

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

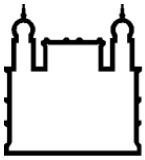
Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
PEGIVIRUS HUMANO TIPO 1 (HPgV-1) EM INDIVÍDUOS  
COINFECTADOS PELOS VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)  
E/OU VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV).**

Jéssica Gonçalves Pereira

Rio de Janeiro

Março/2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

*Jéssica Gonçalves Pereira*

Epidemiologia e caracterização molecular de Pegivirus humano tipo 1 (HPgV-1) em indivíduos coinfectados pelos vírus da hepatite C (HCV) e/ou vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dra Vanessa Salete de Paula

**Co-orientador:** Prof. Dra. Caroline Cordeiro Soares

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2020

Gonçalves Pereira, Jéssica .

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PEGIVIRUS HUMANO TIPO 1 (HPgV-1) EM INDIVÍDUOS COINFECTADOS PELOS VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E/OU VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV). / Jéssica Gonçalves Pereira. - Rio de janeiro, 2020.

78 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Co-orientadora: Caroline Cordeiro Soares.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. HPgV-1. 2. HCV/HIV. 3. Genotipagem. 4. Epidemiologia . 5. -. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: JÉSSICA GONÇALVES PEREIRA***

**Epidemiologia e caracterização molecular de Pegivirus humano tipo 1 (HPgV-1) em indivíduos coinfectados pelos vírus da hepatite C (HCV) e/ou vírus da imunodeficiência humana (HIV).**

**ORIENTADORA:** Dra. Vanessa Salete de Paula

**CO-ORIENTADORA:** Dra. Caroline Cordeiro Soares

Aprovada em: 31 / 03 / 2020

**BANCA EXAMINADORA:**

**Dra.** Flavia Barreto dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz-IOC/ FIOCRUZ)

**Dra.** Carmen Baur Vieira (Universidade Federal Fluminense - UFF)

**Dr.** Francisco Campello do Amaral Mello (Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ)

Suplentes:

**Dra.** Andreza Soriano Figueiredo (Instituto Oswaldo Cruz-IOC/ FIOCRUZ)

**Dra.** Flavia Savassi (Universidade Federal Fluminense – UFF)

Rio de Janeiro, 31 de março de 2020



***“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus.”***

***Albert Einstein***

## ***Agradecimentos***

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus, meu amado Moção, que me deu o dom da vida, a força, o amor, a fé, as lágrimas, os sorrisos ... Tudo o que eu precisava para ter chegado até aqui.

À minha família, minha mãe, minha melhor amiga, que sempre acreditou no meu potencial de uma forma que nem eu acreditava, que sempre foi minha maior inspiração nos estudos e no caráter e é dona do melhor abraço nos momentos difíceis e dona do melhor sorriso diante das minhas vitórias. Meu pai, que foi responsável pelas minhas marmitas diárias e minha companhia na madrugada enquanto eu estudava e escrevia e que tanto se preocupou a respeito da minha segurança em idas e vindas da Fiocruz. Meu gato, bebê, minha fiel companhia em todos os momentos.

Aos meus irmãos dados por Deus, meus amigos, que por diversas vezes me ajudaram a não pirar diante de toda pressão e vibram comigo a cada etapa vencida. Queria escrever o nome de cada um aqui, mas daria briga.

A melhor equipe de laboratório que eu poderia ter, LVM é uma família. Eu não teria chegado até aqui sem tamanha ajuda. Especialmente a Nathalia Alves e sua paciência em me ajudar com toda parte do banco de dados dos pacientes e análises estatísticas, a Jéssica Vasquez por ter me ensinado a organizar minhas referências e sempre ceder seus ouvidos aos meus momentos de crise. E, obviamente, aos demais alunos, por tornar o trabalho mais divertido, leve e terem me mostrado na prática o conceito de equipe. Sintam o nome de todos escritos aqui.

À Dra. Vanessa de Paula, por ser uma líder inspiradora. Obrigada por ter me aceitado no LVM e por ter confiado em mim e no meu trabalho, por se importar com seus alunos como uma mãe e por sempre trazer soluções e tranquilidade. “No final dará tudo certo” é a minha frase favorita dela. E que continue sendo no doutorado.

À Dra. Caroline Cordeiro Soares, minha parceira de Pegivirus Humano, a orientadora mais perfeccionista que tive e que tanto me ensinou com isso. Obrigada por confiar no meu trabalho, vibrar comigo quando os experimentos davam certo e pela paciência no meu aprendizado em relação a escrita.

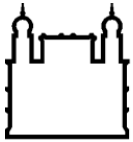
Quero agradecer pelas amizades que fiz na minha turma de mestrado da Biologia Parasitária 2018. Tudo se tornou mais divertido e único graças a vocês. Por mais anos de amizade e futuras colaborações.

Gostaria de agradecer aos colaboradores: Dr. Carlos Eduardo Brandão, a equipe do HUGG e o Dr. José Junior França de Barros por ceder as amostras e banco de dados para que esse trabalho fosse realizado. À Dra. Andreza Salvio e à doutoranda Amanda Lopes obrigada pelas ajudas com as análises e informações das amostras HIV+ da soroteca do LVM.

Gostaria de agradecer também aos membros que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa, por dedicarem o seu tempo ao meu aprimoramento profissional. Especialmente a Dra. Flávia Barreto pela tamanha dedicação em seu papel como revisora, além de também ser presidente da banca.

Finalmente, gostaria de agradecer ao programa de Biologia Parasitária, por confiar no meu trabalho e me permitir realizá-lo, especialmente a Rita Gomes que tanto me ajudou diante de toda burocracia ao longo do mestrado e ao CNPQ.

E que continuemos investindo na ciência brasileira.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Epidemiologia e caracterização molecular de *Pegivirus humano tipo 1* (HPgV-1) em indivíduos coinfectados pelos vírus da hepatite c (HCV) e/ou vírus da imunodeficiência humana (HIV).**

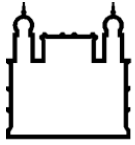
#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Jéssica Gonçalves Pereira**

O Pegivirus humano 1 (HPgV-1) é um vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva membro da família *Flaviviridae*, e que possui similaridade genômica com o vírus da hepatite C (HCV). No entanto, diferentemente do HCV, o HPgV-1 é linfotrópico e estabelece uma infecção subclínica. Vários estudos relataram que a infecção pelo HPgV-1 está associada à progressão tardia da doença pelo HIV, com indivíduos infectados demonstrando maiores contagens de células TCD4+, menor carga viral do HIV, uma progressão mais lenta para AIDS e, conseqüentemente, uma expectativa de vida prolongada. Em pacientes com co-infecção crônica por HCV e HIV, o RNA do HPgV-1 foi associado a níveis significativamente mais baixos de ALT e AST e a uma melhora na sobrevida livre de cirrose, sugerindo um efeito benéfico da infecção pelo HPgV-1 em ambas as infecções. Para a melhor compreensão do impacto do HPgV-1 nas co-infecções, se faz necessário conhecer as características epidemiológicas desse vírus. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência e distribuição genotípica do HPgV-1 em doadores de sangue e pacientes HCV e HIV positivos atendidos em um hospital no Rio de Janeiro entre os anos de 2017 a 2018. Um ensaio de RT-PCR para amplificação específica da região 5'UTR do genoma viral foi realizado em 236 amostras de soro, sendo 56 amostras de co-infecção HCV/HIV, 60 de HCV mono-infectadas, 60 de HIV mono-infectadas e 60 de doadores de sangue. Todas as amostras positivas foram submetidas ao seqüenciamento direto do genoma viral para genotipagem e caracterização molecular. A prevalência geral de HPgV-1 foi de 15,7% (37/236). Maiores frequências de HPgV-1 foram encontradas no grupo de indivíduos com HIV 28,3% (17/60), seguido pelos grupos de indivíduos co-infectados com HCV/HIV (14,3%), doadores de sangue (11,6%) e em co-infecção com HCV (8,3%). A análise filogenética revelou a presença dos genótipos 2a (22,8%), 2b (57,1%), 3 (8,5%) e 1 (8,5%) de HPgV-1. Este é o primeiro estudo que caracteriza a infecção pelo HPgV-1 em pacientes com HCV e HCV/HIV na cidade do Rio de Janeiro e que visa contribuir com maiores informações sobre características epidemiológicas e clínicas do HPgV-1 no curso natural da infecções pelo HCV e/ou HIV.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Epidemiology and molecular characterization of human Pegivirus type 1 (HPgV-1) in individuals co-infected with hepatitis c virus (HCV) and / or human immunodeficiency virus (HIV).**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY**

**Jéssica Gonçalves Pereira**

Human Pegivirus-1 (HPgV-1), formerly known as GBV-C virus, is a member of the *Flaviviridae* family, a single-stranded positive RNA virus and that has genetic similarity to the hepatitis C virus (HCV). However, unlike HCV, HPgV-1 is lymphotropic and is involved in a subclinical infection. Several studies related to HPgV-1 infections are associated with the late progression of HIV disease, demonstrate higher counts of TCD4 + cells, lower HIV viral load, slower progression to AIDS and, consequently, longer life expectancy of the patients. Moreover, in patients with chronic co-infection by HCV and HIV, the HPgV-1 RNA was associated with lower levels of ALT and AST and an improvement in cirrhosis-free survival, suggesting a beneficial effect of HPgV-1 infection for both HCV and HIV infections. To better understand the impact of HPgV-1 on co-infections, the knowledge on the epidemiological characteristics of the virus is necessary. The aim of this study was to determine the prevalence and genetic distribution of HPgV-1 in blood donors and patients with HCV and HIV assisted in a hospital in Rio de Janeiro between 2017 and 2018. An RT-PCR assay for specific amplification of the 5'UTR region of the viral genome was performed on 236 serum samples that were classified into four groups: 56 HCV/HIV co-infected samples, 60 HCV-infected, 60 HIV-infected and 60 from blood donors. All positive samples were subjected to direct viral genome sequencing for genotyping and molecular characterization. The overall prevalence of HPgV-1 was 15.7% (37/236). Among the HCV/HIV co-infected group, the prevalence of HPgV-1 was 14.3% (8/56), in the HCV co-infected one was 8.3% (5/60), in the HIV co-infected was 28.3% (17/60) and in blood donors 11.6% (7/60). From all positive samples, 35 were successfully sequenced. Phylogenetic analysis revealed the presence of HPgV-1 genotypes 2a (22.8%), 2b (57.1%), 3 (8.5%) and 1 (8.5%). Moreover, our results demonstrate that the highest frequencies of HPgV-1 were found in HIV and HCV/HIV co-infected individuals. The circulating HPgV-1 genotypes characterized here have already been reported in Brazil, however, this is the first study on HPgV-1 infection in patients with HCV and HCV/HIV in the city of Rio de Janeiro and aims to contribute with more information on epidemiological and clinical aspects of HPgV-1 in the natural course of the HCV and/or HIV infections.

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Histórico.....	1
1.2. Características Gerais do HPgV-1 .....	2
1.2.1. Classificação.....	2
1.2.2. Morfologia e organização genômica .....	3
1.2.3 Diversidade genética dos HPgV-1 .....	4
1.3. Ciclo Replicativo .....	6
1.4. Epidemiologia .....	7
1.5. História Natural da infecção por HPgV-1.....	9
1.5.1. Interação com HIV .....	10
1.5.2. Papel na coinfeção HIV/HCV .....	11
1.6 Fatores de risco associados ao HPgV-1 .....	12
1.7. Diagnóstico laboratorial do HPgV.....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1 Aspectos éticos .....	16
4.2 Delineamento do estudo.....	16
4.3 Amostragem .....	16
4.4 Variáveis analisadas no estudo.....	17
4.5 Extração e Detecção do RNA de HPgV-1 por nested RT-PCR .....	17

4.6	Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento do HPgV-1 .....	18
4.7	Edição das sequências obtidas e genotipagem do HPgV-1.....	18
4.8	Análises estatísticas .....	21
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
5.1	Perfil sociodemográfico e clínico de indivíduos HCV e HCV/HIV atendidos no HUGG Rio de Janeiro (N=116). .....	21
5.2	Prevalência HPgV-1 na população estudada.....	25
5.2.2	HPgV-1 em indivíduos HIV monoinfectados.....	25
5.3	Análise das variáveis sociodemográficas, comportamentais e clínicas dos pacientes HCV monoinfectados e HCV/HIV coinfectados e a associação com a presença do HPgV-1 (n=116). .....	26
5.4.	Genotipagem do HPgV-1 .....	30
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## ANEXOS

<b>Anexo I</b> Parecer do Comitê de Ética .....	48
<b>Anexo II</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	54
<b>Anexo III</b> Artigo publicado: Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Organização genômica dos HPgV-1 .....	3
<b>Figura 1.2</b> Micrografia eletrônica de HPgV-1.....	4
<b>Figura 1.3:</b> Distribuição global genotípica do HPgV-1 .....	5
<b>Figura 5.1:</b> Prevalência do RNA de HPgV-1 estratificada pelos grupos estudados .....	25
<b>Figura 5.2:</b> Árvore filogenética das 35 amostras sequenciadas .....	34

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 4.1:</b> Distribuição das amostras entre grupos de pacientes investigados para a presença de HPgV-1 no Rio de Janeiro. ....	17
---	----

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> Sequências dos diferentes genótipos do HPgV-1 disponíveis no GenBank e utilizadas neste estudo. ....	19
<b>Tabela 5.1:</b> Características sociodemográficas e fatores de risco para infecções entre os indivíduos com hepatite C crônica monoinfectados ou coinfectados com HIV atendidos no Rio de Janeiro, 2017-2018 .....	22

<b>Tabela 5.2:</b> Características clínicas dos indivíduos com hepatite C crônica mono infectados e HCV/HIC co infectados atendidos no Rio de Janeiro, 2017-2018 (N=116) .....	24
<b>Tabela 5.3:</b> Dados dos indivíduos mono infectados pelo HIV, de acordo com o <i>status</i> da infecção pelo HPgV-1 .....	26
<b>Tabela 5.4:</b> Análise dos fatores sociodemográficos e comportamentais dos pacientes HCV mono infectados e HCV/HIV co infectados relacionados a presença do HPgV-1, N=116 .....	27
<b>Tabela 5.5:</b> Análise dos fatores clínicos dos pacientes HCV e HCV/HIV relacionados a presença do HPgV-1, N=116 .....	29
<b>Tabela 5.6:</b> Amostras positivas para HPgV-1 sequenciadas e seus respectivos genótipos .....	30
<b>Tabela 5.7:</b> Distribuição dos genótipos de HPgV-1 por grupo de indivíduos analisados.	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ALT - Alanina aminotransferase
- AST - Aspartato aminotransferase
- CXCR4 - Receptor de quimiocina tipo 4
- CCR5 - Receptor de quimiocina tipo 5
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- GBV-A - GB vírus A
- GBV-B - GB vírus B
- GBV-C - GB vírus C
- HCV - Vírus da hepatite C
- HGV - Vírus da hepatite G
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- HPgV-1 - Pegivirus humano tipo 1
- ICTV- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
- IRES – Sítio interno de entrada do ribossomo, do inglês: *internal ribosome entry site*
- Kb - Kilobase
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade
- LNH – Linfoma não - Hodgkin
- mRNA – RNA mensageiro

- miR - microRNA
- Células NK – Células exterminadoras naturais, do inglês: *natural killer cells*
- nm - Nanômetro
- nM- nanomolar
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- ORF – Fase aberta de leitura, do inglês: *open reading frame*
- PBMC - Células mononucleares de sangue periférico
- PCR- Reação em cadeia da polimerase, do inglês: *polimerase chain reaction*
- RNA- Ácido ribonucléico
- TCD4 - Linfócitos T CD4<sup>+</sup>
- TCD8 - Linfócitos T CD8<sup>+</sup>
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UNIRIO - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
- UI - Unidade internacional
- UTR - Região não traduzida, do inglês: *untranslated region*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Histórico

A história da descoberta dos pegivírus humanos data da década de 1960, no contexto da identificação e isolamento de agentes etiológicos das hepatites não-A/não-B. Em 1967, Deinhardt e colaboradores documentaram a transmissão de hepatite de humanos à primatas não humanos, quando o soro de um indivíduo com hepatite aguda foi inoculado em saguis de boca branca (*Saguinus labiatus*), que desenvolveram hepatite. A presença de um agente infeccioso foi então confirmada pela transmissão bem sucedida a outros saguis suscetíveis, que também desenvolveram a doença (2, 3).

Baseando-se nas iniciais do nome do indivíduo doador do soro (G.B.), esse agente foi denominado GB. Inicialmente, acreditava-se que o agente GB era responsável por casos de hepatites não-A/não-B, porém a caracterização desse agente revelou que não havia relação deste, com os casos de hepatite de origem desconhecida. Análises posteriores nos soros dos saguis inoculados levaram à descrição de duas espécies do agente GB: GB vírus A (GBV-A) e GB vírus B (GBV-B), que eram relacionados geneticamente ao vírus da hepatite C (HCV), porém apenas encontrados em primatas não-humanos (4) .

O GB virus C (atualmente Pegivírus humano) foi descrito em 1995, quando Simons e colaboradores amplificaram sequências genômicas à partir do soro de um indivíduo de origem africana com hepatite não A-E e as relacionou com os GBV-A e GBV-B em humanos. A denominação GB vírus C (GBV-C) foi escolhida com base nas similaridades nucleotídicas com os GBV-A e GBV-B previamente descritos (5). Quase simultaneamente, outro grupo de pesquisa identificou novas sequências de RNA viral em amostras de soro de indivíduos com hepatites aguda e crônica, não A-E, denominando-o vírus da hepatite G (HGV) (6). Estudos moleculares revelaram que os GBV-C e HGV eram variantes de um mesmo vírus, com 96% de homologia entre os genomas, e que GBV-A e GBV-B eram vírus diferentes (7).

Com base na estrutura do genoma e nas relações entre sequências nucleotídicas, todos os vírus GB foram classificados como membros da família *Flaviviridae* e, as análises de regiões conservadas como os domínios helicase e polimerase revelaram uma relação bastante próxima entre HCV e GBV-B, enquanto GBV-A e GBV-C/HGV formavam clusters separados (7).



Diversos estudos epidemiológicos foram conduzidos, porém como os GBV-C/HGV não foram associados ao quadro clínico de hepatite., o nome vírus da hepatite G (HGV) caiu em desuso (8). Até que em 2011, uma proposta de classificação dos vírus GB, aceita pelo ICTV, foi responsável por definir a nomenclatura desses vírus baseando-se no fato de não existir evidência de que o indivíduo GB de fato estivesse infectado pelos GBV-A, GBV-B, GBV-C/HGV ou pelo posteriormente descrito GBV-D; de, aparentemente, a infecção por GBV-A e B ser restrita aos primatas do novo mundo e GBV-D, restrito a morcegos e do GBV-C/HGV não causar hepatite em humanos (7). Assim, criou-se um novo gênero dentro da família *Flaviviridae*, denominado *Pegivirus*. O nome faz referência à capacidade de causar infecção persistente (*Pe*) e reconhece a relação histórica entre os vírus GB e HGV (*g*). Todos os membros do gênero foram renomeados de acordo com seus hospedeiros. Assim, o GBV-C passou a ser denominado pegivirus humano (HPgV, do inglês *Human Pegivirus*) (7).

