



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE LA
COINFECCIÓN POR PEGIVIRUS HUMANO Y VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
GIBRAN HOREMHEB RUBIO QUINTANARES**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. GUILLERMO MIGUEL RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**COMITÉ TUTOR
DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CD. MX., NOVIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES	7
Interacciones Virales	9
Interferencia Viral	14
HPgV	15
Descubrimiento	15
Epidemiología y Patogénesis	16
Genoma y clasificación filogenética	19
Mecanismos de control de la infección por VIH y su interacción con HPgV.....	23
Ciclo de replicación de VIH	25
Historia natural de la infección por VIH.....	32
Fallas en el Tratamiento Antirretroviral	35
CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS.....	39
CAPITULO II. Prevalencia y comportamiento de la infección activa de HPgV en México	41
METODOLOGÍA	41
Población de estudio y colección de muestras	41
Agrupación de las muestras de suero en conjuntos (<i>pools</i>) y extracción de ácidos nucleicos	43
Detección, Cuantificación y Genotipificación de HPgV.....	44
Análisis de los niveles de carga viral de HPgV y su distribución poblacional.	48
RESULTADOS	49
Viremia, carga viral y Genotipificación de HPgV.	49
Comportamiento de la carga viral de HPgV	53
DISCUSIÓN.....	56
CAPITULO III. Caracterización de los efectos de la interacción HPgV-hospedero-VIH	58
METODOLOGÍA	58
Cuantificación de VIH, cuenta de células T CD4⁺, Relación CD4⁺/CD8⁺ y cálculo de tiempo de infección por VIH.	58
Efecto del genotipo de HPgV en los marcadores de progresión de la infección por VIH y la carga viral de HPgV.....	60

Efecto de la carga viral de HPgV en los marcadores de progresión de la infección por VIH.	60
Cambios en la expresión génica causados por HPgV durante la infección por VIH (ensayo ex vivo).	61
RESULTADOS	64
Caracterización de la interacción HPgV-VIH-Hospedero en pacientes coinfectados.	64
Efecto de la carga viral de HPgV en los marcadores de progresión de VIH.	65
Cambios en la expresión génica causados por HPgV durante la infección por VIH (ensayo ex vivo).	76
DISCUSIÓN.....	78
CAPITULO IV. Desarrollo de modelo in vitro para estudios de interacción HPgV-hospedero-VIH	80
METODOLOGÍA	80
Desarrollo de herramientas para la determinación de la capacidad de coinfección celular.	80
Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la interacción HPgV- hospedero-VIH.	83
RESULTADOS	85
Caracterización del nivel al que ocurre la coinfección entre HPgV y VIH.	85
Desarrollo de un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la interacción HPgV- hospedero-VIH.	90
DISCUSIÓN.....	93
CAPITULO V. Conclusiones	95
PROSPECCIÓN	96
REFERENCIAS.....	98
ANEXO	107

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Nacho e Irma, por haber confiado siempre y apoyarme en todo sentido en cualquier empresa que deseara iniciar.

A Gioco, mi compañera, mi camarada, mi Genossin, por siempre creer en mí y acompañarme en esta travesía llamada vida con el objetivo común de cambiar el mundo.

¡Se que lo lograremos!

A mis hermanos, Sinuhé y Alex por su incondicional apoyo. A Alex González, por la convivencia y apoyo estos años.

Al Dr. Ruiz Palacios, por haber confiado en un estudiante de medicina con una idea loca y apoyarme siempre en el desarrollo de este y otros proyectos.

Al Dr. Kershenobich, por apoyarme durante esta travesía y creer en mi desde el principio.

A la Dra. Patricia Ostrosky, por siempre estar ahí para darme consejos, escuchar y apoyarme en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Remus, por su paciencia y apoyo en la escritura de todos mis trabajos.

A la Dra. Luz Elena, por su amistad y enseñanzas.

Especialmente a Pilar Ramos, por su amistad, enseñanzas y apoyo.

A Fernando Ledesma, por su amistad, compadrazgo, confianza y enseñanzas.

A Fernando Arteaga y Miriam Arciniega, por su amistad, apoyo y confianza.

Al personal del laboratorio de infectología por aguantarme, enseñarme y ofrecerme su amistad.

A Pez Beta Design, por su colaboración en el diseño de las ilustraciones de este trabajo.

RESUMEN

La coinfección entre el Pegivirus Humano (HPgV) y el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) ha sido de interés médico y científico debido a que prolonga el tiempo para desarrollar SIDA. La mayoría de los estudios de esta coinfección se han enfocado en la determinación de la prevalencia y el desenlace de los pacientes coinfectados. Pocos estudios, han intentado descifrar los mecanismos que provocan este fenómeno benéfico para los pacientes, debido principalmente a la falta de herramientas, por lo que aún existen lagunas en el conocimiento de este tema.

El presente trabajo es pionero en estos estudios en México y comprende los primeros pasos de un esfuerzo para caracterizar los mecanismos que provocan los efectos benéficos de la coinfección HPgV/VIH en los pacientes. Nuestra hipótesis es que HPgV y VIH modifican la expresión génica del hospedero, compitiendo en el establecimiento de un ambiente favorable para la replicación de cada uno de ellos. El enfoque para demostrar nuestra hipótesis comprende 3 fases. 1) Determinar la prevalencia y el comportamiento de la infección activa por HPgV en mono infección y coinfección con VIH, 2) Caracterizar los efectos de la interacción HPgV-hospedero-VIH, 3) Desarrollar un modelo *in vitro* para el estudio de las interacciones HPgV-hospedero-VIH.

Resultado de nuestro estudio encontramos que, tanto la mono infección como la coinfección de HPgV con VIH presentan en nuestro país prevalencias similares a las reportadas en otros países. Contrario a otros países, donde un solo genotipo se encuentra presente en más del 90% de la población con infección por HPgV, en México encontramos alta prevalencia de dos genotipos circulantes de HPgV, el genotipo 2 y el 3. Detectamos una distribución bimodal de la carga viral de HPgV en las poblaciones estudiadas, dividiendo a los donadores y pacientes en dos grupos, uno con cargas virales bajas y otras altas. Esta división se estableció al encontrar un punto de corte constante independiente del genotipo de HPgV y la infección por VIH.

Para nuestro segundo objetivo, encontramos que el comportamiento bimodal de la carga viral de HPgV, tiene relación con el establecimiento y aumento del efecto benéfico de la coinfección, observando menores cargas virales de VIH y mayores CD4⁺ en los pacientes coinfectados con cargas virales altas de HPgV. En relación al genotipo, si bien ambos genotipos circulantes causaban el efecto benéfico en los pacientes durante la coinfección, los marcadores de progresión de VIH que reflejan este efecto benéfico son diferentes para cada genotipo. Para completar este objetivo, realizamos un estudio piloto exploratorio, en el cual estudiamos las diferencias en la expresión génica entre células mononucleares de sangre periférica de pacientes HPgV positivos y negativos en respuesta a la infección *ex vivo* por VIH, encontrando diferencias importantes en genes represores de la replicación de VIH y un perfil inmune de tipo Th1.

Finalmente, desarrollamos las herramientas necesarias para la detección de HPgV y VIH. Estas herramientas nos permitieron determinar la posibilidad de coinfección en la misma célula; después estudiamos las causas probables para que HPgV no se pueda replicar *in vitro*, lo que derivó en el diseño y desarrollo de un virus quimérico, formado en su mayoría por genes de HPgV capaz de cultivarse *in vitro*.

En conclusión, la coinfección HPgV/VIH y el establecimiento de sus efectos benéficos, son un fenómeno multifactorial mediado principalmente por las modificaciones en la expresión génica del hospedero. Aunque es necesario realizar estudios más profundos de expresión génica en los pacientes coinfectados, este trabajo creo las herramientas necesarias y señalo el camino a seguir para entender el fenómeno de la coinfección HPgV/VIH y su relación con el hospedero.

SUMMARY

Coinfection between Human Pegivirus (HPgV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) has been of medical and scientific interest because it prolongs the time to develop AIDS. Most studies of this co-infection have focused on determining the prevalence and outcome of coinfecting patients. Few studies have attempted to decipher the mechanisms that cause this beneficial phenomenon for patients, mainly due to the lack of tools, so there are still gaps in the knowledge of this subject. The present work is a pioneer in these studies in Mexico and includes the first steps of an effort to characterize the mechanisms that cause the beneficial effects of HPgV / HIV coinfection in patients.

Our hypothesis is that HPgV and HIV modify the gene expression of the host, competing in the establishment of a favorable environment for the replication of each of virus. The approach to demonstrate our hypothesis comprises 3 phases. 1) Determine the prevalence and behavior of active HPgV infection in monoinfection and coinfection with HIV, 2) Characterize the effects of the HPgV-host-HIV interaction, 3) Develop an *in vitro* model for the study of HPgV-interactions with the Host and HIV. As a result of our study, we found that the prevalence of both monoinfection and coinfection of HPgV with HIV in our country is similar to that reported in other countries.

Contrary to other countries, where only one genotype is present in more than 90% of the population with HPgV infection, in Mexico we found a high prevalence of two circulating HPgV genotypes, genotype 2 and 3. We detected a bimodal distribution of the viral load of HPgV in the populations studied, dividing the donors and patients into two groups, one with low viral loads and other high ones. The division was established by finding a constant cut-off point independent of HPGV genotype and HIV infection. For our second objective, we found that the bimodal behavior of the viral load of HPgV is related to the establishment and increase of the beneficial effect of coinfection, observing lower viral loads of HIV and higher CD4⁺ in patients coinfecting with high viral loads of HPgV.

Regarding the genotype, although both circulating genotypes caused the beneficial effect in patients during coinfection, and the markers of HIV progression that reflect this beneficial effect are different for each genotype. To complete this objective, we conducted an exploratory pilot study, in which we studied the differences in gene expression between peripheral blood mononuclear from HPgV positive and negative patients in response to HIV *ex vivo* infection, finding important differences in gene repressor genes. HIV replication and a Th1 type immune profile.

Finally, we developed the necessary tools for the detection of HPgV and HIV. These tools allowed us to determine the possibility of coinfection in the same cell; then we studied the probable causes for HPgV not being able to replicate *in vitro*, which led to the design and development of a chimeric virus, consisting mostly of HPgV genes capable of being cultured *in vitro*.

In conclusion, the HPgV / HIV coinfection and the establishment of its beneficial effects are a multifactorial phenomenon mediated mainly by modifications in the host gene expression. Although it is necessary to perform deeper studies of gene expression in co-infected patients, this work created the necessary tools and pointed the way forward to understand the phenomenon of HIV / HIV coinfection and its relationship with the host.

I. INTRODUCCIÓN

Durante el curso de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el 30% de los pacientes en promedio adquiere coinfección con el Pegivirus Human (HPgV). Esta coinfección ocasiona cambios en el curso normal de la infección por VIH, provocando una disminución de la carga viral de VIH, aumento en la cuenta de células T CD4⁺ y mayor supervivencia en estos pacientes, incluso sin tratamiento. Sin embargo, no todos los estudios en relación con esta coinfección han logrado encontrar estos efectos [1].

Debido a la importancia de los efectos de la coinfección HPgV/VIH, diversas investigaciones se han enfocado en esclarecer los mecanismos subyacentes a estos efectos, sin lograr aún determinar dichos mecanismos [2,3]. Las complicaciones para estos estudios han sido principalmente: el seguimiento de pacientes, el tamaño de muestra y la falta de un modelo de estudio idóneo.

Este trabajo tiene como objetivo contribuir al entendimiento de la infección por HPgV y la coinfección con VIH, así como generar las herramientas y establecer la ruta de investigación para finalmente descifrar los mecanismos de control de la infección de VIH mediante la infección por HPgV.

Para lograr nuestro objetivo planteamos, 1) determinar la prevalencia y el desarrollo de la infección activa por HPgV en monoinfección y coinfección con VIH, 2) Caracterizar los efectos de la interacción HPgV-Hospedero-VIH, y finalmente 3) Desarrollar un modelo *in vitro* que permita el estudio de las interacciones HPgV-Hospedero-VIH.

II. ANTECEDENTES

Los virus son microorganismos que carecen de la capacidad para reproducirse por sí solos, por lo que, para completar su ciclo de replicación viral, infectan organismos (hospederos) y utilizan los procesos celulares para producir nuevas partículas virales. Todos los organismos vivos son susceptibles de ser infectados por una o más cepas de virus; la infección simultánea por dos o más tipos virales se denomina coinfección [4].

En los organismos pluricelulares, incluido el ser humano, las coinfecciones virales pueden ocurrir a nivel de organismo, tejido o célula. Los virus coinfectantes interactúan entre sí de dos formas: 1) **Indirecta**: cuando los cambios del hospedero en respuesta a la infección por uno de los virus afectan a otro virus. Estas interacciones son mediadas principalmente por respuestas del sistema inmune, y son comunes en coinfecciones a nivel del organismo, es decir en diferentes sistemas y tejidos, aunque pueden ocurrir también a nivel tisular como ocurre en la coinfección por los virus de hepatitis C y B. 2) **Directa**: generalmente son coinfecciones a nivel celular. El resultado de la interacción directa comúnmente es la eliminación de uno de los virus y la subsistencia del otro, debido a que ambos utilizan los mismos componentes celulares para replicarse [5].

Existe una gran variedad de virus que infectan al ser humano, y la relevancia de cada uno, en términos de la salud humana, reside en su capacidad para producir epidemias y la muerte. El virus de inmunodeficiencia humana (VIH), desde su aparición como epidemia a principios de los años 80, cobró rápidamente relevancia al convertirse en pandemia, causando hasta 2017 la muerte de 35.4 millones de personas en el mundo [6], y 4,630 en México hasta 2016 [7]. En 2017 existían 36.9 millones de personas infectadas por este virus en el mundo [6]; 195,194 de éstas en México [7].

La infección por el VIH es permanente en el ser humano y causa el Síndrome de

Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que se caracteriza por una disminución de la capacidad inmunológica del paciente dejándolo susceptible a coinfecciones. Cuando un paciente con VIH o SIDA es coinfectado por otro microorganismo ocurre en el paciente un deterioro acelerado y finalmente la muerte. Sin embargo, en el caso de coinfección entre VIH y otro virus denominado pegivirus humano (HPgV), generalmente ocurre una evolución más lenta del paciente hacia SIDA, manteniendo su estado inmunológico en mejores niveles y mejorando su esperanza y calidad de vida [8].

El HPgV es un flavivirus, ocasiona infecciones asintomáticas y persistentes, y tiene una alta tasa de infección activa en el ser humano sano, entre 1 y 5%, mientras que entre 20 y 40% de los pacientes VIH positivos presentan coinfección con HPgV. Existen diversos estudios que han asociado a la coinfección con HPgV con efectos benéficos durante la infección por VIH. Sin embargo, persisten discrepancias sobre estos efectos [1]. Caracterizar la infección por HPgV y sus implicaciones en coinfección con VIH podría permitir el desarrollo de mejores opciones terapéuticas y profilácticas en el combate a la infección por VIH y la enfermedad que éste ocasiona.

En México no existen reportes acerca del comportamiento de la infección por HPgV y de su relación con VIH. El trabajo presentado en esta tesis pretende esclarecer la situación de la infección por HPgV en nuestro país, tomando como base la región centro – occidente de México, al tiempo de contribuir al entendimiento de las interacciones entre el hospedero y la coinfección por HPgV y VIH. Para lograrlo fue necesario implementar la metodología de detección del virus HPgV y recolectar muestras de pacientes con infección por VIH y de donadores de sangre sanos para caracterizar el comportamiento epidemiológico de la infección por HPgV en ambos tipos de población, así como caracterizar los efectos de la infección por HPgV en los pacientes VIH positivos.

Estudiar la interacción de VIH-Hospedero-HPgV a nivel celular ha sido poco factible debido

a la dificultad de cultivar HPgV *in vitro*, a la ausencia de modelos animales para el estudio de esta coinfección y al desconocimiento de la célula blanco de HPgV. Debido a lo anterior, parte de este trabajo se enfocó en crear las herramientas necesarias para el estudio de esta coinfección *in vitro* mediante la construcción y cultivo de un virus recombinante basado en la secuencia del genoma de HPgV.

Interacciones Virales

Los virus son material genético rodeado de una envoltura proteica o lipídica. La función de los virus al igual que la del resto de los organismos es asegurar su supervivencia. Una gran diferencia entre los virus y el resto de los organismos es que los virus utilizan la maquinaria reproductiva de las células de otro organismo para poder replicarse.

La replicación viral, es el proceso mediante el cual una partícula viral introduce su información genética en las células de un hospedero capaz de leer y decodificar las instrucciones de esta información y producir nuevas partículas virales a partir de ésta [4].

Los virus co-evolucionan con su hospedero, y la presión selectiva conlleva a diferentes tipos de interacciones. Sin embargo, no sólo existen relaciones entre virus y hospedero, sino que los virus son capaces de tener interacción con otros virus. Este tipo de interacciones pueden clasificarse en [5]:

Interacciones directas [5]. Éstas ocurren cuando de forma directa genes o productos de estos genes interactúan con otro virus. Se conocen 6 tipos:

- **Virus dependiente de virus.** Ocurre cuando un virus no puede completar su ciclo de replicación ya que tiene algún defecto en su información y necesita de otro virus co-infectando la misma célula para completar su ciclo de replicación; generalmente la parte faltante corresponde a proteínas estructurales que toman del virus co-infectante. Este tipo de interacciones pueden ser unidireccionales o bidireccionales, es decir, un solo virus se

beneficia y el otro es incapaz de completar su proceso de replicación, o ambos virus completan su proceso y producen partículas virales infectantes. Un ejemplo de esta dependencia viral se encuentra en los virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) que requiere la coinfección con un adenovirus o herpesvirus para replicarse.

- **Pseudotipos virales.** Ocurre cuando dos virus coinfectan la misma célula y como resultado se dan combinaciones en las que partes de un virus se ensamblan con las de otro; por ejemplo, el genoma de uno con las proteínas de envoltura del otro. Puede ocurrir que se generen pseudotipos virales de ambos o sólo de uno de los virus. La diferencia con el tipo anterior es que en este caso ambos virus pueden replicarse de forma independiente. Por ejemplo, la coinfección del virus del herpes simple de tipo 1 con VIH o HTLV-1 produce viriones pseudotipo de HIV o HTLV-1.

- **Exclusión por super-infección.** Cuando dos virus coinfectan una célula y, posterior al inicio de la coinfección, la producción de uno de los dos virus se ve dramáticamente disminuida. Los mecanismos de este fenómeno no están claros; sin embargo, algunos estudios muestran que es producida por interacción directa de los productos virales de la primera infección con la segunda. Ocurre sobre todo en virus con grandes similitudes, como en el caso de la acumulación de los componentes de la nucleocápside del virus de la enfermedad de Borna (BDV) en el citoplasma de la célula, lo que previene una infección posterior de una cepa BDV diferente.

- **Recombinación genética.** La coinfección con dos o más cepas virales de la misma especie, puede dar lugar a la recombinación de material genético dando lugar a viriones recombinantes de los virus parentales, alterando en algunas ocasiones la virulencia, capacidad de escape a la respuesta inmune o resistencia a medicamentos, como en el caso de la recombinación entre los virus atenuados de poliovirus de la cepa vacunal y cepas virulentas de enterovirus salvaje que generaron cepas de poliovirus virulentos y casos semejantes a polio.

- **Incrustación viral.** Similar a la anterior, significa anexar genes que no son propios y provienen de otro virus. La diferencia es que en el caso anterior deben existir similitud y homología entre los virus donantes y los virus receptores, mientras que en este caso se trata de retrovirus que anexan partes del genoma de otros virus al suyo, confiriéndoles características nuevas que pueden facilitar la evasión del sistema inmunológico o ampliar el espectro de células susceptibles a su infección. Por ejemplo, el virus de reticuloendoteliosis se encuentra incrustado en el genoma del virus de la viruela aviar, lo que le permite tener una ruta alternativa de transmisión y entrada a los hospederos.
- **Transactivación heteróloga.** Se refiere a la activación de genes de un virus por proteínas de otro. Generalmente estas proteínas actúan como promotores, provocando aumento en la replicación del otro virus. La coinfección del virus de Epstein-Barr (VEB) y virus de la hepatitis C (VHC) produce una producción de VHC significativamente mayor que la infección de VHC sola debido a la activación transcripcional directa por la proteína EBNA1 (antígeno nuclear codificado por VEB-1)

Interacciones indirectas [5]. Las infecciones virales pueden provocar cambios patogénicos en el hospedero que, durante coinfecciones, generalmente agravan la enfermedad. Estos cambios pueden afectar a su vez al virus coinfectante de forma indirecta a través de las modificaciones al hospedero. Se han reportado 5 tipos de interacciones indirectas entre virus:

- **Transactivación indirecta de genes virales heterólogos.** Es la activación por un virus, de factores transcripcionales celulares que actúan como promotores de la transcripción de virus coinfectantes. La infección por el virus del herpes humano 6 (HHV-6) de células infectadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) provoca la transactivación del gen BZLF1 de EBV, pero la transactivación parece estar mediada por factores de transcripción celular en el promotor EBV.

- **Susceptibilidad alterada del hospedero por disminución de sus barreras físicas.** Este fenómeno ocurre cuando durante las infecciones virales ocurren efectos citopáticos que terminan dañando los tejidos permitiendo a un segundo virus infectar tejidos a los que normalmente no tendría acceso. Pacientes infectados con virus del herpes simple 1 o 2 (HSV-1 o 2) tienen una mayor susceptibilidad para la adquisición del VIH, y una mayor posibilidad de transmisión del VIH a otras personas debido a la capacidad de HSV-2 para causar lesiones abiertas en la piel y reclutar células T CD4⁺ en los sitios de estas lesiones provocando que haya más células hospedadoras disponibles.

- **Susceptibilidad alterada del hospedero por expresión alterada de receptores.** La infectividad de un virus depende entre otros factores, como la densidad de receptores celulares para su ingreso. Algunas infecciones virales pueden modificar la expresión de esos receptores haciendo al hospedero más susceptible a otros virus. Por ejemplo, el virus del herpes humano 7 (HHV7) es un virus T-linfotrófico que utiliza CD4 como receptor al igual que VIH. En un huésped infectado primero con VIH o HHV 7, la expresión de CD4 en las células T se regula a la baja, lo que disminuye la propagación de una infección posterior por el otro virus

- **Activación heteróloga de profármacos.** Para que algunos fármacos tengan efecto, la formulación, que generalmente es un profármaco, debe ser metabolizado por el organismo para transformarlo en el fármaco activo. Aciclovir es un antiviral para el virus del Herpes, que en células que presentan coinfección entre virus del herpes y VIH es capaz de inhibir ambos. Este fenómeno no ocurre en monoinfección por VIH.

- **Modificación del estado antiviral inducido por interferón.** La producción de interferón lleva al hospedero a un estado antiviral; al ser parte de la inmunidad innata, no es específica para un tipo de virus, por lo que una infección viral que desencadene esta respuesta puede inhibir otras infecciones virales. Por ejemplo el estado antiviral de células infectadas con virus de herpes simple puede ser revertido por coinfección de éstas células

con el poliomavirus SV40 o citomegalovirus humano

Interacciones inmunológicas [5]. Ocurren sólo en organismos capaces de generar respuesta inmune adaptativa y, si bien estas interacciones inmunológicas corresponden a las interacciones virales indirectas, difieren en que pueden ocurrir incluso entre infecciones separadas por el tiempo.

