not show any significant difference at the baseline and follow-up visits, we performed a variation analysis regarding the HPgV viremia. In the analysis of the PD-1, CD57, CD95, and CD28 also did not also present statistical difference in the baseline visits. In this analysis there was no difference in relation to the markers of cellular activation and senescence, which are characterized and that in the evolution of the progression to AIDS are used as markers of a worse prognosis. Figure 2 and Figure 3

In the analysis of difference (Δ), there was difference in CD4 and CD8 T cells between the two groups, where the presence of HPgV viremia promoted a decrease in the expression of activation and senescence markers, despite the lack of statistical difference due to the number of samples with viremia.

Differences in the expression of the cell activation and senescence profile in subsets of the CD4 + and CD8 + T lymphocytes.

At baseline CD4+ T cell differentiation profiles differ somewhat between the two groups. About the ontogeny data there was in the baseline visit in two groups not similar

regarding to naïve the data were seen a greater amount in non-viremic patients ($p=0.04$), expressing CCR5+CD38+, both are well established markers of cellular activation in HIV patients. About the central memory also expressing less CCR5+CD38+ in viremic patients ($p=0.02$). Showing that there was a lesser expression in the group with viremia.

Analysis of difference (Δ) showed that the evolution the activation and senescence was dissimilar, although not statistically significant. The naïve T cells presented a decrease in HPgV viremia group ($p=0.05$). As with in the markers of the activation and senescence in CD4+ T subsets. Regarding the analysis of CD8 + T lymphocytes, there was no statistical difference in the baseline analysis. In the difference analysis the profiles of CD8+ T cells not were unlike between groups, with significant differences seen in subsets lymphocytes. The naïve T cells, there was a decrease in the viremic group ($p=0.02$) and expressing the CD28 molecule ($p=0.03$). There was also a decrease in this central memory viremic group also expressing this molecule CD28 ($p=0.04$).

Analysis of CD8 T lymphocytes cells in intermediate memory and terminal effector also showed that the differences in viremic group for HPgV, may be associated with less differentiation ($p=0.04$) and ($p=0.03$), respectively. And the analysis of the expression of HLA-DR expression in this terminal effector population also showed that there was a decrease in this classic activation marker in the group with the presence of HPGV ($p=0.03$).

The other markers of activation and senescence also presented a different profile in CD8+ T cells, with decrease in the group with the presence of viremia, although not statistically significant.

DISCUSSION

Several studies showed that immune activation is associated with worse prognostic in HIV patients, leading to faster progression, AIDS and death (85-88). Exacerbated activation leads to changes that may compromise the immune response, which is compromised in HIV infection (REF).

Studies on chronic immune activation with the CD38 +, HLA-DR and CCR5 + markers are already well established and are used as predictors for the promotion of chronicity and a worse prognosis (89). In order to clarify the mechanisms involved in

the cellular activation process leading to a process of cellular senescence and exhaustion in the progression to AIDS in the HPgV coinfecting was analyzed in a cohort the HIV recent infected. Like other findings, our results also suggest the protective role of the pegivirus in the period infection. Although the number of samples limit statistical data, it is notable that there is a difference in relation to these data in the groups.

In this study, was observed HIV and HPgV coinfection in relation to cellular activation associated with senescence and cellular exhaustion. Cellular activation is essential in the immune response and is indispensable for the promotion of an efficient defense against invasion of the organism, becoming essential for cellular survival and maintenance of homeostasis (91, 92).

Much effort has been done to understand the HPgV and HIV coinfection. Previous studies showed that this coinfection has been involved in the slower progression to AIDS. According with this studies the viraemia is related with decrease T-cell activation and better immune system profile (61, 64). Here, we showed association of CD38, HLA-DR and CCR5 with the coinfection in HIV coinfection with HPgV. Several works shows that this markers are better to characterized of the progression to AIDS. Although not statistically significant, the data show a difference between the two groups, both in CD4 + and CD8+ T lymphocytes.

In the analysis of cellular activation associated with senescence markers, mainly CCR5 and PD-1 there was a difference between the two groups. So, the presence of HPgV was beneficial for patients with viremia. These findings in the analysis of difference in cell activation data in naive and memory cells in HPgV viremic patients demonstrate that this activation may confer protection for these individuals about the senescence and exhaustion. Since persistent activation promotes a depletion of these cells of the immune system compromising the integrity and responsiveness of these cells.

The analysis of senescence and exhaustion analysis also showed a beneficial profile for the viremic group for HPgV compared to controls. Perhaps, this decrease can be seen in this population coinfecting by the protection mediated by HPgV, described in several works recently (64). This exaggerated activation leading to senescence of the immune system is one of the major concerns in the HAART era, since the treatment

does not eliminate other problems related to cardiovascular diseases, cancer, liver and kidney diseases and neurocognitive decline and other comorbidities (104, 105, 119).