## **1.2. Características Gerais do HPgV-1**

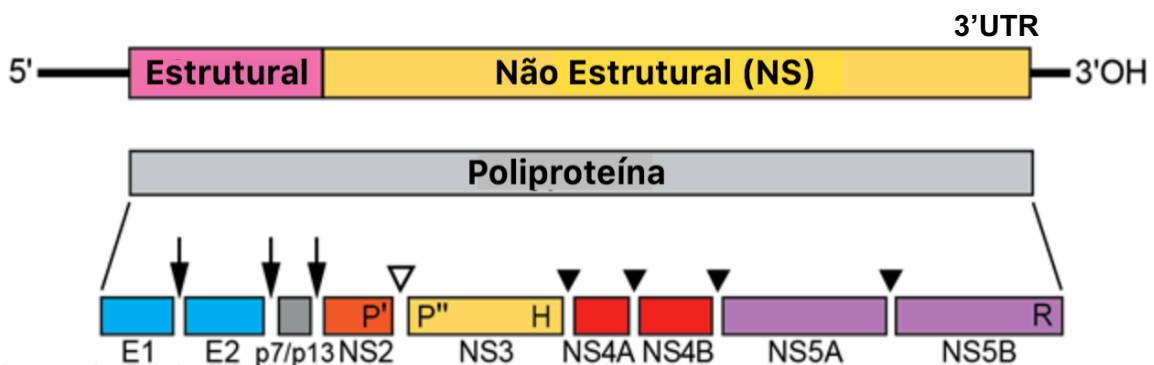
### **1.2.1. Classificação**

Originalmente, o gênero *Pegivirus* englobava duas espécies: *Pegivirus A*, que incluía os GBV-A e GBV-C/HGV e *Pegivirus B*, onde estavam classificados os vírus oriundos de morcegos. No entanto, o grande desenvolvimento de técnicas de sequenciamento nos últimos anos, possibilitou uma melhor caracterização molecular e descoberta de novos vírus. A descrição de diversos vírus que compartilham algumas características com *Pegivirus A* e *B*, porém divergem em outros aspectos como sequencia genômica, estrutura e gama de hospedeiros, levou a uma revisão e atualização da taxonomia do gênero, em 2016 (7, 9).

Atualmente, o gênero *Pegivirus* abrange 11 espécies (*Pegivirus A –J*) de vírus com uma grande diversidade de hospedeiros. Em humanos, recentemente foi descrito um segundo tipo de vírus, denominado HPgV-2 ou hepegivirus humano (HHPgV) (8, 10). HPgV-1 e HPgV-2 são membros das espécies *Pegivirus C* e *Pegivirus H*, respectivamente (9).

## 1.2.2. Morfologia e organização genômica

As partículas de HPgV são envelopadas e esféricas, com aproximadamente 50nm de diâmetro. O genoma, assim como nos outros membros da família *Flaviviridae*, é composto por uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, com cerca de 9,4Kb de tamanho. O RNA contém uma sequência aberta de leitura (ORF), flanqueada por regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3', que codifica uma única poliproteína, com 2900 aminoácidos, que é clivada durante e após o processo de tradução em proteínas virais estruturais e não estruturais. A região codificante para as proteínas estruturais é encontrada no N-terminal, no primeiro terço do genoma, que é processada por sinal-peptidases celulares, enquanto as proteínas não-estruturais estão localizadas na porção C-terminal da ORF e são processadas por duas proteases virais (7, 11) (Figura 1.1).

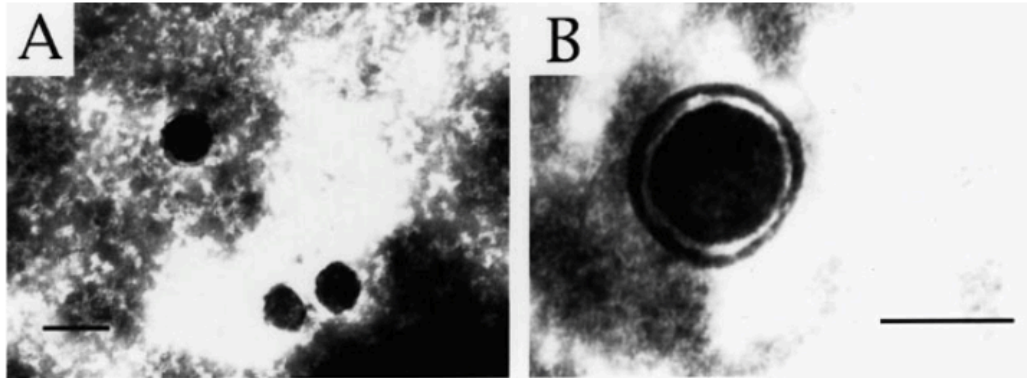


**Figura 1.1: Organização genômica dos HPgV-1.** Representação esquemática do RNA de pegivírus humanos. O genoma viral consiste em uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, com regiões não codantes (NCR) nas extremidades 5' e 3'. A poliproteína codificada é clivada co- e pós-tradução, dando origem às proteínas virais. As proteínas estruturais são clivadas por sinal-peptidases celulares (setas pretas) e a clivagem NS2-NS3 é realizada por uma autoprotease (ponta de seta vazia). As demais proteínas não estruturais são clivadas pelo complexo NS3-NS4A (pontas de seta sólidas). Disponível em: [www.talk.ictvonline.org](http://www.talk.ictvonline.org)

A região 5'UTR, de aproximadamente 555 pares de base (pb), contém um sítio interno de entrada no ribossomo (IRES) que direciona a tradução da poliproteína diretamente a partir do RNA genômico. A tradução e liberação da RNA polimerase-RNA dependente do vírus inicia a replicação do RNA. A região 3'UTR tem aproximadamente 300 pb e, diferente do HCV, não apresenta sequência polipirimidina nem a sequência conservada de 98nt, denominada cauda X (12).

As proteínas estruturais incluem duas glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e, embora a região codificante para a proteína do core não tenha sido desvendada, acredita-

se que esteja localizada a montante do gene da glicoproteína E1 (7, 13). A caracterização biofísica e microscopia eletrônica de partículas de HPgV-1 no plasma de indivíduos infectados demonstraram que o vírus possui uma estrutura de nucleocapsídeo, portanto, codificaria uma proteína de core (12) (Figura 1.2).



**Figura 1.2: Micrografia eletrônica de HPgV-1.** Partículas virais purificadas por centrifugação em gradiente de sacarose a partir do plasma de um indivíduo infectado pelo HPgV-1. A – Três partículas ampliadas 50.000X; B – Partícula HPgV-1 ampliação > 50.000X. Escala 50nm. Adaptada de Xiang J *et al*, 1999.

### 1.2.3 Diversidade genética dos HPgV-1

Estudos filogenéticos baseados na análise do genoma completo ou parcial (regiões 5'UTR e/ou E2) identificaram, até o momento, sete genótipos de HPgV-1 de origem e distribuição geográfica distintas (1, 13, 14).

A distribuição geográfica dos genótipos de HPgV-1 descritos ocorre de forma característica. O genótipo 1 é predominante na África oriental, o genótipo 2 nas Américas e Europa, o genótipo 3 na Ásia ocidental, o genótipo 4 no Sudeste da Ásia, particularmente em Myanmar e Vietnam, o genótipo 5 África do Sul e o genótipo 6 na Indonésia. Mais recentemente, três novos genomas completos foram obtidos em um estudo na China e propostos como um sétimo genótipo de HPgV-1 (15) (Figura 1.3).



**Figura 1.3: Distribuição global genotípica do HPgV-1.** Onde o genótipo 1: Américas e África oriental, 2: Américas e Europa, 3 e 4: Ásia, 5: África do Sul, 6: Indonésia e 7: China. (Adaptado de (1))

Na maioria dos estudos, a identificação de novos genótipos foi realizada com base em análises da região 5'UTR. Esta região tornou-se um alvo interessante visto que é conservada e eficientemente amplificada por RT-PCR (16). Análises sistemáticas de sequências completas revelaram que relações filogenéticas congruentes são obtidas mesmo com a análise de fragmentos menores do genoma, e que a análise da 5'UTR seria suficiente para tal (17).

A similaridade na organização genômica entre os HPgV-1 e HCV foi o que norteou as expectativas de que a variação desses vírus tão relacionados também fosse similar. No entanto, em comparação com o HCV, a diversidade genética de HPgV-1 é bem menor. A diferença nucleotídica entre genótipos varia de 11 a 14% para HPgV-1, enquanto diferentes genótipos de HCV podem diferir em mais de 30% (15, 17).

### 1.3. Ciclo Replicativo

Os HPgV-1 são os vírus que infectam humanos mais relacionados ao HCV. Por causa da similaridade de organização genômica e homologia de aminoácidos entre os dois vírus, muitas características dos HPgV-1 são inferidas a partir do conhecimento sobre o HCV (18).

Inicialmente, acreditava-se que os HPgV-1 eram hepatotrópicos, em função da já mencionada identificação em indivíduos com hepatite de origem desconhecida. Embora o RNA viral já tenha sido detectado no fígado, os estudos epidemiológicos não conseguiram evidenciar a replicação dos HPgV-1 nos hepatócitos de forma conclusiva (19, 20). Em estudos conduzidos em pacientes de transplante hepático, não se observou queda nos níveis séricos de RNA de HPgV-1, diferente do que acontece com os níveis de HCV. Ainda, a fita negativa do RNA viral, um indicativo de replicação ativa, não foi detectada em amostras de biópsia hepática, mas sim em medula óssea e baço (20, 21). Estudos *in vitro* e *ex vivo* já demonstraram que o HPgV-1 também se replicam em PBMCs (Células mononucleares do sangue periférico), inclusive linfócitos B e T, sugerindo que sejam vírus linfotrópicos (22, 23). A detecção de RNA viral em múltiplas linhagens de leucócitos de sangue periférico, levanta a hipótese de que o precursor de células-tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês Haematopoietic stem cell) seja o sítio de replicação primária dos HPgV-1, e que o vírus persiste e pode ser produzido por estas células durante e após a maturação em linfócitos B e T, células *natural killer* e monócitos (20).

A falta de um modelo animal ou sistema eficiente para replicação *in vitro*, prejudica a elucidação do processo replicativo dos HPgV-1. Acredita-se que, assim como para o HCV, possivelmente diversos receptores estejam envolvidos nas etapas iniciais de adsorção e entrada na célula hospedeira. Embora pouco se saiba sobre este processo, estudos sugerem que receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr, do inglês *low-density lipoprotein*) esteja envolvido na entrada do HPgV-1. De fato, no plasma de indivíduos infectados, o RNA dos HPgV-1 é associado a lipídios e microvesículas com propriedades de exossomos (20, 24). Uma alternativa de via de entrada para os HPgV-1 seria através de exossomas contendo o RNA viral. Essas microvesículas de origem endocítica são empregadas por células e vírus para transmissão de RNAs e proteínas a outras células. Uma questão intrigante sobre os pegivírus é que até o momento, nenhuma sequência codificadora para proteína de capsídeo foi determinada para alguns membros do gênero. Então, essa via poderia estar envolvida na liberação de vírus e/ou infecção celular (19, 20).

Após a entrada, ocorre a acidificação da vesícula endossomal levando às alterações conformacionais no virion, com subsequente fusão entre membranas virais e do endossoma. Na replicação do HCV, após liberação do RNA viral no citoplasma, o genoma viral é traduzido próximo ao retículo endoplasmático (RE) dando origem à poliproteína que é clivada por proteases virais e celulares em proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas virais atuam em conjunto com fatores celulares para formar uma organela replicativa, composta por vesículas de membrana dupla. Essas vesículas podem permanecer ligadas ao RE ou não. O RNA replicado é recrutado para a montagem de novas partículas, que ocorre em associação com corpúsculos lipídicos em sítios ricos em proteína do core, glicoproteínas E1 e E2, p7 (p 5.6 nos HPgV-1) e NS2. Os capsídeos adquirem as proteínas de envelope e brotam para o lúmen do RE. Proteínas associadas a lipoproteínas de densidade muito baixa, como apolipoproteínas B e E participam do processo de maturação de partículas infecciosas de HCV e, talvez, de HPgV-1 (25).

#### **1.4. Epidemiologia**

A infecção por HPgV-1 está distribuída mundialmente, porém a frequência varia bastante entre países e populações avaliados. Estima-se que 750 milhões de pessoas no mundo estejam ativamente infectados e que de 1,5 a 2 bilhões já tenham entrado em contato com o vírus (26). Em países desenvolvidos, 1 a 5% dos doadores de sangue estão virêmicos no momento da doação e, de 5 a 13% apresentam anticorpos anti-E2, indicando infecção passada. Em países em desenvolvimento, a frequência da viremia entre indivíduos saudáveis pode chegar a 20% (27).

Devido às vias de transmissão compartilhadas (parenteral e/ou sexual), a viremia de HPgV-1 é ainda maior em indivíduos infectados pelo HIV, HCV ou que estejam sob risco para tais infecções como, por exemplo, usuários de drogas injetáveis, pacientes submetidos a procedimentos como hemodiálise, transfusão de sangue e transplante de órgãos (15, 28). Em um estudo conduzido nos Estados Unidos com homens que fazem sexo com homens, infectados pelo HIV, o RNA do HPgV-1 foi detectado em 39,6% e anticorpos anti-E2, em 46% dos indivíduos (29). Entre portadores crônicos do HCV, a prevalência da viremia de HPgV-1 é de aproximadamente 20% (3, 30).

Recentemente, um estudo de meta análise realizado em todos os continentes, com aproximadamente 35 mil doadores de sangue voluntários, revelou uma prevalência global do RNA de HPgV-1 em 3,1%, porém com grande heterogeneidade de resultados. Os dados de cada continente foram compilados e as prevalências encontradas foram de 1,7% na América do Norte, 9,1% na América do Sul, 2,3% na Europa e 2,4% na Ásia. Para África e Austrália, apenas dois estudos estavam disponíveis para análise quantitativa, por isso os dados não foram compilados. As prevalências de HPgV-1 encontradas e dois estudos para África do Sul e Austrália foram de 8,8% e 18,9% e 4% e 3,3%, respectivamente. A prevalência global de anti-E2 em 9 mil indivíduos foi de 9% (31).

Entre os fatores de risco para a infecção por HPgV-1 estão as baixas condições sócio-econômicas. Estudos mostram que a prevalência de viremia entre doadores de sangue é maior em países em desenvolvimento. Além de fatores econômicos, exposição sexual e parenteral exercem papéis importantes na disseminação do vírus. Indivíduos mais jovens estão sob maior risco, provavelmente pela prática de sexo desprotegido, independente do gênero (27, 31, 32).

A transmissão parenteral dos HPgV-1 associada ao fato de que esse agente não é pesquisado rotineiramente em bancos de sangue, torna os indivíduos que necessitam de múltiplas transfusões de sangue altamente vulneráveis. Estudos comparativos entre pacientes transfusionados e doadores de sangue demonstram prevalências de viremia muito maiores no primeiro grupo. Pacientes com talassemia e anemia falciforme apresentaram taxa de 10,7%, enquanto apenas 4,2% dos doadores eram virêmicos na França (33). Discrepância ainda maior foi encontrada nos Estados Unidos, entre pacientes com anemia e hemofilia, onde a prevalência de HPgV-1 foi 18% e 18,4%, respectivamente, e doadores de sangue, com 1,69% (6, 34). No Brasil, em Ribeirão Preto, São Paulo, a infecção por HPgV-1 foi detectada em 14,3% dos pacientes com talassemia (35).

A distribuição mundial dos sete genótipos de HPgV-1 descritos até o momento ocorre de forma característica. Na América do Sul, os genótipos 1, 2a, 2b e 3 já foram relatados (36) e alguns estudos brasileiros ajudam a entender a epidemiologia da infecção por HPgV-1 no país (14). No entanto, em sua maioria, se restringem a grupos de pacientes HIV positivos, onde a prevalência da infecção é estimada entre 21 e 30% (17).

No Brasil, os estudos que analisaram amostras de doadores de sangue demonstram que a viremia de HPgV-1 nesta população varia entre 5-10%. Em Salvador e no Rio de Janeiro, foi relatada uma frequência de 10% de HPgV-1 entre doadores de sangue (37, 38). Em São Paulo, as prevalências de 9,7% e 8,3% entre doadores de sangue e indivíduos saudáveis já foram descritas (39, 40). Recentemente, na região Sul do país, a prevalência encontrada entre doadores de sangue foi 5,9%, com circulação predominante do genótipo 2 (14).

### **1.5. História Natural da infecção por HPgV-1**

Os HPgV-1 são linfotrópicos e, assim como o HCV, são transmitidos através da exposição parenteral, sexual e por transmissão vertical e, embora a infecção seja debelada em até 2 anos por indivíduos imunocompetentes, em aproximadamente 25% dos casos, torna-se persistente (7). Em um estudo francês realizado em pacientes com desordens hematológicas e multitransfusionados, a viremia persistiu, em média, 4,7 anos e os anticorpos E2 foram detectados em 31,2% dos indivíduos, após o *clearance* viral (34).

Diferente do observado durante a infecção pelo HCV, anticorpos contra proteínas dos HPgV-1 não são encontrados durante a viremia e é incomum que o RNA viral e anti-HPgV-1 coexistam no indivíduo (7). O *clearance* da viremia é geralmente associado à resolução da infecção e ao desenvolvimento de anticorpos anti glicoproteína E2 do envelope viral. A resposta humoral parece restrita à E2, sugerindo que esse seja o sítio imunodominante em humanos. Tais anticorpos provêm proteção parcial contra re-infecções, sugerindo uma atividade neutralizante, fundamental para o controle da infecção (41, 42). Os anticorpos anti-E2 funcionam como marcadores de infecção passada, embora os títulos decaiam a níveis indetectáveis ao longo do tempo, indicando que as estimativas de infecção passada podem estar subestimadas (7, 41).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados desde a descrição dos HPgV-1, na tentativa de associá-los à alguma doença em humanos, nenhuma relação causal entre a infecção e qualquer patologia foi estabelecida, sugerido uma relação simbiótica ou comensal com seu hospedeiro (20). Apesar de ser considerada uma infecção não patogênica, muitos estudos demonstraram um efeito positivo da infecção por HPgV-1 em indivíduos infectados pelo HIV (43-45).



Comparações entre a progressão da infecção pelo HIV em pacientes mono-infectados (HIV) e coinfectedados (HIV/HPgV-1) demonstram maiores contagens de células T CD4<sup>+</sup>, melhora na qualidade de vida, melhor resposta ao tratamento, menor carga viral do HIV, uma progressão mais lenta para AIDS e, conseqüentemente, uma expectativa de vida prolongada nos indivíduos do segundo grupo. Essa associação positiva, no entanto, não é relatada em todos os estudos (46, 47).

### **1.5.1. Interação com HIV**

Embora um efeito protetor da infecção pelo HPgV-1 para indivíduos HIV positivos tenha sido observado por diversos autores (43-45), os mecanismos pelos quais o HPgV-1 modula a infecção pelo HIV e a progressão para AIDS, ainda não estão esclarecidos. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que possa haver uma interferência direta dos HPgV-1 na replicação de HIV ou mesmo em fatores celulares essenciais ao ciclo infeccioso do HIV (20).

Algumas observações clínicas da influência de HPgV-1 sobre o HIV foram comprovadas *in vitro*. Em PBMCs, a viremia de HPgV-1 está associada com diminuição da expressão do co-receptor CCR5 e indução da expressão de ligantes de CCR5 e CXCR4 (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , SDF-1), inibindo a ligação do HIV com os seus co-receptores de entrada (CCR5 e CXCR4) na célula alvo (3, 45).

Além de alterar a expressão de co-receptores de entrada, algumas proteínas do HPgV-1 podem atuar inibindo a replicação do HIV. A glicoproteína de envelope E2 inibe diretamente a ligação e fusão HIV-célula. A fosfoproteína NS5A reduz a expressão de CXCR4 e induz a liberação de seu ligant, SDF-1 em células TCD4<sup>+</sup> (*in vitro*). Mesmo após o *clearance* viral pode haver a interferência do HPgV-1, visto que os anticorpos anti-E2 são capazes de imunoprecipitar partículas de HIV-1, sugerindo que algum motivo estrutural esteja envolvido em uma reação cruzada com algum antígeno (celular ou viral) presente nas partículas de HIV-1 (43, 48).

Apesar de ainda desconhecidos os mecanismos, acredita-se que HPgV-1 estimule a resposta imune inata, uma vez que em indivíduos virêmicos, a frequência de ativação de células dendríticas plasmocitóides e os níveis de IFN- $\gamma$  e mRNA para proteína kinase R

(PKR), são elevados em comparação a indivíduos não-virêmicos. Ainda, essa elevação parece estar correlacionada com a carga viral de HPgV-1 (3, 49).