- **Activación celular alterada.** Ocurre cuando uno de los virus modifica la respuesta inmune del hospedero, aumentando o disminuyendo las posibilidades de infectarse con otro virus. Dos ejemplos son, por un lado, el caso de citomegalovirus y VIH, en el cual la disminución de la respuesta inmune provocada por VIH causa un incremento en la susceptibilidad a citomegalovirus. El otro ejemplo es la infección por el pegivirus humano (HPgV, por sus siglas en inglés), que disminuye la progresión de la patología en la coinfección con VIH [2].
- **Autoinmunidad inducida.** Diversas infecciones virales han sido asociadas con autoinmunidad. Algunos virus son capaces de eliminar la tolerancia inmunológica pero no son capaces de generar células T auto reactivas, responsables de generar autoinmunidad. Sin embargo, una segunda infección por otro virus puede causar esta respuesta y generar autoinmunidad para el hospedero.
- **Incremento de la infección dependiente de anticuerpos.** El ejemplo más representativo de esto es el virus del dengue. Durante una infección por dengue se producen anticuerpos y se mantiene una memoria inmunológica. Sin embargo, estos sólo son neutralizantes para el serotipo específico que infectó en primera instancia, de tal manera que cuando otro virus de dengue de un serotipo distinto infecta al mismo hospedero, se induce una respuesta inmunológica secundaria predominantemente por IgG y la formación de complejos inmunes. Estos complejos inmunes se adhieren a la superficie celular, y son transportados al interior de monocitos y macrófagos, induciendo una

supresión del sistema inmune innato antiviral y permitiendo así, la replicación intracelular en forma logarítmica del virus de dengue.

- **Inmunidad heteróloga.** Después de una infección viral y la producción de memoria inmunológica, ésta puede actuar favorable o desfavorablemente en una segunda infección por otro virus no relacionado. En el caso de los ratones, por ejemplo, la inmunidad contra virus de influenza protege al hospedero a su vez contra el virus de vaccinia; sin embargo, aumenta la virulencia en una infección subsecuente con citomegalovirus.

Los virus interactúan entre sí y el resultado de estas interacciones puede ser benéfico para ambos virus, de perjuicio para ambos o de beneficio para uno solo, lo cual significaría perjuicio para el otro. Este último caso se conoce como interferencia viral.

Interferencia Viral

La interferencia viral es un fenómeno descrito inicialmente en virus de plantas y posteriormente en bacteriófagos (virus de bacterias) y virus animales. La interferencia viral se define como la exclusión mutua de dos o más tipos de virus distintos que tienen como objetivo la misma célula blanco. Durante las primeras décadas del siglo XX se realizaron varios estudios para caracterizar este fenómeno, llegando a la conclusión de que la interferencia viral es un fenómeno universal que se presenta en cualquier tipo de organismo, bacteria, planta, animal o humano; para que ésta ocurra, los virus interferentes deben tener similitudes.

Los ensayos más sobresalientes sobre la interferencia viral fueron realizados por el físico alemán Max Delbrück. En sus estudios sobre bacteriófagos fue capaz de determinar la relación entre los bacteriófagos Alpha, Delta y Gamma al infectar un hospedero bacteriano. Los descubrimientos del Dr. Delbrück demostraron que, pese a que los 3 virus eran capaces de infectar y replicarse en el mismo tipo de bacteria por separado, sólo uno de

ellos era capaz de replicarse durante la coinfección. Las conclusiones más importantes del Dr. Delbrück en su serie de experimentos fueron que existe una constante en la que el virus que se replica en el caso de coinfecciones siempre sería el mismo, aunque el virus no replicante a su vez tiene influencia sobre él, disminuyendo su tasa de replicación. El Dr. Delbrück demostró que los virus interactúan entre sí, siendo estas interacciones positivas o negativas para ellos [9].

Podemos entonces subrayar la importancia que tiene el ampliar el conocimiento a profundidad del fenómeno de interferencia viral con el fin de utilizarlo para el combate de infecciones virales de importancia médica.

HPgV

Descubrimiento

En 1995 en el suero de un paciente con hepatitis no A-E se descubrió un virus nuevo, reportado por los laboratorios Abbott. Lo denominaron GB virus C (GBV-C) debido a que este virus tenía una secuencia genética similar a dos virus llamados GB virus A (GBV-A) y GB virus B (GBV-B). Los virus GB fueron nombrados así debido a un cirujano cuyas iniciales eran G.B., quien en 1966 adquirió hepatitis aguda, su suero fue inoculado en monos tamarindo y el suero de estos en monos sanos comprobando la transmisión de hepatitis. A la par del descubrimiento de GBV-C por parte de Abbott, investigadores del laboratorio Genelabs Technologies descubrieron en el plasma de un paciente con hepatitis crónica un nuevo virus al que denominaron Virus de Hepatitis G (HGV) [10].

Al analizar y comparar las secuencias del virus GBV-C con la del virus de hepatitis G, se observó que mostraron entre sí una homología de 96%, por lo que se determinó que ambos virus eran el mismo. El término hepatitis G finalmente se descartó debido a la ausencia de asociación de GBV-C con hepatitis ya que, después de realizarse diversos estudios en pacientes con riesgo para enfermedad hepática, así como en estudios *in vitro*,

se encontró que el hepatocito no es capaz de replicar a GBV-C. [11–14]

Epidemiología y Patogénesis

Es posible detectar a HPgV en dos fases distintas:

Infección activa. El virus se detecta en suero mediante técnicas moleculares, con amplia distribución de cargas virales desde 10² hasta 10⁸ copias por mililitro de suero. No hay presencia de anticuerpos y la presencia de virus se identifica mediante reacción en cadena de la polimerasa, previa retrotranscripción (RT-PCR, por sus siglas en inglés) del ARN viral [15]. El RT-PCR para detectar HPgV va dirigido contra la región 5'UTR del virus debido a que ésta se encuentra altamente conservada en los diferentes genotipos de HPgV.

La genotipificación de HPgV se realiza mediante RT-PCR o secuenciación de la región 5'UTR o la región E2, principalmente. Sin embargo, estudios han reportado coinfección de diferentes genotipos HPgV en el mismo individuo, mientras que otros estudios han detectado recombinación de genotipos. Estos casos se han determinado al secuenciar las regiones 5'UTR y E2 [16–19].

Infección previa. Indica que la persona tuvo contacto con el virus alguna vez en la vida, aun cuando en el momento de la prueba en suero no se detecten partículas virales sino sólo anticuerpos específicos contra la proteína E2 de superficie de HPgV.

La detección de anticuerpos se realiza en suero mediante ELISA, detectando anticuerpos anti-E2 utilizando antígeno de captura correspondiente a la proteína E2 de HPgV [20].

Diversos estudios alrededor del mundo han encontrado una alta prevalencia de HPgV tanto en infección activa como en infección previa. En infección activa se ha detectado en donadores de sangre sanos una prevalencia de 1-5%, aumentando en países en vías de desarrollo hasta 14%, mientras que en infección previa (anticuerpos) la prevalencia es de 20-25%. La prevalencia aumenta en los pacientes coinfectados con VHC y VIH. En

diversos estudios se detectó una prevalencia de HPgV de 20% en coinfección con VHC y de 20-40% en coinfección con VIH. En el caso de infecciones previas, se ha detectado que hasta 75% de los pacientes HPgV positivos, que generan anticuerpos clarifica la infección [21–25].

Actualmente se conocen 7 genotipos de HPgV, aunque existen discrepancias en la clasificación del genotipo 7, i.e., si debe considerarse como genotipo o como subtipo del 4. Los 7 genotipos de HPgV se distribuyen alrededor del mundo, existiendo sólo un genotipo predominante en cada región geográfica, aunque en países como argentina cuya etnicidad es mayoritariamente caucásica, predomina el genotipo 2 y no el 3. Diversos estudios han asociado esta distribución y predominancia de un genotipo con la etnicidad de la población infectada [26] (Tabla 1, Fig. 1).

Tabla 1. Región geográfica y genotipo de HPgV predominantes.

Genotipo	Región	Genotipo	Región
1	Este de África	5	Este de África
2	Norteamérica y Europa	6	Norteamérica y Europa
3	Asia y Latinoamérica	7	Asia y Latinoamérica
4	Sudeste asiático		

Tabla1. Muestra el genotipo de HPgV predominante según la región geográfica.

Figura 1. Mapa de genotipo predominante de HPgV por región geográfica.



Figura 1. El mapa muestra el genotipo de HPgV predominante en cada región geográfica.

Las vías de transmisión conocidas de HPgV son:

- Transfusión de derivados sanguíneos
- Transmisión sexual
- Vertical (de madre a hijo)

La transmisión mediante derivados sanguíneos se ha comprobado en estudios retrospectivos en muestras de pacientes receptores de sangre. La transmisión sexual se determinó mediante la detección de HPgV en líquido seminal y el aumento de incidencia de infección por HPgV en coinfección con otros patógenos de transmisión sexual, como el VIH. Finalmente, la ruta vertical ha sido demostrada en estudios de coinfección VIH/HPgV en mujeres embarazadas y sus hijos [27–30].

No se han detectado síntomas asociados a la infección por HPgV. Sin embargo, puede provocar infecciones persistentes como el VHC, aunque, contrario a la infección por VHC en la que pueden coexistir anticuerpos y el virus, en el caso de la infección de HPgV mediante transfusión sanguínea la coexistencia de anticuerpos y el virus, sólo es posible por un periodo máximo de 15 días, después de los cuales el virus es indetectable en suero

[20] registrándose algunas excepciones cuando la infección ocurre por otras vías (comunicación personal Dr. Jack Stapleton).

Los pacientes infectados por HPgV pueden generar anticuerpos que son dirigidos contra la proteína E2, y el menor tiempo para generarlos es de 150 días post-infección, registrándose seguimientos por más de 20 años sin que estos anticuerpos lleguen a generarse [20].

En cuanto a la patogénesis, se han realizado diversos estudios en los que se ha verificado que no existe asociación con patología hepática. Sin embargo, existen estudios que asocian a HPgV con el desarrollo de linfoma no Hodgkin, concluyendo que HPgV podría jugar un papel etiológico en el desarrollo de esta enfermedad [31–34]. Por otro lado, múltiples estudios han asociado a HPgV con un efecto benéfico al encontrarse en coinfección con otros virus, como el VIH, VHC y el virus del Ébola [35–37].

Genoma y clasificación filogenética

Según la clasificación de Baltimore HPgV se clasifica en el grupo IV, correspondiente a virus con genoma de ARN de cadena sencilla en sentido positivo. El genoma de HPgV consta de 9.4 kilobases, conformado por una región que se traduce, flanqueada por 2 regiones no traducidas (UTR, del inglés, untranslated region). La estructura del genoma se conforma entonces de la siguiente manera: Una región no traducida del extremo 5' (5'UTR), que contiene un sitio interno para la unión de ribosoma (IRES, del inglés, internal ribosome entry site), seguida de la región traducida, que contiene un marco de lectura (open reading frame, ORF) único que codifica para la formación de una poliproteína larga que posteriormente será procesada para dar proteínas de menor tamaño. Esta última poliproteína está conformada por las proteínas estructurales E1 y E2, que conformarán la cápside del virus, seguida de la proteína X, cuya función no está bien determinada. Sin embargo, la proteína X es análoga a la proteína p7 del VHC y p6-p7 del GBV-B, la cual, una vez cortada, es fundamental para la replicación *in vivo*. Finalmente, existe otra región

no traducida en el extremo 3' (3'UTR) necesaria para controlar y dirigir la replicación viral [38] (Fig. 2).

Figura 2. Esquema general del genoma de los Pegivirus.

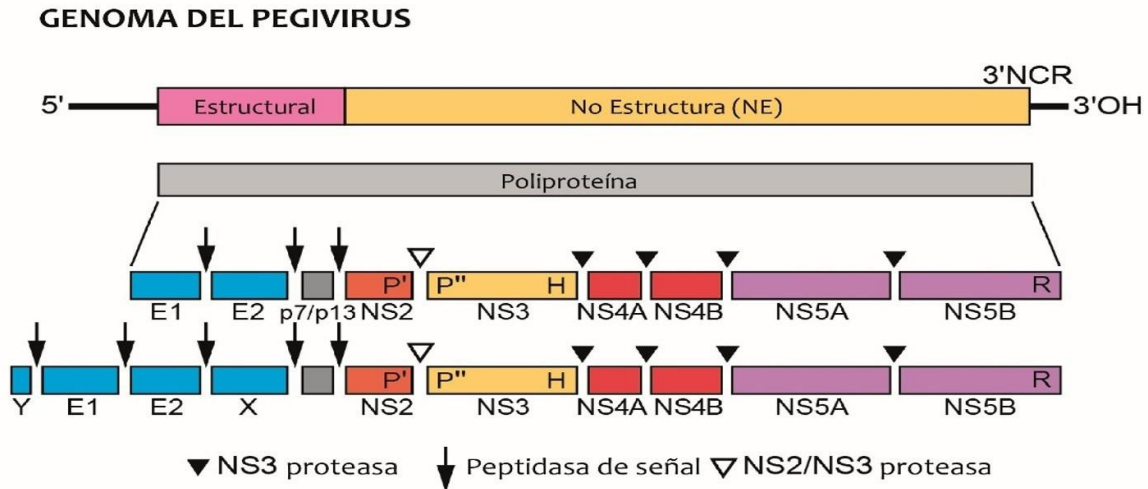


Figura 2. El esquema muestra la estructura del genoma de los Pegivirus, con una región TRADUCIDA, flanqueada por regiones no TRADUCIDAS. La región que se TRADUCE muestra la división entre proteínas estructurales y no estructurales. Además, detalla los cortes que ocurren en la poliproteína para formar todas las proteínas que se ensamblan para generar partículas virales de HPgV y para replicar el RNA viral (Modificado del Comité Internacional en Taxonomía de Virus ICTV [39])

Durante su ciclo de replicación HPgV necesita un intermediario negativo que sirva de molde para crear copias de su genoma [40]. Estudios en cadáveres han encontrado la cadena positiva del genoma de HPgV en prácticamente todo el cuerpo y todos los órganos, incluso en cerebro, mediante técnicas de secuenciación de siguiente generación; sin embargo, la cadena negativa sólo ha sido posible localizarla en la médula ósea y bazo. Esto sugiere que la replicación de HPgV ocurre en células hematopoyéticas; sin embargo, se ha logrado replicar a HPgV *in vitro* en cantidades bajas y de forma transitoria en linfocitos aislados de sangre periférica, aunque no se ha detectado la cadena negativa del

virus en este tipo celular en donadores sanos con infección por HPgV [41].

GBV-C se clasificó dentro de la familia Flaviviridae, por su similitud genética con el virus de hepatitis C (VHC), en 2011. Después del descubrimiento de otro virus “GB”, GBV-D, el cual infecta murciélagos, se propuso reclasificar a los virus “GB” en un nuevo género al que se denominó Pegivirus, por “persistent infection viruses” (virus de infección persistente) debido a su capacidad de causar infecciones persistentes. Se abrevió este género como “PgV,” dejando como letra inicial la especie a la que infectan, i.e., Human Pegivirus, HPgV. Posteriormente se agregarían el GBV-Ccpz, capaz de infectar a chimpancés, aunque con un gran parecido al GBV-C humano, y el GBV-E, que infecta caballos. La clasificación final es la siguiente [42]:

- SPgV – Simian Pegivirus (GBV-A), pegivirus de simio
- **HPgV – Human Pegivirus (GBV-C), pegivirus humano**
- SPgV-cpz – Simian Pegivirus chimp. (GBV-Ccpz), Pegivirus de chimpancé BPgV-Bat Pegivirus (GBV-D), pegivirus de murciélago
- EPgV – Equine Pegivirus (GBV-E), pegivirus de caballo.

Se dejó fuera de la clasificación de Pegivirus a GBV-B, que se agrupó dentro de la familia Flaviviridae y género Hepacivirus debido a su similitud con estos y la capacidad de causar hepatitis fulminante en los simios.

En 2015 se descubrió un nuevo pegivirus que inicialmente se denominó Hepegivirus humano 1 (HHpgV-1, por sus siglas en inglés) o HPgV-2. Su importante asociación con la infección por virus de Hepatitis C (VHC), la capacidad para crear infecciones persistentes y los antecedentes de asociación de HPgV con reducción en la progresión de la patología en pacientes coinfectados con VIH, así como la evolución más lenta de la fibrosis en los pacientes coinfectados con VHC/VIH/HPgV, han hecho que la investigación relacionada a

HHpgV-1/HPgV-2 se enfoque a determinar si causa patología o es capaz de reducir la progresión de otras patologías, como se ha asociado previamente a HPgV. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado asociaciones positivas ni negativas de la infección por este virus [43] (Fig. 3).

Figura 3. Árbol filogenético de los Flavivirus.

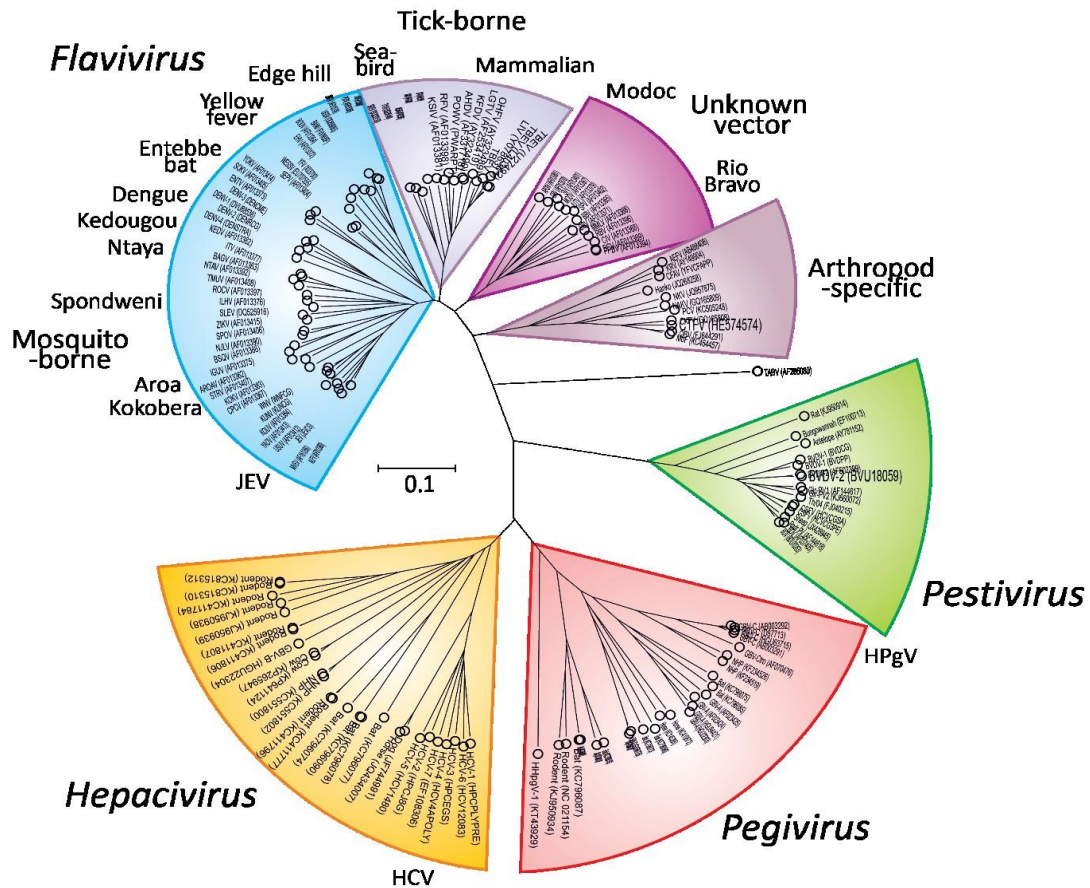


Figura 3. Esquema de clasificación filogenética de los Flavivirus, encontramos al género Pegivirus, cercano a los Hepacivirus debido a su similitud genética (Modificado del Comité Internacional en Taxonomía de Virus ICTV [39]).

El estudio de los pegivirus en especial HPgV ha cobrado importancia, aunque el conocimiento sobre la infección por este virus más allá de la epidemiología es poco. La mayor parte de este conocimiento ha sido generado a través de comparaciones con otros

virus como el virus de hepatitis C y VIH. Esto se debe a que la importancia del estudio de HPgV reside en los efectos sobre la infección por VIH, extendiendo la supervivencia de los pacientes al disminuir la carga viral de VIH y aumentar la cantidad de células T CD4⁺.

Algunos de estos estudios han intentado descifrar los mecanismos que desencadenan este fenómeno de control de VIH [2].

Mecanismos de control de la infección por VIH y su interacción con HPgV

Los pacientes con VIH progresan en su mayoría hacia SIDA; sin embargo, existe un grupo de pacientes conocidos como controladores élite que son capaces de mantener cargas virales bajas de VIH, <50 copias/ml. Al igual que estos controladores élite, los pacientes coinfectados con HPgV presentan reducción de carga viral de VIH, aumento de células T CD4⁺ y mejor respuesta al tratamiento antirretroviral [44]. Aunque existen discrepancias sobre el efecto benéfico de HPgV en coinfección con VIH, los resultados de un meta-análisis de estudios de coinfección HPgV/VIH encontró una reducción de 2.5 veces en la tasa de mortalidad en los pacientes coinfectados comparada con los pacientes monoinfectados con VIH. [1]

Para entender los mecanismos de control sobre la replicación de VIH y la reducción de progresión hacia SIDA, han sido estudiados diversos casos donde ocurre el control de la replicación de VIH, como lo son: los casos de pacientes coinfectados con HPgV, pacientes controladores élite, defectos en el virus VIH infectante y cambios en el hospedero implicando a la respuesta inmune innata y adaptativa.

Entre los factores relacionados a la inmunidad del hospedero se encuentra la respuesta temprana de interferones tipo I (INF-1), cuya síntesis es activada mediante el sistema de detección de peligro mediado por los receptores similares a Toll (TLR, del inglés Toll LikeReceptors). Esta respuesta es una de las primeras en aparecer en infecciones virales.

Los INF tipo I detienen la replicación viral mediante múltiples mecanismos incluyendo la reducción de síntesis de proteínas y degradación de ácidos nucleicos extraños; a esto se le conoce como “estado antiviral”.

En la mayoría de los estudios relacionados a la coinfección HPgV/VIH se ha encontrado una asociación benéfica para el paciente coinfectado, con mayor supervivencia y un tiempo más largo para el desarrollo de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En estudios realizados en mujeres embarazadas VIH-positivas, con y sin coinfección con HPgV, se encontró que, en los hijos de madres coinfectadas, la tasa de transmisión vertical de VIH fue menor en los recién nacidos que habían adquirido la infección por HPgV, sugiriendo un efecto benéfico al prevenir el establecimiento de la infección por VIH en los casos de primoinfección por HPgV detectada en el producto. No existen estudios que definan si la transmisión de HPgV mediante la vía vertical ocurre durante la gestación o durante el parto [45].

Pese al importante efecto protector de HPgV en coinfección con VIH, no conocemos en su totalidad los mecanismos que derivan en este fenómeno. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que esta regulación depende de la interacción de HPgV con factores celulares necesarios para el ciclo de vida de VIH, y que además podría interferir directamente con VIH afectando su replicación.

Para estudiar los mecanismos de interferencia e inhibición de la replicación de VIH, es necesario asociarlos con las etapas del ciclo de replicación de VIH:(Fig. 4) [46,47]:

Ciclo de replicación de VIH

Aproximación y Adhesión. El acercamiento de la partícula viral a la célula es el primer paso del ciclo de replicación de VIH. Éste puede ser mediado por las proteínas de envoltura (Env) del virus o por factores celulares presentes en la membrana que envuelve al virus ($\alpha 4\beta 7$, proteoglicanos de heparán sulfato, integrinas o DC-SIGN en células dendríticas). Una vez aproximado el virus a la célula, el segundo paso es la adhesión, que conlleva la interacción del fragmento gp120 de la proteína de superficie de VIH con el receptor CD4⁺, seguida de la unión de la proteína gp120 al correceptor celular, CXCR4 (X4) o CCR5 (R5); la selección de uno de los dos correceptores está determinada por el tropismo viral [48].