Until now, the consequences of the presence of the HIV virus in the homeostasis of the immune system have not yet been fully elucidated. And the understanding of molecules involved in the aging of the immune system can help in this process. Can be the high expression of CD95/Fas, the presence of PD1 and CD57 is being related to an apoptotic profile in patients infected with HIV (117). Westendorp and colleagues showed that the pathways involved in the apoptosis involve CD95 with TCR involvement (107) The CD57 is associated with loss of CD4 T lymphocytes in HIV patients with death by apoptosis (82). As predictors of an exaggerated immune response, cellular aging and also the exhaustion of the immune response are associated with loss CD4 and a worse prognosis for AIDS.

Despite the small numbers and the small number in this cohort, no significant differences were founding. But the impact of the study on coinfection in HIV coinfection is important in the current context of new approaches to combating the HIV/AIDS epidemic.

CONCLUSIONS

Persistent HPgV infection was associated with overall greater reduction in activation and senescence markers on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However the effect did not reach statistical significance for all the variables. Similar trend was observed for subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Despite sample size limitation, our study suggests that persistent HPgV infection is associated with reduction in immune activation and exhaustion in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These findings help elucidate the mechanisms by which HPgV prevents detrimental outcomes in HIV-infected patients.

In this study we observed that there are differences in the profile of cellular activation and senescence in the presence of HPgV and Persistent HPgV infection was associated with better prognosis for coinfecting individuals.

Funding: This work was supported by FAPESP (project number 2013/05246-8);

Acknowledgements

We are grateful for Teresa Maidana-Giret for GBV-C (HPgV) RT-PCR assays results of the most of the samples; Lucio Gama by the plasmid design and aid in the experimental

design. Claudia Tomiyama and Helena Tomiyama for support in constituting the sample repository.

Authorship: D.A.C and E.G.K. developed the study concept/ D.A.C, P.R.C and L.G for experimental design/ Statistical analyses were done by D.A.C and V.I.A./D.A.C wrote the manuscript/ All authors were involved in manuscript review and editing.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*. 2008;22(4):439-46.
2. Burger S, Poles MA. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Semin Liver Dis*. 2003;23(2):115-24.
3. K. AA, H. LA, PILLAI S. *Imunologia celular e molecular* 2ed. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER; 2008. 560 p.
4. Highleyman L. Inflammation, immune activation, and HIV. *BETA*. 2010;22(2):12-26.
5. Nixon DE, Landay AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):498-503.
6. UNAIDS. Global AIDS Response Progress Reporting 2015. 2015 [cited 14/04/2016]. www.unaids.org/en/dataanalysis/Knowyourresponde/globalaidsprogressreporting, [cited 14/04/2016].
7. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999;285(1):1-32.
8. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2587-99.
9. McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, et al. Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet*. 2016;387(10013):53-60.
10. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis*. 1998;177(6):1723-6.
11. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2001;345(10):715-24.
12. Lefrère JJ, Loiseau P, Maury J, Lasserre J, Mariotti M, Ravera N, et al. Natural history of GBV-C/hepatitis G virus infection through the follow-up of GBV-C/hepatitis G virus-infected blood donors and recipients studied by RNA polymerase chain reaction and anti-E2 serology. *Blood*. 1997;90(9):3776-80.
13. Lefrère JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*. 1999;179(4):783-9.
14. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;17(3):209-13.

15. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3401-5.
16. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*. 1995;1(6):564-9.
17. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 1996;271(5248):505-8.
18. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*. 1996;48(1):60-7.
19. Saito S, Tanaka K, Kondo M, Morita K, Kitamura T, Kiba T, et al. Plus- and minus-stranded hepatitis G virus RNA in liver tissue and in peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(2):288-91.
20. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med*. 1997;336(11):747-54.
21. Schlauder GG, Dawson GJ, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Gutierrez RA, Heynen CA, et al. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol*. 1995;46(1):81-90.
22. Fiordalisi G, Zanella I, Mantero G, Bettinardi A, Stellini R, Paraninfo G, et al. High prevalence of GB virus C infection in a group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. *J Infect Dis*. 1996;174(1):181-3.
23. Fogeda M, Navas S, Martín J, Casqueiro M, Rodríguez E, Arocena C, et al. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus. *J Virol*. 1999;73(5):4052-61.
24. Xiang J, Wünschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol*. 2000;74(19):9125-33.
25. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2000;132(12):959-63.
26. Xiang J, Wünschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2001;345(10):707-14.
27. Devereux H, Sabin CA, Kinson Z, Brown D, Griffioen A, Dusheiko GM, et al. Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *J Med Virol*. 1998;56(4):316-20.
28. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 2):233-46.
29. Adams MJ, King AM, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol*. 2013;158(9):2023-30.
30. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat*. 2009;16(11):757-68.
31. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol*. 1995;69(9):5621-30.