Durante a progressão da infecção pelo HIV, a resposta imune mediada por células Th1 é prejudicada, contribuindo não só para patogênese do HIV como também para infecções oportunistas. Em indivíduos infectados pelo HPgV-1, os níveis das citocinas IL-2 e IL-12 que estimulam a resposta Th, se mantêm estáveis, porém estão diminuídos em indivíduos mono infectados pelo HIV. Já as citocinas envolvidas na resposta via Th2 (IL-4 e IL-10) são encontradas em níveis aumentados apenas em indivíduos HIV-mono infectados, não nos co infectados HIV/HPgV-1. Essas observações, corroboradas por estudos *in vitro* em PBMCs, sugerem que na infecção por HPgV-1 acontece uma polarização para o aumento de citocinas do perfil de resposta Th1, que pode ser favorável aos indivíduos HIV-positivos (50, 51).

### **1.5.2. Papel na coinfeção HIV/HCV**

A estreita relação com HCV e a influência no curso da infecção pelo HIV levaram à especulação sobre o papel dos HPgV-1 na coinfeção HIV/HCV. Após a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), a doença hepática relacionada ao HCV tornou-se uma causa importante de morbidade/mortalidade em indivíduos HIV-positivos em tratamento (52). Apesar de pouca informação sobre os fatores virais ou do hospedeiro que podem influenciar a progressão da doença hepática em co infectados HIV/HCV, já foi demonstrado que a viremia do HPgV-1 está associada a um tempo prolongado sem cirrose. Num estudo australiano, durante a viremia do HPgV-1, os níveis de cirrose, fibrose e encefalopatia hepática foram reduzidos (52, 53).

Além dos níveis de cirrose serem reduzidos devido a presença de HPgV-1, não foi observado um aumento na lesão hepática causada pelo HCV no paciente co infectado (54). Corroborado pelos resultados dos níveis das transaminases hepáticas, ALT e AST, e até carga viral do HCV (55, 56). Em pacientes triplamente infectados, não se observa uma alteração significativa na contagem de células TCD4 e acredita-se que isto seja devido ao número limitado de pacientes investigados ou por estes pacientes estarem em tratamento antes da detecção do HPgV-1 (46, 57). A presença do HPgV-1 evita a ativação das células TCD4, diferentemente do HIV, que necessita desta ativação para poder replicar-se de

maneira efetiva. Além disso, os diferentes genótipos de HPgV-1 influenciam diretamente na replicação do HIV, por questão de afinidade de receptor (27).

### **1.6 Fatores de risco associados ao HPgV-1**

O HPgV-1 é um vírus de caráter assintomático, ou seja, não desenvolve doença. Mas, os fatores de risco relacionados a sua transmissão já são bem descritos na literatura principalmente pelo fato de sua presença estar relacionada a outros vírus como o HCV e HIV (18). Então as principais vias relacionadas ao HPgV-1 são a parenteral e/ou sexual (7).

O uso de drogas injetáveis, compartilhamento de objetos perfuro-cortantes e a prática de sexo sem preservativo estão entre os principais fatores de risco da infecção pelo HPgV-1. Indivíduos submetidos a procedimentos médicos invasivos como hemodiálise, transfusão de sangue e transplante de órgãos também estão em risco aumentado para adquirir a infecção.

### **1.7. Diagnóstico laboratorial do HPgV**

A presença do RNA viral no soro ou plasma indica infecção ativa e é avaliada por métodos moleculares, principalmente RT-PCR. Inicialmente, a detecção era realizada com *primers* específicos para as regiões das proteínas não-estruturais NS3 e NS5A. Após comparações entre as diferentes regiões que poderiam ser usadas como alvo de amplificação, ficou demonstrado que tanto a região 5'-UTR como a glicoproteína E2 apresentam sensibilidade equivalente, podendo ser usadas para detecção dos HPgV-1, com a vantagem de que ambas reproduzem as relações filogenéticas encontradas na análise do genoma viral completo (17, 58).

Já a infecção passada, definida pela presença de anticorpos anti-E2, pode ser diagnosticada através de ensaios de ELISA, utilizando uma proteína E2 recombinante como antígeno. Apesar do papel da viremia de HPgV-1 ser bastante estudado em indivíduos HIV positivos (59), o papel dos anticorpos anti-E2 ainda é desconhecido. Já foi sugerido que tais anticorpos estariam envolvidos na diminuição da transmissão do HIV e melhora do curso da doença devido à sua capacidade de precipitar tais partículas e devido às reações cruzadas com antígenos na superfícies dos vírus (43, 60). Esses achados ratificam a importância da avaliação da presença de anticorpos anti-E2 em pacientes HIV-positivos. Ainda, fazendo um paralelo com a resposta humoral a outras infecções, onde não apenas

os anticorpos neutralizantes são produzidos, especula-se que na infecção por HPgV-1, outros anticorpos são produzidos e, caso sejam, poderiam também ser utilizados como ferramentas para detecção de exposição ao HPgV-1 para facilitar análises futuras dos efeitos desses anticorpos na progressão da doença causada pelo HIV (60).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da infecção por HPgV-1 não estar associada a nenhuma doença em humanos, dados da literatura apontam para um efeito positivo em indivíduos HIV-positivos. Comparações entre a progressão da infecção pelo HIV em pacientes mono-infectados (HIV) e coinfectedados (HIV/HPgV-1) demonstram maiores contagens de células T CD4, menor carga viral do HIV, uma progressão mais lenta para AIDS e, conseqüentemente, expectativa de vida prolongada nos indivíduos do segundo grupo (46, 61). Essa associação positiva, no entanto, não é relatada em todos os estudos. Portanto, a viremia de HPgV-1, no contexto da coinfecção HIV/HPgV-1, é de particular interesse.

Assim como em coinfecções com o HIV, o HPgV-1 também parece impactar o curso de uma infecção pelo HCV em pacientes triplamente infectados (HIV/HCV/HPgV). Com a maior sobrevivência que a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) confere aos indivíduos HIV-positivos, as complicações da infecção crônica pelo HCV emergem como importante causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes. Uma redução na gravidade da doença hepática relacionada ao HCV já foi descrita, porém apenas nos casos de coinfecção HIV/HCV, e não no contexto da monoinfecção pelo HCV (62).

Dados sobre a tripla infecção (HIV/HCV/HPgV) no Brasil são raros. Em pacientes atendidos em um hospital de São Paulo, o RNA viral foi detectado em 15% das amostras investigadas (63). A biópsia hepática realizada neste estudo demonstrou um menor grau de lesões histológicas em indivíduos com RNA do HPgV-1 detectável em relação aos pacientes negativos para HPgV-1. Apesar de dados da literatura indicarem que não há efeito da infecção por HPgV-1 em pacientes HCV monoinfectados, o cenário em coinfectedados HIV/HCV sugere uma redução no grau de cirrose nos pacientes HPgV positivos (52, 63).

O papel da infecção por HPgV-1 em diferentes populações no Brasil são escassos, concentrados na cidade de São Paulo e quase exclusivamente restritos a indivíduos HIV-positivos (61, 64, 65). Apesar de estudos que investiguem pacientes HCV monoinfectados e doadores de sangue, estes são muito antigos (37, 39, 66). Até o momento, não existem estudos brasileiros sobre o acompanhamento de pacientes HIV/HCV coinfectedados. Neste contexto de falta de informações epidemiológicas, moleculares e sobre aspectos da interação vírus/hospedeiro dos HPgV-1 em diferentes cidades do Brasil e em diferentes populações, este estudo se torna relevante para fornecer novos dados e ampliar o conhecimento sobre o impacto do HPgV-1 no país e nos casos de coinfecção HIV e HCV.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estimar a prevalência e avaliar os genótipos circulantes de pegivírus humano tipo 1 (HPgV-1) em indivíduos coinfectados pelos vírus da hepatite C (HCV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) e doadores de sangue, na cidade do Rio de Janeiro.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Descrever o perfil sociodemográfico, clínico e prevalência de HPgV-1 em indivíduos HCV e/ou HIV atendidos no do Rio de Janeiro;
- b) Avaliar a associação entre variáveis sociodemográficas, comportamentais e clínicas dos indivíduos HCV monoinfectados e HCV/HIV coinfectados com a infecção pelo HPgV-1;
- c) Identificar os genótipos de HPgV-1 circulantes nos diferentes grupos de indivíduos estudados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz, sob número 2.927.747 (Anexo I) Os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), declarando o interesse em participar do estudo (Anexo II). Foi enfatizado o caráter sigiloso e confidencial das informações, esclarecendo-se que somente a equipe de pesquisadores teria acesso às informações e que os dados coletados seriam utilizados exclusivamente para fins de pesquisa.

### 4.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo observacional descritivo e com pesquisa de dados primários submetidos às técnicas laboratoriais. As amostras de pacientes HCV mono infectados e HCV/HIV co infectados foram obtidas, por conveniência, através da colaboração com o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da UNIRIO (ambulatório de gastroenterologia) no período de Janeiro de 2017 à Janeiro de 2018. As amostras de pacientes HIV mono infectados (coletados em 2016) e de doadores de sangue (coletados em 2018) foram provenientes da soroteca do Laboratório de Virologia Molecular IOC/Fiocruz, onde foram processadas para a obtenção de soro, aliquotadas e estocadas a - 20°C. Todas as amostras coletadas são do estado do Rio de Janeiro.

**Crítérios de Inclusão:** Indivíduos maiores de 18 anos com diagnóstico de infecção pelo HCV e/ou HIV/HCV e/ou HIV e/ou doadores de sangue e que assinaram o TCLE.

**Crítérios de exclusão:** Gestantes, indivíduo incapaz ou portador de doenças mentais.

### 4.3 Amostragem

Um total de 236 amostras de soro coletadas foram selecionadas para o estudo. O cálculo do tamanho amostral foi realizado através da seguinte fórmula:

$$N = z^2 \times p(1-p)/e^2$$

Onde: z= valor da distribuição normal padrão correspondente ao nível de confiança desejado (Z= 1,96 para Intervalo de 95% de Confiança - IC 95%), p= prevalência esperada

(média de 12% da prevalência de HPgV na população em geral do Brasil), e= erro máximo aceitável na estimativa (semi-amplitude do IC - medida de precisão, utilizamos 0,05). O valor mínimo aceitável para validação do estudo foi de N= 163.

As amostras coletadas e investigadas foram divididas em 4 grupos conforme apresentado no Quadro 4.1.

**Quadro 4.1:** Distribuição das amostras entre grupos de pacientes investigados para a presença de HPgV-1 no Rio de Janeiro.

<b>Grupos</b>	<b>Número de amostras</b>
<b>Pacientes HIV+</b>	60
<b>Pacientes HCV+</b>	60
<b>Pacientes HIV/HCV+</b>	56
<b>Doadores de Sangue</b>	60
<b>Total</b>	236

#### **4.4 Variáveis analisadas no estudo**

Foram utilizadas variáveis preditivas sociodemográficas como estado civil, orientação sexual, sexo, drogas injetáveis, uso de álcool, cirurgia, hemodiálise, transfusão sanguínea, tatuagem, piercing e dados clínicos, como grau de fibrose, cirrose, hepatocarcinoma, ALT e AST, albumina, bilirrubina total, glicose, GGT, tratamento HCV, tratamento HIV, carga viral HCV e HIV, plaquetas, taxa de TCD4+, hemoglobina e esteatose. Estas variáveis foram obtidas apenas dos pacientes provenientes do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle para avaliação de suas associações com a prevalência de HPgV-1.

#### **4.5 Extração e Detecção do RNA de HPgV-1 por nested RT-PCR**

O RNA viral foi extraído a partir de 200µL de soro, com o *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada por RT-PCR utilizando-se o kit *SuperScript*



*III one-step RT-PCR system with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) com iniciadores específicos para amplificação parcial da região 5' UTR.. As posições dos nucleotídeos são numeradas de acordo com a sequência de referência U44402, conforme descrito por Jarvis e colaboradores, 1996 (67). Resumidamente, 5 µL do RNA extraído foram adicionados a 20 µL de uma mistura de reação 2X, 10 µM do iniciador de sentido externo 108 (5'-AGGTGGTGGATGGGTTAT-3'), 10 µM do iniciador antisense externo 531 (5'-TGCCACCCGCCCTCACCCGAA -3'), 1 µL de SuperScript III RT / Taq Mix e 5,5 µL de água destilada. A amplificação por RT-PCR em uma etapa consistiu em uma pré-incubação a 50 ° C por 20 min e 94 ° C por 2 min, seguida por 40 ciclos com os seguintes tempos e temperaturas de incubação: 94 ° C 30 s, 50 ° C 30 s e 68 ° C 30 s. Para a segunda rodada, 5 µL do produto da primeira rodada foram adicionados a 45 µL de uma mistura de reação contendo: 1x tampão, 0,2 µM de mistura dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µM de iniciador de sentido interno 134 (5'-TGGTAGGTCGTAAATCCCGGT-3'), 10 µM de iniciador anti-sense interno 476 (5'-GGAGCTGGGTGGCCCCATGCAT-3'), 1U Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Massachusetts, EUA) e água destilada estéril. A amplificação de um fragmento de 344 pb foi realizada sob as seguintes condições: 94°C/2 min, 40 ciclos a 94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s e uma extensão final a 72°C 5 min. Dez microlitros do produto de amplificação foram aplicados em em gel de agarose a 2%, submetidos a eletroforese a 100V por 1 h, corados com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizados sob luz UV.

#### **4.6 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento do HPgV-1**

Os produtos da amplificação do HPgV-1 foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemanha), para a remoção do excesso de nucleotídeos e oligonucleotídeos, de acordo com instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram submetidos a reação de sequenciamento utilizando o kit comercial *Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). A leitura automática das sequências foi realizada no sequenciador automático de 96 capilares ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) da Plataforma de Sequenciamento de DNA da FIOCRUZ.

#### **4.7 Edição das sequências obtidas e genotipagem do HPgV-1**

Os eletroferogramas das sequências resultantes do sequenciamento automático foram visualizados através da função Trace/Editor, editadas e analisadas manualmente

usando o software MEGA versão 7.0.18 (68). Os genótipos do HPgV-1 foram determinados por análise filogenética, utilizando-se sequências de referência disponíveis no GenBank (Tabela 4.1). A árvore filogenética das sequências de HPgV-1 foi construída pelo método *Neighbor-Joining*, no software Mega 7, com *bootstrap* de 500 replicatas, também incorporado ao software MEGA.

**Tabela 4.1:** Sequências dos diferentes genótipos do HPgV-1 disponíveis no GenBank e utilizadas neste estudo.

Número de acesso	Origem/País	Genótipo de HPgV-1
AF007956	-	2b
U59529	-	2b
LT009486	Reino Unido	2b
U63715	Africa	2b
JX494197	Venezuela	2b
GQ227324	Brasil	2b
GQ227331	Brasil	2b
JN127373	Estados Unidos	2b
HM208575	Brasil	2b
HM208582	Brasil	2b
GQ227348	Brasil	2a
AJ539458	Brasil	2a
MH053115	França	2a
GQ227317	Brasil	2a
HM208561	Brasil	2a
AF131118	Africa do Sul	2a
HM208586	Brasil	2a

LT009485	Reino Unido	2a
AF081782	-	2a
LT009487	Reino Unido	2a
MK291245	Estados Unidos	2a
JF832375	Colômbia	2a
AB018667	Vietnam	4
AB021287	Myanmar	4
AB003292	-	6
HQ331235	China	7
HQ331233	China	7
HQ331234	China	7
JF832381	Colômbia	3
U76893	-	3
AB008342	Japão	3
D87714	Japão	3
AF131116	Africa do Sul	1
Y16441	República Democrática do Congo	1
LT009482	Austrália	1
AJ539460	Brasil	1
JF832366	Colômbia	1
AF131115	Africa do Sul	1
AF131114	Africa do Sul	1
LT009490	Republica Democrática do Congo	5
LT009484	Reino Unido	5
KC618401	Uganda	5

## 4.8 Análises estatísticas

Análises de associação estatística entre dados sociodemográficos e clínicos e a infecção por HPgV-1 só puderam ser avaliadas entre os pacientes atendidos no HUGG (HCV e HCV/HIV). Informações sobre os indivíduos mono infectados pelo HIV foram insuficientes para avaliação da associação com HPgV-1 e as informações de doadores de sangue não estavam disponíveis. O processamento e análise dos dados foram realizados no programa estatístico *R studio* (RStudio, PBC) para avaliar a associação entre prevalência de HPgV-1 e fatores de risco associados a esta infecção. Os dados categóricos foram analisados com o teste Qui-quadrado. A análise univariada foi utilizada para verificar a associação entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes. Variáveis que atingiram nível de significância ( $p < 0,20$ ) foram incluídas em análise multivariada, mediante o modelo de regressão logística binomial verificando-se a atuação conjunta dos possíveis fatores de risco. Permaneceram no modelo multivariado as variáveis independentes que mantiveram associação com a infecção pelo HPgV-1 após ajuste ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Perfil sociodemográfico e clínico de indivíduos HCV e HCV/HIV atendidos no HUGG, Rio de Janeiro (N=116).

Observou-se que a média de idade entre os indivíduos HCV mono infectados foi de 63,4 anos ( $\pm 8,2$  anos) e entre os HCV/HIV co infectados foi 53,9 anos ( $\pm 7,8$  anos). A maioria dos pacientes HCV mono infectados era do sexo feminino (65%) e dos HIV/HCV co infectados, do sexo masculino (84%), Tabela 5.1.

Características sociodemográficas e alguns fatores de risco associados a infecção pelo HPgV-1 foram analisados. Os fatores de risco mais frequentes entre HCV mono infectados e HCV/HIV co infectados foram: histórico de cirurgia, reportados em 60% e 39,2%, respectivamente; transfusão sanguínea em 50% e 28,5% e uso de drogas injetáveis, entre 10% e 8,9%. Outros fatores, como tatuagem e piercing também foram relatados pelos participantes do estudo.

**Tabela 5.1:** Características sociodemográficas e fatores de risco para infecções entre os indivíduos com hepatite C crônica mono infectados ou co infectados com HIV atendidos no Rio de Janeiro, 2017-2018.

	HCV mono infectados (%) (N=60)	Sem informação	HCV/HIV co infectados (%) (N=56)	Sem informação
<b>Idade</b>	63,4 ± 8,2		53,9 ± 7,8	
<b>Sexo</b>				
Feminino	39 (65)		9 (16)	
Masculino	21 (35)		47 (84)	
<b>Estado Civil</b>		41		28
Solteiro	1 (1,6)		11 (19,6)	
Casado	16 (26,6)		12 (21,4)	
Viúvo	2 (3,3)		5 (8,9)	
<b>Orientação sexual</b>		27		26
Heterossexual	33 (55)		18 (32,1)	
Homossexual	0		12 (21,4)	
<b>Drogas injetáveis</b>				
Sim	6 (10)		5 (8,9)	
Não	54 (90)		51 (91,1)	
<b>Uso de álcool</b>				
Sim	23 (37,9)		27 (48,2)	
Não	37 (62,1)		29 (51,8)	
<b>Cirurgia</b>				
Sim	36 (60)		22 (39,2)	
Não	24 (40)		34 (60,8)	
<b>Hemodiálise</b>				
Sim	2 (3,3)		0	
Não	58 (96,7)		56 (100)	
<b>Transfusão sanguínea</b>				
Sim	30 (50)		16 (28,5)	
Não	30 (50)		40 (71,5)	
<b>Tatuagem</b>				
Sim	4 (6,6)		4 (7,1)	18
Não	56 (94,4)		34 (60,7)	
<b>Piercing</b>				
Sim	5 (8,3)		7 (1,7)	13
Não	55 (91,7)		36 (64,2)	

Análises das características clínicas dos participantes demonstraram alta frequência do quadro de fibrose avançada (F4) e cirrose. As dosagens de substâncias relacionadas à função hepática revelaram que a média de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) estavam moderadamente elevadas nos dois grupos de pacientes, porém um pouco maior entre os HCV mono infectados em relação aos HCV/HIV co infectados (média ALT 81,2U/L vs 54,3U/L; AST 82,6U/L vs 49,4U/L). Os níveis de gama glutamil transpeptidase (GGT) também encontraram-se alterados em ambos os grupos.