Esta fase puede ser inhibida por la coinfección con HPgV. Ensayos de co-inmuno-precipitación han demostrado que tanto la proteína E2 de HPgV como péptidos de esta proteína y los anticuerpos anti-E2 producidos por el hospedero contra HPgV inhiben las fases iniciales de la entrada en el ciclo de vida de VIH [49–51]. *In vivo*, la viremia de HPgV ha sido asociada con reducción de la expresión en la superficie celular de los correceptores CCR5 (R5) y CXCR4 (X4) [52]. *In vitro*, la infección por HPgV induce la producción de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y SDF-1, ligandos específicos de los correceptores R5 y X4, reduciendo la disponibilidad de estos en la superficie celular [53]. La proteína NS5A reduce la expresión superficial del receptor CD4⁺ y el correceptor X4 al inducir la sobreexpresión de su ligando SDF-1 [52,54–57]. De igual manera, los controladores élite cuentan con mayor número de células CD8⁺ polifuncionales en mucosas, capaces de degranular por estímulo de VIH secretando MIP-1- α MIP-1 β , RANTES [58,59].

Fusión. Una vez completada la adhesión, la proteína gp120 sufre un cambio conformacional, dejando expuesta la porción gp41, la cual se une a la membrana celular y

comienza un proceso de plegamiento sobre sí misma (HB6) en el que acerca la membrana celular a la membrana viral, se crea un poro de fusión concluyendo con la entrada del virus a la célula [60].

La proteína Serinc-3/5, que se incorpora al virión durante la gemación, altera el ensanchamiento del poro de fusión impidiendo la fusión de la envoltura de VIH con la membrana celular. Esta proteína y su efecto son inhibidos por la proteína Nef de VIH [59,61]. Existen antirretrovirales que interfieren en estas dos primeras fases del ciclo, conocidos como Inhibidores de Adhesión o Fusión, mediante el bloqueo de los receptores o correceptores por competencia [62,63].

Retrotranscripción. Después de fusionarse las membranas celular y viral, la cápside inicia su recorrido hacia la membrana nuclear. Durante este transporte tiene lugar la retrotranscripción, en la que la enzima retrotranscriptasa del virus inicia la producción de una cadena de ADN tomando como molde una de las dos cadenas idénticas de ARN que contiene la cápside. La doble cadena idéntica de ARN se genera al dimerizar un segmento de las dos cadenas cerca del extremo 5', previo al empaquetado del ARN dentro de la cápside viral [64,65].

Para iniciar este proceso la enzima retrotranscriptasa viral se adhiere a un extremo de la cadena de ARN viral identificado como sitio de iniciación, donde se ubica un ARN de transferencia tomado de la célula hospedera durante la fase final del ciclo de replicación viral intracelular. Posteriormente, sintetiza la hebra complementaria para tener el ADN de doble cadena, que junto con la integrasa y la proteína Vpr se conoce como complejo pre integración (PIC). Durante este proceso ocurre el desnudamiento, es decir, la disolución de la cápside viral, permitiendo el acceso del PIC al núcleo, atravesando la membrana nuclear por uno de sus poros [61,66].

Para impedir este proceso, el ser humano cuenta con dos mecanismos de defensa, APOBEC3 y TRIM5a. APOBEC3 es una desaminasa de citidina mutagénica, que se incorpora dentro del virión durante el ensamblado y provoca mutaciones en el genoma viral, lo cual le impedirá retrotranscribirse. Por su parte, TRIM5a se une a la cápside viral una vez que ingresa a la célula, desnudando al virus de forma prematura y evitando así el transporte del genoma hacia el núcleo celular [59,67].

VIH es capaz de inhibir la respuesta de APOBEC mediante su proteína Vif y escapar de TRIM5a debido a la alta tasa de variabilidad del genoma de VIH. Además, la función de tener dos cadenas de ARN idénticas es que una actúe de reemplazo si hubiera algún daño en la cadena con la que se inició la transcripción, de tal manera que la retrotranscriptasa de VIH es capaz de migrar entre una de las hebras de ARN viral y la otra tantas veces como sea necesario para continuar el proceso hasta tener una hebra de ADN terminada [61].

En esta fase intervienen los Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN) y no análogos de los nucleósidos (ITINN); los primeros se unen al sitio activo de la enzima bloqueándola al ocupar el espacio, y los segundos a un sitio no activo provocando un cambio conformacional que inhibe su funcionamiento [63,65,68].

Integración. Al ingresar el PIC al núcleo, el ADN es capaz de integrarse en diversas regiones del ADN humano y una célula infectada puede contener más de una copia de ADN viral integrado, llamado provirus [69]. El proceso de integración inicia con el acercamiento del ADN viral al ADN humano. Todo el proceso es mediado por la enzima integrasa del virus, la cual retira 2 nucleótidos de cada extremo 3' en el ADN viral, volviéndolo pegajoso; posteriormente, rompe enlaces de fosfato en el ADN humano logrando que los extremos pegajosos del ADN viral se unan al ADN humano. Después se cortan los 2 nucleótidos de los extremos 5' y se completa la integración cuando las enzimas celulares reparan la cadena de ADN quedando fusionada el ADN viral al ADN

humano [64,70].

Las proteínas Mx2/MxB, cuya producción es estimulada por interferón, son capaces de inhibir la integración en 2 sitios, provocar mutaciones en la cápside viral que impidan su desnudamiento y entrada del PIC al núcleo y provocar inestabilidad del provirus inhibiendo así su integración [59,71,72].

Este proceso es bloqueado por los inhibidores de integrasa, ocupando el sitio de unión de la integrasa al ADN humano [63,73].

Replicación. Para la replicación de VIH, es decir, la transcripción del ADN a ARN y posteriormente la traducción de éste a proteínas, para generar más virus, es necesaria la activación de los linfocitos infectados. Esto se debe a que, cuando la célula infectada se activa, se enciende la cascada del factor de transcripción NFkB, el cual tiene similitud con los extremos del genoma viral de VIH (LTR, del inglés Long Terminal Repeats), por lo cual cada vez que se activa la célula se activa la replicación de VIH [74,75]. Una vez activada la replicación, la célula comenzara a producir miles de copias de las proteínas virales. No existen medicamentos que actúen en esta fase. La activación inmune crónica es el principal factor conocido para la apoptosis de linfocitos T CD4⁺ y el agotamiento de las células T CD8⁺ debido al fenómeno de apoptosis post activación [76,77]. La disminución de las reservas de células T CD4⁺, está mediado principalmente por la unión de Fas con su ligando FasL, típicamente aumentados en los pacientes VIH positivos [76,78].

Los pacientes coinfectados con HPgV y VIH, mantienen menor activación inmunológica, presentando menor expresión de los marcadores de activación y diferenciación CD38, CD69, CD25, y CCR5 en células T CD4⁺ y CD8⁺ en comparación con pacientes mono infectados con VIH [79,80], una expresión significativamente menor de Fas y mantienen conteos más elevados de células T CD4⁺, sugiriendo que la coinfección protege a estas células contra la muerte post activación [81,82]. Estudios *in vitro*, demuestran que

la proteína E2 de HPgV expresada intracelularmente, inhibe la vía de activación celular mediada por LCK [83,84], pudiendo ser este el mecanismo de protección en esta fase.

A su vez, los controladores élite mantienen estable la cantidad de células T CD4⁺ circulantes por más tiempo. Esto se debe a que los CD4⁺ son capaces de secretar IL-2 y un alto potencial proliferador al ser estimulados por VIH, traduciéndose en alta resistencia a la apoptosis inducida por activación, mediante la inactivación del factor transcripcional FOXO3a [59,85– 87]. Mantener niveles altos de CD4⁺ es fundamental para el control de la infección debido a que estas células estimulan y dirigen la respuesta de las células CD8⁺. Es importante señalar que el conglomerado de células T CD4⁺ específicas para VIH, presentes principalmente en controladores élite, no muestran signos de agotamiento. [85,88].

Ensamblaje, Gemación y Maduración. El ensamblaje del virus ocurre en la membrana celular, donde los componentes se van alineando. Las proteínas de envoltura (Env) de VIH son producidas en el retículo endoplásmico, donde se glicosilan y adquieren su conformación trimérica. Así son transportadas hacia la membrana celular, donde la proteína Gag mediante el dominio Ma se une a la membrana celular y recluta a las proteínas Env, mientras su dominio Nu captura las cadenas de ARN viral y el extremo p6 de Gag se encarga de proteínas accesorias como Vpu. Una vez ensamblado, el virión es liberado mediante gemación, llevando con él una envoltura formada por membrana celular, en este punto el virión de VIH se denomina inmaduro. Una vez fuera de la célula el virus inmaduro completa su proceso de maduración por acción de la proteasa; ésta corta las proteínas virales Gag-Pol en sus componentes, liberando la región central de Gag donde se encuentra el dominio Ca que dará lugar a la formación de la cápside dentro de la cual estarán protegidas la proteasa y nucleocápside que contendrá el ARN viral, el ARN de transferencia, la nucleoproteína, la integrasa, la retrotranscriptasa y las proteínas

accesorias del virus, así como restos de proteínas celulares. Completado este proceso, el virión inmaduro se convierte en un virus de VIH infectante, adquiriendo una característica figura cónica visible por microscopía electrónica [64,89]. Para impedir esta fase existen los inhibidores de proteasa, los cuales impiden el corte de las poliproteínas virales evitando así la maduración del virus y, por ende, su infectividad [63].

Estudios realizados *in vitro* han comprobado mediante microscopía confocal que la presencia intracelular de la proteína E2 de HPgV impide el correcto ensamblado y gemación de VIH, al encontrar gp120 acumulado intracelularmente cerca de la membrana y reducción de p24 en sobrenadante comparado con el control [90].

En cuanto a los mecanismos naturales de defensa contra VIH, se encuentra la producción de teterina, también inducida por INF-1. Esta proteína impide la gemación de VIH, anclándolo a la membrana celular de la célula infectada. La actividad de teterina es inhibida por acción de la proteína Vpu de VIH [59,91–93].

Figura 4. Esquema representativo del ciclo de replicación de VIH y los mecanismos de control

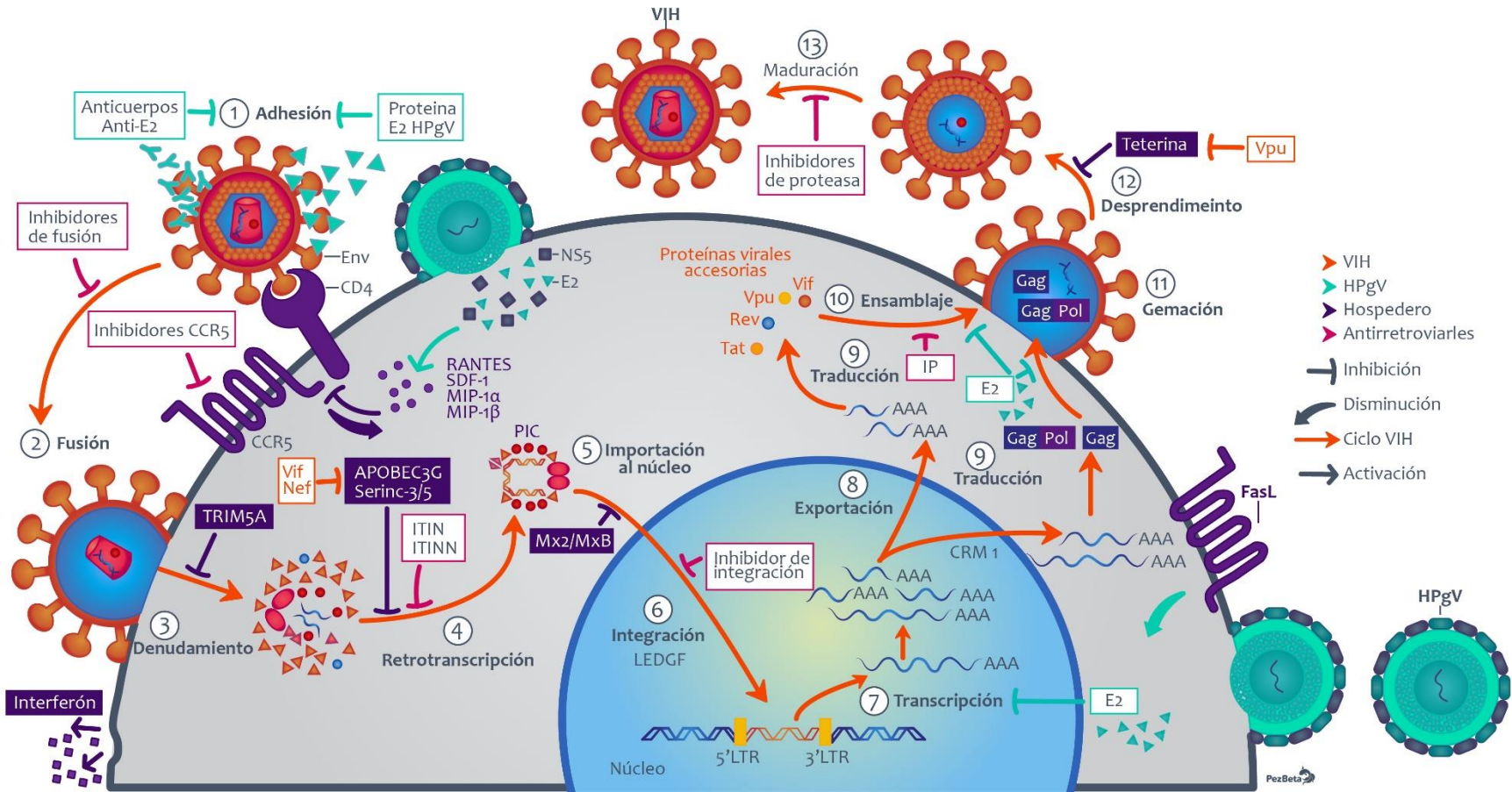


Figura 4. El esquema muestra en flechas naranjas el ciclo de replicación de VIH. Los mecanismos de control de este ciclo están representados en azul los correspondientes a HPgV durante la coinfección, morado los correspondientes a defensas naturales del hospedero (principalmente observadas en los pacientes controladores elite) y en rosa los tratamientos antirretrovirales. Las flechas rectas indican activación, las flechas curvas disminución y las líneas en forma de T indican inhibición, tal como lo indica la imagen.

Historia natural de la infección por VIH

VIH se transmite a través de productos sanguíneos, durante el parto y por interacción sexual no protegida. La historia natural de la infección presenta las siguientes fases (Fig. 5) [94]:

Fase de Eclipse. (duración de 1 a 2 semanas) Posterior a su ingreso al cuerpo vía sexual (la más común actualmente), el virus ingresa a células de Langerhans y células dendríticas presentadoras de antígeno. Estas células, una vez infectadas, migran hacia el ganglio desde la mucosa; a su paso, infectan células T vecinas que expresan los receptores y correceptores apropiados para VIH (CD4⁺ y CCR5) e inicia la replicación viral sin que pueda ser detectado en suero o aparezcan síntomas [47,95].

Infección Primaria. (duración de 2 a 4 semanas) Al inicio de esta etapa, VIH continúa su acelerada replicación llegando a cargas virales de hasta 10⁷ copias/ml de sangre, posteriormente reduciéndose hasta 10² veces al final esta etapa. Una de las primeras respuestas es la producción de INF-1, capaces de inhibir tanto etapas tempranas como tardías del ciclo de replicación viral. Se ha demostrado que la aplicación temprana de interferón alfa (INF- α) reduce la viremia en plasma y mejora la producción de anticuerpos antivirales. Sin embargo, existen estudios que demuestran que esta actividad contra VIH es transitoria y subóptima, debido a que la transmisión célula-célula de VIH es mucho menos susceptible al INF-1 [96,97].

Durante la infección primaria, las células T CD4⁺ infectadas llegan a los ganglios de drenaje y regionales e inducen activación y proliferación de las células T al estimular las células T CD8⁺ con funciones Específicas para VIH y las células dendríticas plasmacitoides (pDC) que son capaces de producir altas cantidades de interferón. Una vez activadas las células CD8⁺ Específicas para VIH, éstas liberan perforinas y granzimas para eliminar a las células infectadas, producen y liberan quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) que previenen la entrada de VIH a nuevas células, y producen citocinas que

activan la vía de interferón para inhibir la replicación viral. Esta activación inmunológica VIH específica permite la reducción de la carga viral y provoca reducción de los linfocitos T CD4⁺ por efecto citotóxico y muerte post activación. [59,85,97–99].

Durante la infección aguda de VIH, la capacidad productora de interferón de las pDC se encuentra disminuida en los pacientes progresores contribuyendo a la rápida diseminación del virus. Sin embargo, las pDC de pacientes coinfectados HPgV/VIH mantienen su capacidad productora de interferón, un estudio encontró sobreexpresión de los genes relacionados con interferón, esta sobreexpresión está directamente relacionada a la carga viral de HPgV presente en los pacientes coinfectados [100].

Los síntomas asociados a esta fase son fiebre e inflamación de ganglios que generalmente se confunde con un cuadro gripal.

Infección Crónica. (duración de 1 a 10 años generalmente) El estado antiviral permanente previene la replicación viral y retrasa la progresión de la infección. La infección por VIH se caracteriza por un aumento progresivo y lento de la carga viral basal de VIH de 1 a aproximadamente 10⁵ copias/ml de suero, y estabilidad de la cantidad de linfocitos T CD4⁺ cercana a cantidades normales. Pese a esto, la producción crónica de interferón provoca deterioro en el hospedero, aumenta la expresión de CCR5 y la activación inmune, dos situaciones que favorecen la replicación y diseminación de VIH, provocando un descenso gradual de estas células hasta aproximadamente 300 células T CD4⁺/mm³ de sangre [47,95].

Los pacientes VIH positivos coinfectados con HPgV muestran niveles estables de citocinas Th1 (IL-2, IL-12) y bajos niveles de Th2 (IL-4, IL-10), comparados con los pacientes con monoinfección por VIH, sin aumentar los niveles de activación inmunológica, manteniendo un equilibrio favorable para controlar la progresión de VIH [101–103]. Aún no se ha definido el mecanismo que modula la respuesta de INF-1 para no contribuir a la

inmunopatología provocada por VIH que logran los controladores élite [59].

En los primeros años de esta fase el paciente no presenta síntomas, por lo que la infección es imperceptible, periodo conocido como latencia clínica, aunque el virus continúa infectando nuevas células y es transmisible a otras personas.

SIDA. Una vez que el descenso gradual de células T CD4⁺ llega a niveles por debajo de 200 CD4⁺/mm³ el sistema inmune es incapaz de combatir infecciones, por lo que los primeros signos de infección por VIH comienzan a ser evidentes, al tener el paciente continuas infecciones oportunistas. Al mismo tiempo, es imposible contener la replicación de VIH, por lo que los niveles del virus ascienden y finalmente el paciente muere [47,104].

En un estudio retrolectivo de pacientes VIH positivos en etapas avanzadas o con SIDA se determinó que, posterior a la coinfección por HPgV, los pacientes mostraron disminución en la carga viral de VIH y aumento significativo de células T CD4⁺. Este fenómeno se asoció a cambios en la expresión de citocinas de los pacientes coinfectados, debido a que se encontró una disminución de la expresión de IL-1R α , IL-6, IL-7, IL-10, MIP-1 α , 6Ckine, SCF y GCP-2, y un aumento de la expresión de I-TAC y eotaxin-2, asociando este cambio en la expresión a la disminución de carga viral de VIH y aumento de CD4⁺[103,105].

De acuerdo con los reportes estadísticos, los pacientes con VIH sin tratamiento antirretroviral tienen un desenlace mortal en 95% de los casos. Actualmente existen diversos medicamentos que funcionan para tratar la infección por VIH, aunque ninguno ha sido capaz de eliminar el virus del organismo.

Los tratamientos antirretrovirales actuales en la mayoría de los casos son capaces de controlar la carga viral de VIH. Sin embargo, estudios demuestran que los pacientes con VIH y tratamiento tienen menor esperanza de vida que las personas sanas.

Figura 5. Esquema del curso natural de la enfermedad por VIH.

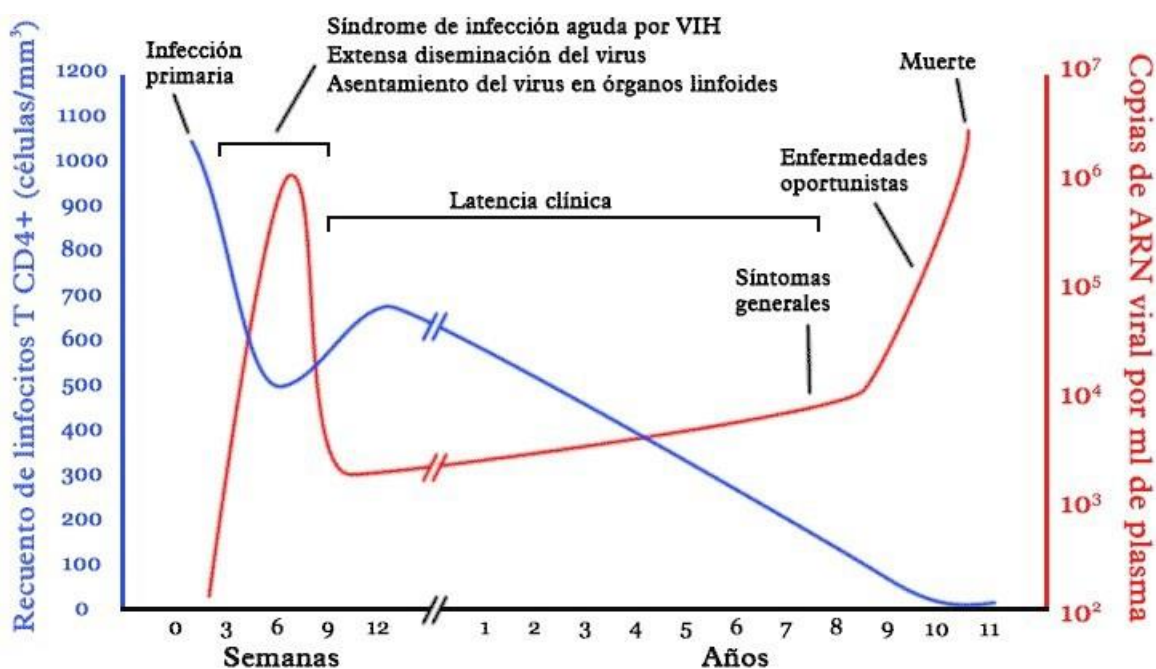


Figura 5. El esquema de la historia natural de la enfermedad por VIH, se muestran las 3 etapas principales, infección primaria, latencia y SIDA. En rojo se muestra las variaciones en carga viral de VIH durante todo el curso de la infección y en azul las variaciones en células T CD4⁺ (Modificado de Fauci 1991 [106]).

Fallas en el Tratamiento Antirretroviral

Existen casos en los que el tratamiento antirretroviral falla, pese a la amplia gama de fármacos y opciones de combinaciones. Estas fallas pueden ser de tipo virológico o inmunológico.

Falla Virológica. Debido a la velocidad de replicación del virus, existe una tasa alta de errores en el proceso de síntesis de su ARN y en la retrotranscripción, lo cual da lugar a mutantes que pueden llegar a escapar del efecto del tratamiento antirretroviral. Esto, aunado a la resistencia transmitida debido principalmente a las prácticas sexuales de riesgo por parte de los pacientes, así como el poco apego al tratamiento, han derivado en resistencia a los medicamentos antirretrovirales causando que la carga viral no disminuya, continuando con la progresión de la enfermedad hacia SIDA. En los controladores élite, la

avidez de algunos subgrupos de células T CD4⁺ y CD8⁺ por VIH, en específico por Gag las hace fundamentales para el control de la enfermedad, contribuyendo al control virológico [107–109].

Falla Inmunológica. La causa aún es desconocida; sin embargo, es posible que sea por agotamiento de las reservas de células T CD4⁺. Es una condición en la que, pese al control virológico (carga viral indetectable), el paciente no recupera la cantidad deseable de CD4⁺ y su deterioro y evolución hacia SIDA continúa, los principales factores de riesgo para que esto ocurra son: poca adherencia al tratamiento, carga viral de VIH mayor de 1000 copias/ml y coinfección con tuberculosis [110,111].

Por otra parte, ha habido y continúa habiendo esfuerzos por generar una vacuna contra el virus, pero ninguno de los intentos ha sido fructífero.