32. Oubina J, Mathet V, Feld M, Della Latta M, Ferrario D, Verdun R, et al. Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina. *Virus Research*. 1999;65(2):121-9.
33. Noguchi S, Sata M, Suzuki H, Ohba K, Mizokami M, Tanikawa K. GB virus C (GBV-C) hepatitis G virus (HGV) infection among intravenous drug users in Japan. *Virus Research*. 1997;49(2):155-62.
34. Kaneko T, Hayashi S, Arakawa Y, Abe K. Molecular cloning of full-length sequence of hepatitis G virus genome isolated from a Japanese patient with liver disease. *Hepatology Research*. 1998;12(3):207-16.
35. Saito T, Ishikawa K, Osei-Kwasi M, Kaneko T, Brandful J, Nuvor V, et al. Prevalence of hepatitis G virus and characterization of viral genome in Ghana. *Hepatology Research*. 1999;13(3):221-31.
36. Tribl B, Schoniger-Hekele M, Petermann D, Bakos S, Penner E, Muller C. Prevalence of GBV-C/HGV-RNA, virus genotypes, and anti-E2 antibodies in autoimmune hepatitis. *American Journal of Gastroenterology*. 1999;94(11):3336-40.
37. Lu L, Ng M, Zhou B, Luo H, Nakano T, Robertson B, et al. Detection and genotyping of GBV-C/HGV variants in China. *Virus Research*. 2001;73(2):131-44.
38. Ebadi M, Yaghobi R, Geramizadeh B, Bahmani M, Malek-Hosseini S, Nemayandeh M. Prevalence of HCV and HGV Infections in Iranian Liver Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 2011;43(2):618-20.
39. Lampe E, de Oliveira J, Pereira J, Saback F, Yoshida C, Niel C. Hepatitis G virus (GBV-C) infection among Brazilian patients with chronic liver disease and blood donors. *Clinical and Diagnostic Virology*. 1998;9(1):1-7.
40. Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocencio L, Fonseca L, Duarte A. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Research*. 2010;151(2):148-52.
41. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis*. 2006;193(3):451-4.
42. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton J. Human Pegivirus (HPgV or GB virus C) RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA containing particles are infectious in vitro. *J Gen Virol*. 2014.
43. Gutierrez RA, Dawson GJ, Knigge MF, Melvin SL, Heynen CA, Kyrk CR, et al. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J Med Virol*. 1997;53(2):167-73.
44. Tanaka E, Kiyosawa K, Shimoda K, Hino K, Tacke M, Schmolke S, et al. Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepat*. 1998;5(3):153-9.
45. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, et al. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*. 1998;28(2):379-84.
46. Gómara MJ, Fernández L, Pérez T, Ercilla G, Haro I. Assessment of synthetic chimeric multiple antigenic peptides for diagnosis of GB virus C infection. *Anal Biochem*. 2010;396(1):51-8.
47. Keck ZY, Li SH, Xia J, von Hahn T, Balfe P, McKeating JA, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol*. 2009;83(12):6149-60.
48. Keck ZY, Angus AG, Wang W, Lau P, Wang Y, Gatherer D, et al. Non-random escape pathways from a broadly neutralizing human monoclonal antibody map to a highly conserved region on the hepatitis C virus E2 glycoprotein encompassing amino acids 412-423. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):e1004297.

49. Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Sauleda S, Esteban JI, Tanaka E, et al. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology*. 1997;26(6):1626-33.
50. Ramezani A, Gachkar L, Eslamifar A, Khoshbaten M, Jalilvand S, Adibi L, et al. Detection of hepatitis G virus envelope protein E2 antibody in blood donors. *Int J Infect Dis*. 2008;12(1):57-61.
51. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, Schmitt C, Fritsch S, Lang JM, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(9):721-4.
52. Jarvis LM, Davidson F, Hanley JP, Yap PL, Ludlam CA, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet*. 1996;348(9038):1352-5.
53. Menéndez C, Sánchez-Tapias JM, Alonso PL, Giménez-Barcons M, Kahigwa E, Aponte JJ, et al. Molecular evidence of mother-to-infant transmission of hepatitis G virus among women without known risk factors for parenteral infections. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2333-6.
54. Stapleton JT, Xiang J, McLinden JH, Bhattarai N, Chivero ET, Klinzman D, et al. A novel T cell evasion mechanism in persistent RNA virus infection. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2014;125:14-24; discussion -6.
55. Rodriguez B, Woolley I, Lederman MM, Zdunek D, Hess G, Valdez H. Effect of GB virus C coinfection on response to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*. 2003;187(3):504-7.
56. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med*. 2004;350(10):981-90.
57. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med*. 2006;7(1):25-31.
58. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*. 2003;17(10):1457-62.
59. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, Tural C, Clotet B, Blackard JT, et al. GB virus C coinfection in advanced HIV type-1 disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4(+) T-cells. *Antivir Ther*. 2010;15(5):745-52.
60. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol*. 2010;185(7):4496-505.
61. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, et al. GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS*. 2009;23(5):605-10.
62. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(5):563-72.
63. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, Chang Q, Kaufman TM, Klinzman D, et al. Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol*. 2009;183(12):7860-9.
64. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS*. 2009;23(17):2277-87.
65. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15570-5.

66. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4+ T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 12):3341-6.
67. Ranjbar MM, Ghorban K, Alavian SM, Keyvani H, Dadmanesh M, Roayaei Ardakany A, et al. GB Virus C/Hepatitis G Virus Envelope Glycoprotein E2: Computational Molecular Features and Immunoinformatics Study. *Hepat Mon.* 2013;13(12):e15342.
68. Eissmann K, Mueller S, Sticht H, Jung S, Zou P, Jiang S, et al. HIV-1 fusion is blocked through binding of GB Virus C E2-derived peptides to the HIV-1 gp41 disulfide loop [corrected]. *PLoS One.* 2013;8(1):e54452.
69. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS.* 2007;21(5):645-7.
70. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol.* 2011;85(14):7037-47.
71. George SL, Varmaz D, Tavis JE, Chowdhury A. The GB virus C (GBV-C) NS3 serine protease inhibits HIV-1 replication in a CD4+ T lymphocyte cell line without decreasing HIV receptor expression. *PLoS One.* 2012;7(1):e30653.
72. Bhattarai N, Stapleton JT. Study design may explain discrepancies in GB virus C effects on interferon- γ and interleukin-2 production and CD38 expression in T lymphocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(4):568-9; author reply 9.
73. Sacchi A, Lalle E, Martini F, Abbate I, Castilletti C, D'Offizi G, et al. GB-Virus type C effect on HIV infection, interferon system, and dendritic cells. *Archives of Medical Research.* 2008;39(3):362-3.
74. Romagnani S, Del Prete G, Manetti R, Ravina A, Annunziato F, De Carli M, et al. Role of TH1/TH2 cytokines in HIV infection. *Immunol Rev.* 1994;140:73-92.
75. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Kaufman TM, Stapleton JT. GB virus C envelope protein E2 inhibits TCR-induced IL-2 production and alters IL-2-signaling pathways. *J Immunol.* 2012;189(5):2211-6.
76. Keyvani H, Mohammadi A, Sabouri Ghannad M, Hajabdolbaghi M. The Effect of GBV-C Infection on CD4 Count and Viral Loads in Patients Infected With HIV. *Hepat Mon.* 2012;12(1):39-42.
77. Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien S, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *American Journal of Human Genetics.* 1997;61(6):1261-7.
78. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol.* 1999;162(11):6942-6.
79. Tomiyama H, Miwa K, Shiga H, Moore YI, Oka S, Iwamoto A, et al. Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol.* 1997;158(10):5026-34.
80. Bévillacqua S, Rabaud C, May T. [HIV-tuberculosis coinfection]. *Ann Med Interne (Paris).* 2002;153(2):113-8.
81. Chun HM, Roediger MP, Hullsiek KH, Thio CL, Agan BK, Bradley WP, et al. Hepatitis B virus coinfection negatively impacts HIV outcomes in HIV seroconverters. *J Infect Dis.* 2012;205(2):185-93.
82. Cobos Jiménez V, Wit FW, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis.* 2016;214(2):216-25.
83. Maidana MT, Sabino EC, Kallas EG. GBV-C/HGV and HIV-1 coinfection. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(2):122-5.