Dos 116 pacientes hepatite C crônica, 69 (59,5%) receberam algum tratamento para a infecção HCV e 47 (40,5%) eram virgens de tratamento. Dentre os HCV mono infectados, 53,3% receberam tratamento e no grupo HCV/HIV, 66%. À época das coletas, o tratamento disponível consistia na administração de Interferon-alfa (na forma peguilada ou não) e Ribavirina.

Todos os pacientes HCV/HIV co infectados (n=56) receberam terapia antiviral altamente ativa (HAART) como tratamento para o HIV. A carga viral do HIV em todos pacientes estava em níveis indetectáveis e a média de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, apenas registrada para tais pacientes, foi 701,2 células/mm<sup>3</sup> (± 11,8 células/mm<sup>3</sup>), Tabela 5.2.

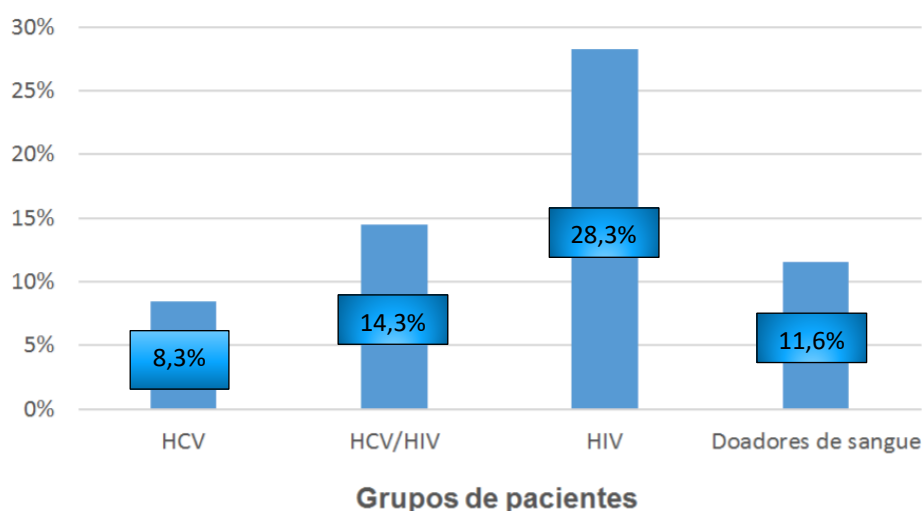
**Tabela 5.2:** Características clínicas dos indivíduos com hepatite C crônica mono infectados e HCV/HIV co infectados atendidos no Rio de Janeiro, 2017-2018 (N=116).

	HCV mono infectados N= x (%)	HCV/HIV co infectados N= x (%)
<b>Grau de Fibrose</b>		
1	1 (1,6)	13 (23,2)
2	2 (3,3)	10 (17,8)
3	12 (20)	12 (21,4)
4	45 (75,1)	21 (37,6)
<b>Cirrose</b>		
Sim	45 (75)	30 (53,5)
Não	15 (25)	26 (46,5)
<b>Hepatocarcinoma</b>		
Sim	3 (5)	4 (7,1)
Não	57 (95)	52 (92,9)
<b>ALT (U/L)</b>	81,2 ± 61,9	54,3 ± 46,8
<b>AST (U/L)</b>	82,6 ± 50,5	49,4 ± 31,2
<b>Albumina (g/dL)</b>	4,1 ± 1	4,9 ± 5,1
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	0,9 ± 0,6	4,8 ± 2,7
<b>GGT (U/L)</b>	92,8 ± 9,6	109,3 ± 12,1
<b>Tratamento HCV</b>		
Sim	32 (53,3)	37 (66)
Não	28 (46,7)	19 (34)
<b>Tratamento HIV</b>		
Sim	-	56 (100)
Não	-	0
<b>Carga viral HCV (log 10 cópias/mL)</b>	5,8 ± 1	5,9 ± 1
<b>Carga viral HIV</b>	-	Indetectável
<b>CD4+ (cel/mm<sup>3</sup>)</b>	-	701,2 ± 11,8
<b>Esteatose</b>		
Sim	21 (35)	13 (23,2)
Não	39 (65)	43 (76,8)

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transpeptidase. Os valores normais para referência são: ALT 31U/L, AST 31 U/L, GGT 8-41 U/L para mulheres e ALT 41 U/L, AST 37 U/L e GGT 12-73 U/L para homens. Níveis normais de albumina e bilirrubina variam entre 3,5-4,7g/dL e 0,2-1,0 mg/dL, respectivamente e linfócitos TCD4 maior do que 500 células por milímetro cúbico.

## 5.2 Prevalência HPgV-1 na população estudada (n=236)

A prevalência global de RNA de HPgV-1 foi 15,7% (37/236). Estratificando-se por grupo estudado, a maior frequência da infecção por HPgV-1 ocorreu entre os pacientes somente HIV (28,3%; 17/60), seguida pelos pacientes HCV/HIV (14,3%; 8/56), doadores de sangue (11,6%; 7/60) e HCV monoinfetados (8,3%; 5/60), Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Prevalência do RNA de HPgV-1 estratificada pelos grupos estudados.

As características sociodemográficas e comportamentais dos doadores de sangue não foram fornecidas, impossibilitando de apresentá-las neste trabalho.

### 5.2.2 HPgV-1 em indivíduos HIV monoinfetados.

Este estudo englobou amostras de indivíduos infectados pelo HIV (n=60) pertencentes à coleção do laboratório de Virologia Molecular IOC/Fiocruz. Tais amostras haviam sido coletadas para um estudo anterior, por esse motivo, poucas informações que pudessem ser relacionadas à infecção pelo HPgV-1 estavam disponíveis. Todos os indivíduos estavam sendo tratados com HAART no momento da coleta. O grupo de indivíduos HIV monoinfetados foi composto majoritariamente por homens (61,6%) e a média de idade foi de 41,2 anos ( $\pm$  11,7 anos).

A maior frequência de infecção pelo HPgV-1 foi observada entre mulheres (52,9%; 9/17), e na faixa etária de 22-32 anos (41,2%). Não houve diferença na contagem de células



TCD4+ entre indivíduos HPgV-1 positivos e negativos (649,4 cél/mL vs 647,8 cél/mL) e nenhuma correlação estatística com a infecção pelo HPgV-1 foi observada (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3:** Dados dos indivíduos monoinfetados pelo HIV, de acordo com o *status* da infecção pelo HPgV-1.

	<b>N (%)</b> <b>N=60</b>	<b>HPgV-1 positivo</b> <b>(%)</b> <b>N=17</b>	<b>HPgV-1 negativo</b> <b>(%)</b> <b>N=43</b>	<b><math>\chi^2</math> (p-valor)</b>
<b>Sexo</b>				0,9
Feminino	23 (38,4)	9 (52,9)	14 (35,5)	
Masculino	37 (61,6)	8 (47,1)	29 (64,5)	
<b>Idade (anos)</b>				0,1
22-32	16 (26,7)	7 (41,2)	9 (20,9)	
33-43	16 (26,7)	5 (29,4)	9 (20,9)	
44-54	21 (35)	3 (17,6)	18 (41,8)	
>55	7 (11,6)	2 (11,8)	5 (16,4)	
<b>Média</b> <b>(células/mm<sup>3</sup>)</b>				0,7
TCD4+	648,3	649,4	647,8	
TCD8+	987,2	855,5	1039,3	

### 5.3 Análise das variáveis sociodemográficas, comportamentais e clínicas dos pacientes com hepatite C crônica e associação com a presença do RNA de HPgV-1 (n=116).

A Tabela 5.4 exibe as análises univariada e multivariada para possíveis associações entre a infecção por HPgV-1 e variáveis sociodemográficas e comportamentais. A análise univariada, identificou o uso de drogas injetáveis (1,3 IC 95% 1,2-2,4), histórico de hemodiálise (1,2 IC 95% 1,06-2,4), piercing (2,07 IC 95% 1,6-4,7) e tatuagem (2,5 IC 95% 1,3-6,1) como potenciais fatores de risco. O sexo masculino mostrou-se como uma variável de menor risco em adquirir a infecção por HPgV-1 (0,17 IC 95% 0,07-0,3). Na análise multivariada, apenas as variáveis histórico de hemodiálise (2,01 IC 95% 1,8 - 3,8) e tatuagem (1,2 IC 95% 1,1-2,6) associaram-se com significância estatística à infecção por HPgV-1.

**Tabela 5.4:** Análise dos fatores sociodemográficos e comportamentais dos pacientes HCV monoinfectados e HCV/HIV coinfectados relacionados a presença do HPgV-1, N=116.

Variáveis	N (%)	Sem informações	Prevalência de HPgV-1 (%)	Univariada		Multivariada	
				X <sup>2</sup> (p-valor)	OR (IC 95%)	X <sup>2</sup> (p-valor)	OR (IC 95%)
<b>Sexo</b>							
Feminino	47 (40,5)		7 (6)		1		
Masculino	69 (59,5)		6 (5,1)	<0,001	0,17 (0,07-0,3)	0,3	
<b>Faixa etária (anos)</b>							
		8					
30-40	7 (6)		2 (1,7)				
41-51	14 (12)		3 (2,5)	1			
52-62	46 (39,6)		6 (5,1)	0,09			
>62	41 (35,3)			0,7			
<b>Orientação sexual</b>							
		53					
Heterossexual	51 (43,9)		6 (5,1)	0,9			
Homossexual	12 (10,3)		1 (0,8)				
<b>Estado Civil</b>							
		69					
Solteiro	12 (10,3)		2 (1,7)		1		
Casado	28 (24,1)		4 (3,4)	0,004	3,5 (1,4-5,3)	0,5	
Viúvo	7 (6)						
<b>Nº de Parceiros</b>							
		94					
Múltiplos	13 (11,2)		5 (4,3)		1		
Único	9 (7,7)		1 (0,8)	0,04	0,25 (0,06-0,6)	0,9	
<b>Cirurgia</b>							
Não	58 (50)		4 (3,4)		1		1
Sim	58 (50)		6 (5,1)	0,009	1,8 (1,3-3,5)	0,03	1,2 (1,1-2,7)
<b>Usuário de Drogas Injetáveis</b>							
		27					
Não	78 (67,2)		9 (7,7)		1		
Sim	11 (9,4)		4 (3,4)	<0,001	1,3 (1,2-2,4)	0,06	
<b>Hemotransusão</b>							
		20					
Não	50 (43,1)		6 (5,1)		1		1
Sim	46 (39,6)		6 (5,1)	0,04	1,6 (1,1-2,9)	0,05	1,4 (1,09-2,9)
<b>Hemodiálise</b>							
		34					
Não	80 (68,1)		3 (2,5)		1		1
Sim	2 (1,7)		2 (1,7)	<0,001	1,2 (1,06-2,4)	<0,001	2,01 (1,8-3,8)
<b>Piercing</b>							
		20					
Não	84 (72,4)		8 (6,8)		1		
Sim	12 (10,3)		5 (4,3)	<0,001	2,07 (1,06-4,7)	0,9	
<b>Tatuagem</b>							
		30					
Não	78 (66,3)		5 (4,3)		1		
Sim	8 (6,8)		7 (6)	<0,001	2,5 (1,3-6,1)	<0,001	1,2 (1,1-2,6)
<b>Uso de Álcool</b>							
		18					
Não	48 (41,3)		7 (6)				
Sim	50 (43,1)		2 (1,7)	0,9			

As possíveis associações entre características clínicas e infecção por HPgV-1 estão exibidas na Tabela 5.5. Na análise univariada, as variáveis que indicaram risco de infecção por HPgV-1, foram: coinfeção HCV/HIV (1,8 IC 95% 1,5-6,4) e AST (3,7 IC 95% 2,6-9,2) elevado. E variáveis que indicaram um menor risco de adquirir infecção por HPgV-1 foram: indivíduos tratados para o HCV (0,37 IC 95% 0,09-0,8) e indivíduos com uma menor taxa de TCD4+ (0,1 IC 95% 0,04- 0,3) (Tabela 5.5).

Quando essas variáveis foram submetidas à análise multivariada, a única característica que permaneceu associada à infecção por HPgV-1 com significância estatística foi a coinfeção HCV/HIV (1,2 IC 95% 1,1-3,1). A variável tratamento para HCV (0,4 IC 95% 0,2-0,9) apresentou-se como um menor risco de adquirir infecção por HPgV-1.

**Tabela 5.5:** Análise dos fatores clínicos dos pacientes HCV e HCV/HIV relacionados a presença do HPgV-1, N=116.

Variáveis	N (%)	Sem informações	Prevalência de HPgV-1 (%)	X <sup>2</sup> (p-valor)	Univariada	Multivariada	
					OR (IC 95%)	X <sup>2</sup> (p-valor) aOR (IC 95%)	
<b>Hepatocarcinoma</b>							
Não	109 (93,9)		10 (8,6)		1		
Sim	7 (6,1)		3 (2,5)	0,002	2,3 (1,1-7,5)	0,07	
<b>Esteatose</b>							
Não	82 (70,6)		1(0,8)		1		
Sim	34(29,4)		2 (1,7)	0,007	1,0 (1,0-5,7)	0,4	
<b>Tratamento (HCV)</b>							
NAIVE	47 (40,5)		9 (7,7)		1	1	
Tratados	69 (59,6)		4 (3,4)	<0,001	0,37 (0,09-0,8)	<0,001 0,4 (0,2-0,9)	
<b>Coinfecção (HIV-HCV)</b>							
Não	60 (51,7)		5 (4,3)		1	1	
Sim	56 (48,2)		8 (6,8)	<0,001	1,8 (1,5-6,4)	<0,001 1,6 (1,1-3,1)	
<b>Cirrose</b>							
		4					
Não	37 (31,8)		3 (2,5)		1		
Sim	75 (64,6)		10 (8,6)	0,02	1,8 (1,2-3,6)	0,004 1,4 (1,2-4,6)	
<b>Grau de Fibrose</b>							
F1	14 (12)						
F2	12 (10,3)		1 (0,8)	0,9			
F3	24 (20,6)		2 (1,7)	0,4			
F4	66 (57,1)		8 (6,8)	0,05	1,2 (1,08-2,1)	0,3	
<b>Gama glutamil transferase (GGT)</b>							
		10					
Normal	34 (29,3)		4 (3,4)				
Elevadas	72 (62)		7 (6)	0,07			
<b>Abulmina</b>							
		6					
Normal	91 (78,4)		9 (7,7)		1		
Elevadas	19 (16,3)		4 (3,4)	0,02	1,07 (1,05-4,6)	0,9	
<b>Plaquetas /µL</b>							
		9					
150-450	72 (62)		6 (5,1)		1		
<150	33 (28,4)		7 (6)	0,01	1,2 (1,1-3,1)	0,9	
>450	2 (1,7)						
<b>Hemoglobina</b>							
		12					
Normal	66 (56,8)		6 (5,1)				
Baixa	37 (31,8)		5 (4,3)	0,4			
Elevada	1 (0,8)						
<b>AST</b>							
		2					
Normal	43 (32,7)		4 (3,4)		1	1	
Elevada	71 (61,2)		9 (7,7)	<0,001	3,7 (2,6-9,2)	0,05 2,3 (1,1-3,8)	
<b>ALT</b>							
		2					
Normal	64 (32,7)		7 (6)		1	1	
Elevada	50 (60,3)		6 (5,1)	0,04	2,6 (1,6-6,2)	0,03 1,05 (1,02-2,6)	
<b>Diabetes</b>							
		14					
Não	77 (66,3)		6 (5,1)		1	1	
Sim	25 (21,5)		5 (4,3)	0,009	3,1 (1,8-8,6)	0,02 2,1 (1,6-5,4)	
<b>TCD4 (Coinfectados HIV)</b>							
		6					
Normal	43 (37)		5 (4,3)				
Baixa	7 (6)		1 (0,8)	<0,001	0,1 (0,04-0,3)	0,1	

Referências: Tratamento HCV: tratados com Interferon e/ ou Ribavirina (não respondedores); AST (U/L)- 5-40: normal, > 40: elevado; ALT (U/L)- 7-56: normal, >56: elevado; GGT (U/L) - masculino 8-61: normal, >61: elevado, feminino 5-36: normal, >36 elevado; Abulmina (g/dL)- 3,5-4,7: normal, <3,5: baixa, >4,7 elevado. (69))

#### 5.4. Genotipagem do HPgV-1

A genotipagem das amostras positivas para HPgV-1 foi realizada através da análise filogenética da região 5'UTR em 94,6% (35/37) das amostras. Vinte e nove (78,3%) indivíduos estavam infectados com o genótipo 2, sendo 21 sequências identificadas como 2b e oito sequências como 2a. Os genótipos 3 e 1 também foram identificados, em três pacientes cada, Tabela 5.6.

**Tabela 5.6:** Amostras positivas para HPgV-1 sequenciadas e seus respectivos genótipos.

Amostras Sequenciadas	Grupo	Ano de coleta	Origem	Genótipo HPgV-1	Genótipo HCV
120	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	3	1b
121	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	3	1b
155	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	2b	4
200	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	2b	1a
239	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	2b	1a
240	Coinfectados HIV/HCV	2016	HUGG	2a	1a
32	Coinfectados HIV/HCV	2017	HUGG	2b	4
33	Coinfectados HIV/HCV	2017	HUGG	2b	1a
DS24	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	2b	-
DS11	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	2b	-
DS22	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	2b	-
DS23	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	2b	-

DS19	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	1	-
DS17	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	1	-
DS20	Doadores de Sangue	2018	Soroteca LVM	1	-
HCV35	Monoinfectados HCV	2016	HUGG	3	1a
HCV41	Monoinfectados HCV	2016	HUGG	2a	1b
HCV17	Monoinfectados HCV	2016	HUGG	2b	1a
HCV10	Monoinfectados HCV	2016	HUGG	2b	1b
HIV3	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV9	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV11	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV13	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV15	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV16	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV18	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV22	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV24	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV26	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV31	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV38	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2a	-
HIV52	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-

HIV53	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV54	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-
HIV57	Monoinfectados HIV	2014	Soroteca LVM	2b	-

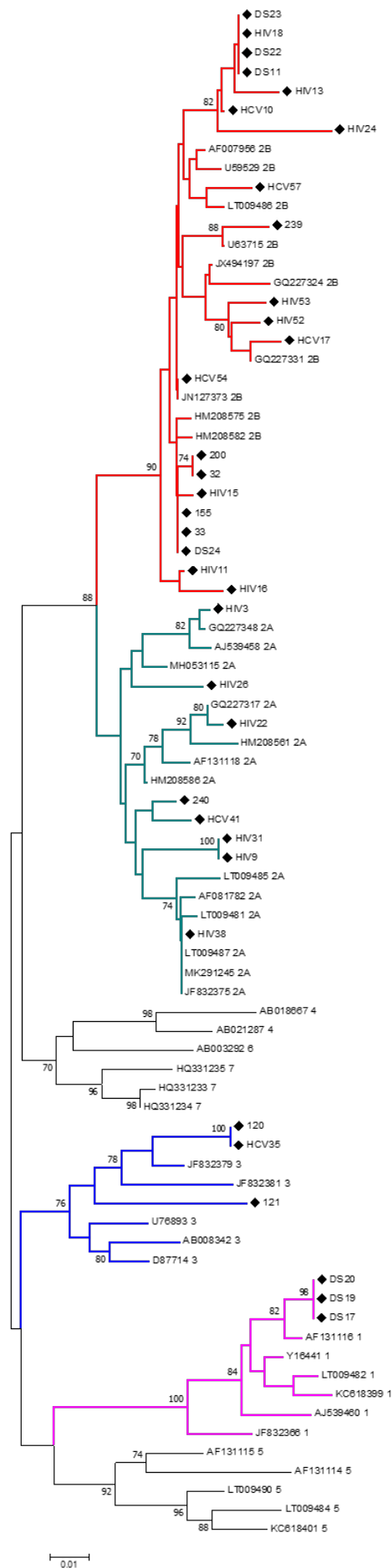
No grupo dos HIV/HCV coinfectados, foram encontrados os genótipos 2 (2b em 5 amostras e 2a em 1 amostra) e 3 (em 2 amostras), no grupo dos HCV monoinfectados foram encontrados os genótipos 2 (2b em duas amostras, 2a em 1 amostra) e 3 (em 1 amostra), no grupo de doadores de sangue, foram encontrados os genótipos 2 (2b em 4 amostras) e 1 (em 3 amostras) e no grupo dos pacientes HIV monoinfectados, foi somente encontrado o genótipo 2 (2b em 10 amostras e 2a em 6 amostras), Tabela 5.6 e Figura 5.2. Um resumo da distribuição dos genótipos de HPgV-1 por grupo está apresentado na Tabela 5.7.