Otros mecanismos de control de VIH aún no completamente descritos dependen del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I), teniendo un efecto claramente protector en los caucásicos el haplotipo (HLA B*5701) y africanos (HLA B*5703). Esta protección ocurre gracias a la respuesta mediada por células CD8⁺ y NK fundamentales para el control de VIH. La interacción de las células CD8⁺ y los receptores KIR (KIR3DL1 y KIR3DS1) que se encuentran en la superficie de las células NK con MHC clase I, induce una mayor protección contra la progresión de la enfermedad por VIH en los controladores élite, quienes tienen sobrerrepresentación de HLA clase I del grupo serológico Bw4 y B*57 [59].

Por otra parte, en ocasiones el virus transmitido puede tener defectos, como deleciones en genes accesorios nef o vif, o codones de paro prematuros, que puede llevar a un control de la viremia y de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, debido a la alta tasa de mutaciones de VIH, algunos de estos aparentes no progresores o controladores élite progresan hacia VIH con el tiempo [59,112].

Los mecanismos anteriormente expuestos demuestran la complejidad de la interacción entre el hospedero, HPgV y VIH. Entender cómo ocurre este fenómeno podría darnos la pauta para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales, no sólo para la infección por VIH, sino para múltiples infecciones virales.

CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pese a la gran cantidad de información en torno a la infección por VIH, los esfuerzos para controlar y curar la infección, la alta eficacia de los tratamientos antirretrovirales y la cultura de prevención, la pandemia por VIH continúa causando estragos en la población mundial y aún estamos lejos de encontrar la cura o una vacuna para esta infección [6].

Las infecciones virales por virus complejos, de rápida evolución, y capaces de evadir o nulificar al sistema inmune, e.g., la infección por VIH, presentan un gran reto de salud que exige alternativas innovadoras de prevención y tratamiento.

Comprender a fondo las interacciones virales y los mecanismos que las rigen, enfocándonos principalmente en las coinfecciones que resultan favorables para el hospedero e.g. la coinfección HPgV/VIH, deben estudiarse a profundidad para originar a partir de esto nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas.

Debido a lo anterior, decidimos realizar la caracterización virológica e inmunológica de las interacciones entre HPgV, el hospedero y VIH para comprender los mecanismos subyacentes que conducen a la mejoría de los pacientes coinfectados. Para ello es necesario:

- Conocer la prevalencia de infección por HPgV.
- Caracterizar la interacción entre VIH, el hospedero y HPgV.
- Desarrollar un modelo *in vitro* adecuado para el estudio de la coinfección, que permita la caracterización detallada del fenómeno.

HIPÓTESIS

HPgV interfiere en la replicación y la evolución de la patogénesis de VIH, mediante la modificación de factores de transcripción del hospedero.

OBJETIVOS

1. Determinar la prevalencia y el comportamiento de la infección activa por HPgV en México en monoinfección y en coinfección con VIH.
 - a) Determinar la prevalencia de infección activa de HPgV en donadores de sangre sanos y pacientes VIH positivos.
 - b) Determinar el genotipo de HPgV en los donadores sanos y pacientes VIH positivos.
 - c) Determinar el comportamiento de la infección activa de HPgV en donadores sanos y pacientes VIH positivos mediante el análisis de la distribución de la carga viral.
2. Caracterizar los efectos de la interacción HPgV-hospedero-VIH.
 - a) Determinar los marcadores de progresión de infección por VIH (carga viral, conteo de células T CD4⁺, relación de CD4⁺/CD8⁺) y el tiempo de infección en pacientes VIH⁺ vírgenes a tratamiento antirretroviral (ART-naïve).
 - b) Establecer la influencia de la coinfección por HPgV en relación a los marcadores de progresión de infección por VIH en los pacientes VIH positivos ART-naïve coinfectados.
 - c) Analizar los cambios en la expresión génica en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes coinfectados HPgV/VIH que ocurren durante la coinfección.

3. Desarrollar un modelo *in vitro* para estudiar la interacción HPgV-hospedero-VIH.
 - a) Caracterizar el nivel al que ocurre la coinfección entre HPgV y VIH (célula, tejido).
 - b) Identificar la o las causas posibles que impiden la replicación de HPgV *in vitro* durante periodos prolongados.
 - c) Desarrollar un modelo *in vitro* para estudios de interacción HPgV-hospedero- VIH.

Para el correcto abordaje del proyecto, este se dividió en 3 partes que están representadas en esta tesis como capítulos. Cada capítulo corresponde a uno de los objetivos principales de esta investigación.

CAPITULO II. Prevalencia y comportamiento de la infección activa de HPgV en México

Con la finalidad de comprender la infección por HPgV, fue necesario determinar la prevalencia de infección activa por HPgV en nuestro país, para lo cual se estandarizó el método de detección, reacción en cadena de la polimerasa, acoplada a retrotranscripción (RT-PCR) en tiempo real. La búsqueda de infección por HPgV se realizó en donadores de sangre sanos, debido a la ausencia de síntomas de esta infección y en pacientes VIH positivos por los reportes que señalan alta prevalencia de HPgV en estos pacientes en otros lugares del mundo. Una vez determinada la prevalencia en nuestra muestra, caracterizamos el comportamiento de la infección, determinando los genotipos infectantes de HPgV y los niveles de cargas virales de HPgV en la población infectada.

METODOLOGÍA

Población de estudio y colección de muestras

Para determinar la prevalencia de infección por HPgV y su coinfección con VIH se analizaron 7,890 muestras de suero para determinar viremia de HPgV, de las cuales 6,484 correspondieron a donadores de sangre sanos y 1,406 a pacientes con VIH. Las muestras de pacientes con VIH están conformadas por 770 pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral (ART-naïve, por su denominación en inglés), es decir que no han sido tratados previamente con tratamientos antirretrovirales y 636 pacientes en tratamiento (Fig. 6).

El estudio fue aprobado por los comités de ética e investigación de las instituciones participantes, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y el Hospital General de México, en la Ciudad de México; Antiguo Hospital Civil Fray Antonio Alcalde y Nuevo Hospital Civil Juan I. Menchaca, en la ciudad de

Guadalajara. Los donadores de sangre firmaron el consentimiento informado previo a la toma de la muestra. Las muestras de donadores sanos (6,484) fueron colectadas durante la donación (5ml de sangre), durante tres diferentes periodos que comprenden: agosto - diciembre 2009, marzo – junio 2010 y enero -agosto 2015 en los 4 hospitales de referencia anteriormente mencionados, que cubren la región centro – occidente del país: Estas muestras fueron centrifugadas a 3000xg para separar el suero, el cual se almacenó a -70°C en alícuotas de 1ml para su posterior análisis.

Las muestras de los pacientes con VIH en tratamiento (n=636) fueron colectadas y almacenadas en el repositorio de muestras de la clínica de VIH del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán durante los periodos de febrero 2004 a mayo 2010. Las muestras correspondientes a los 770 pacientes VIH positivos ART-naïve fueron colectadas en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) durante el periodo de octubre 2007 a julio 2013 y almacenadas en el repositorio del CIENI.

Figura 6. Esquema representativo de la población en estudio.

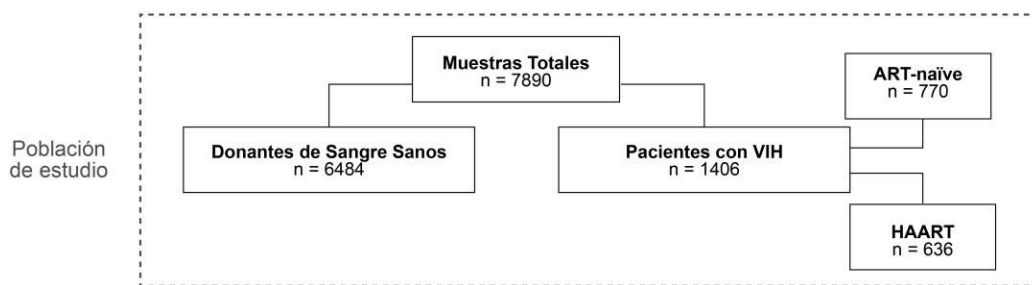


Figura 6. Esquema que muestra la población en estudio y su división en grupos de acuerdo a su relación con la infección de VIH y el tratamiento.

Agrupación de las muestras de suero en conjuntos (*pools*) y extracción de ácidos nucleicos

Debido a la prevalencia reportada en otros países, 1-5% de infección activa por HPgV en donadores de sangre sanos, para su análisis agrupamos las muestras de suero de los donadores de la siguiente forma: 200µl de cada 10 muestras fueron mezclados para crear grupos de 10 muestras por tubo, con la finalidad de agilizar el proceso de detección y el ahorro de reactivos al descartar las negativas y continuar el proceso sólo con las muestras positivas [113,114] (Fig. 7).

Figura 7. Método de agrupación de muestras.

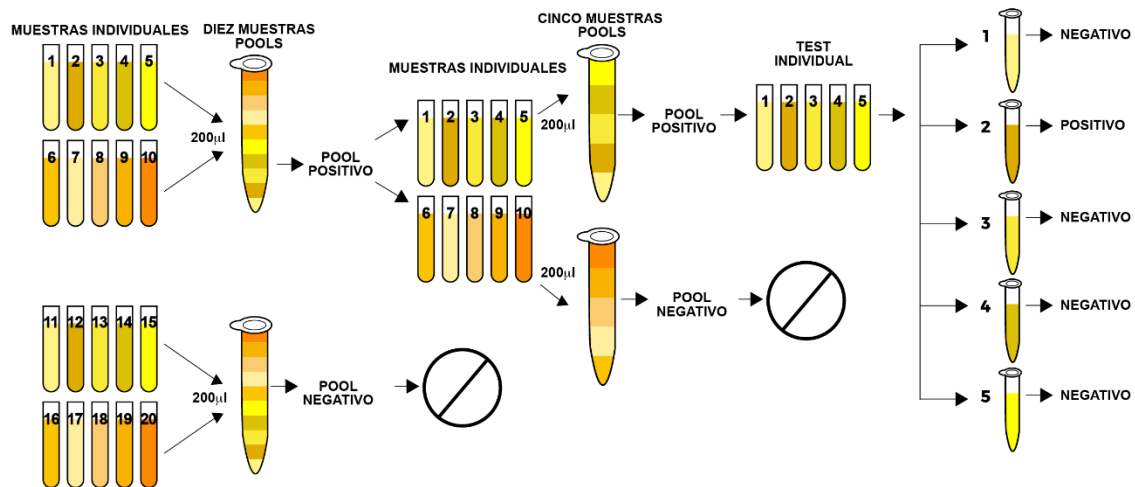


Figura 7. El diagrama muestra el orden de construcción de grupos para el análisis de la viremia por HPgV en donadores de sangre sanos.

De cada grupo de 10 muestras se tomaron 500µl para procesarlos mediante el sistema de extracción automática de ácidos nucleicos NucliSenS easyMag, (Biomérieux, Francia). Se utilizaron los ácidos nucleicos para determinar la infección activa (viremia) por HPgV mediante RT-PCR en tiempo real.

Después de obtenidos los resultados del RT-PCR en tiempo real, se descartaron las muestras de los grupos negativos, mientras que las muestras de pacientes correspondientes a los grupos positivos se reagruparon en nuevos grupos de 5 muestras

cada uno, tomando 200µl de suero de las muestras. Se repitió el proceso de extracción de ácidos nucleicos y la determinación de viremia por HPgV en estos nuevos grupos.

Finalmente, de las muestras pertenecientes a los grupos con resultado positivo posterior a la segunda ronda de pruebas, se tomaron 500µl de suero para repetir el proceso de extracción de ácidos nucleicos y determinación de viremia por HPgV y carga viral.

Para el caso de los sueros de pacientes VIH positivos, debido a que la prevalencia reportada de HPgV en otros países es de 20% a 40%, el procesamiento de estas muestras fue realizado de forma individual con 500µl suero de cada paciente, siguiendo el proceso de extracción descrito arriba y determinando la viremia de HPgV por RT-PCR tiempo real. De las muestras que resultaron positivas, se tomaron nuevamente 500µl de suero para extracción de ácidos nucleicos y determinación de carga viral de HPgV por RT-PCR tiempo real.

Detección, Cuantificación y Genotipificación de HPgV.

Detección de HPgV. La detección de HPgV en suero se realizó mediante RT-PCR tiempo real de un solo paso, teniendo como límite inferior de detección 50 copias/ml.

Para esta detección fue necesaria la selección de cebadores y sonda, cuyas secuencias inicialmente fueron proporcionados por la Dra. Reil del Instituto de Virología de la Universidad de Erlangen-Nürnberg (comunicación personal). Sin embargo, durante el proceso de estandarización del ensayo obtuvimos la detección de falsos positivos (Fig.8).

Figura 8. Gráfica de resultados del RT-PCR en tiempo real, controles positivos y negativos.

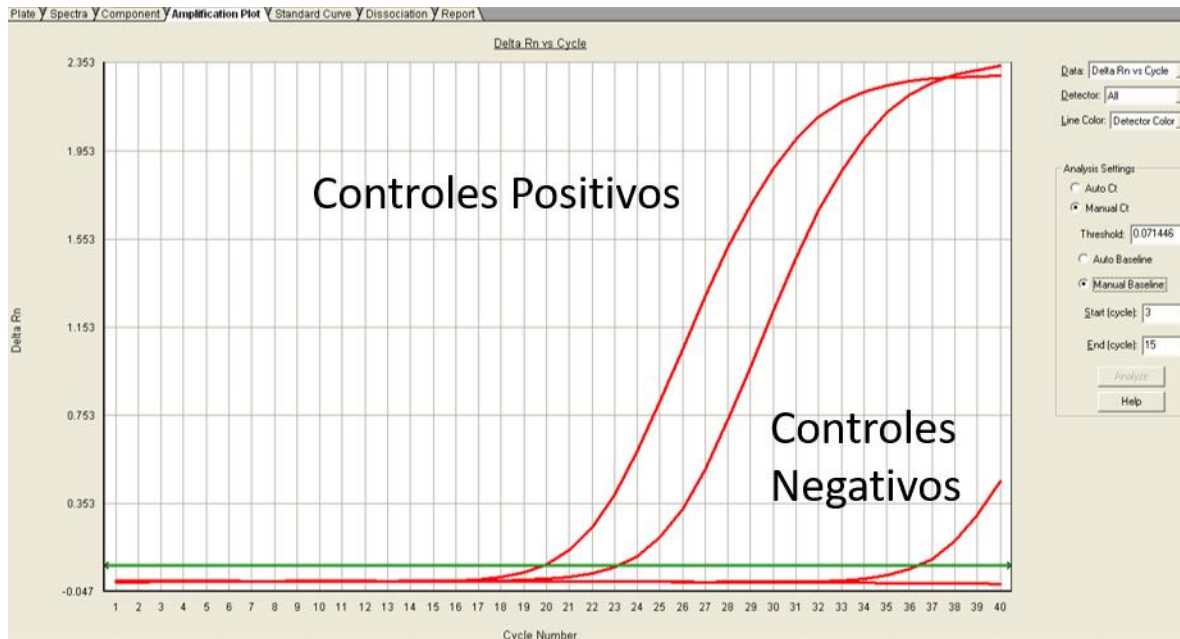


Figura 8. La gráfica de resultados del RT-PCR en tiempo real, muestra elevación correcta de los controles positivos, que corresponden a un plásmido que contiene la secuencia de HPgV y a una muestra clínica positiva, y elevación de uno de los controles negativos, correspondiente a suero negativo a HPgV, el otro control negativo (cuya línea se mantiene sin elevación) corresponde a control de reactivos. Las líneas rojas indican los resultados de las muestras y la línea verde el punto de corte entre negativos y positivos. Las elevaciones por encima de la línea verde son consideradas resultados positivos a viremia por HPgV.

Para eliminar la detección de falsos positivos, estandarizamos el RT-PCR en tiempo real a partir de la estandarización de la combinatoria entre 2 pares de cebadores y una sonda correspondiente a la región 5'UTR (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores y sonda utilizados en la estandarización del RT-PCR en tiempo real para detección de HPgV.

Dra. Reil	Sentido (F)	Anti-sentido (R)
	5'-GGCGACCGCCAAAA-3'	5'-CTTAAGACCCACCTATAGTGGCTACC-3'
Dr. Schleicher[122]	Sentido (28)	Anti-sentido (277)
	5'-GGCCAAAAGGTGGTGGATGG-3'	5'-ATTGAAGGGCGACGTGGACC-3'
Sonda	5'-TGACCGGGATTACGACCTACCAACCCT-3'	

Tabla 2. Los cebadores y sonda mostrados en la tabla fueron utilizados en diferentes combinaciones para la estandarización del RT-PCR en tiempo real para detección de HPgV.

Una vez completada la estandarización, se siguió el protocolo de amplificación compartido por la Dra. Reil para la detección de HPgV: para la retrotranscripción: 50°C por 30 min; activación de la polimerasa, 95°C por 2 min; 40 ciclos de amplificación iniciando a 95°C por 15s para el alineamiento de cebadores y 55°C por 1min para los procesos de elongación – detección.

Cuantificación de HPgV. Se utilizó el RT-PCR en tiempo real de un paso descrito arriba para la cuantificación de las muestras individuales, utilizando los ácidos nucleicos extraídos a partir de 500µl de suero de forma individual.

Para generar la curva estándar para la cuantificación se mandó sintetizar la secuencia correspondiente a la región que comprenden los nucleótidos 85-362 de acuerdo con la referencia AF121950 de GenBank; esta secuencia fue insertada en un plásmido puc57. Completado este proceso, se electroporó el plásmido que denominamos “GBV-C nuevo PCR” en E. coli competentes, las cuales se cultivaron en medio Luria, y a las 24h se extrajo el plásmido con el kit Qiagen Plasmid Midi Kit.

Ésta curva estándar derivada del uso del plásmido, se utilizó como referencia para la cuantificación de carga viral de HPgV en rangos de 10⁹ a 10² copias/reacción. Cada punto de la curva y cada muestra fueron procesados por triplicado.

Genotipificación de HPgV. Se determinó el genotipo de 445 muestras positivas para infección por HPgV. Para ello se extrajeron los ácidos nucleicos a partir de 500µl de suero como se describió anteriormente. Los ácidos nucleicos extraídos fueron analizados para determinación del genotipo de HPgV mediante PCR anidado dirigido a la región 5'UTR del virus. La primera ronda de PCR amplifica el fragmento que abarca los nucleótidos 139 – 400 de acuerdo con la secuencia de referencia con número de GenBank U44402, y la ronda subsecuente de PCR genera fragmentos de menor tamaño de acuerdo con el genotipo. Los productos del PCR anidado de cada muestra para genotipos 1 y 3 se visualizaron por separado de los productos para genotipos 2 y 4, utilizando gel de agarosa al 3% y con un marcador de peso molecular de 50pb como referencia. El tamaño de fragmento generado se esperaba en 95 pares de bases (pb) para el genotipo 1, 174pb para el genotipo 2, 161pb para el genotipo 3 y 161pb para el genotipo 4[115]. Las muestras en las que no se visualizó banda o cuyos resultados no fueron concluyentes en el ensayo del PCR anidado, se secuenciaron a partir del producto de la primera ronda de PCR por secuenciación capilar y el genotipo fue establecido a partir de comparación con secuencias de referencia de los genotipos 1 al 7 con los siguientes números de acceso en la plataforma GenBank: U59547 y AF131116 para genotipo 1; AB003289, U45966, U44402, U59520, U59521, U59519, AF131118, AY196904, y U59518 para genotipo 2a; U59529, U59532, U59530, U59531, y U59533 para genotipo 2b; D87711, AB003288, D87251, D87710, AB008335, D87714, D87713, D87712, AB003290, D87709, y D90601 para genotipo 3; AB021287, HQ331172 y AB018667 para genotipo 4; AF131111 y AF131112 para genotipo 5; AB003292 para genotipo 6; HQ331234 y HQ331235 para genotipo 7[116]. Los análisis filogenéticos y de evolución molecular fueron realizados en el

programa MEGA versión 6[117].

Análisis de los niveles de carga viral de HPgV y su distribución poblacional.

Debido a la amplia distribución de cargas virales de HPgV en las poblaciones estudiadas (donadores de sangre y los pacientes VIH-positivos con tratamiento y vírgenes al mismo), decidimos verificar la existencia de subgrupos estructurados en relación con la carga viral de HPgV.

Para este propósito, realizamos un análisis de Modelo de Mixtura Finita (FMM del inglés, Finite Mixture Models). Las mixturas finitas se definen como densidades asociadas a una población constituida por subgrupos de poblaciones denominadas “componentes;” cada componente es una fracción de la población y se denomina “proporción de la mixtura.” Para descomponer a la población en sus componentes se pueden usar modelos de mixtura finita con diferentes funciones: normal, exponencial o Bernoulli. Para los objetivos de este estudio y por las características poblacionales (6 grupos con diferente tamaño de muestra y con una distribución normal) se eligió usar el modelo de mixtura finita con función normal [118–120]. Este tipo de modelos ha sido utilizado de forma exitosa en diversos campos como astronomía, genética, biología, medicina, economía e ingeniería, entre otros, para la discriminación de clases en un grupo.

Se analizó la cantidad de distribuciones normales que se ajustan en cada una de las de nuestras poblaciones estudiadas (donadores de sangre sanos, pacientes VIH positivos ART-naïve y pacientes VIH⁺ con tratamiento antirretroviral) para hacer la distinción de los componentes que las conforman, utilizando un modelo de mixturas finitas no condicionado con un algoritmo de expectación-maximización, en el programa R, mediante las funciones NormalmixEM y plot.mixEM que se encuentran en el paquete Mixtools, el cual itera hasta encontrar la mejor probabilidad donde el modelo converge, resultando así en el número de componentes idóneo con sus puntos de corte definidos, donde el punto de corte de cada

subgrupo corresponde al valor donde se cruzan las curvas de densidad de los grupos obtenidas mediante el modelo.

Para el uso de esta estrategia se estableció un valor inicial de sigma de 1.4 en todas las poblaciones evaluadas, que corresponde a la desviación estándar de la población de donadores sanos, y el valor inicial de lambda 0.5, que se define como la proporción de la población en cada componente. [121]

RESULTADOS

Viremia, carga viral y Genotipificación de HPgV.

Uno de los objetivos de este estudio fue caracterizar la prevalencia infección activa por HPgV en México, debido a la ausencia de información. Para esto, determinamos la prevalencia de viremia de HPgV (infección activa), carga viral y genotipos circulantes en donadores de sangre sanos y pacientes con infección por VIH. Estos parámetros fueron determinados mediante RT-PCR en tiempo real.

Después de encontrar falsos positivos en la detección de HPgV mediante RT-PCR tiempo real durante el proceso de estandarización, probamos varias combinaciones de cebadores y re-estandarizamos la prueba.

Durante el proceso de estandarización encontramos que, al combinar los cebadores reportados por el Dr. Schleicher con la sonda de la Dra. Reil, se evitaba el problema de los falsos positivos. Sin embargo, su nivel de detección se encontraba muy por debajo de los cebadores de la Dra. Reil, detectando solamente cargas virales por encima de 105 copias/ml.

El problema del bajo nivel de detección se resolvió probando diferentes combinaciones entre los cebadores de la Dra. Reil y el Dr. Schleicher. Como resultado de esto obtuvimos la siguiente combinación: el cebador sentido del Dr. Schleicher y el anti-sentido y sonda de la Dra. Reil, obteniendo un nivel de detección de hasta 50 copias/ml y evitando la

detección de falsos positivos (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores y sonda utilizados en el RT-PCR en tiempo real para la detección de HPgV.

Cebadores	Sentido (28) Dr. Schleicher	Anti-sentido (R) Dra. Reil
	5'-GGCCAAAAGGTGGTGGATGG-3'	5'-CTTAAGACCCACCTATAGTGGCTACC-3'
Sonda	5'-TGACCGGGATTTACGACCTACCAACCCT-3'	

Tabla 3. Muestra la combinación ideal de cebadores y sonda, que fueron utilizados en el RT-PCR en tiempo real para la detección de HPgV.