84. Giret MT, Miraglia JL, Sucupira MC, Nishiya A, Levi JE, Diaz RS, et al. Prevalence, incidence density, and genotype distribution of GB virus C infection in a cohort of recently HIV-1-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(4):e18407.
85. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1534-43.
86. Kovacs A, Karim R, Mack WJ, Xu J, Chen Z, Operskalski E, et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2010;201(6):823-34.
87. Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012;9(2):139-47.
88. Huson MA, Wouters D, van Mierlo G, Grobusch MP, Zeerleder SS, van der Poll T. HIV Coinfection Enhances Complement Activation During Sepsis. *J Infect Dis*. 2015.
89. Bansal A, Sterrett S, Erdmann N, Westfall AO, Dionne-Odom J, Overton ET, et al. Normal T-cell activation in elite controllers with preserved CD4+ T-cell counts. *AIDS*. 2015;29(17):2245-54.
90. Sajadi MM, Pulijala R, Redfield RR, Talwani R. Chronic immune activation and decreased CD4 cell counts associated with hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. *AIDS*. 2012;26(15):1879-84.
91. Rydze RT, Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther*. 2012;17(7):1271-9.
92. Bhattarai N, Rydze RT, Chivero ET, Stapleton JT. GB virus C viremia is associated with higher levels of double-negative T cells and lower T-cell activation in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2012;206(9):1469-72.
93. Stapleton JT, Chaloner K, Martenson JA, Zhang J, Klinzman D, Xiang J, et al. GB virus C infection is associated with altered lymphocyte subset distribution and reduced T cell activation and proliferation in HIV-infected individuals. *PLoS One*. 2012;7(11):e50563.
94. Ernst D, Greer M, Akmatova R, Pischke S, Wedemeyer H, Heiken H, et al. Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: a 20-year follow-up study. *HIV Med*. 2014;15(4):245-50.
95. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(1):111-26.
96. Bastard JP, Fellahi S, Couffignal C, Raffi F, Gras G, Hardel L, et al. Increased systemic immune activation and inflammatory profile of long-term HIV-infected ART-controlled patients is related to personal factors, but not to markers of HIV infection severity. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(6):1816-24.
97. Borges Á, Weitz JI, Collins G, Baker JV, Lévy Y, Davey RT, et al. Markers of inflammation and activation of coagulation are associated with anaemia in antiretroviral-treated HIV disease. *AIDS*. 2014;28(12):1791-6.
98. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno A, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfecting patients. *HIV Med*. 2015;16(4):240-8.
99. Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, et al. T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis*. 2011;203(4):452-63.

100. Yao ZQ, Moorman JP. Immune exhaustion and immune senescence: two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(3):193-201.
101. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol*. 2007;42(5):432-7.
102. Baggio-Zappia GL, Barbosa AeJ, Brunialti MK, Salomão R, Granato CF. Influence of GB virus C on IFN- γ and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(6):662-9.
103. Yoshimura K. Current status of HIV/AIDS in the ART era. *J Infect Chemother*. 2017;23(1):12-6.
104. Patel N, Veve M, Kwon S, McNutt LA, Fish D, Miller CD. Frequency of electrocardiogram testing among HIV-infected patients at risk for medication-induced QTc prolongation. *HIV Med*. 2013;14(8):463-71.
105. Tan-Tam C, Liao P, Montaner JS, Hull MW, Scudamore CH, Erb SR, et al. HIV and liver transplantation: The British Columbia experience, 2004 to 2013. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2014;25(3):159-62.
106. Chivero ET, Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Stapleton JT. Human Pegivirus (HPgV; formerly known as GBV-C) inhibits IL-12 dependent natural killer cell function. *Virology*. 2015;485:116-27.
107. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995;375(6531):497-500.
108. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
109. Shang Q, Yu J, Zhang G. [Effects of hepatitis G virus coinfection on hepatic pathological changes of patients with chronic hepatitis B: a long-term comparative study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2001;81(22):1365-8.
110. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CM, Bassit L, Chamone DF, Focaccia R, et al. Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in São Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(6):438-43.
111. Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocêncio L, Fonseca LA, Duarte AJ. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Res*. 2010;151(2):148-52.
112. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*. 2011;62:141-55.
113. Sacchi A, Lalle E, Martini F, Abbate I, Castilletti C, D'Offizi G, et al. GB-virus type C effect on HIV infection, interferon system, and dendritic cells. *Arch Med Res*. 2008;39(3):362-3.
114. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol*. 2005;33(4):257-66.
115. Berzsenyi MD, Woollard DJ, McLean CA, Preiss S, Perreau VM, Beard MR, et al. Down-regulation of intra-hepatic T-cell signaling associated with GB virus C in a HCV/HIV co-infected group with reduced liver disease. *J Hepatol*. 2011;55(3):536-44.
116. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med*. 2003;139(1):26-30.
117. Lu I, Eberhard J, Ahmad F, Bhatnagar N, Behrens G, Jacobs R, et al. Elevated CD57 and CD95 expressions are associated with lower numbers of CD4⁺ recent thymic emigrants in HIV-1 infected immune responders following antiretroviral treatment. *Immunol Lett*. 2014;158(1-2):1-6.