As sequências classificadas como subgenótipo 2b se agruparam randomicamente com sequências isoladas de indivíduos do Reino Unido (LT09486), África (U63715), Estados Unidos (JN127373) e Brasil (HM208575 e HM 208582). O mesmo perfil de distribuição randômica foi observado para as sequências do subgenótipo 2a, que se agruparam com sequências isoladas na França (MH053115), Brasil (GQ227348), Reino Unido (LT009485), Estados Unidos (MK291245) e Colômbia (JF832375), confirmando a ampla distribuição do genótipo 2 pelo mundo. Sequências pertencentes ao genótipo 1 foram exclusivamente encontradas em doadores de sangue. Estas sequências formaram um único cluster, agrupando-se com uma sequencia isolada na África do Sul (AF131116). As sequências classificadas como genótipo 3 agruparam-se com sequências isoladas na Colômbia (JF832381 e JF832379). A diversidade intragenotípica das sequências obtidas foi calculada em 0,052 para o genótipo 1, 0,058 e 0,032 para os subgenótipos 2a e 2b, respectivamente, e para o genótipo 3 o valor calculado foi 0,068.

**Tabela 5.7:** Distribuição dos genótipos de HPgV-1 por grupo de indivíduos analisados.

<b>Grupos</b>	<b>Genótipo (n)</b>
HIV/HCV	2b (5) 3 (2) 2a (1)
HCV	<b>3 (1)</b> 2a (1) 2b (2)
HIV	2a (6) 2b (10)
Doadores de Sangue	<b>1 (3)</b> 2b (4)





**Figura 5.2: Árvore filogenética das 35 amostras sequenciadas.** Análise filogenética baseada em 302 pares de base de seqüências da região 5' UTR do HPV-1. As seqüências obtidas neste estudo estão marcadas com losango preto e os ramos que representam os genótipos encontrados estão marcados em **magenta** (genótipo 2b), **verde** (genótipo 2a), **azul** (genótipo 3) e **rosa** (genótipo 1). As seqüências usadas como referências para genotipagem estão indicadas com os números de acesso no GenBank. A árvore representada aqui foi gerada através do método *Neighbor joining*, com *bootstrap* de 500 replicatas.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a frequência e a distribuição genotípica da infecção por HPgV-1 foram estimadas entre indivíduos infectados pelo HCV e/ou HIV na cidade do Rio de Janeiro. Os participantes deste estudo foram divididos em quatro grupos, de acordo com o status de infecções por HCV e/ou HIV: HCV monoinfectados (n=60), HIV/HCV (n=56) coinfectados, HIV monoinfectados (n=60) e doadores de sangue (n=60), perfazendo um total de 236 participantes.

A prevalência global estimada do RNA de HPgV-1 foi 15,7% (37/236). No grupo de indivíduos HCV monoinfectados atendidos em um Hospital do Rio de Janeiro, a prevalência de HPgV-1 encontrada foi de 8,3%.

No grupo de indivíduos HCV monoinfectados atendidos em um Hospital do Rio de Janeiro, a prevalência de HPgV-1 encontrada foi de 8,3%. Estudos anteriores realizados no Brasil demonstraram prevalências similares de HPgV-1 RNA entre indivíduos com doença hepática (38, 55, 69, 70). A infecção por HPgV-1 foi demonstrada em 9% dos pacientes com hepatite aguda A, B e não A-C, num estudo conduzido em Salvador; em 13% de indivíduos com hepatite crônica (causados por HBV ou HCV), onde o RNA do HPgV-1 foi encontrado em 11% com doença crônica pelo HCV, e em 28% de indivíduos com carcinoma hepatocelular (CHC), onde 4% dos pacientes em que o HCV foi identificado como o agente etiológico do CHC, estavam também infectados pelo HPgV-1 (37, 38, 70). Entre indivíduos cronicamente infectados pelo HCV, a coinfeção com HPgV-1 foi demonstrada em 10,5% na região Nordeste (n=128) e em 18,2% na região Sudeste (n=44) (55, 69). As diferenças nas taxas de prevalência obtidas nestes estudos podem ter sido influenciadas pelo número de amostras testadas em cada ensaio e por diferenças de metodologia para detecção do RNA viral. Alguns autores optaram por regiões codificantes de proteínas não estruturais NS3 ou NS5 ou estruturais E2, enquanto outros optaram pela região 5'-UTR (repetir as referências). Estima-se que a infecção pelo HPgV-1 ocorra entre 11% e 24% dos indivíduos infectados pelo HCV (18), porém a taxa de coinfeção é ampla e pode variar entre diferentes regiões geográficas (71). A prevalência encontrada entre usuários de drogas injetáveis monoinfectados pelo HCV, em uma província chinesa, foi 33,3%. Um dos motivos para tal frequência, mais alta do que o esperado, pode estar relacionado ao fato de que tais indivíduos nunca haviam sido tratados para o HCV (54). Dados na literatura demonstram que o interferon alfa (peguilado ou não, combinado ou não com ribavirina), nas doses

recomendadas para tratamento da infecção pelo HCV, possui uma potente atividade antiviral contra o HPgV-1 (72-74).

Por causa das vias de transmissão compartilhadas, a infecção por HPgV-1 é comum entre indivíduos infectados pelo HCV e/ou HIV. Neste trabalho, o RNA de HPgV-1 foi detectado em 14,3% dos pacientes coinfectedados HCV/HIV. No Brasil, um estudo cujo objetivo era avaliar o papel da influência do HPgV-1 na co-infecção HCV/HIV, a tripla infecção (HCV/HIV/HPgV-1) foi reportada em 15% dos pacientes (63) e num estudo de prevalência do HPgV-1 em indivíduos HIV positivos da região Sul do país, a tripla infecção foi demonstrada em 9,3% da população participante (75). Entretanto, taxas bem maiores de prevalência de HPgV-1 em indivíduos HCV/HIV coinfectedados são descritas com frequência na literatura. Nos Estados Unidos, entre mulheres HCV/HIV positivas, a prevalência encontrada foi 22,9% e, entre indivíduos HCV/HIV, o RNA de HPgV-1 foi detectado em 36% (76, 77). Na China, a tripla infecção entre usuários de drogas injetáveis foi descrita numa taxa de 32,4% (54). No entanto, numa população de 1062 indivíduos HIV positivos, na mesma região da China, a tripla infecção foi detectada em 8,8% (62). Tais diferenças entre as prevalências encontradas em diversos estudos podem ser reflexo do número de amostras testadas, técnicas laboratoriais empregadas ou mesmo das características intrínsecas de cada população.

A maior frequência de infecções por HPgV-1 deste trabalho foi encontrada entre os indivíduos monoinfectados pelo HIV, onde o RNA de HPgV-1 foi detectado em 28,3% dos participantes. No Brasil, estima-se que a prevalência de HPgV-1 seja de 21-30% entre indivíduos HIV-1 positivos (61, 65, 78, 79), porém, na região Sul do país, essa coinfecção foi registrada com uma frequência um pouco maior, de 34% (75). No mundo, a coinfecção HIV/HPgV-1 ocorre entre 14-45%, sendo as maiores frequências registradas entre usuários de drogas injetáveis e homens que fazem sexo com homens (18, 80).

A maior frequência de infecções por HPgV-1 deste trabalho foi encontrada entre os indivíduos monoinfectados pelo HIV, onde o RNA de HPgV-1 foi detectado em 28,3% dos participantes. No Brasil, estima-se que a prevalência de HPgV-1 seja de 21-30% entre indivíduos HIV-1 positivos (61, 65, 78, 79), porém, na região Sul do país, essa coinfecção foi registrada com uma frequência um pouco maior, de 34% (75). No mundo, a coinfecção HIV/HPgV-1 ocorre entre 14-45%, sendo as maiores frequências registradas entre usuários de drogas injetáveis e homens que fazem sexo com homens (18, 80).

No trabalho apresentado aqui, um grupo de doadores de sangue da cidade do Rio de Janeiro também foi avaliado quanto à presença de RNA de HPgV-1, que foi encontrado em 11,6% dos doadores. No Brasil, estima-se que a prevalência de HPgV-1 em doadores de sangue varie entre 5-10%, com exceção de um estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto (SP), onde HPgV-1 foi detectado em 12% (81), e outro, na cidade de Rio Grande (RS), onde encontrou-se uma prevalência de 21,7% entre doadores de sangue (82). Em contraste ao descrito na cidade de Rio Grande, em Santa Maria, no mesmo estado (RS), HPgV-1 foi detectado em 5,9% dos doadores (14). Essa discrepância entre a cidade de Rio Grande e as outras cidades brasileiras estudadas pode ser entendida como uma condição da população local e não como diferenças de métodos, já que a detecção do RNA viral nos demais estudos brasileiros teve como alvo a mesma região genômica e a mesma técnica de amplificação, que também foi adotada neste trabalho (14, 27). A frequência de HPgV-1 em doadores de sangue no mundo foi avaliada através de trabalhos de revisões sistemáticas e meta-análise, com aproximadamente 35 mil doadores voluntários. Os valores de prevalência foram compilados por continente a estimativa para a América do Sul foi 9,1% (31). Uma limitação deste estudo foi o número pequeno de amostras (n=60), bem inferior aos realizados em outras cidades brasileiras, o que poderia explicar a pequena diferença entre a prevalência encontrada aqui (11,6%) e a máxima no Brasil (estimada em 10%).

Dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos dos pacientes com infecção crônica pelo HCV (HCV e HCV/HIV) acompanhados pela equipe médica do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle foram analisados em busca de possíveis associações com a infecção pelo HPgV-1. Dentre as diversas variáveis avaliadas, após análises multivariadas, o histórico de hemodiálise, tatuagem, coinfeção HCV/HIV e tratamento para o HCV apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença de HPgV-1. Esse resultado corrobora com a relação entre a infecção por HPgV-1 e a exposição parenteral, que é uma via de transmissão bastante eficiente e bem documentada na literatura (62, 75, 83). Por causa das vias de transmissão compartilhadas (sexual e parenteral), a infecção por HPgV-1 é ainda mais frequente em indivíduos infectados pelo HCV e/ou HIV (12, 20). Aqui observou-se que, entre os indivíduos com hepatite C crônica, a coinfeção com HIV foi um fator associado com significância estatística à infecção pelo HPgV-1.

Em relação ao tratamento para o HCV, os participantes deste estudo foram classificados entre tratados e virgens de tratamento. O grupo de pacientes tratados foi composto exclusivamente por pessoas que não responderam ao tratamento com interferon e ribavirina. No entanto, pela análise estatística, houve uma associação negativa entre o tratamento e a infecção por HPgV-1. Apesar de não apresentarem resposta virológica sustentada para o HCV, aparentemente, o tratamento é um fator que diminui as chances de infecção pelo HPgV-1. A ação antiviral do Interferon alfa (peguilado ou não) no HPgV-1 em pacientes em tratamento para o HCV, já foi descrita por diversos autores. No entanto, quando o tratamento é interrompido, o RNA de HPgV-1 no soro pode voltar a ser detectado (77, 84). A resposta virológica sustentada do HPgV-1 já foi associada a carga viral mais baixa antes do tratamento (77). Embora os fatores que influenciam o *clearance* do HPgV-1 não sejam conhecidos, estudos em pacientes HCV/HPgV-1 coinfetados mostram que a ribavirina, usada em combinação com interferon no tratamento do HCV, não tem efeito, ou apenas um efeito marginal na resposta sustentada do HPgV-1 (73, 77). Infelizmente, neste estudo, não foi possível avaliar se houve soroconversão para anti-E2 e se a presença de tais anticorpos poderia ser uma razão para a correlação negativa entre tratamento para HCV e infecção pelo HPgV-1. Outra limitação deste estudo foi não ter havido coleta seriada de amostras dos participantes, portanto, também não foi possível avaliar se houve resposta sustentada ou se o RNA de HPgV-1 voltaria a ser detectado após a interrupção do tratamento para o HCV. Tais pacientes não respondedores ao HCV estavam aguardando o início da terapia com agentes antivirais de ação direta para o tratamento da hepatite C.

Poucas informações sobre os indivíduos mono infectados pelo HIV estavam disponíveis para avaliação de possíveis fatores de risco associados ao HPgV-1. No entanto, observou-se o maior número de casos de HPgV-1 entre indivíduos na faixa etária entre 22 e 32 anos e a frequência da infecção diminuiu de acordo com a idade dos participantes. A infecção por HPgV-1 em indivíduos jovens já foi observada em diversos estudos, com associação estatística (76, 77). No Brasil, da Mota e colaboradores observaram que a indivíduos com idades entre 18-30 anos e 30-50 anos tinham 8 e 6 vezes mais chance de se infectar com HPgV-1 em comparação a indivíduos maiores de 50 anos de idade (75).

Até o momento, a infecção por HPgV-1 não foi associada de forma conclusiva a nenhuma doença em humanos. No entanto, muitos estudos e meta-análises relatam um impacto positivo da infecção por HPgV-1 em indivíduos infectados pelo HIV. Dados da literatura mostram que coinfetados (HIV/HPgV-1) têm uma sobrevivência prolongada quando

comparados aos HPgV-1 negativos (20, 43, 85). A infecção por HPgV-1 já foi associada com níveis de ALT e AST significativamente mais baixos em pacientes com hepatite C crônica e HIV (52, 54). No trabalho apresentado aqui não foi possível fazer avaliações sobre o impacto do HPgV-1 na infecção pelo HIV porque os participantes receberam tratamento, portanto os níveis de células TCD4 e carga viral do HIV estavam controlados.

A análise genotípica revelou a circulação dos genótipos 1, 2 e 3 de HPgV-1 em pacientes infectados por HCV e/ou HIV na cidade do Rio de Janeiro. Esse resultado é consistente com achados em outras regiões do Brasil (27, 61, 86). O genótipo 2, representado pelos subgenótipos 2a e 2b, foi encontrado com maior frequência, detectado em 82,8% das amostras sequenciadas. O subgenótipo 2b foi identificado em 60% e o subgenótipo 2a, em 22,8% das sequências obtidas. A predominância do genótipo 2 é muito bem documentada no Brasil, tendo sido descrita em diferentes regiões do país: Norte (Amapá), Nordeste (Pernambuco), Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Rio Grande do Sul) e em populações diversificadas, como indivíduos infectados pelo HIV (27, 61, 65), indivíduos com hepatite C crônica (55), doadores de sangue (14, 27, 86, 87), receptores de transplante renal (88) e indivíduos com talassemia politransfundidos (35).

A existência de múltiplos genótipos de HPgV-1 já levantou questionamentos sobre possíveis diferenças no impacto destes genótipos na progressão da doença pelo HIV (77). Apesar deste tema ter sido pouco estudado até o momento, o genótipo 2 já se mostrou associado a maiores níveis de células TCD4 em indivíduos infectados pelo HIV, quando comparado ao genótipo 1 e o subgenótipo 2b mostrou a mesma associação quando comparado ao subgenótipo 2a (77, 89). A distribuição dos genótipos de HPgV-1 pelo mundo pode ser reflexo de processos de migração humana que ocorrem há séculos. Acredita-se que a presença do genótipo 2 no continente americano seja resultado da forte influência das migrações a partir da Europa (90).

Os genótipos 1 e 3 também foram encontrados neste estudo, porém em menor frequência. O genótipo 1, predominante na África, curiosamente só foi encontrado em amostras de doadores de sangue e todas as sequências formaram um único cluster, agrupando-se com uma sequência africana. Infelizmente, dados sociodemográficos dos doadores não foram disponibilizados, impedindo que qualquer observação sobre nacionalidade e/ou etnia pudesse ser realizada aqui. O mesmo acontece com as

sequencias caracterizadas como genótipo 3. Tais dados dos pacientes não fizeram parte da pesquisa sociodemográfica. O genótipo 3 foi descrito apenas entre os pacientes infectados pelo HCV (com ou sem HIV) e todas se agruparam em um único clado, junto com sequencias descritas na Colômbia. O genótipo 3, característico da Ásia, também é encontrado em comunidades ameríndias. Um estudo conduzido na Argentina observou que o genótipo 3 estava predominantemente associado a mulheres grávidas, imigrantes de outros países da América Latina com populações predominantemente indígenas, como Peru e Bolívia (90).

## 7. CONCLUSÕES

- A infecção por HPgV-1 em indivíduos infectados pelo HCV e/ou HIV e doadores de sangue da cidade do Rio de Janeiro foi estimada em 15,7% e os genótipos 1, 2 e 3 foram identificados circulando na população estudada, porém em proporções diferentes.
- A infecção por HPgV-1 foi detectada com maior frequência entre indivíduos mono infectados pelo HIV.
- Fatores de exposição parenteral e sexo feminino foram comumente observados entre os indivíduos infectados pelo HPgV-1. Os casos de infecção por HPgV-1 entre os pacientes HCV e/ou HIV foram mais frequentes em uma faixa etária maior do que observada entre indivíduos HIV mono infectados (52-62 anos e 22-32 anos, respectivamente).
- Houve correlação estatística entre a infecção por HPgV-1 e os fatores histórico de hemodiálise, tatuagem e coinfeção HCV/HIV. Ainda, o tratamento para hepatite C crônica mostrou-se negativamente associado ao HPgV-1.
- Observou-se a predominância do genótipo 2, majoritariamente subgenótipo 2b, entre as sequencias obtidas neste estudo. Sequencias dos genótipos 1 e 3 também foram descritas, porém em um número menor de amostras. O genótipo 1 foi encontrado exclusivamente em doadores de sangue e o genótipo 3 apenas em indivíduos infectados pelo HCV (com ou sem HIV).



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. N'Guessan KF, Boyce C, Kwara A, Archampong TNA, Lartey M, Sagoe KW, et al. Human pegivirus (HPgV) infection in Ghanaians co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV). *Virus Genes*. 2018;54(3):361-7.
2. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys : i. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med*. 1967;125(4):673-88.
3. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol*. 2012;20(3):124-30.
4. 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.
5. 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.
6. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 1996;271(5248):505-8.
7. 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.
8. Berg MG, Lee D, Collier K, Frankel M, Aronsohn A, Cheng K, et al. Discovery of a Novel Human Pegivirus in Blood Associated with Hepatitis C Virus Co-Infection. *PLoS Pathog*. 2015;11(12):e1005325.
9. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol*. 2016;97(11):2894-907.
10. Kapoor A, Kumar A, Simmonds P, Bhuvana N, Singh Chauhan L, Lee B, et al. Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses. *MBio*. 2015;6(5):e01466-15.
11. Karayiannis P, Pickering J, Zampino R, Thomas HC. Natural history and molecular biology of hepatitis G virus/GB virus C. *Clin Diagn Virol*. 1998;10(2-3):103-11.
12. Stapleton JT. GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis*. 2003;23(2):137-48.
13. Xiang J, Daniels KJ, Soll DR, Schmidt WN, Labrecque DR, Stapleton JT. Visualization and characterization of GB virus-C particles: evidence for a nucleocapsid. *J Viral Hepat*. 1999;6 Suppl 1:16-22.
14. Slavov SN, Silveira RM, Rodrigues ES, Diefenbach CF, Zimmermann AM, Covas DT, et al. Human pegivirus-1 (HPgV-1, GBV-C) RNA prevalence and genotype diversity among volunteer blood donors from an intra-hospital hemotherapy service in Southern Brazil. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(2):174-8.
15. Feng Y, Zhao W, Dai J, Li Z, Zhang X, Liu L, et al. A novel genotype of GB virus C: its identification and predominance among injecting drug users in Yunnan, China. *PLoS One*. 2011;6(10):e21151.

16. Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J Med Virol*. 2006;78(1):105-11.
17. Smith DB, Basaras M, Frost S, Haydon D, Cuceanu N, Prescott L, et al. Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 3):769-80.
18. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol*. 2005;33(4):257-66.
19. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton JT. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious in vitro. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 6):1307-19.
20. Chivero ET, Stapleton JT. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 7):1521-32.
21. Tucker TJ, Smuts HE, Eedes C, Knobel GD, Eickhaus P, Robson SC, et al. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol*. 2000;61(1):52-8.
22. George SL, Xiang J, Stapleton JT. Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virology*. 2003;316(2):191-201.
23. Fama A, Larson MC, Link BK, Habermann TM, Feldman AL, Call TG, et al. Human Pegivirus Infection and Lymphoma Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2019.
24. Xiang J, Klinzman D, McLinden J, Schmidt WN, LaBrecque DR, Gish R, et al. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol*. 1998;72(4):2738-44.
25. Fukuhara T, Ono C, Puig-Basagoiti F, Matsuura Y. Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus. *Trends Microbiol*. 2015;23(10):618-29.
26. 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.
27. Da Mota LD, Finger-Jardim F, Silva CM, Germano FN, Nader MM, Goncalves CV, et al. High prevalence and autochthonous transmission of human pegivirus (HPgV-1) in blood donors in the extreme southern of Brazil. *J Med Virol*. 2019;91(1):31-7.
28. Berg T, Muller AR, Platz KP, Hohne M, Bechstein WO, Hopf U, et al. Dynamics of GB virus C viremia early after orthotopic liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C replication. *Hepatology*. 1999;29(1):245-9.
29. 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.
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. Yang N, Dai R, Zhang X. Global prevalence of human pegivirus-1 in healthy volunteer blood donors: a systematic review and meta-analysis. *Vox Sang*. 2019.

32. Hitzler WE, Runkel S. Prevalence, persistence and liver enzyme levels of HGV RNA-positive blood donors determined by large-scale screening and transmission by blood components. *Clin Lab*. 2004;50(1-2):25-31.
33. Sathar MA, Soni PN, York D. GB Virus C/Hepatitis G Virus (GBV-C/HGV): still looking for a disease. *Int J Exp Pathol*. 2000;81(5):305-22.
34. Lefrere 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.
35. Dos Santos Bezerra R, Santos EV, Maraninchi Silveira R, Silva Pinto AC, Covas DT, Kashima S, et al. Molecular prevalence and genotypes of human pegivirus-1 (HPgV-1) and SENV-like viruses among multiply transfused patients with beta-thalassemia. *Transfus Apher Sci*. 2019:102697.
36. Alvarado-Mora MV, Botelho L, Nishiya A, Neto RA, Gomes-Gouvea MS, Gutierrez MF, et al. Frequency and genotypic distribution of GB virus C (GBV-C) among Colombian population with Hepatitis B (HBV) or Hepatitis C (HCV) infection. *Viol J*. 2011;8:345.
37. Lyra AC, Pinho JR, Silva LK, Sousa L, Saraceni CP, Braga EL, et al. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):767-75.
38. Lampe E, de Oliveira JM, Pereira JL, Saback FL, Yoshida CF, Niel C. Hepatitis G virus (GBV-C) infection among Brazilian patients with chronic liver disease and blood donors. *Clin Diagn Virol*. 1998;9(1):1-7.
39. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):75-8.
40. 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 Sao Paulo, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(6):438-43.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Xiang J, Wunschmann 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.
45. Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet*. 2004;363(9426):2040-6.
46. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Reyes-Teran G, et al. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184494.

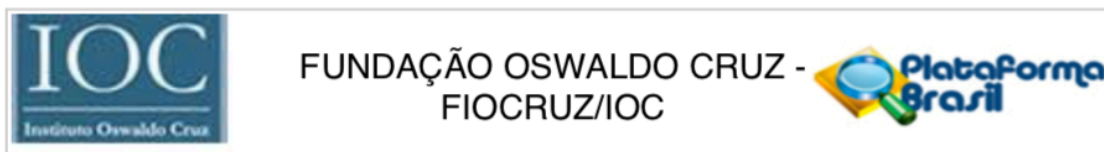
47. Ruegamer T, Hoffmann R, Rohrhofer A, Audebert F, Salzberger B, Korn K, et al. Inhibition of HIV-1 infection by human pegivirus type 1-derived peptides is affected by human pegivirus type 1 genotype and HIV-1 coreceptor tropism. *Aids*. 2018;32(14):1951-7.
48. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman 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.
49. Lalle E, Sacchi A, Abbate I, Vitale A, Martini F, D'Offizi G, et al. Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(1):161-71.
50. 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.
51. Rydze RT, Xiang J, McLinden JH, Stapleton JT. GB virus type C infection polarizes T-cell cytokine gene expression toward a Th1 cytokine profile via NS5A protein expression. *J Infect Dis*. 2012;206(1):69-72.
52. Berzsenyi MD, Bowden DS, Kelly HA, Watson KM, Mijch AM, Hammond RA, et al. Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1821-30.
53. 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.
54. Feng Y, Liu L, Feng YM, Zhao W, Li Z, Zhang AM, et al. GB Virus C infection in Patients With HIV/Hepatitis C Virus Coinfection: Improvement of the Liver Function in Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon*. 2014;14(3):e14169.
55. Pereira LM, Spinelli V, Ximenes RA, Cavalcanti MS, Melo R, Juca N, et al. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. *J Med Virol*. 2002;67(1):27-32.
56. Tan D, Matsumoto A, Conry-Cantilena C, Melpolder JC, Shih JW, Leuther M, et al. Analysis of hepatitis G virus (HGV) RNA, antibody to HGV envelope protein, and risk factors for blood donors coinfecting with HGV and hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 1999;179(5):1055-61.
57. Björkman P, Flamholz L, Molnegren V, Marshall A, Güner N, Widell A. Enhanced and resumed GB virus C replication in HIV-1-infected individuals receiving HAART. *AIDS*. 2007;21(12):1641-3.
58. Souza IE, Allen JB, Xiang J, Klinzman D, Diaz R, Zhang S, et al. Effect of primer selection on estimates of GB virus C (GBV-C) prevalence and response to antiretroviral therapy for optimal testing for GBV-C viremia. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3105-13.
59. RA G. ELISA for detection of antibody to the E2 protein of **GB virus C**. In: Dawson GJ MI, editor. *J Virol Methods*. 1997.
60. Gomara MJ, Fernandez L, Perez T, Tenckhoff S, Casanovas A, Tillmann HL, et al. Diagnostic value of anti-GBV-C antibodies in HIV-infected patients. *Chem Biol Drug Des*. 2011;78(2):277-82.

61. Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocencio 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.
62. Miao Z, Gao L, Song Y, Yang M, Zhang M, Lou J, et al. Prevalence and Clinical Impact of Human Pegivirus-1 Infection in HIV-1-Infected Individuals in Yunnan, China. *Viruses.* 2017;9(2).
63. Barbosa Ade J, Baggio-Zappia GL, Dobo C, Alves-Sousa VK, Lanzara Gde A, Silva ID, et al. Analysis of GB virus C infection among HIV-HCV coinfecting patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):591-3.
64. Arif MS, Hunter J, Leda AR, Zukurov JPL, Samer S, Camargo M, et al. Pace of Coreceptor Tropism Switch in HIV-1-Infected Individuals after Recent Infection. *J Virol.* 2017;91(19).
65. 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.
66. Goubau P, Andrade FB, Liu HF, Basilio FP, Croonen L, Barreto-Gomes VA. Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in north-eastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 1999;4(5):365-7.
67. LM J, F D, JP H, PL Y, CA L, P S. Infection With Hepatitis G Virus Among Recipients of Plasma Products. *Lancet (London, England).* 1996;348(9038).
68. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.
69. JR P, PM Z, JL F, LM S, FJ C, LC dS, et al. High prevalence of GB virus C in Brazil and molecular evidence for intrafamilial transmission. *Journal of clinical microbiology.* 1999;37(5).
70. GC L-F, EP L, AA F, I M, JR P, C R, et al. Hepatitis G virus infection in patients with hepatocellular carcinoma in Recife, Brazil. *Japanese journal of clinical oncology.* 2007;37(8).
71. Ghanbari R, Ravanshad M, Hosseini SY, Yaghobi R, Shahzamani K. Genotyping and infection rate of GBV-C among Iranian HCV- infected patients. *Hepat Mon.* 2010;10(2):80-7.
72. Lau JY, Qian K, Detmer J, Collins ML, Orito E, Kolberg JA, et al. Effect of interferon-alpha and ribavirin therapy on serum GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) RNA levels in patients chronically infected with hepatitis C virus and GBV-C/HGV. *J Infect Dis.* 1997;176(2):421-6.
73. Kao JH, Lai MY, Chen W, Chen PJ, Chen DS. Efficacy of ribavirin plus interferon alpha on viraemia of GB virus-C/hepatitis G virus: comparison with interferon alpha alone. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13(12):1249-53.
74. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen W, Chen DS. Effects of GB virus-C/hepatitis G virus on hepatitis B and C viremia in multiple hepatitis virus infections. *Arch Virol.* 1998;143(4):797-802.
75. Da Mota LD, Nishiya AS, Finger-Jardim F, Barral MF, Silva CM, Nader MM, et al. Prevalence of human pegivirus (HPgV) infection in patients carrying HIV-1C or non-C in southern Brazil. *J Med Virol.* 2016;88(12):2106-14.
76. Blackard JT, Ma G, Welge JA, King CC, Taylor LE, Mayer KH, et al. GB Virus C (GBV-C) Infection in Hepatitis C Virus (HCV) Seropositive Women with or at Risk for HIV Infection. *PLoS One.* 92014.

77. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Zheng H, Addo MM, Lin W, Robbins GK, et al. GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfected patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype. *J Infect Dis.* 2006;194(4):410-9.
78. Campos AF, Tengan FM, Silva SA, Levi JE. Influence of hepatitis G virus (GB virus C) on the prognosis of HIV-infected women. *Int J STD AIDS.* 2011;22(4):209-13.
79. Alves-Sousa VK, Komninakis SC, Baggio-Zappia GL, Barbosa AJ, Mantovani NP, Diaz RS, et al. Short communication: Evaluation of GB virus C/hepatitis G viral load among HIV type 1-coinfected patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(10):1301-4.
80. N'Guessan KF, Anderson M, Phinius B, Moyo S, Malick A, Mbangiwa T, et al. The Impact of Human Pegivirus on CD4 Cell Count in HIV-Positive Persons in Botswana. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(4):ofx222.
81. Watanabe MA, Milanezi CM, Silva WA, de Lucena Angulo I, Santis G, Kashima S, et al. Molecular investigation of GB virus C RNA in hemodialysis and thalassemics patients from Brazil. *Ren Fail.* 2003;25(1):67-75.
82. LD DM, F F-J, CM S, FN G, MM N, CV G, et al. High Prevalence and Autochthonous Transmission of Human Pegivirus (HPgV-1) in Blood Donors in the Extreme Southern of Brazil. *Journal of medical virology.* 2019;91(1).
83. Abe K. GB virus-C/hepatitis G virus. *Jpn J Infect Dis.* 2001;54(2):55-63.
84. Giménez-Barcons M, Sánchez-Fueyo A, Ampurdanés S, Puig-Basagoiti F, Guilera M, Ibáñez A, et al. Genetic evolution of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) under interferon pressure. *Antiviral Res.* 2000;46(2):157-70.
85. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med.* 2006;7(3):173-80.
86. SN S, R MS, MR H, V S, ES R, L FK, et al. Human pegivirus-1 (HPgV-1) RNA Prevalence and Genotypes in Volunteer Blood Donors From the Brazilian Amazon. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine.* 2019;26(4).
87. Oliveira LA. Prevalence and Genotypes of GB Virus C/Hepatitis G Virus among Blood Donors in Central Brazil. In: Regina MB Martins/ + MAC, Sheila A Teles, Simonne A Silva, Divina DP Cardoso, Elisabeth Lampe\*, Clara FT Yoshida, editor. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*2002.
88. F S-R, JG P, MAP H, TCS W, TA M, DB MdC, et al. Human pegivirus-1 Infection in Kidney Transplant Recipients: A Single-Center Experience. *Journal of medical virology.* 2020.
89. Muerhoff AS, Tillmann HL, Manns MP, Dawson GJ, Desai SM. GB virus C genotype determination in GB virus-C/HIV co-infected individuals. *J Med Virol.* 2003;70(1):141-9.
90. Trinks J, Maestri M, Oliveto F, Del Pino N, Weissenbacher M, Torres OW, et al. Human pegivirus molecular epidemiology in Argentina: potential contribution of Latin American migration to genotype 3 circulation. *J Med Virol.* 2014;86(12):2076-83.

## ANEXOS

### ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Padronização da técnica de pirosequenciamento para detecção e análise das variações na proteína core do vírus da hepatite C (R70Q/Y/H E L91M), subtipo 1A E 1B, associadas à cirrose/hepatocarcinogênese e à resposta terapêutica

**Pesquisador:** José Júnior França de Barros

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 34246914.4.1001.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.927.747

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda referente ao projeto CAAE: 34246914.4.1001.5248, na qual o pesquisador principal solicita a inclusão de estudos, que segundo ele: "será utilizada a mesma amostragem para a detecção de Hepatite B oculta (OBI), com objetivo de investigar a presença de infecção oculta pelo vírus da hepatite B e a sua potencial reativação em pacientes com infecção crônica pelo HCV que foram submetidos aos novos tratamentos com os antivirais orais de ação direta (DAAs), já que nos casos de paciente com HCV e HBsAg positivos é recomendado a realização do teste de detecção da presença do HBV-DNA para que se avalie a conduta terapêutica concomitante a ser adotada. O tratamento com DAAs tem como objetivo impedir a progressão da infecção pelo HCV e eliminar o vírus. Nos casos de paciente com HCV e infecção ativa de HBV é recomendado a realização do teste de detecção da presença do HBV-DNA para que se avalie a conduta terapêutica concomitante a ser adotada. Porém em casos de não detecção de infecção ativa o tratamento com DAAs é liberado sem a investigação da presença do HBV-DNA (Brasil, 2018)." Ainda segundo o pesquisador: "a realização de estudos voltados para a investigação sobre a presença OBI em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV e que serão submetidos ao tratamento com DAAs é de grande importância e representa os novos desafios do protocolo terapêutico. Além disso, a falta de informações epidemiológicas, moleculares e sobre aspectos da interação vírus/hospedeiro dos HPgV-1 e HPgV-2 em diferentes cidades do Brasil e em diferentes

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.927.747

populações, este projeto se torna relevante para fornecer novos dados e 5 ampliar o conhecimento sobre o impacto dos HPgV no país e nos casos de co-infecção HIV e HCV." Serão utilizados 200 participantes no estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Desenvolver e otimizar a técnica de pirosequenciamento como biomarcador para detectar, quantificar e analisar mutações na proteína do core do HCV (R70Q/YH e L91M), associadas ao estágio cirrótico, ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular e à resposta virológica do protocolo terapêutico adotado.

Objetivos Secundários:

1. Desenvolver e otimizar os métodos de pirosequenciamento para detectar e analisar as variações nucleotídicas no gene que codifica a proteína do core do HCV que levam a substituições de aminoácidos (R70Q/YH e L91M);
2. Investigar a associação das mutações observadas com progressão clínica da doença (Cirrose e CHC);
3. Avaliar a frequência das mutações com as características demográficas, bioquímicas, virológicas e histológicas de pacientes com cirrose e/ou CHC submetidos ou não ao tratamento;
4. Avaliar a associação dessas mutações com a resposta terapêutica ao tratamento convencional feito com INF e suas apresentações farmacêuticas peguilhado, RIBA e aos novos tratamentos com os antivirais orais de ação direta (DAAs);
- 5- Estimar a prevalência de hepatite B oculta nos pacientes com HCV crônico, os fatores de risco associados e a variabilidade genética deste vírus;
- 6- Investigar a presença de infecção oculta pelo vírus da hepatite B e a sua potencial reativação em pacientes com infecção crônica pelo HCV que serão submetidos aos DAAs;

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 2.927.747

7- Avaliar a circulação de pegyvirus humano (HPgV) em pacientes HCV positivos e co-infectados com HIV, fatores de risco associados e a variabilidade genética deste vírus;

8- Formar recursos humanos na área de Virologia, propiciando a capacitação de profissionais na área de saúde com especial enfoque ao diagnóstico molecular das hepatites virais.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Segundo o pesquisador: "Relacionado aos que se referem às questões de Biossegurança"

No entanto no TCLE e na Justificativa da Emenda o pesquisador apresenta o risco corretamente: "Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, tais como, dor ou rouidão no local. Contudo, haverá um profissional experiente da equipe médica sempre presente para evitar ou minimizar possíveis transtornos decorrentes desse procedimento. É possível que novas amostras sejam necessárias."

Benefícios:

Segundo o pesquisador: "A detecção da presença e análise de mutações na região do core do HCV associadas ao desenvolvimento do quadro clínico da cirrose/ hepatocarcinogênese se torna uma ferramenta bastante adequada para uma melhor da infecção natural pelo HCV, do subtipo 1a e 1b, e seu valor prognóstico na evolução clínica da enfermidade, auxiliando, desta forma, o monitoramento da infecção, fornecendo subsídios no que diz respeito à estratégia e conduta terapêutica a ser adotada para prevenção ou retardo das complicações clínicas geradas pelo dano causado ao fígado, o que leva a um grave problema de Saúde Pública."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A Emenda trará importante contribuição para o conhecimento do tema e a equipe tem capacidade para desenvolvê-la.

Segundo o pesquisador: "As sequências nucleotídicas obtidas serão editadas, alinhadas e analisadas com o software Mega4 (Tamura et al., 2007). Os dados serão codificados e digitados em um banco de dados criado no programa ACCESS. Os parâmetros demográficos, bioquímicos, virológicos e histológicos, tais como, carga viral, genótipo, biópsia hepática, esteatose, entre outros, obtidos dos prontuários dos pacientes, serão avaliados através de cálculo de médias,

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.927.747

freqüências e intervalos de confiança de 95%. As variáveis categóricas serão comparadas utilizando-se o teste qui-quadrado. Para as variáveis quantitativas com distribuição normal será utilizado o teste t de Student, e para aquelas sem distribuição normal se fará uso de testes não-paramétricos adequados. Para esta finalidade será utilizado o pacote estatístico (software) SPSS versão 8.0 e será considerado um valor significativo quando  $p < 0,05$ ."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados e analisados os seguintes documentos:

1-PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1158978\_E1 (1);

2-Justificativa da Emenda;

3-TCLE e

4-Justificativa da Emenda, em papel timbrado, datado e assinado pelo pesquisador principal.

**Recomendações:**

O espaço para as rubricas do pesquisador e para a rubrica do participante devem estar na primeira folha, Na folha dois, que é a última, já tem as assinaturas.

A Emenda deverá ser desenvolvida na forma em que foi aprovada.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências forma atendidas. As recomendações devem ser contempladas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, em sua 242a Reunião Ordinária, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res.466/12 do CNS, manifestou-se por Aprovar em Ad Referendum a Emenda ao projeto CAAE: 34246914.4.1001.5248.