Dirigidos a la región 5'UTR, los cebadores y sonda abarcan los nucleótidos 103 – 163 de acuerdo con la referencia AF121950 de la base de datos GenBank, correspondiendo el cebador sentido a la región 103-122, 5'-GGC CAA AAG GTG GTG GAT GG- 3'[122]; el anti- sentido a la región 188-163, 5'- CTT AAG ACC CAC CTA TAG TGG CTA CC -3'; y la sonda a la región 131-158 5'- (FAM) TGA CCG GGA TTT ACG ACC TAC CAA CCC T (TAMRA)-'3 [15]. Estos cebadores fueron utilizados a una concentración de 10pmol por reacción y la sonda a 5pmol y 8µl templado (Fig. 9).

Figura 9. Gráfica de resultados del RT-PCR en tiempo real, controles positivos y negativos.

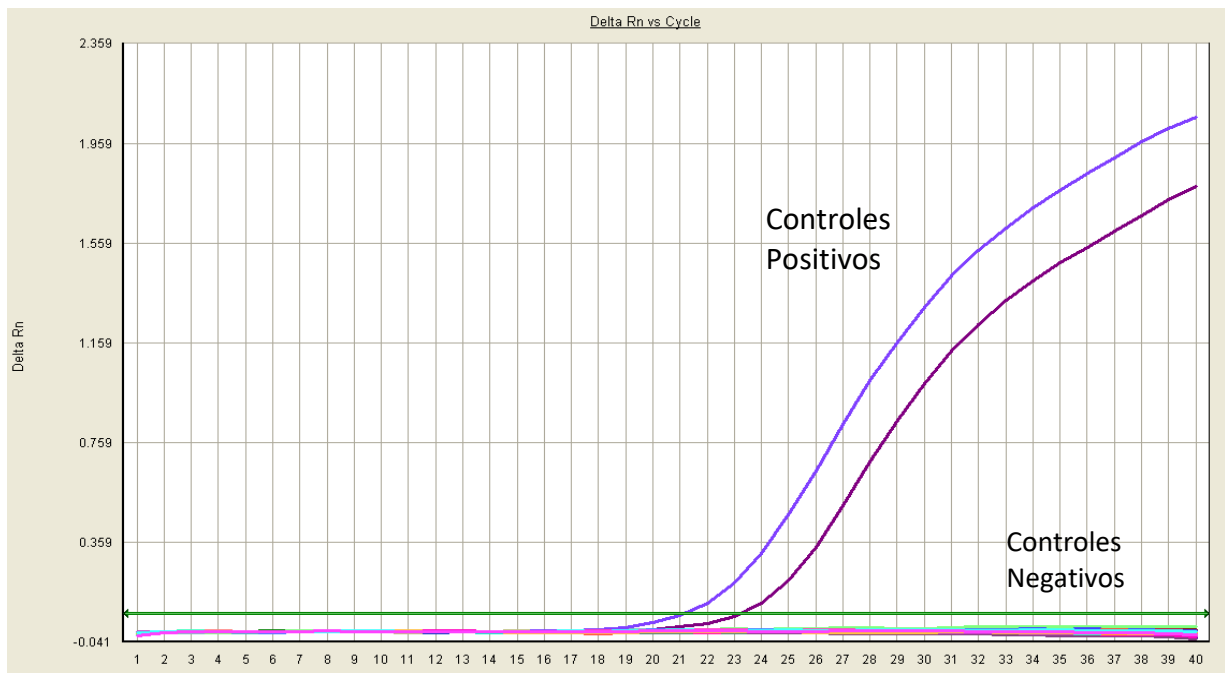


Figura 9. La gráfica de resultados del RT-PCR en tiempo real, muestra elevación correcta de los controles positivos y ausencia de elevación de los controles negativos. Los controles positivos corresponden al plásmido que contiene la secuencia de HPgV (morado) y una muestra clínica positiva (tinto) y los negativos corresponden a suero negativos a HPgV y a control de reactivos. Elevaciones por encima de la línea verde son considerados resultados positivos a viremia por HPgV.

Viremia de HPgV. Detectamos viremia de HPgV en 2.94% (191/6,484) de los donadores de sangre y en 33.64% (473/1,406) de los pacientes con infección por VIH (con y sin tratamiento antirretroviral). Encontramos un rango amplio de distribución de cargas virales en las muestras positivas, desde 10^2 hasta 10^8 copias/ml (Fig.10).

Figura 10. Esquema de la división de la población en grupos posterior al análisis de viremia por HPgV.

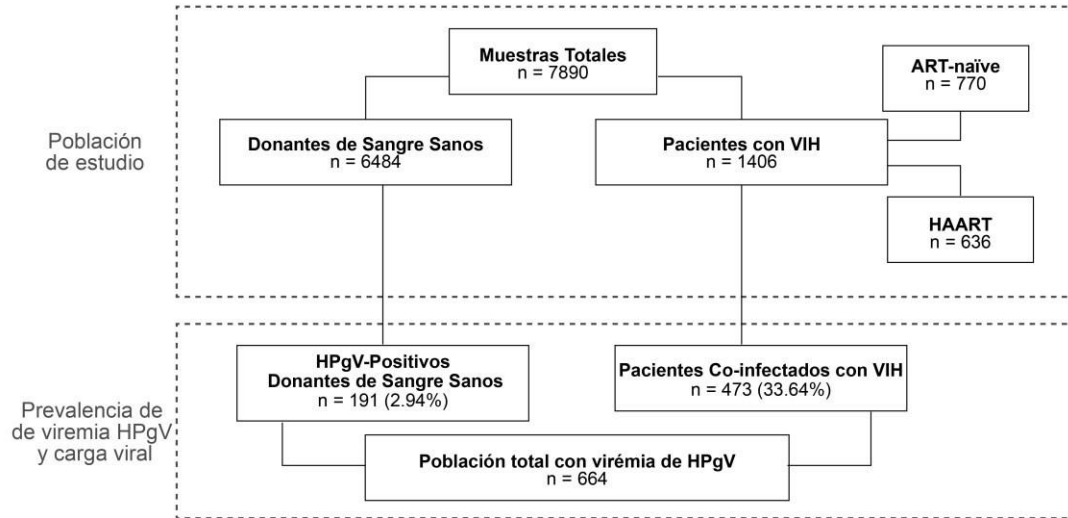


Figura 10. El esquema muestra la división de la población en grupos posterior al análisis de viremia por HPgV y la prevalencia de HPgV en mono infección y coinfección con VIH.

Genotipos de HPgV. Se determinaron los genotipos circulantes de HPgV en 445 muestras: 72/191 de donadores sanos y 373/473 de pacientes con infección por VIH, de los cuales 165/180 se encontraban en tratamiento antirretroviral y 208/293 eran naïve. Los genotipos más prevalentes fueron el 3 (en 261 pacientes, 58.6%), seguido por el genotipo 2 (en 150 pacientes, 33.7%).

Encontramos coinfección de los genotipos 2 y 3 en 30 (6.7%) pacientes, de los cuales 20 (4.5%) correspondían al genotipo 2a/3 y 10 (2.2%) al 2b/3. Encontramos también los genotipos 1 y 4 aunque con una frecuencia muy baja (0.45%), en 2 pacientes positivos a cada uno de los genotipos anteriores (Fig.11).

Figura 11. Esquema de la división de la población en grupos posterior al análisis de viremia y resultados de genotipo por HPgV.

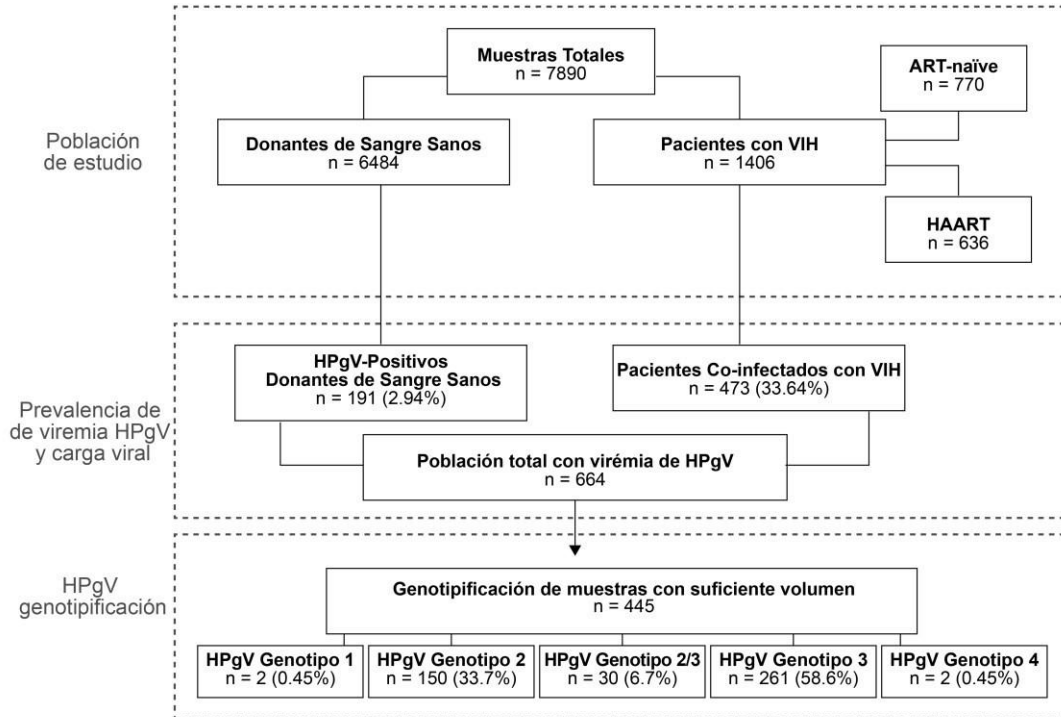


Figura 11. El esquema muestra la división de la población en grupos posterior al análisis de viremia por HPgV, la prevalencia de HPgV en mono infección y coinfección con VIH y la prevalencia de genotipos de HPgV.

Comportamiento de la carga viral de HPgV

Los resultados de la prevalencia y cargas virales de la infección por virus HPgV mostraron amplia heterogeneidad. Para verificar la existencia de subgrupos, mediante el modelo de mezclas finitas (FMM por sus siglas en inglés) analizamos los patrones de distribución de carga viral en cada una de las siguientes poblaciones:

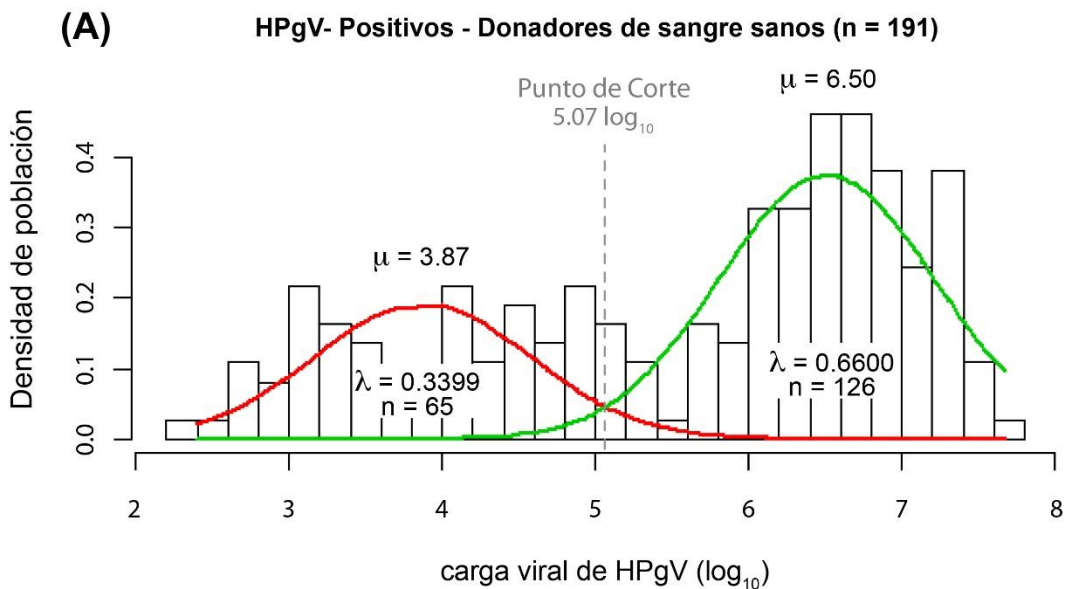
- Donadores de sangre sanos,
- Pacientes coinfectados con tratamiento antirretroviral,
- Pacientes coinfectados ART-naïve.

Encontramos que cada una de las poblaciones analizadas estaba conformada por dos componentes bien delimitados en relación a la carga viral de HPgV. Para nuestro estudio denominamos HPgV-bajo al componente a la izquierda del punto de corte y HPgV-alto el componente a la derecha.

El punto de corte entre los componentes de las poblaciones fue similar para los donadores de sangre sanos ($5.07\log_{10}$) y pacientes coinfectados naïve ($5.06\log_{10}$), mientras que para los pacientes coinfectados con tratamiento fue de ($5.28\log_{10}$).

Después, determinamos la densidad de población en cada clúster, encontrando que 34% de los donadores de sangre pertenece a HPgV-bajos y el 66% a HPgV-altos. Por su parte, 66.4% de los pacientes coinfectados naïve pertenecen al componente HPgV-bajo y 33.6% al HPgV-alto, y de los pacientes VIH-positivos con tratamiento ART 25% corresponden al componente HPgV-bajo y 75% al HPgV-alto (Fig.12).

Figura 12. Graficas de agrupación en dos componentes encontrados mediante el FMM



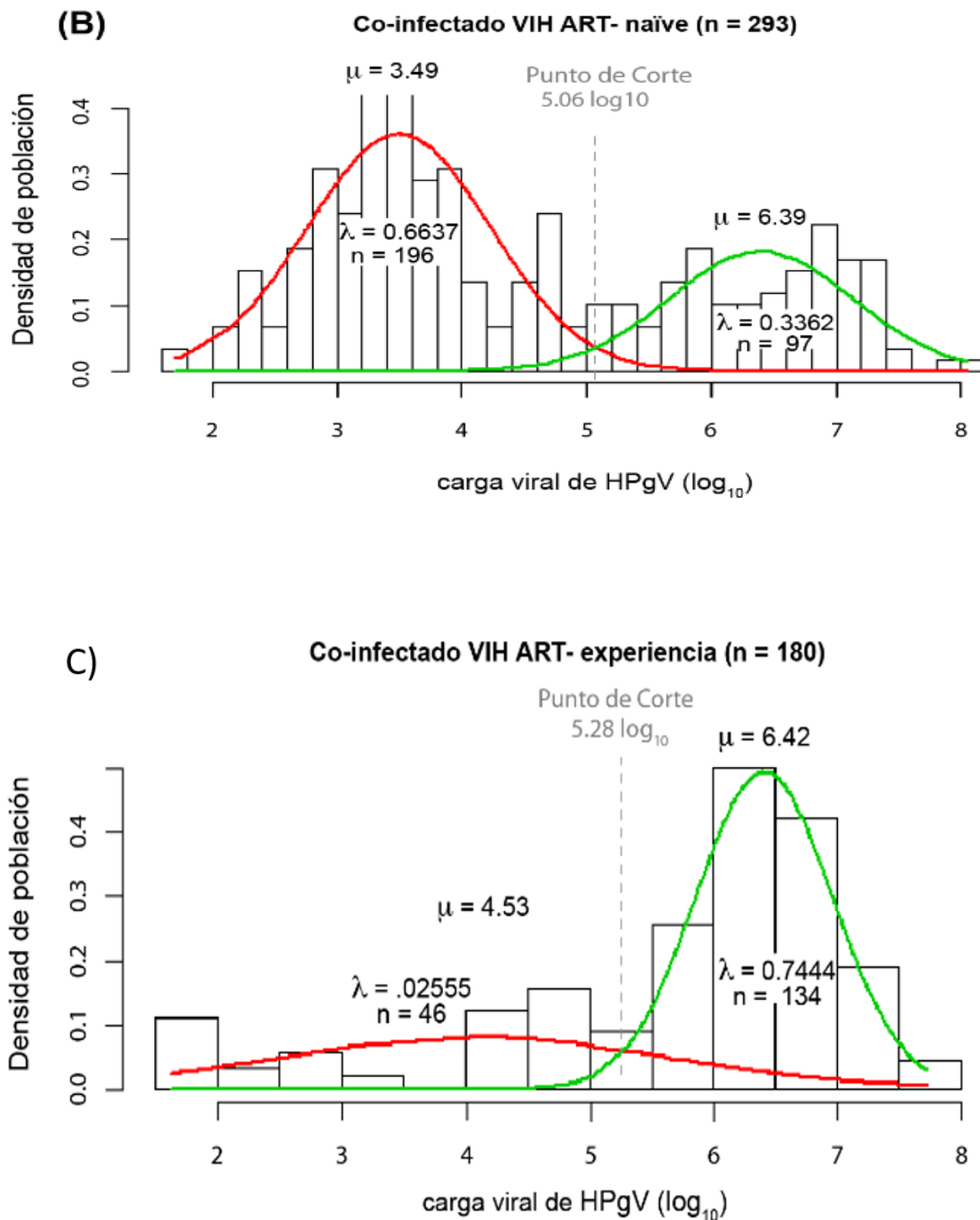


Figura 12. Las gráficas muestran la densidad de distribución (barras) de la carga viral de HPgV (\log_{10}) de los donadores de sangre sanos (A), los pacientes coinfectados HPgV/VIH ART-naïve (B) y los pacientes coinfectados HPgV/VIH con tratamiento antirretroviral (C). Las curvas gaussianas indican el subgrupo con cargas virales bajas (rojo) y cargas virales altas (verde), la media de cada subgrupo (μ), el número de pacientes (n) y la proporción de cada componente (λ). El punto de corte entre los grupos, corresponde al punto donde se interceptan las curvas.

Para evaluar si el comportamiento bimodal de las cargas virales de HPgV dependía del genotipo, analizamos en la población de pacientes naïve la distribución de los genotipos 2 y 3, por ser los más prevalentes. Encontramos que, de 100 pacientes con genotipo determinado en el componente HPgV-bajo, 76 (76%) fueron genotipo 3 y 24 (24%) fueron genotipo 2, mientras que de 76 pacientes con genotipo determinado del componente HPgV- alto, 54 (71%) correspondían al genotipo 3 y 22 (29%) a genotipo 2.

DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue describir la infección por HPgV en México. Encontramos una prevalencia de viremia activa de 2.9% en donadores de sangre sanos y 33% en pacientes VIH positivos, ambas prevalencias dentro de los rangos reportados en otros países [1,123– 127]. En cuanto al genotipo, a diferencia de otros países en los que solo predomina un genotipo, encontramos que los más prevalentes fueron 3 y 2, lo cual puede estar asociado a nuestra ubicación geográfica y la etnicidad de la población. La genética de un mexicano mestizo en promedio está formada por genes: 59% amerindios, 33% europeos y 13% africanos, estos porcentajes se obtuvieron promediando el porcentaje de genes amerindios, europeos y africanos que presenta la población mexicana mestiza en las regiones norte, centro y sur del país [128]. Estas proporciones son similares a las que encontramos en el genotipo de HPgV en nuestra población, 58.6% de la población corresponde al genotipo 3 y 33.7% de la población al genotipo 2, este hallazgo concuerda con la posible asociación entre el genotipo de HPgV y la etnicidad de la población, ya que el genotipo 3 es el más prevalente en Asia y Latinoamérica[129–131], pudiendo estar asociado a los ancestros amerindios, y el genotipo 2 tiene mayor prevalencia en Europa y Norteamérica[115,132], posiblemente asociado a población caucásica.

HPgV causa infecciones crónicas, lo que puede ocasionar coinfecciones de genotipos de HPgV o recombinaciones entre estos, especialmente en regiones como la nuestra donde prevalecen más de un genotipo [18,19]. En nuestro estudio encontramos coinfecciones

entre los genotipos 2 y 3 en el 6.7% de los casos, equivalente a 30 pacientes. Estas coinfecciones de genotipos de HPgV deben ser estudiadas más a fondo para determinar sus implicaciones clínicas.

Para entender el comportamiento de la carga viral de HPgV, analizamos la densidad de distribución de la carga viral de HPgV mediante FMM. Identificamos en los donadores de sangre sanos con infección por HPgV y en los pacientes coinfectados ART-naïve a tratamiento, claramente 2 componentes, uno con cargas virales bajas y el otro con cargas virales altas en ambas poblaciones, con puntos de corte prácticamente idénticos ($5.06\log_{10}$ para los donadores sanos y $5.07\log_{10}$ para los pacientes ART-naïve). El comportamiento bimodal de las poblaciones parece ser independiente de la infección por VIH. Incluso en la población de pacientes VIH con tratamiento se encontró este comportamiento bimodal, aunque con un punto de corte distinto probablemente ocasionado por efecto del tratamiento antirretroviral, ya que como se ha reportado anteriormente causa de aumento de la carga viral de HPgV probablemente asociada a la disminución de la carga viral de VIH [133]. Para verificar si el comportamiento bimodal dependía del genotipo de HPgV, comprobamos los porcentajes de cada genotipo en ambos componentes (bajo y alto) encontrando porcentajes similares, por lo que aparentemente el genotipo no es un factor determinante en este comportamiento bimodal. Para entender este fenómeno bimodal es importante estudiarlo a fondo para determinar la causa, que podría ser el resultado de distintos subtipos virales, en este caso habría que secuenciar el virus de HPgV completo en los individuos infectados o factores inherentes al hospedero, como HLA o la regulación antiviral del mismo. Si bien la infección por VIH no altera el comportamiento bimodal de la infección por HPgV, sí modifica la proporción de los sujetos dentro de los componentes (bajo y alto), sugiriendo interacción y competencia entre ambos virus.

CAPITULO III. Caracterización de los efectos de la interacción HPgV-hospedero-VIH

El siguiente objetivo, en nuestro planteamiento comprendía la caracterización de la influencia de HPgV en el curso de la infección por VIH. Para determinar la existencia de modificaciones en la patogénesis de VIH causados por la coinfección con HPgV, medimos y analizamos los marcadores de progresión de VIH, 1) carga viral de VIH, 2) cuantificación de CD4⁺, 3) relación CD4⁺/CD8⁺. Estas mediciones y análisis se realizaron solo en pacientes VIH positivos ART-naïve, para eliminar el tratamiento antirretroviral, ya que actúa como elemento confusor. Finalmente, a manera de piloto decidimos analizar los cambios en la expresión genética del hospedero durante la coinfección HPgV/VIH.

METODOLOGÍA

Para caracterizar los efectos de la interacción HPgV-hospedero-VIH en el curso de la infección por VIH, analizamos los cambios en los marcadores de progresión de la enfermedad, (carga viral, conteo de células T CD4⁺ y la relación de células T CD4⁺/CD8⁺), con relación a la carga viral y genotipo de HPgV.

Para evitar factores de confusión como el tratamiento antirretroviral y el tiempo de infección de VIH, solo se tomó en cuenta para este estudio los pacientes VIH positivos ART-naïve y en los pacientes que fue posible se determinó el tiempo de infección de VIH.

Cuantificación de VIH, cuenta de células T CD4⁺, Relación CD4⁺/CD8⁺ y cálculo de tiempo de infección por VIH.

Todos los datos en relación con la infección por VIH fueron obtenidos de las bases de datos del CIENI/INER.

Carga viral de VIH. Se determinó mediante el kit Real Time HIV-1 (Abbott), en el equipo m2000 de la misma compañía. Este kit, en combinación con el equipo, permite automatizar la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de suero o plasma mediante el

sistema de extracción con perlas de sílica magnética, para posteriormente preparar la mezcla para el RT-PCR en tiempo real, dejando la placa lista para su amplificación, detección y cuantificación. Cada pozo de la placa incluye los reactivos necesarios para la reacción de RT-PCR en tiempo real, la muestra y 3 controles (negativo, positivo alto y positivo bajo) para asegurar la validez de los resultados.