118. Saeidi A, Chong YK, Yong YK, Tan HY, Barathan M, Rajarajeswaran J, et al. Concurrent loss of co-stimulatory molecules and functional cytokine secretion attributes leads to proliferative senescence of CD8(+) T cells in HIV/TB co-infection. *Cell Immunol.* 2015;297(1):19-32.
119. Narayan KM, Miotti PG, Anand NP, Kline LM, Harmston C, Gulakowski R, et al. HIV and noncommunicable disease comorbidities in the era of antiretroviral therapy: a vital agenda for research in low- and middle-income country settings. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;67 Suppl 1:S2-7.

Table 1- HIV patient characteristics in both HPgV coinfecting and uninfected groups.

Characteristics	Group 1 HPgV(+) (n=9)	Group 2 HPgV(-) (n=8)	P value
Age in years (median, IQ)	31,6 (29,6-40,6)	31,7 (28,7-35,5)	0,89
MSM	8 (88,8)	8 (100)	1,0
Viral load (HIV, log)			
Baseline (V0)	4,32 (2,72-4,91)	3,91 (2,60-4,66)	0,38
Difference (Δ -V1 and Vn) *	-0,18 (-0,5-0,75)	-0,05 (-0,56 to 0,32)	0,70
CD4+ Counts (median, IQ)			
Baseline (V0)	594,0 (585-698)	603 (503-761)	0,77
Difference (Δ)	-207,0 (-251,5- 37)	-46,5 (-115,5-12,5)	0,25
CD8+ Counts (median, IQ)			
Baseline (V0)	972,0 (610-1203)	1060 (625-1255)	1,0
Difference (Δ)	-154,0 (-256 to 144)	163 (-198 to 344,5)	0,21
CD4/CD8 Ratio V0	0,61 (0,38-1,02)	0,72 (0,58-0,83)	0,92
CD4/CD8 Difference of ratio (Δ)*	-0,11 (-0,41-0,07)	-0,16 (-0,31 to 0,02)	0,85

*Vn refers to the one-year visit after HPgV infection for HPgV+ group and, for HPgV-, the mean number of days corresponding to the positive group (~ 800 days)