Cabe ressaltar que:

A responsabilidade do pesquisador principal é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.927.747

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1158978_E1.pdf	27/09/2018 13:56:51		Aceito
Outros	JustificativaEmenda.pdf	27/09/2018 13:55:57	José Júnior França de Barros	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	27/09/2018 13:55:36	José Júnior França de Barros	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	27/09/2018 13:54:41	José Júnior França de Barros	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.pdf	30/08/2018 15:44:20	José Júnior França de Barros	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo.pdf	30/08/2018 15:44:01	José Júnior França de Barros	Aceito
Outros	Justificativa.pdf	30/08/2018 15:42:23	José Júnior França de Barros	Aceito
Outros	Resposta a Plataforma Brasil_ Pend-2.pdf	08/12/2014 20:04:59		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo de Anuência_Gaffree_UNIRIO.pdf	08/12/2014 19:58:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pad de Piroseq_Cirrose_HCC_Revisto.doc	08/12/2014 19:39:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HCV_Pyro_Rev.pdf	08/12/2014 19:35:51		Aceito
Outros	Resposta a Plataforma Brasil.pdf	08/10/2014 17:05:30		Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.927.747

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HCV_Pyro.pdf	08/10/2014 16:57:03		Aceito
Outros	TCS_Brandao (2).jpg	08/10/2014 16:56:04		Aceito
Outros	TCS-Waldir 001 (2).jpg	08/10/2014 16:53:31		Aceito
Outros	TCS-Selma 001 (2).jpg	08/10/2014 16:53:00		Aceito
Outros	TCS-Christian 001 (2).jpg	08/10/2014 16:49:56		Aceito
Outros	TCS_Kycia.pdf	08/10/2014 16:49:28		Aceito
Outros	TCS_JoseJr.pdf	08/10/2014 16:48:44		Aceito
Outros	TCS_Aline 001 (2).jpg	08/10/2014 16:43:54		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto-2014_Assinada.pdf	01/08/2014 15:24:33		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Jr.doc	31/07/2014 13:37:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pad de Piroseq_Cirroseq_HCC.doc	31/07/2014 13:34:44		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 30 de Setembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Maria Regina Reis Amendoeira**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

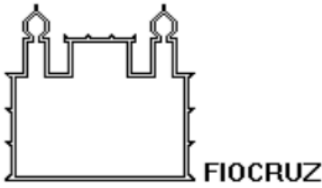
**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Departamento de Virologia  
Laboratório de Virologia Molecular

## ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Instituições participantes:** Laboratório de Virologia Molecular- IOC/ FIOCRUZ e Ambulatório de Doenças do Fígado do Hospital (HUGG/UNIRIO)

**Projetos de Pesquisa:** Análise de mutações no genoma do vírus da hepatite C (HCV), subtipo 1A E 1B, associadas à hepatocarcinogênese e à resposta virológica sustentada em amostras de pacientes crônicos com cirrose e/ou hepatocarcinoma celular.

**Coordenador:** Dr. José júnior França de Barros.

O(A) senhor(a) \_\_\_\_\_ foi convidado (a) a participar de um estudo que irá investigar as alterações no vírus da hepatite C (HCV), do vírus da hepatite B oculta (OBI) e Pegyvírus humano (HPgV) e de que maneiras os vírus se comportam durante a infecção/coinfecção. Para isso o (a) senhor (a) precisa consentir em doar cerca de 10 mL (2 colheres de chá) do meu sangue que será separado e levado para o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ com o objetivo de se investigar a presença do HCV, OBI, HPgV e estudar os fatores presentes nos mesmos responsáveis pela persistência e agravamento destas doenças. Para isto o seu sangue deverá ser coletado na veia por um técnico especializado. Está sendo informado (a) que possa não ter benefício imediato dos resultados desta pesquisa, mas este trabalho pode, futuramente, esclarecer problemas relacionados a forma crônica e desenvolvimento de tumor no fígado pela hepatite C, B e HPgV. Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, tais como, dor ou rouidão no local. Contudo, haverá um profissional experiente da equipe médica sempre presente para evitar ou minimizar possíveis transtornos decorrentes desse procedimento. É possível que novas amostras sejam necessárias. Está sendo informado (a) também que possa ser solicitado (a) a retornar em intervalos de 3 a 12 meses para fornecer amostras adicionais. Caso seja necessário, será chamado por um dos integrantes do estudo que irá me perguntar se estará disposto a doar nova amostra de sangue. Está livre para recusar esta solicitação. A sua participação é voluntária e poderá sair do estudo a qualquer momento. Para participar deste estudo, forneceras também aos

pesquisadores algumas informações sobre suas condições socioeconômicas outros fatores.

**Declara ter recebido informações a respeito deste estudo e autoriza o Coordenador do projeto a utilizar as amostras do seu sangue para realização de exames para estudar o vírus da hepatite C, hepatite B oculta e Pegyvirus humano e a resposta ao tratamento estabelecido?**

( ) Sim ( ) Não

Os resultados laboratoriais referentes ao seu quadro clínico serão fornecidos a você de maneira confidencial. As informações obtidas dos diferentes laboratórios desta pesquisa serão para publicação científica com sigilo da sua identidade.

Será entregue uma cópia deste termo de consentimento a sua pessoa de igual teor a que ficará com o pesquisador responsável. Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo em qualquer etapa, você terá acesso ao seu médico, como de costume, e/ou ao coordenador do projeto que pode ser encontrado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no endereço Avenida Brasil, 4365, pavilhão Hélio e Peggy Pereira, térreo, sala B15, telefone para contato direto (21) **2562-1895**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FIOCRUZ), Prédio da Expansão, Av. Brasil 4.036, sala 705, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP 21.040-360. Tel: **3882-9000** Ramal: 9011, Tel/fax: 2561-4815. E-mail: [etica@fiocruz](mailto:etica@fiocruz).

Rio de Janeiro \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável legal (quando for o caso) \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Sexo do paciente ( ) Masculino ( ) Feminino Idade \_\_\_\_\_

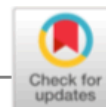
\_\_\_\_\_  
Rubrica do participante

Nome do pesquisador \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador





RESEARCH ARTICLE

# Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience

Flavia Savassi-Ribas<sup>1</sup> | Jessica G. Pereira<sup>2</sup> | Marco A. P. Horta<sup>3</sup> |  
Tereza C. S. Wagner<sup>4</sup> | Tereza A. Matuck<sup>4</sup> | Deise B. Monteiro de Carvalho<sup>4</sup> |  
Francisco C. A. Mello<sup>5</sup> | Rafael B. Varella<sup>1</sup> | Caroline C. Soares<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Biomedical Institute, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>BSL-3 Platform, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Service of Renal Transplantation, Rio de Janeiro State Center of Transplantation, São Francisco na Providência de Deus Hospital, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## Correspondence

Francisco C. A. Mello, Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil.  
Email: fcammel@ioc.fiocruz.br

Caroline C. Soares, Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil.  
Email: csoares@ioc.fiocruz.br

## Funding information

Fundação Oswaldo Cruz

## Abstract

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. In the posttransplant period, the induced immunosuppression leads to an increased risk of developing infectious diseases, a leading cause of death after kidney transplantation. Human pegivirus-1 (HPgV-1) is considered a nonpathogenic human virus and is highly frequent in individuals parenterally exposed, however, its impact on kidney transplantation outcome is poorly understood. Given the scarcity of epidemiological data for this infection on organ recipients in Brazil, we conducted a study in a single center for kidney transplantation in Rio de Janeiro, aiming to determine HPgV-1 prevalence and genotypic distribution. Serum samples from 61 renal recipients, followed up for the first year after transplantation, were evaluated for viral RNA and genotypes were determined by sequencing of the 5'-untranslated region. HPgV-1 RNA was detected in 36.1% (22/61) of patients. Genotype 2 was the most commonly found (80.9%), followed by genotypes 3 (9.5%), 1, and 5, in 4.8% each. Statistical comparisons did not reveal any significant impact of HPgV-1 in patient outcome. Further epidemiologic studies are needed to understand if immunosuppression may interfere in HPgV-1 persistence rates and if viremia might impact graft dysfunction rates in kidney recipients.

## KEYWORDS

genotype, human pegivirus-1, kidney transplantation, molecular characterization, viral persistence

## 1 | INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a global public health issue that affects approximately 120,000 people in Brazil.<sup>1</sup> Kidney transplantation is the treatment of choice for the majority of patients with CKD conferring better survival and long-term quality of life when compared to patients undergoing dialysis.<sup>2</sup> Several factors have contributed for better prognosis for patients undergoing kidney transplantation, as improvement in surgical techniques and immunosuppressive therapy. Even though modern immunosuppressive therapy has dramatically reduced the incidence of acute rejection and improved graft survival, it

is also associated with various posttransplant complications.<sup>3</sup> In developed countries, cardiovascular events are the major cause of death posttransplant, but in Brazil, the major cause of death is infection, not only during the first year but during any time after kidney transplantation.<sup>4</sup>

Human pegivirus-1 (HPgV-1, previously denominated GB virus C/hepatitis G virus) is a single-stranded RNA virus classified into genus pegivirus within the Flaviviridae family. The genomic organization of pegivirus features a 9.4-kb RNA genome, 5'- and 3'-untranslated regions (UTR), and an open-reading frame encoding for a polyprotein subsequently cleaved by proteases to produce

functional and structural proteins.<sup>5</sup> This genus was formerly divided into two species (pegivirus A and pegivirus B), but recently, its classification was revised and new species were proposed. HPgV-1 is currently classified into pegivirus C and the newly discovered HPgV-2 is classified into pegivirus H species.<sup>6</sup>

On the basis of phylogenetic analyses of 5'-UTR, E2, or complete genomic sequences, at least six genotypes of the virus have been described. Geographically, these genotypes show distinct distribution patterns. In general, genotype 1 is predominant in Africa, genotype 2 is found in Europe and America. Genotype 3 is the most common in Asia including Japan and China. Genotype 4 is predominant in Southeast Asia, and genotype 5 is only seen in South Africa and genotype 6 in Indonesia. Recently, genotype 7 was proposed with its sequences discovered in China.<sup>7,8</sup>

HPgV-1 is transmitted through parenteral, sexual, and perinatal routes. Worldwide, ~750 million people are actively infected and HPgV-1 viremia in blood donors from developed countries varies from 1% to 5%, whereas is higher in the same populational group in developing countries (up to 20%).<sup>9,10</sup> Due to shared modes of transmission, HPgV-1 viremia is highly prevalent in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C virus (HCV)-infected or parenterally exposed individuals, as hemodialysis patients or organ transplantation recipients.<sup>11</sup> HPgV-1 commonly causes persistent infection and to date it has not been shown to cause any human disease. As a commensal virus, any change in immunological status, as immunosuppression received after an organ transplantation, may shift the condition between innocuous viral resident and disease-causing pathogen. There is already evidence that complications experienced by haematopoietic stem cell transplant recipients may be modulated by the presence of commensal viruses.<sup>12</sup> The aim of this study is to determine the prevalence and genotypic distribution of HPgV-1, a nonpathogenic human virus, among kidney transplant recipients as well as evaluate its role in patient outcome.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study population

This study was carried out in one center for organ transplantation in Rio de Janeiro and included 61 patients who underwent kidney transplantation between April and August 2015. Blood samples were collected with 3-month intervals, up to 1-year period, as part of their follow up after renal transplantation. In total, 257 blood samples were submitted to molecular analyses, representing a mean of approximately four samples per patient. In two cases, only one sample was available due to the occurrence of allograft rejection before the second collection point. Data were collected from the patients' medical records. Demographic data included age (donor and receptor), sex, cause of CKD, and immunosuppressive therapy adopted. Patients were also screened for hepatitis B virus (HBV), HCV, and HIV serological markers before transplant. This study was conducted in accordance with the Declaration

of Helsinki and the protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Clementino Fraga Filho University Hospital (approval number 1.211.280/2015).

### 2.2 | Nucleic acid extraction and detection of HPgV-1 RNA

Viral RNA was extracted from 200  $\mu$ L plasma samples using High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Detection of viral RNA was performed by nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) with specific primers for partial 5'-UTR amplification. Nucleotide positions are numbered according to reference sequence U44402, as described by Jarvis et al.<sup>13</sup> Briefly, 5  $\mu$ L from extracted RNA were added to 20  $\mu$ L of a reaction mixture containing 2X reaction mix, 10  $\mu$ M of outer sense primer 108 (5'-AGGTGGTGGATGGGTGAT-3'), 10  $\mu$ M of outer antisense primer 531 (5'-TGCCACCCGCCCTCACCAGAA-3'), 1  $\mu$ L SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, and 5.5  $\mu$ L of autoclaved distilled water. One-step RT-PCR amplification consisted of a preincubation at 50°C for 20 minutes and 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles with the following incubation times and temperatures: 94°C 30 seconds, 50°C 30 seconds, and 68°C 30 seconds. For the second round, 5  $\mu$ L of first round product were added to 45  $\mu$ L of a reaction mixture containing: 1X buffer, 0.2  $\mu$ M dNTP mixture, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M of inner sense primer 134 (5'-TGGTAGGTCGTAAATCCCGGT-3'), 10  $\mu$ M of inner antisense primer 476 (5'-GGAGCTGGGTGGCCCCATGCAT-3'), 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen), and autoclaved distilled water. Amplification of a 344-bp fragment was performed under following conditions: 94°C 2 minutes, 40 cycles at 94°C 30 seconds, 60°C 30 seconds, 72°C 30 seconds, and a final extension at 72°C 5 minutes.<sup>14</sup> Ten microliters of amplification product were loaded on 2% agarose gels, electrophoresed, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

### 2.3 | Sequencing and genotyping

The 344-bp PCR product was purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) and directly sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City) according to the manufacturer's protocol. The retrieved electropherogram from both strands were analyzed and edited using MEGA 7 software<sup>15</sup> to generate consensus sequences. HPgV-1 sequences obtained were aligned with reference sequences of the seven genotypes available in GenBank. Phylogenetic analysis was performed in MEGA 7 software using the maximum-likelihood method with nucleotide substitution model GTR+G+I selected as the best fit for the input multiple sequence alignment. Bootstrap values using 1000 replicates were accessed to test and estimate the confidence of evolutionary relatedness between HPgV-1 sequences.



## 2.4 | Statistical analysis

HPgV positivity and independent risk factors were transformed into categorical variables and Fisher's exact test was used to examine possible relationships between them. Mann-Whitney test was used for nonparametric analyses.  $P < .05$  were considered significant. Statistical analyses were performed using RStudio Desktop (version 1.2.1335).

## 3 | RESULTS

We analyzed the HPgV-1 RNA presence among 257 serum samples collected from 61 kidney transplant recipients (24 females and 37 males), during the first year posttransplant. All organs but one were from deceased donors and the most common primary diseases observed were chronic glomerulonephritis (23%), systemic arterial hypertension (21.3%), and systemic arterial hypertension associated with diabetes mellitus 2 (13.1%). Table 1 shows the characteristics of the 61 patients according to their HPgV-1-RNA status. HPgV-1 was found in 36.1% (22/61) of patients, at least in one blood collection and there was no coinfection with HBV, HCV, or HIV. Statistical analysis revealed a correlation between HPgV-1 and female sex ( $P = .01$ ) but not with other demographic and clinic variables.

Detectable viral RNA was observed in all blood collections in 50% (11/22) of HPgV-1 infected individuals. Of these, one patient died after two samplings. In five renal recipients, samples comprising the whole period of follow up (12 months) were constantly viremic. For the remaining five patients which RNA HPgV-1 was detected in all samples, but blood collections were performed only for 6 months after transplantation.

Viremia was detected in, at least, one collection point for the remaining 11 subjects who tested positive. For all but one of these patients, HPgV-1 RNA was not detected in the first month posttransplantation. Viral RNA was detected in 10 patients after 3 months. Of these, one subject (ID 41) had two consecutive positive samples (months 3 and 6) and one participant (ID 9) had HPgV-1 RNA detected only in the last sample, collected after 12 months posttransplantation, suggesting a newly acquired HPgV-1 infection. Interestingly, a fluctuation in viral RNA presence was noted in one patient (ID 5), who tested positive in samples collected in months 6 and 12, with a negative sample between this interval (Table 2).

Genotypes were determined by phylogenetic analysis of the 5' UTR of HPgV-1 samples obtained from 21 of 22 positive individuals (Figure 1). Due to the low quality of the nucleotide sequencing, a sample from one individual was not suitable for performing phylogenetic analysis. Seventeen patients were infected by genotype 2, corresponding to 80.9% (17/21) of the total. Subtypes 2a and 2b were identified in 17.6% (3/17) and 76.5% (13/17) of samples, respectively. Interestingly, for one patient (ID 5) (1/17; 5.9%), both subtypes were found in different time points of blood collections. Genotype 3 was identified in two individuals (9.5%) and, finally, genotypes 1 and 5 were also identified into one (4.8%) sample each. HPgV-1 sequences

obtained here were deposited in GenBank under accession numbers: MK624940 to MK624947 and MK624949 to MK624963.

Phylogenetic analysis indicated that sequences that were classified as subtype 2a formed two separated groups (Figure 1). Subtype 2a reference sequences were from Brazil, South Africa, Europe, and USA. Sequences 5.12 and 13.1 were identical and clustered together with a previously described Brazilian sequence. The other 2a sequences, 7.2 and 24.1, were closely related to a sequence reported in Europe. The sequences obtained from kidney recipients, classified as subtype 2b, clustered together in small groups, randomly spread in the whole 2b cluster, along with sequences from Europe and USA. Two sequences were identified as genotype 3 and they clustered together with a Brazilian one, separated from Asiatic sequences from Japan and Taiwan. Here, one sequence was subscribed as HPgV-1 genotype 1 and one sequence as HPgV-1 genotype 5. This latter sequence clustered together with reference sequence from South Africa, whereas HPgV-1 genotype 1 sequence did not cluster together with reference sequences, forming a separated lineage inside genotype 1 (Figure 1).

Nucleotide sequences analyses of 19 patients with multiple collection points indicated that HPgV-1 sequence remained identical during all the evaluated periods. An identical nucleotide sequence was also observed between different recipients. Patients ID 5, ID 10, and ID 78, shared the same sequence, as well as (a) patient ID 58 and ID 99; (b) patient ID 54 and ID 76; (c) patient ID 38 and ID 40; (d) patient ID 5 and ID 13; and (e) patient ID 18 and ID 49 (Figure 1). For patient ID 10, the substitution of two nucleotides was observed between the first collection point (1 month after the transplant; ID 10.1) and the second one, 2 months later (ID 10.3). These substitutions were maintained in the subsequent three points. Patient ID 5, positive for the presence of HPgV-1 RNA in only two collection points (6 months; ID 5.6, and 12 months; ID 5.12, after transplant, with a negative result in the further points), presented HPgV-1 sequences classified in different subtypes. Sample collected 6 months after the transplant was characterized as 2b while a 12-month sample indicated infection with subtype 2a.