Cuenta de células T CD4⁺ y CD8⁺. Se realizó mediante citometría de flujo en el equipo FACSCanto II (BD biosciences), mediante el kit Trucount (BD tritest). Este kit permite la medición de ambos tipos celulares mediante inmunofluorescencia directa, acoplando 3 fluorocromos distintos a anticuerpos específicos anti-CD3⁺, anti-CD4⁺ y anti-CD8⁺, permitiendo el conteo absoluto de los 3 subtipos celulares en una sola muestra y en un solo ensayo.

Cálculo del tiempo de infección. Para evitar que el tiempo de infección por VIH fuera un factor confusor, fue posible calcularlo en 303 muestras de las 770 positivas a la infección y naïve a tratamiento. El cálculo se realizó mediante el ensayo HIV-1 LAg-Avidity EIA (Sedia), el cual es un ensayo *in vitro* de avididad cuantitativa limitada cuyo objetivo es distinguir las infecciones recientes por VIH de las de larga evolución. Está basado en el hecho de que en la infección reciente por VIH los pacientes presentan menor avididad de IgG hacia VIH que los que tienen una evolución más larga.

Se definió como infección reciente (<6 meses) a las muestras de pacientes con los resultados de avididad de los anticuerpos en suero en densidades ópticas normalizadas (ODn por sus siglas en inglés) <1.5 (95% CI 118±142), en conjunto con las siguientes características: fecha de diagnóstico <1 año, el conteo de células T CD4⁺ ≥200 células/mm³ y la carga viral >400 copias/ml. Las muestras de los pacientes que no cumplieran con estos criterios se consideraron como infecciones tardías (>6 meses). Todas las pruebas se realizaron por triplicado [134,135].

Efecto del genotipo de HPgV en los marcadores de progresión de la infección por VIH y la carga viral de HPgV.

Para determinar la influencia del genotipo en los marcadores de progresión de VIH, comparamos mediante ANOVA de una vía las medias de los siguientes parámetros: carga viral de VIH, cuenta de células T CD4⁺ y la relación CD4⁺/CD8⁺ en los pacientes coinfectados naïve a tratamiento antirretroviral entre los pacientes HPgV de la misma condición y diferente genotipo (HPgV-bajo genotipo 2 vs HPgV-bajo genotipo 3) y (HPgV-alto genotipo 2 vs HPgV-alto genotipo 3).

Efecto de la carga viral de HPgV en los marcadores de progresión de la infección por VIH.

Estudios previos han mostrado el efecto de HPgV en los marcadores de progresión de VIH (carga viral de VIH, cuenta de células T CD4⁺ y relación de cuenta de células T CD4⁺/CD8⁺). Sin embargo, la mayoría de estos estudios no considera la relevancia de la carga viral de HPgV en el fenómeno, persistiendo discrepancias sobre el efecto de HPgV en la infección por VIH.

Para determinar la influencia de la carga viral de HPgV, comparamos en los pacientes VIH positivos ART- naïves las medias de los marcadores de progresión de VIH agrupados por las condiciones de HPgV obtenidas mediante el modelo FMM (negativo, positivo bajo y positivo alto). Posteriormente se repitieron estas comparaciones subdividiendo por genotipo de HPgV (2 y 3); y finalmente por tiempo de infección de VIH (reciente y tardía). Según el caso, el análisis se realizó utilizando prueba t de Student, ANOVA de una vía o prueba de Bonferroni (Fig. 13).

Figura 13. Esquema de los grupos de los pacientes VIH positivos ART-naïve para análisis de los efectos de la coinfección por HPgV.

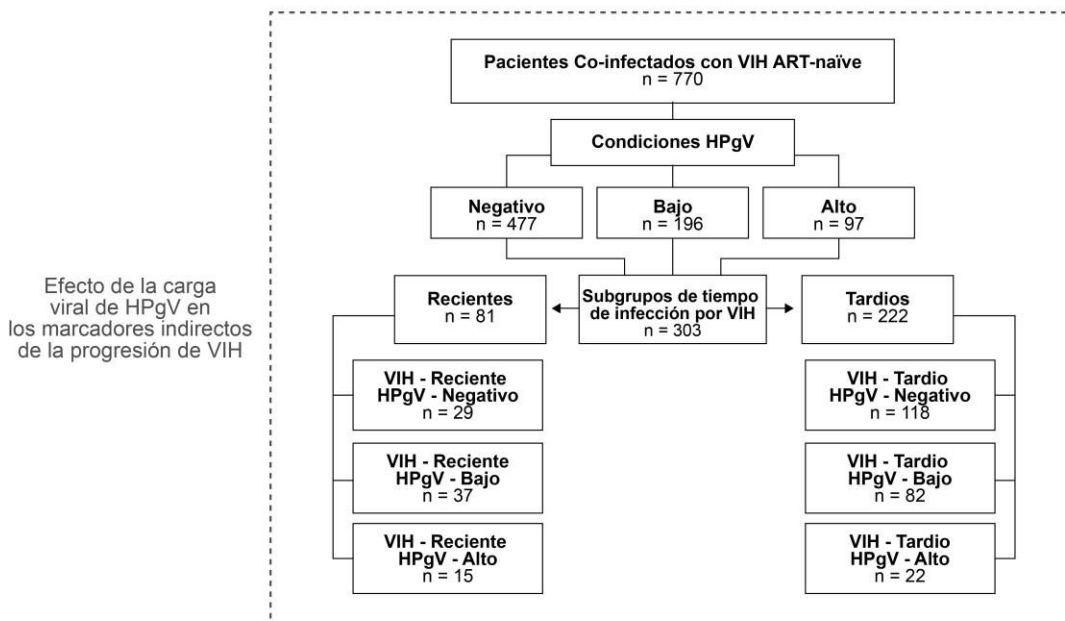


Figura 13. El esquema muestra las subdivisiones del grupo de pacientes VIH positivos ART-naïve de acuerdo a la condición de viremia y carga viral de HPgV y al tiempo desde la infección por VIH.

Cambios en la expresión génica causados por HPgV durante la infección por VIH (ensayo ex vivo).

Para este ensayo, previo consentimiento informado, se seleccionaron 2 donadores sanos definidos como “controles” negativos a serología para VIH, VHC y VHB, sin fiebre al momento de la donación y con RT-PCR negativo para HPgV, y a 2 donadores sanos definidos como “casos”, negativos a serología para VIH, VHC y VHB, sin fiebre y con infección por HPgV-alto.

A los participantes en el estudio se les solicitó la donación de 20ml de sangre, la cual se colectó en 4 tubos de 5ml con EDTA como anticoagulante.

La sangre colectada fue procesada para separación de PBMCs de la siguiente manera: Se

centrifugaron los tubos con la sangre de los donadores a 3000g x 10min para separar el suero, el cual se retiró de la muestra y se sustituyó por buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés).

Se homogeneizó la muestra y se depositó de forma lenta, formando dos capas con el líquido para separación por gradiente, con una densidad de 1.077g/ml (Lymphoprep, Axis-Schield), en un tubo de 50ml cónico, en una relación 3 (muestra):1 (Lymphoprep). (Fig.14).

Figura 14. Esquema representativo de la separación de PBMCs por gradiente de densidad.

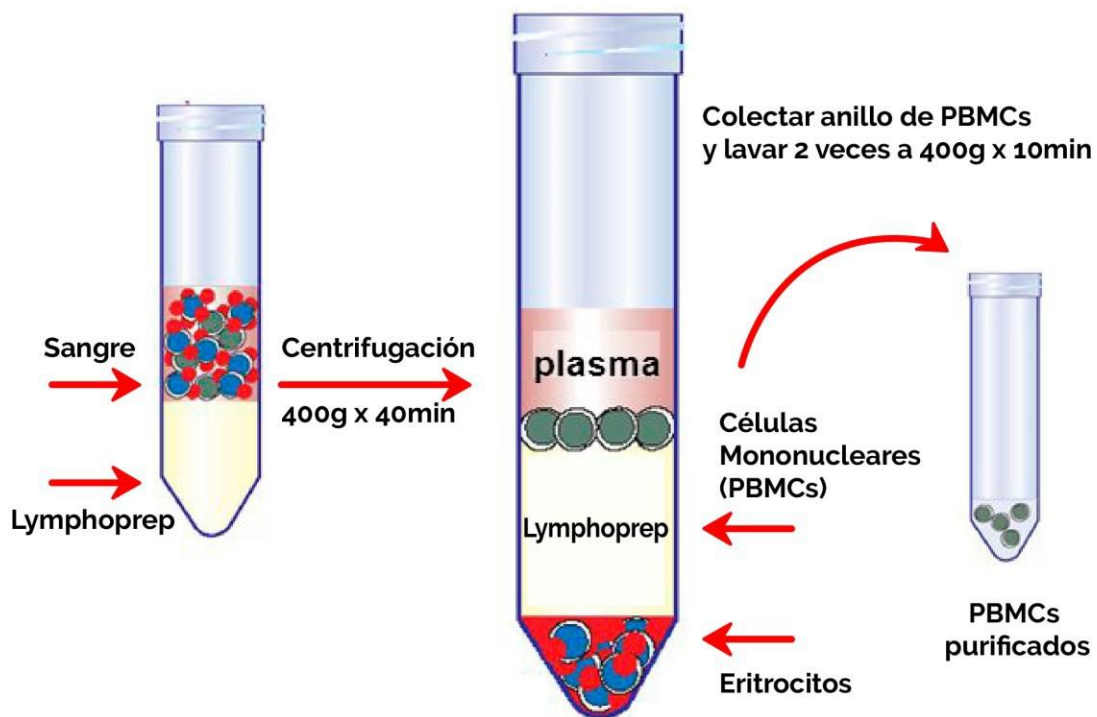


Figura 14. En el esquema se muestran los pasos para la separación de PBMCs por gradiente de densidad.

Se centrifugó a 400g x 40min, después se rescató el anillo de PBMCs y se lavó 2 veces con 15ml de PBS a 400g x 10min [136].

Los PBMCs obtenidos fueron cultivados durante 48h en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A las 48h de cultivo,

se cosecharon, centrifugaron a 400g x 10min para formar un botón celular, se desechó el sobrenadante y se contaron las células utilizando el contador automático Countess (Invitrogen). Se separaron 10×10^6 células para extracción de ácidos nucleicos con el kit RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraídos los ácidos nucleicos con el kit y eliminado el ADN con DNasa I, se analizaron mediante RT-PCR los perfiles de expresión génica con los kits RT2 Profiler PCR Arrays, PAH-051 PCR Array Human HIV Host response y PAH-034 Human Th1 & Th2 Responses (SABioscience), según las instrucciones del fabricante, para evaluar la respuesta del hospedero a la infección por VIH y la polarización inmunológica hacia los perfiles Th1 y Th2 respectivamente. Los resultados se clasificaron como condiciones basales del estudio [137].

Para la infección por VIH, el virus fue purificado y concentrado del suero de un paciente, [138] mediante ultracentrifugación de la siguiente manera: se depositaron 250 μ l de medio para separación por gradiente de densidad, Iodixanol al 60% en agua (Opti-prep, axis-shield), con una densidad de 1.319 - 1.321 g/ml en tubos de 12ml; sobre el Iodixanol de forma lenta para no mezclar las fases se depositaron 10ml de suero. Se utilizó el rotor TH-641 en las siguientes condiciones: 50,000g x 2h 22min a 4°C. Terminado el ultracentrifugado se retiró el suero por la parte superior hasta llegar a $\approx 500\mu$ l por encima de la división de fases, esto es, dejando en el tubo $\approx 750\mu$ l, los cuales se colectaron en tubos cónicos con capacidad para 1.5ml. Estos tubos se colocaron en agitador vibratorio a velocidad de 200rpm durante un periodo de 2-3hr a 4°C. Terminado este proceso los tubos se centrifugaron a 6000g x 24h a 4°C. Después del centrifugado se retiró el sobrenadante, teniendo cuidado de no desechar los botones formados por la sedimentación del virus, estos botones se resuspendieron en 50 μ l de PBS, donde se incubaron por 10-14hr a 4°C. Terminado el proceso se cuantificó el purificado viral y diluyó a las concentraciones deseadas [139,140].

Se incubaron 2 tubos (1 por condición) con 60×10^6 PBMCs con 3ml de sobrenadante del cultivo de VIH con una relación de .1 virus por célula (Multiplicity of infection MOI) durante 3h agitando suavemente el tubo cada hora [141].

Posterior a la infección se lavaron las células con medio de cultivo RPMI 4 veces a 400g x 10min y se cultivaron en botellas para cultivo celular de 25cc en RPMI suplementado como se describió previamente. De cada muestra se realizaron 2 ensayos por triplicado para evaluar los resultados después de 4 y 7 días de cultivo.

El último día de cada cultivo (día 4 - día 7) se colectaron las células y el sobrenadante. Las células fueron procesados de la misma manera en que se procesaron las células de las condiciones basales y mediante el kit ELISA p24 (Perkin-Elmer) se cuantificó antígeno p24 en el sobrenadante.

Finalmente, los resultados de los PCR arrays, las comparaciones entre condiciones y el análisis estadístico se realizaron en la plataforma en línea GeneGlobe Data Analysis. Comparamos los resultados de la diferencia en el cambio de expresión entre las condiciones basales y los días 4 y 7 de los casos vs los controles, para determinar las modificaciones en la expresión génica con relación a la respuesta a la infección por VIH y la polarización celular, en presencia y ausencia de HPgV.

RESULTADOS

Caracterización de la interacción HPgV-VIH-Hospedero en pacientes coinfectados.

Cuantificación de VIH, Células T CD4⁺, relación CD4⁺/CD8⁺ y determinación del tiempo de infección. Obtuvimos las cargas virales de VIH y el conteo de células T CD4⁺ y CD8⁺ de 770 pacientes naïve a tratamiento. El tiempo de infección por virus de VIH en 303 de estos pacientes se obtuvo con una precisión del 85%. Efecto del genotipo de HPgV en los marcadores de progresión de la infección por VIH y la carga viral de HPgV. Al comparar mediante ANOVA de una vía las medias de los marcadores de progresión de VIH y la carga viral de HPgV de los pacientes naïve entre los pacientes con genotipos 2 y 3 de

HPgV, agrupados en las condiciones HPgV bajo y alto, no encontramos diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Marcadores de progresión de VIH comparados entre genotipos 2 y 3, de acuerdo con la carga viral de HPgV baja o alta en pacientes VIH positivos ART-naïve.

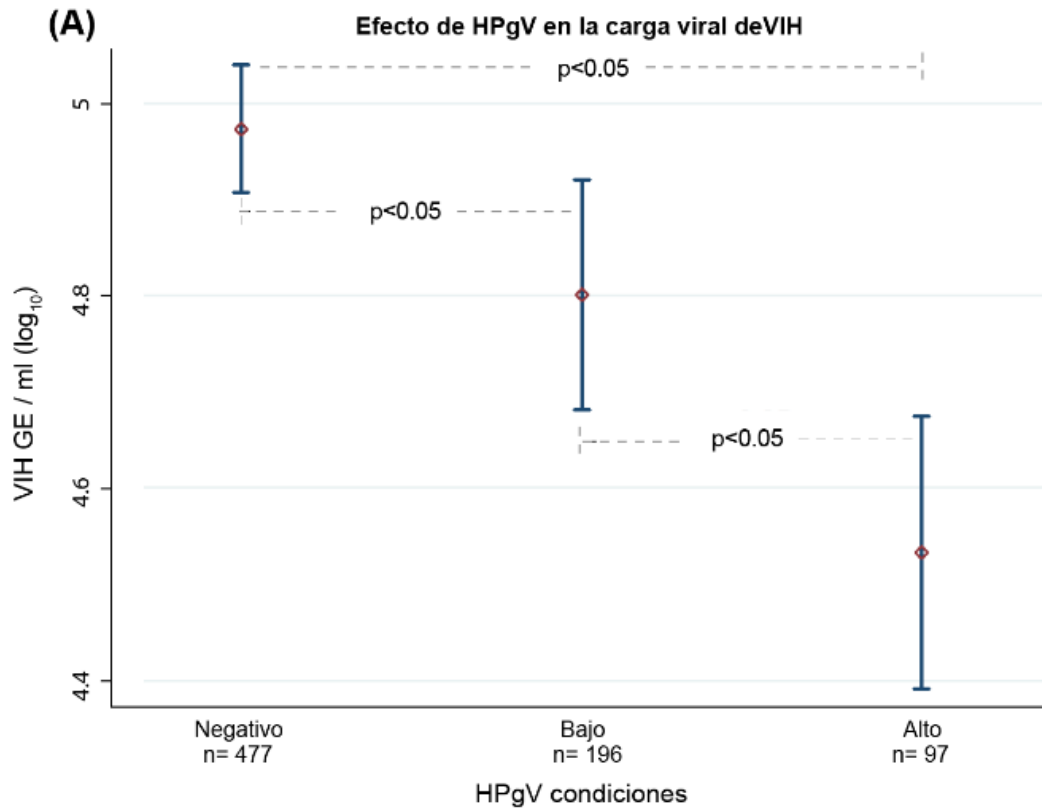
Condición	HPgV – bajo			HPgV - alto		
	2 (n = 23*)	3 (n = 76)	p	2 (n = 22)	3 (n = 54)	p
Media de carga viral de VIH copias/ml (\log_{10})	4.98 CI95% (4.66 – 5.28)	4.80 CI95% (4.63 – 4.97)	0.33	4.70 CI95% (4.39 – 4.99)	4.44 CI95% (4.25 – 4.63)	0.15
Media de conteo de células CD4+	323 CI95% (215 - 431)	293 CI95% (233 - 352)	0.63	344 CI95% (251 - 437)	394 CI95% (335 - 453)	0.37
Media de la relación CD4+/CD8+	.325 CI95% (.231 - .418)	.286 CI95% (.234 - .337)	0.46	.379 CI95% (.271 - .485)	.394 CI95% (.324 - .462)	0.82
Media de carga viral de HPgV copias/ml (\log_{10})	3.35 CI95% (3.04 – 3.64)	3.58 CI95% (3.41 – 3.74)	0.18	6.42 CI95% (6.11 – 6.72)	6.43 CI95% (6.23 – 6.62)	0.96

Tabla 4. Muestra las diferencias entre los genotipos 2 y 3 de HPgV (mediante T-student y Boferroni) en los marcadores de progresión de VIH. *un paciente (ID 667) fue excluido debido a que sus CD4⁺ se encontraban fuera de rango. La $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Efecto de la carga viral de HPgV en los marcadores de progresión de VIH.

Al comparar mediante ANOVA de una vía, divididos de acuerdo con su condición de HPgV (-negativo, -bajo, -alto), comparamos las medias de los marcadores de progresión de VIH. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en carga viral de VIH ($p < 0.05$), cuenta de células T CD4⁺ ($p < 0.05$) y en la relación CD4⁺/CD8⁺ ($p < 0.05$) (Fig. 15).

Figura 15. Efecto de la coinfección con HPgV en los marcadores de progresión de VIH en pacientes VIH positivos ART-naïve.



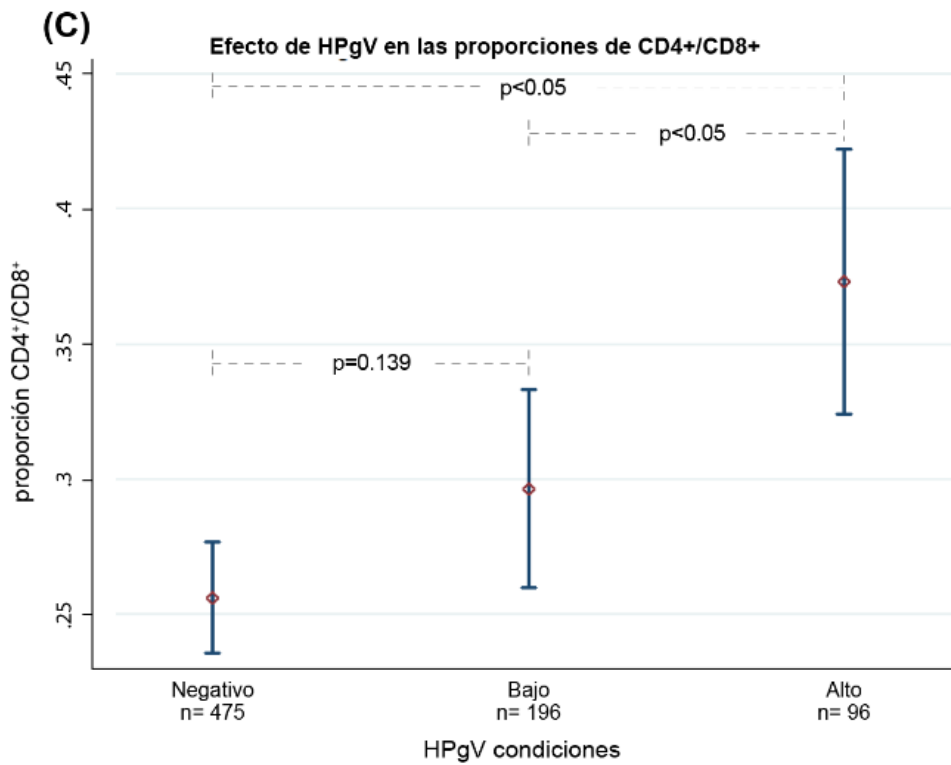
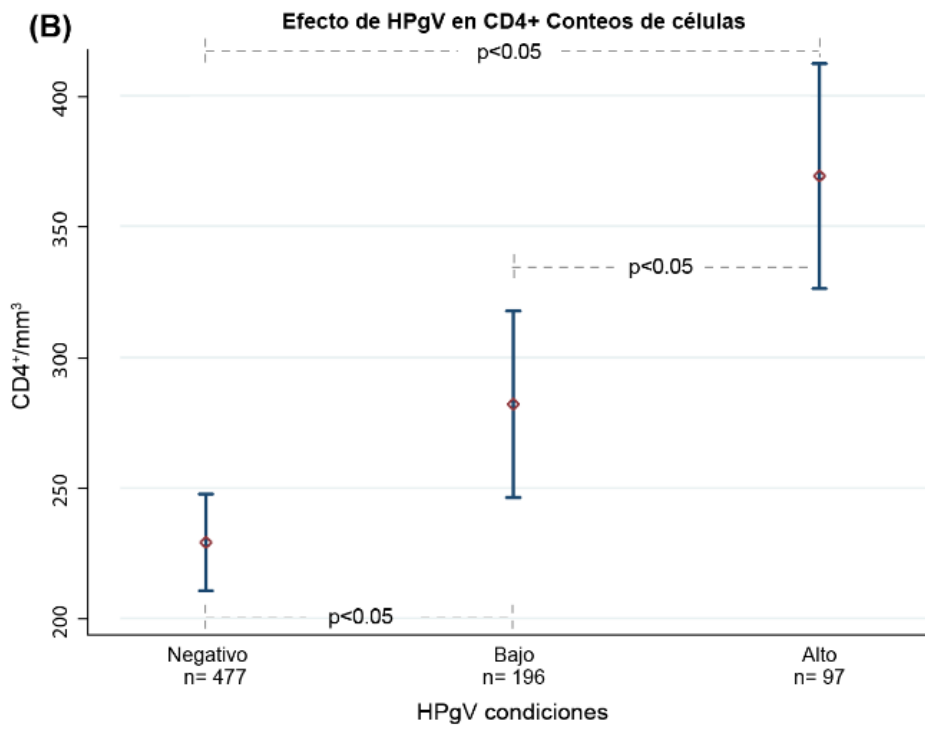
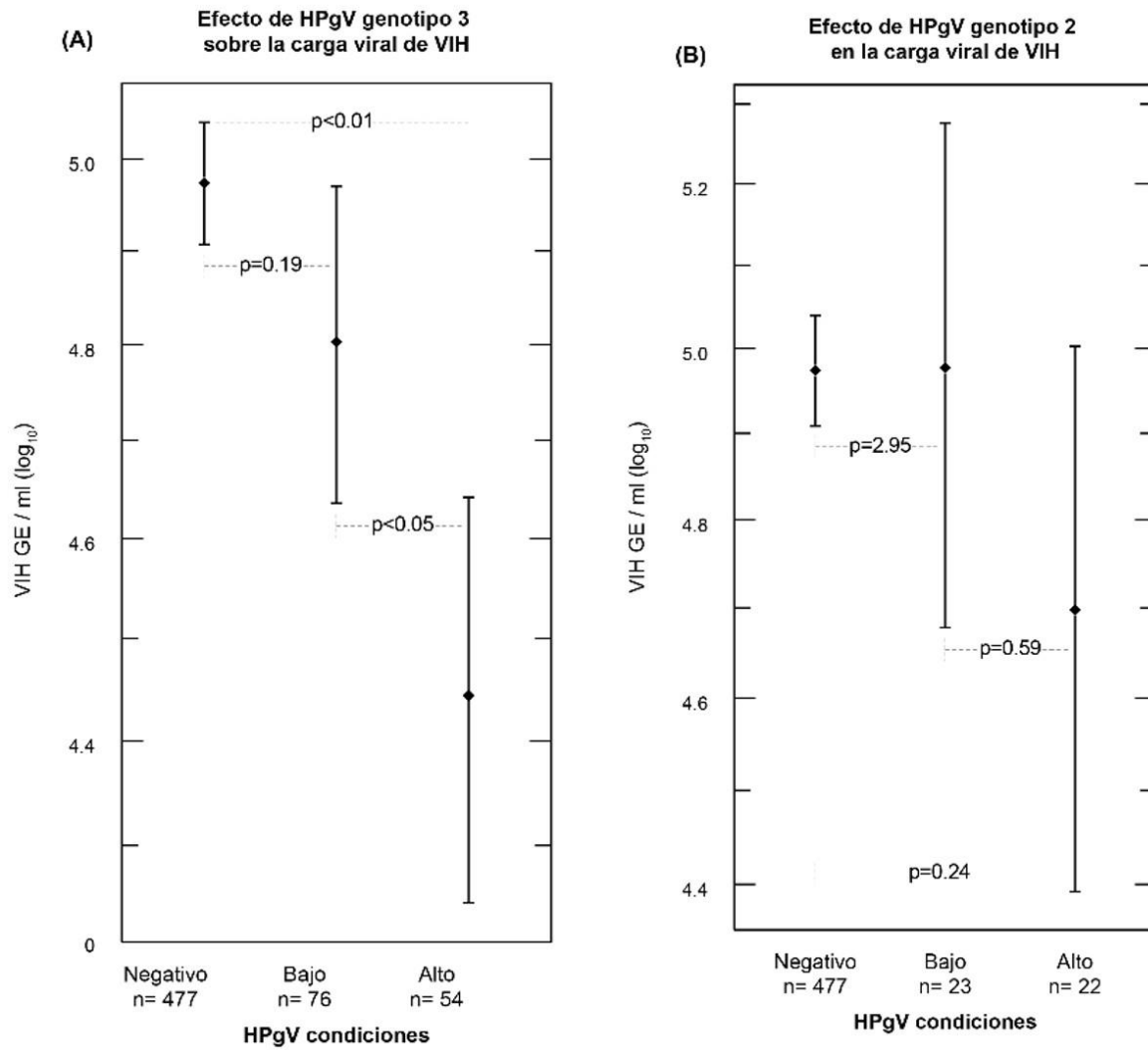