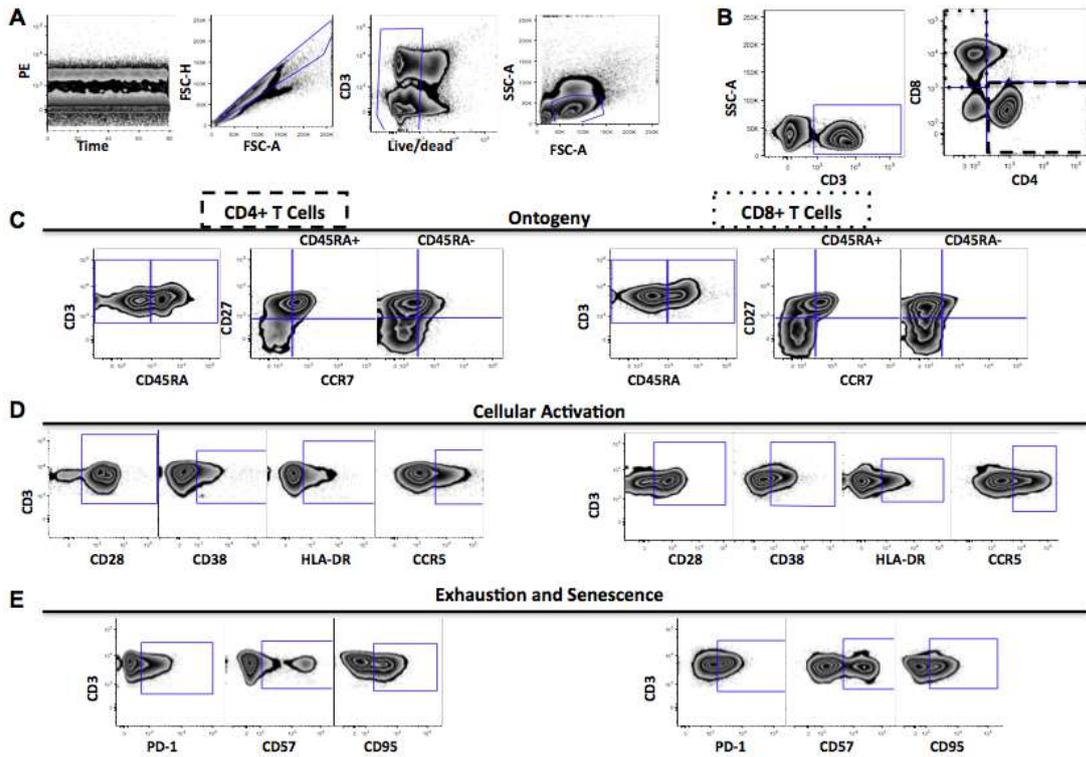


Figure 1- Analysis strategy used for the characterization of the cells T CD4 + and CD8+. Data were analyzed in zebra plot graphics and gates were based on the FMO. Quality criteria were used (A), then CD3+, CD4+, and CD8+ T cell populations were identified (B). Cellular ontogeny was identified through the combined expression of CD27, CD45RA and CCR7 classifying the following subpopulations: naive (Nv = CD45RA + CCR7 + CD27 +); central memory (CM = CD45RA-CCR7 + CD27 +); transient memory (TM = CD45RA-CCR7-CD27 +); intermediate memory (IM = CD45RA + CCR7-CD27 +); effector memory (Ef.M=CD45RA- CCR7-CD27-); terminal effector (Ef. T= CD45RA+CCR7-CD27-) (C), cellular activation was investigated by the expression of CCR5+, CD38+, HLA-DR+, CD28+ markers (D), and the exhaustion and senescence profile were characterized by expression of the PD-1, CD95, and CD57 markers (E).

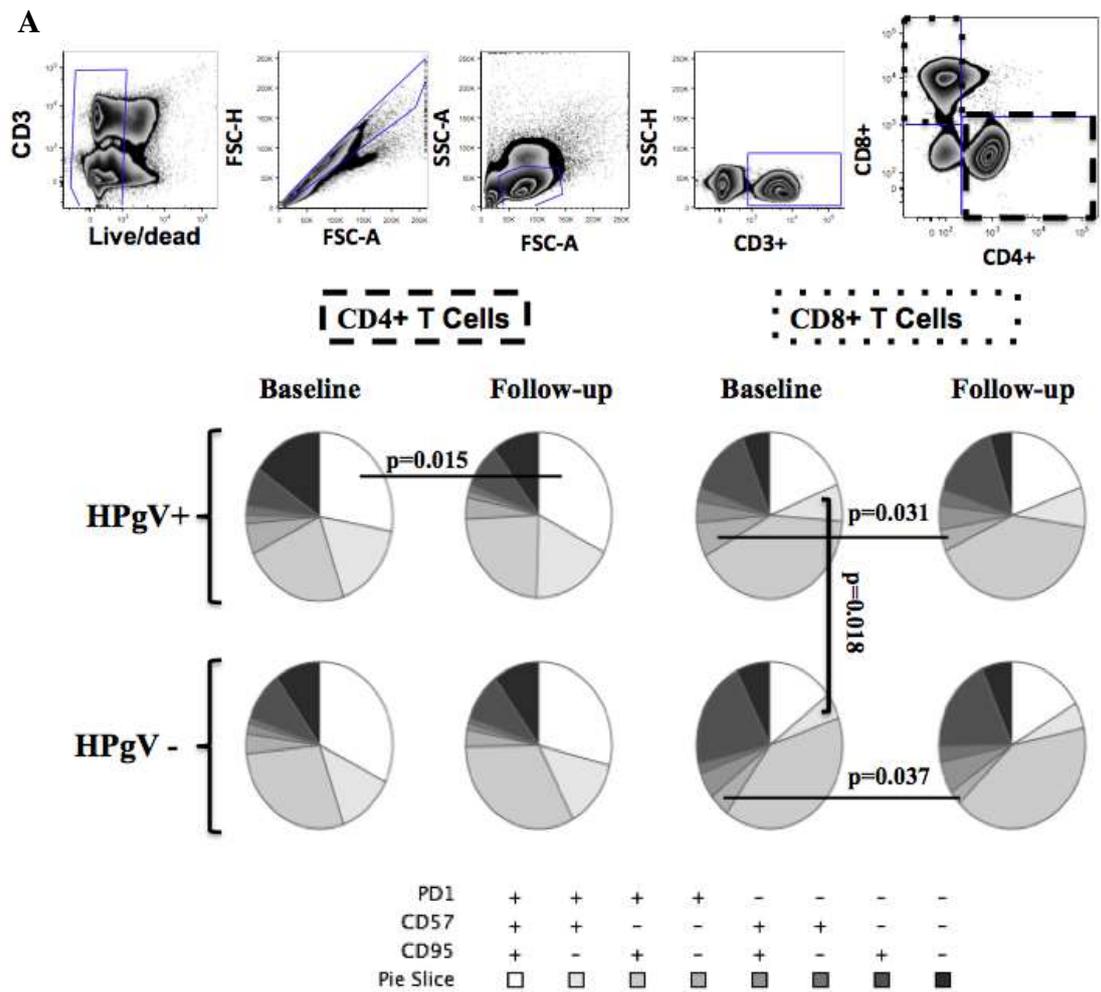


Figure 2. Profile of the coexpression of PD1+, CD57+ and CD95+ on the cells T CD4+ and CD8+(A). Gating scheme for determination of T-cells. Pies illustrate the expression the senescence and exhaustion markers. (B) Comparative analysis between the HPgV + and HPgV- (without viremia) groups in relation to PD-1 +, CD95 + and CD57 data at the baseline and follow-up visit. Data in pie charts were evaluated using SPICE program.