## 4 | DISCUSSION

Kidney transplantation is the best treatment option for patients with end-stage renal disease, improving quality of life and contributing to a better prognosis for these patients. Despite the development of more effective immunosuppressive agents had led to a significant reduction of acute rejection and improved graft survival, its administration is also associated with various posttransplant complications, such as infectious diseases.<sup>3,16</sup>

In the present study, we determined the prevalence and genotypic characteristics of HPgV-1 in kidney transplant recipients. Until now, although HPgV-1 has been considered a nonpathogenic agent, its activity reducing immune system activation has been investigated<sup>17,18</sup> and how this mechanism could impact organ transplantation outcome is still poorly understood.<sup>19-21</sup>

**TABLE 1** Baseline characteristics of kidney transplant recipients according to HPgV-1 status

	All patients (%)	HPgV-1 negative (%)	HPgV-1 positive (%)	P value <sup>a</sup>
Patients, n	61 (100)	39 (63.9)	22 (36.1)	
Age				
20-35	14 (23)	9 (64.3)	5 (35.7)	.739
36-50	31 (50.8)	21 (67.7)	10 (32.3)	
≥51	16 (26.2)	9 (56.2)	7 (43.8)	
Sex				
Male (%)	37 (60.7)	28 (75.7)	9 (24.3)	<b>.01</b>
Female (%)	24 (39.3)	11 (45.8)	13 (54.2)	
Primary disease (%)				
Chronic glomerulonephritis	14 (23)	11 (78.6)	3 (21.4)	.23
Systemic arterial hypertension	13 (21.3)	8 (61.5)	5 (38.5)	
Systemic arterial hypertension + diabetes mellitus 2	8 (13.1)	6 (75)	2 (25)	
Other <sup>b</sup>	24 (39.3)	14 (58.3)	10 (41.7)	
Unknown	2 (3.3)	...	2 (100)	
HLA match, n (%)				
0	1 (1.6)	1 (100)	0	.17
1-3	51 (83.6)	30 (58.8)	21 (41.2)	
4-6	9 (14.8)	8 (88.8)	1 (11.2)	
Induction therapy				
Thymoglobulin, n (%)	41 (67.2)	29 (70.7)	12 (29.3)	.15
Basiliximab, n (%)	20 (32.8)	10 (50)	10 (50)	
Immunosuppressive drugs, n (%)				
Tacrolimus + prednisone + mycophenolate mofetil	31 (50.8)	17 (54.8)	14 (45.2)	.18
Tacrolimus + prednisone + mTOR inhibitors	28 (45.9)	21 (75)	7 (25)	
Others	2 (3.3)	1 (50)	1 (50)	
Delayed graft function				.54
No	45 (73.8)	30 (66.7)	15 (44.3)	
Yes	16 (26.2)	9 (56.2)	7 (43.8)	
Graft dysfunction, n (%)				.09
No	36 (60.0)	20 (55.6)	16 (44.4)	
Yes	24 (40.0)	19 (79.2)	5 (20.8)	
Rejection				.77
No	43 (70.5)	28 (65.1)	15 (34.9)	
Yes	18 (29.5)	11 (61.1)	7 (38.9)	
Graft loss				.73
No	51 (83.6)	32 (62.7)	19 (37.3)	
Yes	10 (16.4)	7 (70)	3 (30)	
Receptor median age, y	44	44	43.5	.927
Donor median age, y	51	...	...	

Note: Bold value indicate statistically significant variable analyzed.

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; HPgV-1, human pegivirus-1; mTOR, mammalian target of rapamycin.

<sup>a</sup>P value from Fisher's exact test or Mann-Whitney test.

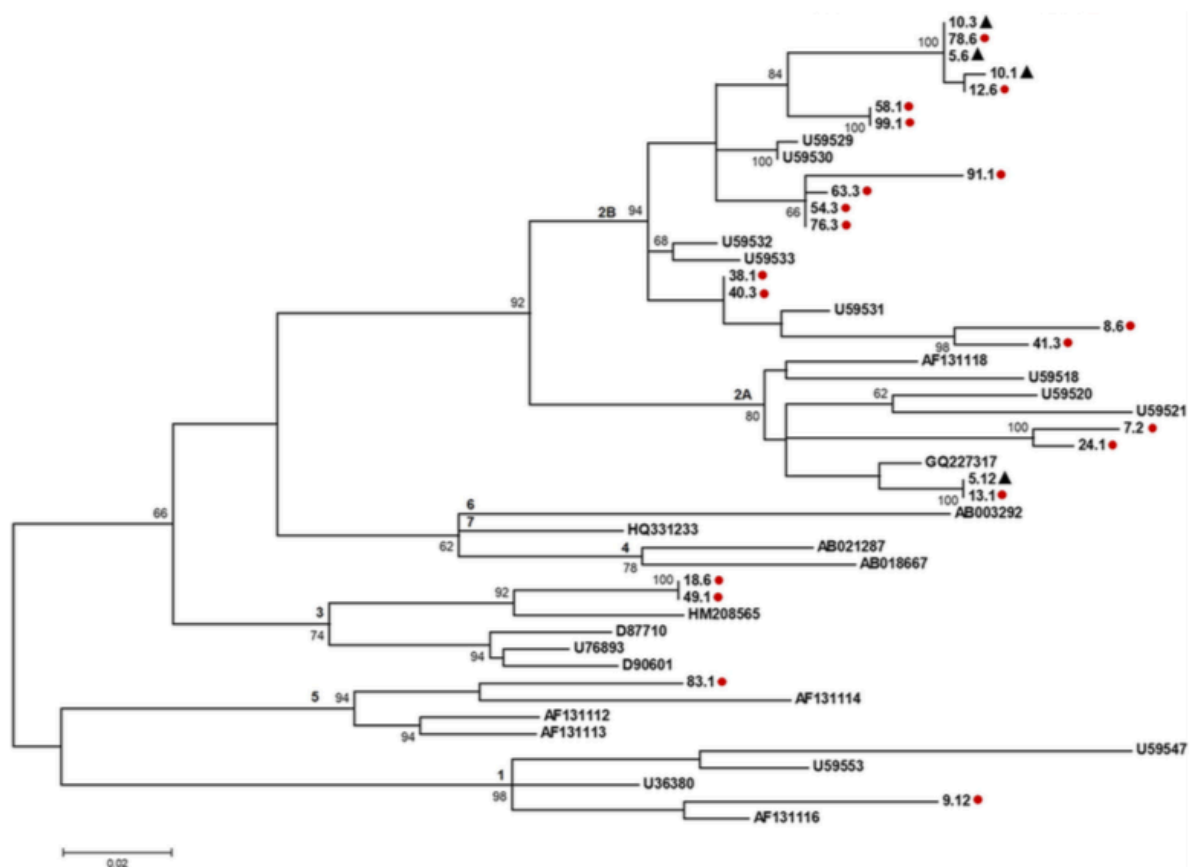
<sup>b</sup>Other primary diseases that individually account for less than 5% of cases.

**TABLE 2** HPgV-1 RNA status and viral genotyping during follow up samples of infection acquired after kidney transplantation

Patient ID	Months posttransplantation HPgV-1 RNA/genotype				
	1	3	6	9	12
5	-	-	+/2b	-	+/2a
9	-	-	-	-	+/1
12	-	-	+/2b	-	-
18	-	-	+/3	-	-
40	-	+/2b	-	NA	NA
41	-	+/2b	+/und	-	NA
54	-	+/2b	-	-	-
55	-	+/und	-	-	NA
63	-	+/2b	-	-	-
78	-	-	+/2b	-	-
99	+/2b	-	-	-	-

Abbreviations: HPgV-1, human pegivirus-1; ID, identification; NA, not available; und, undetermined.

The prevalence of HPgV-1 viremia among renal transplant patients was 36.1%, much higher than the frequency found in a previous Brazilian study, where HPgV-1 RNA was detected in 16.7% among kidney recipients.<sup>21</sup> This discrepancy might be explained by the low number of transplant patients evaluated in the former study (n = 12), different locality of the study population, and/or methodology used to perform the molecular tests. This rate was also much higher than found in studies carried on developed countries as the USA, France, and Italy, which ranged from 17% to 26%.<sup>19,22-24</sup> Regarding developing countries, HPgV-1 prevalence in renal recipients was still higher than the demonstrated here, affecting 43% individuals in Thailand,<sup>25</sup> 41.2% in South Africa,<sup>26</sup> 42% in Turkey,<sup>20</sup> and 52.9% in India.<sup>27</sup> Although HPgV-1-RNA detection by RT-PCR had targeted different genomic region (5'UTR, NS3, and NS5) in these studies, which could interfere in results due to inner sensitivity and specificity of each employed methodology, the difference in detection rates emphasizes the high prevalence of viral RNA in low-income countries, mirroring what is observed for other infectious diseases with similar modes of transmission, such as HIV and HCV.



**FIGURE 1** Maximum-likelihood phylogenetic tree of HPgV-1 5'-UTR sequences of kidney transplantation patients along with international sequences representing all known genotypes presented by numbers above each separated clade. Samples of patients with the identical nucleotide sequences in all collection points are marked with a red circle. Two patients (ID 5 and ID 10) that presented differences in nucleotide sequences are marked with a black triangle. 5'-UTR, untranslated region; HPgV-1, human pegivirus-1; ID, identification [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

There was no statistical association between HPgV-1 viremia and age, primary disease, human leukocyte antigen match, induction therapy, immunosuppressive drugs, rejection, and graft loss events. However, for graft dysfunction, a *P* value very close to the cut off for statistical significance was observed when testing the association with HPgV-1 infection. Further analysis with a larger sampling size might shed a light if the presence of HPgV-1 would be a negative factor for graft dysfunction. As expected, we confirmed the high frequency of chronic glomerulonephritis systemic arterial hypertension and diabetes mellitus 2 considered the most common comorbidities associated with the development of kidney dysfunction.<sup>28,29</sup> Statistical comparisons between HPgV-1 RNA positive and negative groups indicated that HPgV-1 infection in women was more frequent than in men (*P* = .01), a result previously reported in a cohort of patients with end-stage renal disease in the USA,<sup>24</sup> an association that might be further investigated to suggest a plausible explanation.

In this cohort, 50% (11/22) of seropositive participants were persistently viremic up to 1 year after transplantation, an unexpected result, since it is estimated that HPgV-1 infection persists in approximately 25% of infected individuals and 75% to 80% are able to clear viremia up to 2 years of infection.<sup>18</sup> On the basis of this information, at least for our 1-year follow-up research, immunosuppressive status posttransplantation might have interfered in viral clearance or persistence among renal transplant recipients. We observed newly acquired infections in 50% of HPgV-1 positive individuals and 45.5% (10/22) of them cleared the virus a few months after infection. This fast clearance was also observed in a cohort of men who have sex with men followed up for 1 year<sup>30</sup> and in recipients of HPgV-1-positive blood, also followed for 1 year after transfusion.<sup>31</sup> One patient (4.5%) infection was detected in the last blood collection, 12 months after transplantation, preventing us to observe whether HPgV-1 infection would persist or suppressed.

In Brazil, few studies have evaluated the circulating genotypes of HPgV-1 and the main studied population was blood donors and HIV-infected individuals. Genotypes 1, 2, and 3 were commonly found, but strains from genotype 2 and its subtypes (2a and 2b) constituted the majority and most widely spread in Brazil, ranging from 72% to 98% of sequenced samples.<sup>14,21,32-38</sup> Our results demonstrate the high prevalence of genotype 2 among kidney recipients in Rio de Janeiro, identified in 80.9% of cases; followed by 9.5% of genotype 3% and 4.8% of genotypes 1 and 5 each. As in previous studies performed in Brazil, subtype 2b was the most prevalent, identified into 76.5% (13/17) of genotype 2 HPgV-1-infected patients. Interestingly, in one patient (ID 5), both subtypes 2a and 2b were found in different points of follow up, with a 6-month interval between blood collections and a negative result during this interval. This may reflect a case of clearance of infection and reinfection, but, unfortunately, the lack of demographic data to support multiple episodes of exposition to HPgV-1 in this individual prevented us to further discuss this fact.

Interestingly, we found one patient infected by HPgV-1 genotype 5. Genotype 5 circulates within central and southern Africa and here we

report the first detection of this genotype in Brazil. Further investigation and analysis of a larger genomic fragment might elucidate possible routes of dissemination and entrance of HPgV-1 genotype 5 in Brazil.

Substitutions in nucleotide sequences between different collection points were only observed in one patient (ID 10). In this case, two transition between purines (in positions A318G and G453A, according to the reference sequence U44402) occurred between the first and second collection. These substitutions were maintained in the subsequent three points. This result is in accordance with a previous study analyzing genetic diversity of 5'-UTR region that indicated transitions of one or two nucleotides as the most common substitutions observed in the noncoding genomic sequence.<sup>39</sup> The high similarity observed among HPgV-1 sequences infecting different patients and its stability over collection points could be explained by the characteristics of the genomic region analyzed. The choice of the analysis fragment (5'-UTR) was based on the availability of international sequences to enable a proper comparison with the Brazilian sequences. Nonetheless, the short length of the amplified fragment was not informative enough to support a likely chain of transmission between the organ recipients who attended this transplantation center.

In this study, we investigated the frequency of HPgV-1 infection in renal transplant recipients and, despite the high prevalence of viremia found, no significant impact in patient outcome was observed. We observed a high rate of persistence among positive individuals. Larger epidemiologic studies are needed to elucidate whether immunosuppression induced after organ transplantations may increase persistence rates. Viral infections may have an impact on allograft function and may contribute to the risk of rejection, especially considering the current era of potent immunosuppression protocols before and after kidney transplantation. To reduce the risk of such infections, even those viruses considered as nonpathogenic in healthy hosts should be evaluated when monitoring patient outcomes after organ transplantation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the DNA Sequencing Platform FIOCRUZ for performing nucleotide sequencing. This study was supported by the Oswaldo Cruz Institute—Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ—Brazil.

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design: RBV and CCS; data curation: RBV; data analysis: MAPH, FCAM, and CCS; data collection: TCSW, TAM, and DBMC; methodology: FS-R and JGP; project administration: CCS; and writing—original draft: FCAM and CCS. All authors read and approved the manuscript.

#### ORCID

Francisco C. A. Mello  <http://orcid.org/0000-0003-4561-4332>

Rafael B. Varela  <http://orcid.org/0000-0002-1698-5989>



## REFERENCES

- Sesso RC, Lopes AA, Thome FS, Lugon JR, Martins CT. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. *J Bras Nefrol.* 2017;39(3):261-266. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170049>
- Nga HS, Andrade LGM, Contti MM, Valiatti MF, Silva MM, Takase HM. Evaluation of the 1000 renal transplants carried out at the University Hospital of the Botucatu Medical School (HCFMB)—UNESP and their evolution over the years. *J Bras Nefrol.* 2018;40(2):162-169. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-3871>
- Masutani K. Viral infections directly involved in kidney allograft function. *Nephrology (Carlton).* 2018;23(suppl 2):31-37. <https://doi.org/10.1111/nep.13285>
- de Castro Rodrigues Ferreira F, Cristelli MP, Paula MI, et al. Infectious complications as the leading cause of death after kidney transplantation: analysis of more than 10,000 transplants from a single center. *J Nephrol.* 2017;30(4):601-606. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0379-9>
- Vitrenko Y, Kostenko I, Kulebyakina K, Sorochynska K. Prevalence of human pegivirus-1 and sequence variability of its E2 glycoprotein estimated from screening donors of fetal stem cell-containing material. *Viral J.* 2017;14(1):167. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0837-y>
- Smith DB, Becher P, Bukh J, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera hepacivirus and pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol.* 2016;97(11):2894-2907. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000612>
- Jordier F, Deligny ML, Barré R, et al. Human pegivirus isolates characterized by deep sequencing from hepatitis C virus-RNA and human immunodeficiency virus-RNA-positive blood donations, France. *J Med Virol.* 2019;91(1):38-44. <https://doi.org/10.1002/jmv.25290>
- Feng Y, Zhao W, Feng Y, et al. A novel genotype of GB virus C: its identification and predominance among injecting drug users in Yunnan, China. *PLoS One.* 2011;6(10):e21151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021151>
- Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat.* 2009;16(11):757-768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01194.x>
- Jögeda EL, Huik K, Pauskar M, et al. Prevalence and genotypes of GBV-C and its associations with HIV infection among persons who inject drugs in Eastern Europe. *J Med Virol.* 2017;89(4):632-638. <https://doi.org/10.1002/jmv.24683>
- Stapleton JT, Martinson JA, Klinzman D, Xiang J, Desai SN, Landay A. GB virus C infection and B-cell, natural killer cell, and monocyte activation markers in HIV-infected individuals. *AIDS.* 2013;27(11):1829-1832. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328363089f>
- Vu DL, Cordey S, Simonetta F, et al. Human pegivirus persistence in human blood virome after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(2):225-232. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.004>
- Jarvis L, Davidson F, Hanley J, Yap P, Ludlam C, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet.* 1996;348(9038):1352-1355. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)04041-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)04041-x)
- Giret MTM, Miraglia JL, Sucupira MCA, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018407>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Aloufi M, Alzahrany G, Abdulmajeed N, et al. Viral infections after kidney transplantation in a cohort of children: a retrospective single-center study. *Transplant Proc.* 2019;51(2):522-525. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.01.010>
- Gajurel K, Stapleton JT. Hepatitis viruses in kidney transplantation. *Semin Nephrol.* 2016;36(5):386-396. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.05.015>
- Chivero ET, Stapleton JT. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. *J Gen Virol.* 2015;96(pt 7):1521-1532. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000086>
- De Filippi F, Lampertico P, Soffredini R, et al. High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Dig Liver Dis.* 2001;33(6):477-479.
- Erensoy S, Zeytinoğlu A, Göksel S, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection among renal transplant recipients in Izmir, Turkey: molecular analysis of phylogenetic groups. *Int J Infect Dis.* 2002;6(3):242-243.
- Ramos Filho R, Carneiro MA, Teles SA, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(6):639-643. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600019>
- Isaacson AH, Bhardwaj B, Qian K, et al. Hepatitis G virus infection in renal transplant recipients. *J Viral Hepat.* 1999;6(2):151-160.
- Berthoux P, Dejean C, Cecillon S, Batié M, Berthoux F. High prevalence of hepatitis G virus (HGV) infection in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(11):2909-2913.
- Murthy BVR, Scott Muerhoff A, Desai SM, et al. Predictors of GBV-C infection among patients referred for renal transplantation. *Kidney Int.* 1998;53(6):1769-1774. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00910.x>
- Raengsakulrach B, Ong-aj-yooth L, Thaiprasert T, et al. High prevalence of hepatitis G viremia among kidney transplant patients in Thailand. *J Med Virol.* 1997;53(2):162-166.
- Casteling A, Song E, Sim J, et al. GB virus C prevalence in blood donors and high risk groups for parenterally transmitted agents from Gauteng, South Africa. *J Med Virol.* 1998;55(2):103-108.
- Abraham P, John GT, Raghuraman S, et al. GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections among high risk renal transplant recipients in India. *J Clin Virol.* 2003;28(1):59-69.
- Siviero P, Machado C, Cherchiglia M, Drumond E. Insuficiência renal crônica e as causas múltiplas de morte: uma análise descritiva para o Brasil, 2000 a 2004. *Cad Saude Coletiva.* 2014;22(4):372-379.
- Peres LAB, Biela R, Herrmann M, et al. Estudo epidemiológico da doença renal crônica terminal no oeste do Paraná. Uma experiência de 878 casos atendidos em 25 anos. *Braz J Nephrol.* 2010;32(6):51-56.
- Stark K, Doering CD, Bienzle U, et al. Risk and clearance of GB virus C/hepatitis G virus infection in homosexual men: a longitudinal study. *J Med Virol.* 1999;59(3):303-306.
- Sauleda S, Esteban JI, Hernandez JM, et al. Evaluation of RNA and E2 antibodies in prospectively followed recipients of hepatitis G virus-infected blood. *Transfusion.* 1999;39(6):633-638.
- Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocêncio L, Fonseca LAM, Duarte AJS. Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Res.* 2010;151(2):148-152. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.04.008>
- Slavov SN, Silveira RM, Rodrigues ES, et al. Human pegivirus-1 (HPgV-1, GBV-C) RNA prevalence and genotype diversity among volunteer blood donors from an intra-hospital hemotherapy service in Southern Brazil. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(2):174-178. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.01.002>
- Da Mota LD, Finger-Jardim F, Silva CM, et al. High prevalence and autochthonous transmission of human pegivirus (HPgV-1) in blood donors in the extreme southern of Brazil. *J Med Virol.* 2019;91(1):31-37. <https://doi.org/10.1002/jmv.25291>
- Oliveira LA, Martins RM, Carneiro MA, et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):953-957.
- Lyra AC, Pinho JRR, Silva LK, et al. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(5):767-775. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000500015>

37. Nishiya AS, Ribeiro-Dos-Santos G, Bassit L, Focaccia R, Chamone DF, Sabino EC. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(4):213-216.
38. Levi JE, Contri DG, Lima LP, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(2):75-78.
39. Shao L, Shinzawa H, Zhang X, et al. Diversity of hepatitis G virus within a single infected individual. *Virus Genes*. 2000;21(3):215-221.

**How to cite this article:** Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol*. 2020;1-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.25764>