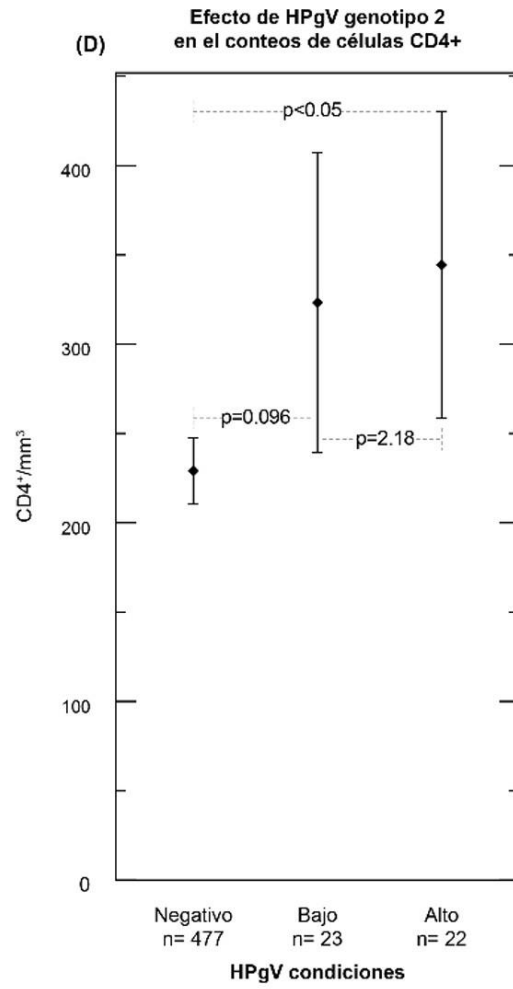
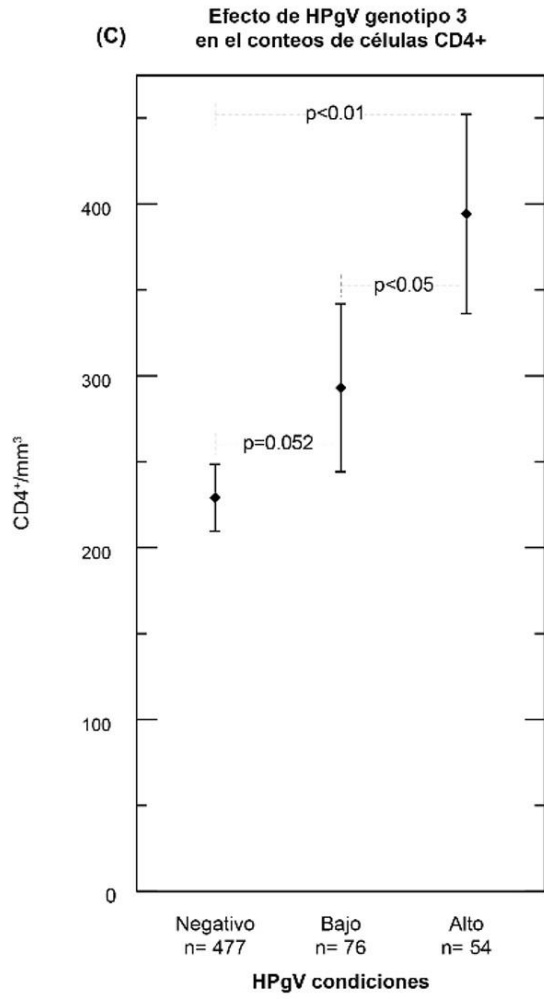
Figura 15. Cada grafica muestra las diferencias entre las medias de: (A) carga viral de VIH, (B) CD4⁺, (C) relación CD4⁺/CD8⁺, de acuerdo a la condición de HPgV. La p<0.05 fue considerada estadísticamente significativa.

Posteriormente, realizamos la comparación mediante Bonferroni post hoc para obtener las diferencias entre cada grupo, encontrando menor carga viral de VIH ($p < 0.05$) en la condición HPgV-bajo (-0.17 copias de VIH/ml \log_{10}) y en la condición HPgV-alto (-0.44 copias de VIH/ml \log_{10}) ambas en relación con la condición HPgV-negativo (Fig.15-A). A su vez, encontramos mayor conteo de células T CD4⁺ ($p < 0.05$) en la condición HPgV-bajo (+53 CD4⁺/mm³) y en HPgV-alto (+140 CD4⁺/mm³), ambas en relación con la condición HPgV-negativo (Fig.15-B). En cuanto a la relación CD4⁺/CD8⁺, encontramos un aumento significativo ($p < 0.05$) sólo en la condición HPgV-alto (+0.11) ambas en relación con la condición HPgV-negativo (Fig.15-C).

Para determinar la influencia del genotipo de HPgV en los marcadores de progresión de VIH, comparamos las medias de la carga viral de VIH, cuenta de células T CD4⁺ y relación de CD4⁺/CD8⁺ de los pacientes positivos a VIH naïves mediante ANOVA de una vía y comparación múltiple de Bonferroni post hoc entre las condiciones HPgV-negativo, -bajo, -alto. Encontramos que los grupos de pacientes con carga viral de VIH significativamente menor fueron los coinfectados con genotipo 3 de HPgV, en la condición de HPgV alto ($p < 0.01$, -0.53 copias de VIH/ml \log_{10}) y HPgV-bajo ($p < 0.05$, -0.36 copias de VIH/ml \log_{10}). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los pacientes coinfectados con HPgV genotipo 2 en ninguna de las condiciones HPgV-alto ($p > 0.05$) o HPgV-bajo ($p > 0.05$). Los resultados se obtuvieron en comparación con la condición HPgV-negativo (Fig. 16).

Figura 16. Efecto del genotipo de HPgV (2 o 3) en los marcadores de progresión de VIH en pacientes VIH positivos ART-naïve.





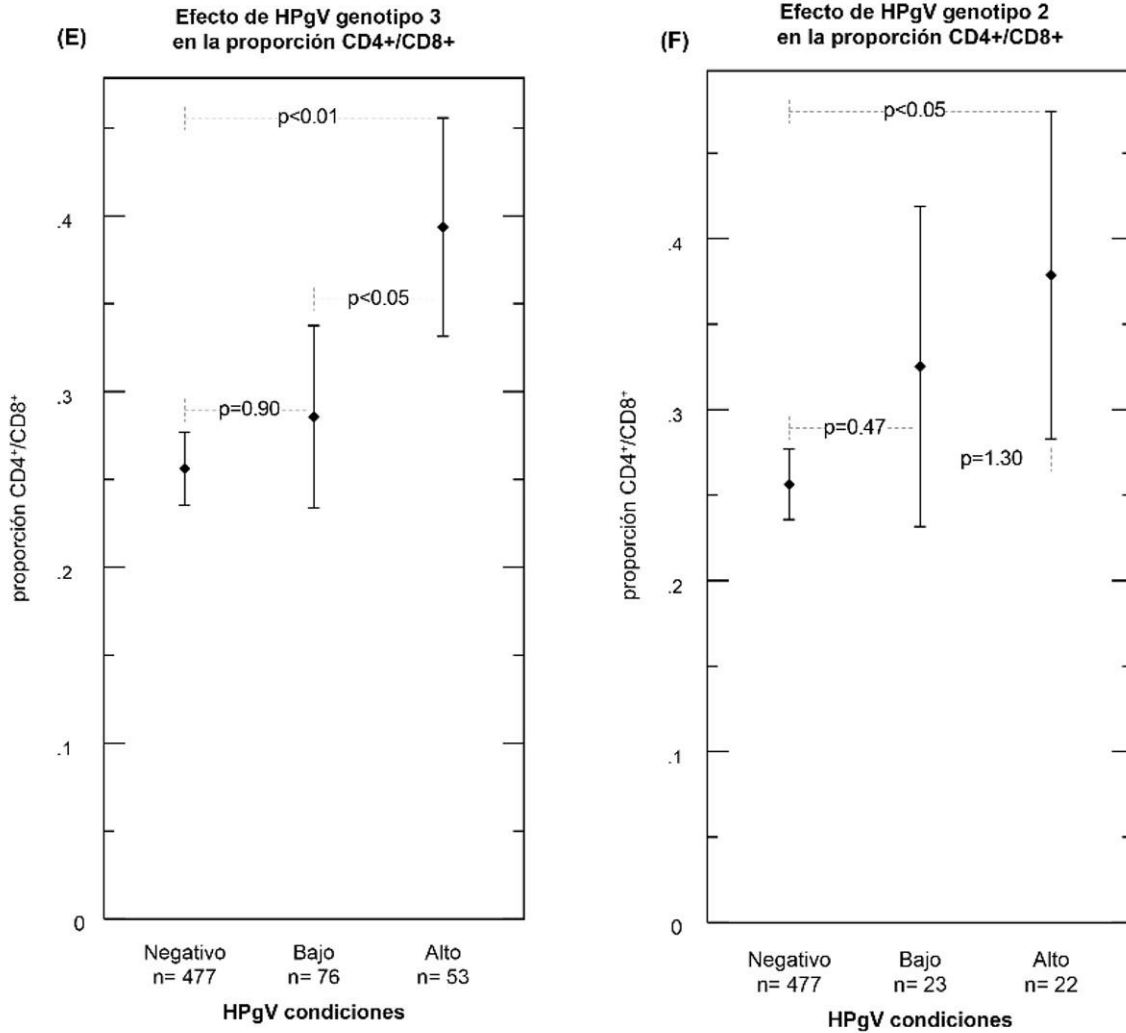


Figura 16. Cada grafica muestra las diferencias entre las medias de: (A y B) carga viral de VIH, (C y D) CD4⁺, (D y E) relación CD4⁺/CD8⁺, de acuerdo a la condición de HPgV y al genotipo. Genotipo 3 (A, C, y E), genotipo 2 (B, D y F). La p<0.05 fue considerada estadísticamente significativa.

Contrario a lo anterior, al comparar la media de células T CD4⁺ de los pacientes con genotipo 3 de HPgV, encontramos el conteo de células significativamente más alto en los pacientes HPgV-alto (P<0.01, +166) comparado con los pacientes HPgV-negativo y (p<0.05, +101) comparado con HPgV-bajo. A su vez, encontramos CD4⁺ significativamente más altos en los pacientes HPgV-alto genotipo 2 (p>0.05, +115) comparado con los pacientes HPgV- negativos.

Más aún, al comparar la media de la relación CD4⁺/CD8⁺ de los pacientes con genotipo 3

de HPgV, encontramos el conteo significativamente más alto en los pacientes HPgV-alto ($P < 0.01$, $+0.137$) comparado con los pacientes HPgV-negativo y ($p < 0.05$, $+0.108$) comparado con HPgV-bajo, así como en los pacientes HPgV-alto genotipo 2 ($p > 0.05$, $+0.122$) comparado con los pacientes HPgV-negativo.

Debido al efecto confusor del tiempo de infección de VIH para la determinación del efecto de HPgV en la infección por VIH, subdividimos la población de pacientes VIH positivos naïves en reciente, si la infección por VIH fue adquirida hace menos de 6 meses, y tardía, si el paciente se infectó antes de 6 meses. Comparamos, entonces, las medias de los marcadores de progresión de VIH entre las 3 condiciones de HPgV en cada grupo de temporalidad de infección de VIH (recientes o tardíos) mediante prueba de Bonferroni.

Encontramos una carga viral de VIH significativamente menor en el subgrupo VIH-tardío/HPgV-alto (-0.85 copias de VIH/ml \log_{10}) comparado con el subgrupo VIH-tardío/HPgV-negativo ($p < 0.05$) y en el subgrupo VIH-tardío/HPgV-alto (-0.79 copias de VIH/ml \log_{10}) comparado con el subgrupo VIH-reciente/HPgV-negativo ($p < 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencia entre las medias de carga viral de VIH (\log_{10}) en pacientes VIH positivos ART- naïve de acuerdo con el tiempo de infección y las condiciones de carga viral de HPgV.

Condiciones	VIH-reciente HPgV-negativo n=29	VIH-tardío HPgV-negativo n=118	VIH- reciente HPgV-bajo n=37	VIH-tardío HPgV-bajo n=82	VIH-reciente HPgV-alto n=15
VIH-tardío HPgV-negativo n=118	+0.062016				
VIH-reciente HPgV-bajo n=37	-0.429253	-0.491269			
VIH-reciente HPgV-bajo n=82	-0.212959	-0.274974	+0.216294		
VIH-reciente HPgV-alto n=15	-0.455913	-0.517929	-0.02666	-0.242955	
VIH-tardío HPgV-alto n=22	-0.795124*	-0.85714*	-0.365871	-0.582166	-0.339211

Tabla 5. La tabla muestra las diferencias de la carga viral media de VIH entre las 6 condiciones formadas (comparación de Bonferroni). Las diferencias están expresadas en copias/ml (\log_{10}). * = **estadísticamente significativo (p<0.05)**

También encontramos un conteo de CD4⁺ significativamente menor en el subgrupo VIH-tardío/HPgV-negativo (-228 CD4⁺/mm³) comparado con el subgrupo VIH-reciente/HPgV-negativo (p<0.05), y en el subgrupo VIH-tardío/HPgV-bajo (-268 CD4⁺/mm³) comparado

con el subgrupo VIH-reciente/HPgV-bajo ($p < 0.05$). Sin embargo, no hubo menor conteo de células en los pacientes VIH-tardío/HPgV-alto ($-133\text{CD4}^+/\text{mm}^3$) comparado con los pacientes VIH-reciente/HPgV-alto ($p = 1.0$) (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencia entre las medias de CD4^+ en pacientes VIH positivos ART-naïve de acuerdo con el tiempo de infección y las condiciones de carga viral de HPgV.

Condiciones	VIH-reciente HPgV-negativo n=29	VIH-tardío HPgV-negativo n=118	VIH- reciente HPgV-bajo n=37	VIH-tardío HPgV-bajo n=82	VIH- reciente HPgV-alto n=15
VIH-tardío HPgV-negativo n=118	-228.079*				
VIH-reciente HPgV-bajo n=37	+55.7465	+283.826 ‡			
VIH-reciente HPgV-bajo n=82	-212.819 ‡	+15.2604	-268.565*		
VIH-reciente HPgV-alto n=15	+55.1609	+283.24 ‡	-585.586	+267.98 ‡	
VIH-tardío HPgV-alto n=22	-78.6724	+149.407	-134.419	+134.146	<u>-133.833</u>

Tabla 6. La tabla muestra las diferencias de la media de CD4^+ entre las 6 condiciones formadas (comparación de Bonferroni). Las diferencias están expresadas en $\text{CD4}^+/\text{mm}^3$. **Subrayado** = no significativo pero relevante para la progresión de VIH, ‡ = estadísticamente significativo, pero no necesariamente relacionado a la infección

por HPgV, * = estadísticamente significativo ($p < 0.05$)

Igualmente, encontramos una relación de células T CD4⁺/CD8⁺ significativamente mayor en el subgrupo VIH-tardío/HPgV-alto (+0.17) comparado con el subgrupo VIH-tardío/HPgV-negativo (p<0.05) (Tabla 7).

Tabla 7. Diferencia entre las medias de la relación CD4⁺/CD8⁺ en pacientes VIH positivos ART-naïve de acuerdo con el tiempo de infección y las condiciones de carga viral de

Condiciones	VIH-reciente HPgV-negativo n=29	VIH-tardío HPgV-negativo n=118	VIH-reciente HPgV-bajo n=37	VIH-tardío HPgV-bajo n=82	VIH-reciente HPgV-alto n=15
VIH-tardío HPgV-negativo n=118	-0.056481				
VIH-reciente HPgV-bajo n=37	-0.101481	-0.045			
VIH-reciente HPgV-bajo n=82	-0.017579	+0.038902	+0.083902		
VIH-reciente HPgV-alto n=15	-0.086815	-0.030333	+0.014667	-0.069236	
VIH-tardío HPgV-alto n=22	+0.118064	+0.174545*	+0.219545 [‡]	+0.135643	+0.204879

HPgV.

Tabla 7. La tabla muestra las diferencias de la media de la relación CD4⁺/CD8⁺ entre las 6 condiciones formadas (comparación de Bonferroni). Las diferencias están expresadas en CD4⁺/mm³. ‡ = estadísticamente significativo, pero no necesariamente relacionado a la infección por HPgV, * = **estadísticamente significativo (p<0.05)**

Cambios en la expresión génica causados por HPgV durante la infección por VIH (ensayo ex vivo).

En el estudio *ex vivo* realizado para evaluar los cambios en la expresión génica atribuibles a HPgV durante la coinfección con VIH, se analizaron 84 genes involucrados en la respuesta del hospedero a VIH y 84 genes involucrados en la polarización de los linfocitos T. Encontramos diferencias significativas en la expresión de varios genes implicados en el control de la replicación de VIH principalmente en CCR5, CD4, FOS, ELANE, SERPINA1, XCL1, HCK y CCL8 (Tabla 8). A su vez, se encontró una tendencia progresiva hacia la polarización Th1 en los casos y una pérdida de esta polarización en los controles al comparar día 4 con día 7; sin embargo, la respuesta inicial hacia Th1 fue mayor en los controles (Tabla 9).

Tabla 8. Diferencias de expresión génica entre PBMCs de donadores sanos y donadores con viremia de HPgV en respuesta a la infección por VIH *ex vivo*.

Respuesta del Hospedero a VIH					Respuesta del Hospedero a VIH				
Gen	HPgV D4	HPgV D7	Control D4	Control D7	Gen	HPgV D4	HPgV D7	Control D4	Control D7
APOBEC3G	5.5604	4.0443	3.0242	3.4163	HCK	-28.2935	-56.591	-59.7652	-168.3913
CASP8	3.9768	1.0747	4.1358	2.6188	IL2	-3.3184	-7.4544	-3.0313	-24.2931
CCL2	5.7061	1.1167	6.1286	2.808	MAP3K5	-20.4496	-20.6418	-33.9193	-38.3904
CCL3	4.3744	-1.8036	1.8226	2.0963	MBL2	-3.8066	-5.4984	-2.9844	-3.8245
CCL4	2.4681	2.0852	1.9754	1.4224	NFKBIA	-4.7986	-7.6206	-9.8426	-13.6931
CCL8	35.2243	2.8013	-4.1772	-1.9205	SELL	2.0515	1.2823	1.2123	-1.2213
CCR4	3.7989	-1.5939	6.1176	1.164	SERPINA1	-18.6241	-33.2965	-57.5895	-457.7366
CCR5	5.8934	5.4816	-1.5378	-2.5791	SLPI	-8.3815	-4.1014	-2.315	-1.0644
CD4	-7.3595	-42.5327	1.0183	-6.3584	STAT1	3.2277	2.1874	5.9487	2.7645
CEBPB	-12.2219	-16.9381	-2.2478	-4.7137	TGFB1	-3.8111	-7.7613	-2.1737	-2.3942
CR2	-17.6978	-17.666	-5.5195	-6.7903	TNFRSF1B	-3.7586	-11.1858	-1.2946	-1.5082
ELANE	-62.6178	-28.6051	-18.3643	-8.4431	XCL1	4.196	8.0982	40.6721	89.0366
FOS	-503.4135	-1008.294	-139.6172	-189.0696					

Tabla 8. La tabla muestra los genes con diferencias significativas y sus valores de expresión en número de veces a los días 4 y 7 entre células controles y con infección natural por HPgV.

Tabla 9. Diferencias de expresión génica de polarización inmunológica entre PBMCs de donadores sanos y donadores con viremia de HPgV en respuesta a la infección por VIH ex vivo.