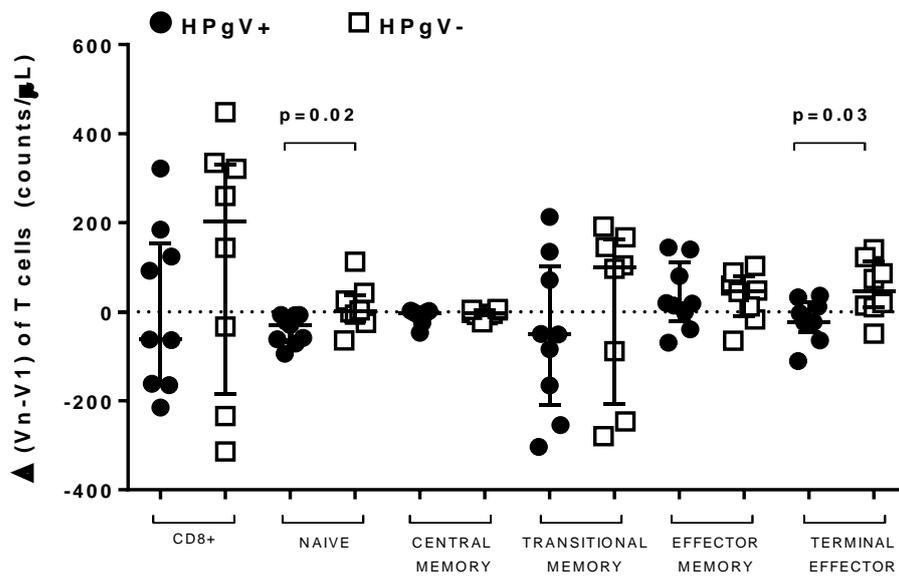


Figure 3- Differences ($\Delta Vn-V1$) in counting into CD8+ T cells subsets. Differences between HIV-1+/HPgV+ coinfecting group compared to HIV-1+/HPgV- uninfected group were explored. Graphics scatter dot plot showed median as interquartile (25-75%) values.

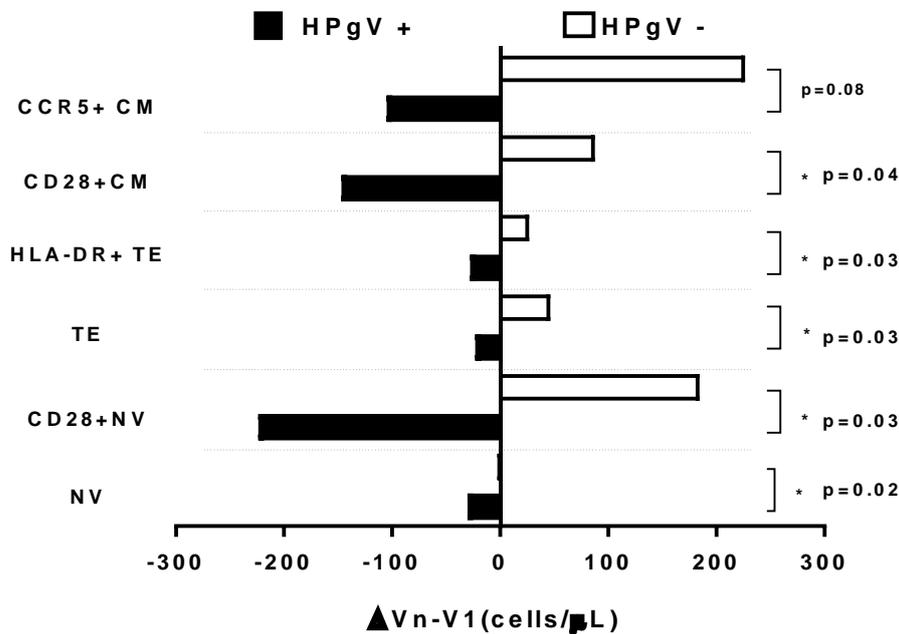


Figure 4- Differences ($\Delta Vn-V1$) in counting CD8+ T cells. Changes into CD8+ T cells subsets and their specific activation markers were analysed between HIV-1+/HPgV+ coinfecting group compared to HIV-1+/HPgV- uninfected. Graphics bars showed median values.