Polarización Th1 Th2					Polarización Th1 Th2				
Gen	HPgV D4	HPgV D7	Control D4	Control D7	Gen	HPgV D4	HPgV D7	Control D4	Control D7
CCL5	1.0622	4.509	-1.9124	1.1144	IL15	-8.9346	-7.9806	-5.7865	-10.4621
CCL7	9.9853	2.9758	-2.4218	-1.4537	IL18	-12.5351	-10.2695	-8.6494	-8.6674
CCR3	2.9588	5.1011	-2.9541	-6.7524	IL18R1	-14.0685	-7.0587	-9.1331	-10.1246
CCR4	6.4411	1.9755	4.9242	-1.2793	IL1RL1	-4.5675	-4.1777	-2.2006	-6.9264
CCR5	7.1038	9.2882	-2.4068	-5.9077	IL2	-3.2739	-2.5933	-1.6764	-12.9475
CD28	-5.2649	-12.9933	-2.6038	-21.3313	IL25	94.9371	39.2821	20.1876	8.5368
CD4	1.2769	-3.0281	-2.2639	-8.7277	IL2RA	6.5382	1.3023	-1.2574	2.0594
CD80	3.5101	2.2861	4.9055	3.365	IL3	-2.6268	-6.7777	-3.0934	-57.66
CD86	-3.4526	-3.6193	-5.5616	-9.5104	IL4	-25.3024	-14.1419	-25.138	-45.8897
CEBPB	-17.0099	-5.934	-4.6219	-8.6969	IL4R	-2.6048	-2.1199	-6.0143	-13.8748
CSF2	57.0874	79.8267	310.1667	100.8313	IL5	7.3437	-1.6636	7.2874	-1.0494
CTLA4	6.806	5.8995	9.6505	3.545	IL6R	26.4079	74.4294	69.272	16.3532
CXCR3	5.7749	5.9176	2.3981	1.5862	IL7R	7.5047	6.1105	10.1725	5.5071
EBI3	1.5533	2.4865	1.2641	-1.0285	IRF4	5.6092	17.389	11.5883	7.2914
FASLG	3.5903	2.7603	1.1163	-1.553	PTPRC	-1.0121	-2.2836	-2.257	-5.6467
GATA3	2.3758	5.374	5.5144	4.1655	SFTPD	1.458	2.4683	1.086	-3.8098
PTGDR2	-1.4733	-4.7529	-14.2629	-11.0886	SOCS1	135.768	410.7452	49.6045	8.9488
HAVCR2	5.9262	10.0081	8.6326	6.6951	SOCS5	3.4899	4.261	5.2394	1.6343
ICOS	7.4153	4.975	2.0748	-1.0695	STAT4	-2.6363	-1.0974	-3.6303	-4.8858
IL10	-7.7829	-4.557	-49.9322	-48.5366	TGFB3	-70.2877	-107.5602	-344.3185	-226.0503
IL12B	-105.0112	-62.4834	1.3414	-1.081	TLR4	-5.4717	-4.6021	-3.0591	-3.351
IL13	21.9432	23.2603	16.5551	13.9626	TNFRSF8	6.1813	6.9288	2.6548	2.6119
IL13RA1	33.9255	4.4	126.2991	24.1994	TNFRSF9	-1.1169	-5.9036	-2.6631	-1.7811
					TNFSF4	15.024	24.7731	105.8663	78.2164

Tabla 9. La tabla muestra los genes con diferencias significativas y sus valores de expresión en número de veces a los días 4 y 7 entre células controles y con infección natural por HPgV. En relación a la polarización inmunológica.

DISCUSIÓN

Para entender el comportamiento de la coinfección, evaluamos los efectos de la viremia de HPgV en VIH mediante los marcadores de progresión de la infección. Comparamos las medias de estos marcadores (carga viral de VIH, conteo de células T CD4⁺ y la relación CD4⁺/CD8⁺) entre las condiciones de HPgV (-negativo, -bajo y -alto) en pacientes VIH positivos ART-naïve. Encontramos que los pacientes HPgV-positivos comparados con los pacientes HPgV-negativos tenían significativamente menor carga viral de VIH, mayor cantidad de células T CD4⁺ y la relación CD4⁺/CD8⁺ más cercana a 1. Más aun, encontramos mayor efecto en los pacientes HPgV-alto con relación a los HPgV-bajos. Estos efectos también fueron observados independientemente del genotipo, excepto en reducción de la carga viral de VIH en la que el efecto sólo estuvo presente en los pacientes con genotipo 3 de HPgV. Aunque el efecto benéfico de HPgV es independiente del genotipo, nuestros resultados sugieren mecanismos distintos dependientes del genotipo.

Es ampliamente conocido que la progresión de la enfermedad por VIH se encuentra directamente relacionada con el tiempo de infección, encontrando disminución de los conteos de células T CD4⁺ y aumento de carga viral de VIH conforme aumenta el tiempo de la infección [142]. Para eliminar el factor tiempo de infección por VIH como confusor en nuestro estudio, analizamos el efecto de HPgV en relación al tiempo de infección de VIH. Encontramos que la viremia de HPgV-alto se asociaba de manera significativa a menor carga viral de VIH y mayor conteo de CD4⁺ en forma independiente del tiempo de infección. También encontramos que niveles bajos o ausencia de viremia de HPgV se asociaba de forma significativa con menor conteo de CD4⁺ en los pacientes VIH tardío. Aunque, no encontramos diferencia significativa en el conteo de CD4⁺ al comparar entre infección de VIH reciente y tardía en los pacientes HPgV-altos, corroborando el efecto protector de los niveles de CD4⁺ sugerido por otros estudios [143]. Estos resultados podrían sugerir

correlación entre la viremia alta de HPgV y efectos benéficos en los pacientes con VIH, independientemente del tiempo de infección.

Nuestros hallazgos verifican los resultados de otros estudios, los cuales sugieren que HPgV y VIH se interfieren mutuamente, independientemente de los tiempos de infección [103,105,144]; más aún, nuestros resultados sugieren que HPgV tiene un rol protagónico en este fenómeno. En la presente tesis encontramos un umbral de carga viral de HPgV necesario para observar estos efectos benéficos, por lo que proponemos que se utilice este umbral para el análisis de la interacción HPgV-Hospedero-VIH en estudios posteriores.

Para entender los mecanismos que generan los efectos benéficos de HPgV durante la infección por VIH, es necesario determinar los cambios en la expresión génica durante la coinfección. Realizamos un primer acercamiento (estudio piloto) a entender esta interacción mediante un experimento *ex vivo*. En este ensayo se infectaron *in vitro* células PBMCs de dos donadores sanos (controles) y dos donadores sanos con infección por HPgV con carga viral alta (casos), para determinar la diferencia en cambios de expresión basados en dos paneles (respuesta del hospedero a VIH y polarización celular Th1-Th2).

Encontramos variabilidad entre la respuesta de los donadores sanos y los HPgV positivos, con tendencia hacia un fenotipo represor de VIH a diferentes niveles del ciclo de replicación de éste y con polarización Th1 en los HPgV positivos, corroborando otro estudio donde encuentran una respuesta similar [103]. Sin embargo, al ser un ensayo preliminar, los resultados obtenidos sólo son orientativos. Para entender a fondo cómo influyen estos cambios, es necesario ampliar el número de muestras y la cantidad de genes analizados.

CAPITULO IV. Desarrollo de modelo *in vitro* para estudios de interacción HPgV-hospedero-VIH

El estudio de la coinfección HPgV/VIH y su interacción con el hospedero se ha complicado por la falta de modelos de estudio *in vitro*. Con la finalidad de generar un modelo *in vitro* para el estudio de esta coinfección, generamos las herramientas necesarias y caracterizamos el nivel al que ocurre la coinfección, realizamos un análisis exhaustivo de las posibles causas que impiden la replicación de HPgV *in vitro* y finalmente desarrollamos la primera fase de un modelo factible para el estudio de la coinfección.

METODOLOGÍA

Desarrollo de herramientas para la determinación de la capacidad de coinfección celular.

Para identificar las células infectadas por VIH en un cultivo, creamos partículas fluorescentes de VIH mediante Succinimidil Éster Diacetato de Carboxifluoresceína[145] (CFDA-SE, por sus siglas en inglés). Para este proceso, partículas de VIH con tropismo específico X4 y R5 fueron concentradas y purificadas de sobrenadante de cultivo mediante ultracentrifugación siguiendo el protocolo descrito en el capítulo III. Los virus de VIH purificados se incubaron en obscuridad a 37°C con 10µM de CFDA-SE en 1ml de volumen durante 90 minutos. Posterior a la incubación, se diluyó la solución viral hasta lograr translucidez y se procedió a centrifugarla en cuantas columnas Amicon YM-100 fueran necesarias para completar el volumen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluaron el filtrado y remanente para detectar antígeno del virus de VIH mediante ELISA de cuarta generación en equipo Biomérieux buscando antígeno viral. Finalmente, para recuperar el virus se realizaron orificios en la membrana de la columna. Se repitió el centrifugado con 100µl de PBS y se probó de nuevo con ELISA para la detección del virus.

Para evaluar el correcto lavado del marcador fluorescente no adherido al virus, se cultivaron células MT-2 en RPMI suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico. Estas células se incubaron para infección con VIH como se describió anteriormente, para evaluar de 4-7 días postinfección la fluorescencia como indicativo de la infección viral en el virus con tropismo X4, y la ausencia de fluorescencia indicando un lavado correcto del colorante CFDA-SE en el cultivo con el virus de tropismo R5, debido a que las células MT-2 sólo son susceptibles a infección por virus X4 al no contar con receptores R5 [146]. Finalmente, el virus de VIH teñido con CFDA-SE no fue usado en los ensayos de coinfección debido a que la intensidad de la fluorescencia no permitía evaluar la presencia de HPgV mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH del inglés, fluorescent *in situ* hybridization).

Además, para identificar las células con infección HPgV y la posibilidad de coinfección celular con VIH, diseñamos sondas específicas para identificar las células infectadas por VIH y por HPgV, mediante ensayos de FISH.

Las sondas para HPgV fueron diseñadas para hibridar con la región 5'UTR, con un insertando la secuencia del promotor T7 al inicio y promotor SP6 al final para facilitar su transcripción *in vitro*, esto con la finalidad de usar las sondas para identificar la cadena negativa de ARN (replicante) del virus. La sonda para VIH fue diseñada para hibridar con la región gagpol de VIH, flanqueada con los mismos promotores que la anterior. Las sondas se sintetizaron en la compañía Genscript y fueron insertadas en el plásmido puc57 (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencia de las sondas para identificación de infección por HPgV y VIH mediante FISH

Sonda gag-pol	Sonda HPgV
5'TAATACGACTCACTATAGGGAGATATTTAAAAGCATTAGG GCCAGCAGCTACGCTAGAAGAAATGATGATAGCATGTCAGG GAGTGGGAGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGA AGCAATGAGCCAAGTAACAGGGTGGCTAACATAATGATGC AGAGAGGCAATTTAGGAACCAAGAAAAATTGTTAAGTGT TTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGCTAAAAATTGCAG GGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAGTGTGAAAGGA AGGACATCAAATGAAAGATTGTAAGAGAGACAGGCTAATT TTTTCNCTTCTATAGTGTACCTAAAT-3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTGGTTGAGCTCTCCGAG TGGGGAGTCCCGTGCCTAACGTGTATTCTGGACCGTCGGCCTG CTTCATGTGGCACCTGTGTGCGGGACTGTGGCCCGAAACCGG GTCGGTTAGATTCCTTTCCATCGGTGCGGCACGGGGCCTCGG CTGACAAAGGACTTGAAGCTGTGCCCTTCGTCACAGGACAA CTCCTTCACCATAAGGGGCCCTGGGCAACCAGGGGAGAG GCAACCCGGTGCCTGCGCCCTGGGTTTTGGGTCTACACCAT GACCAAGATCCGGGATTCCCTGCATTTGGTGAATGTCCACAC CAGCCATAGAGCCTCCGACTGGAACGTTCCGGTTCTTCNCTCT ATAGTGTACCTAAAT-3'

Tabla 10. Secuencia de las sondas utilizada para identificación de infección por VIH (sonda gag-pol) y HPgV (sonda HPgV).

El plásmido que contenía cada sonda fue electroporado en células E. coli competentes, las cuales se cultivaron en medio Luria y a las 24h se extrajo el plásmido con el kit Qiagen plasmid midi kit.

Las sondas se marcaron fluorescentemente mediante el kit FISH Tag™ RNA Multicolor Kit, Alexa Fluor™ Dye Combination (molecular probes, invitrogen, Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez creadas las herramientas, se realizaron ensayos *in vivo* de infección de VIH y HPgV en PBMCs y se realizó búsqueda de HPgV en medula ósea de donadores con y sin viremia para HPgV. Para los ensayos de coinfección *ex vivo* se colectaron PBMCs de donadores sanos negativos y positivos a la infección activa por HPgV. Se comprobó mediante RT-PCR en tiempo real la presencia de HPgV en los PBMCs de un donador, el cual presentaba cargas virales altas de HPgV.

Se realizaron múltiples ensayos con 10×10^6 PBMCs cada uno, colectados de la misma forma que el ensayo anterior, los cuales fueron infectados con suero de un donador positivo a HPgV con cargas virales altas, 108 copias/ml, durante periodos de 1 a 4 horas y

posteriormente con VIH como se describió en el capítulo anterior.

Las células infectadas se mantuvieron en cultivo por 72hr; posteriormente se cosecharon y dividieron en 2. A la mitad de ellas se le realizó RT-PCR en tiempo real previa extracción de ácidos nucleicos mediante el equipo automatizado Easymag. A las células restantes al igual que a la biopsia de hueso de cresta iliaca, se les fijó y permeabilizó en un portaobjetos, para después hibridarlas con las sondas correspondientes, durante 12hr a 37°C. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se lavaron las muestras para eliminar las sondas no adheridas y se sellaron con el cubreobjetos, previa aplicación de inti-fade.

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico, en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA-UNAM).

Desarrollo de un modelo *in vitro* para estudiar la interacción HPgV-hospedero-VIH.

Desarrollar un modelo *in vitro* para el estudio de la coinfección es fundamental para una caracterización fina de las interacciones HPgV-hospedero-VIH. La primera fase para la obtención de este modelo es lograr la replicación de HPgV *in vitro* por periodos prolongados [13].

Para esta primera fase se analizó el genoma de HPgV en comparación con otros flavivirus, especialmente pegivirus, agrupándolos en los que se han podido replicar *in vitro* (GBV-B) y los que no [SPgV (GBV-A) [38].

Posterior al análisis, observamos diferencias fundamentales en el genoma de los pegivirus no cultivables comparado con los cultivables, que pudieran ser la causa de la replicación

transitoria *in vitro* de HPgV. Debido a lo anterior, diseñamos un virus quimérico con la finalidad de mejorar el tiempo de replicación activa de HPgV *in vitro*.

En este diseño, conjuntamos gran parte del genoma de HPgV con una pequeña parte del genoma del “virus X”, es importante señalar que no se especifica que virus de que virus se tomó la parte faltante, ni se especifica que regiones fueron debido a la intención de realizar una solicitud de patente. Este diseño se analizó *in silico* para corroborar su viabilidad biológica, mediante el uso de diversas herramientas de NCBI para el análisis de secuencias nucleicas y proteicas, así como de los sitios de corte de la poliproteína que se formará.

Una vez diseñado el virus quimérico, que denominamos “GB-Quim1”, la secuencia fue sintetizada e insertada en el plásmido pcDNA3.1⁺, los sitios de inserción se determinaron *in silico* comprobando que se mantuviera un marco de lectura que generara una poliproteína sin codones de paro intermedios y que no modificara los sitios de corte de la misma. La síntesis e inserción en el plásmido fue realizada por la compañía Genscript, quien también analizó la secuencia y sugirió optimizarla modificando la secuencia de los codones para facilitar su replicación en células humanas. Este proceso a su vez permitió eliminar los motivos antivirales que contenía la secuencia. El plásmido pcDNA3.1⁺ se seleccionó debido a las características de sus genes accesorios (promotor de CMV, promotor T7, gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a gentamicina), los cuales nos permitirían asegurar la replicación de nuestra quimera por diversas vías, al tener 4 promotores pertenecientes a diferentes virus, los dos promotores originales de nuestra secuencia y los dos promotores adicionales pertenecientes al plásmido. Además, el gen de resistencia a ampicilina es necesario para el crecimiento del plásmido en bacterias y el gen de resistencia a gentamicina que permite seleccionar células humanas que contengan el plásmido y crear una línea celular estable productora de la quimera.

Se electroporó el plásmido que denominamos “GB-Quim1” en E. coli competentes, las cuales se cultivaron en medio Luria, y a las 24hr se extrajo el plásmido con el kit Qiagen Plasmid Midi Kit. Una vez extraído el plásmido se transfectó mediante lipofectamina 3000 (invitrogen) en células HEK293T, usando el protocolo establecido por la compañía. Se mantuvieron las células en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Se monitoreó el sobrenadante del cultivo cada 3 días por RT-PCR en tiempo real para “GB-Quim1” durante 30 días, haciendo pase de las células conforme fue necesario. Durante los pases se tomó una muestra del cultivo y se procesó para microscopía confocal, TIRF y microscopía electrónica, así como inmunoelectromicroscopía. Para estos estudios se fijaron las células, se permeabilizaron y se añadieron anticuerpos fluorescentes en el caso de la microscopía confocal y TIRF. Uno de los anticuerpos dirigido contra la proteína de superficie de HPgV (E2) y el otro a una de las proteínas del “virus X” que forma parte del quimérico, para asegurar que se hubiera realizado el ensamblaje del virus quimérico “GB-Quim1”. Para el caso de la inmunomicroscopía, se utilizaron los mismos anticuerpos sin fluorescencia y fueron revelados con anti-ratón con nano-oro en el caso de HPgV y anti- conejo en el caso del “virus X”. Los cebadores y sonda para la detección de “GB-Quim1” por RT-PCR en tiempo real fueron diseñados para detectar la región de unión entre los genomas de los virus que forman la quimera (HPgV- “Virus X”).

RESULTADOS

Caracterización del nivel al que ocurre la coinfección entre HPgV y VIH.

Durante la generación del VIH fluorescente mediante con CDFDA-SE, encontramos que la técnica de tinción y lavado funcionaron de forma correcta. Para corroborarlo se realizaron ensayos de infección en células MT-2 con VIH fluorescente con tropismo X4, en los que encontramos generación de sincicios y fluorescencia. Sin embargo, en el ensayo de infección con VIH con tropismo R5 no se observó fluorescencia. Se cuantifico la presencia

de antígeno p24 en sobrenadante mediante ELISA; ninguno de los cultivos (R5 o X4) mostraron aumento de antígeno en el seguimiento del cultivo (Fig. 17).

Figura 17. Virus VIH fluorescente creado mediante CFDA-SE infectando células MT-2.

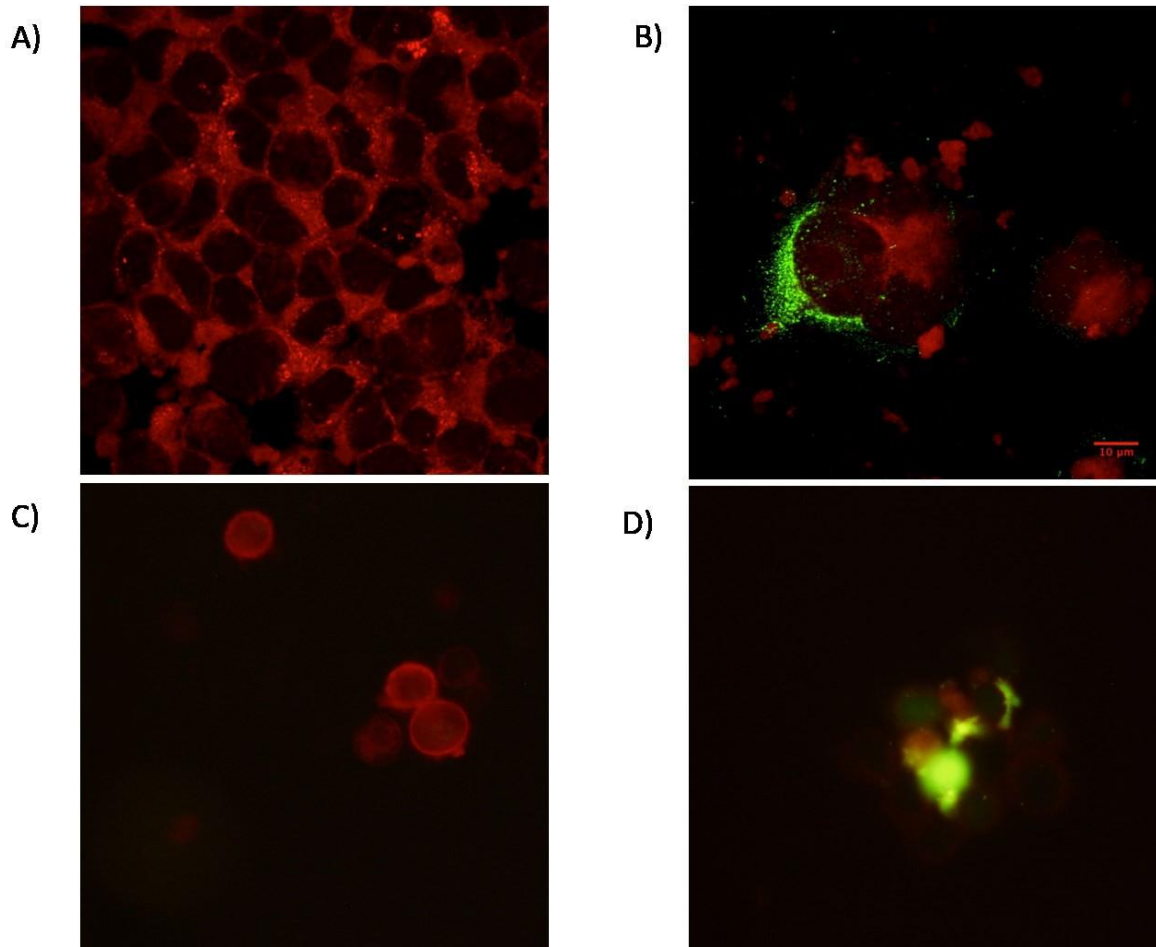


Figura 17. En las imágenes podemos observar teñidas mediante azul de Evans la membrana de células MT-2 (rojo) y la fluorescencia ocasionada por la infección por el VIH fluorescente (verde). (A) Control (no infectado), (B) infección por VIH fluorescente con tropismo X4, (C) infección por VIH fluorescente con tropismo R5, (D) Sincitio provocado por la Infección por VIH fluorescente con tropismo X4. Las fotografías (C y D) fueron realizadas en un microscopio de fluorescencia y las fotografías (C y D) en un microscopio confocal.

Además, realizamos cultivos de PBMCs de un donador sano con HPgV con carga viral alta ($>1 \times 10^8$) para determinar la existencia del virus en estas células, y posteriormente se infectaron *in vitro* con VIH. Se realizaron estudios de RT-PCR en tiempo real y FISH, encontrando presencia de HPgV en PBMCs del donador infectado (Fig. 18).

Figura 18. Virus HPgV en PBMCs de donador virémico sano identificado mediante FISH.

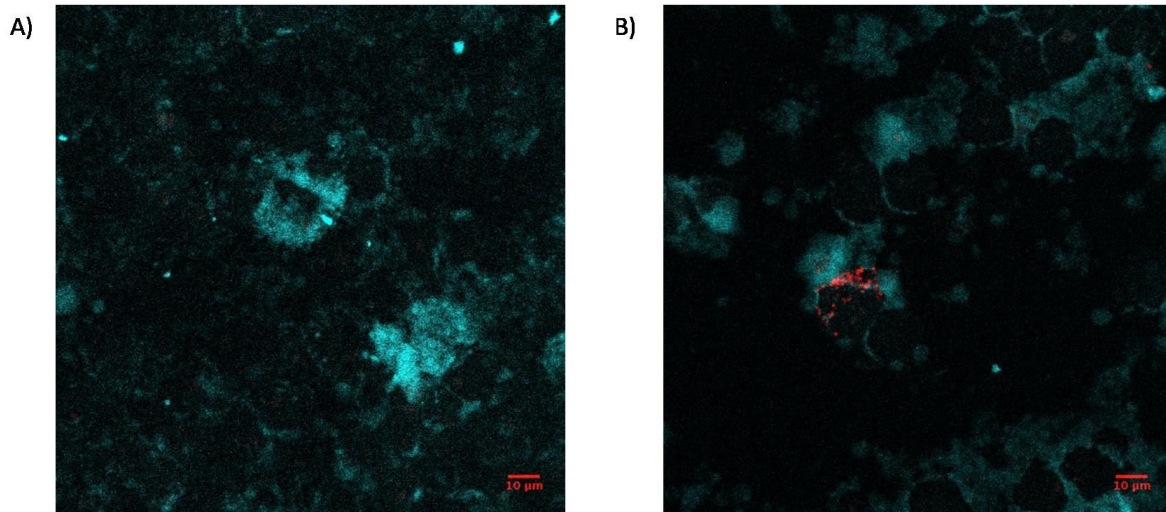


Figura 18. En las imágenes podemos observar la membrana de células MT-2 (aqua) y la sonda hibridada con el genoma de HPgV (rojo). (A) Control (células de donador no infectado), (B) células de donador infectado. Las fotografías en un microscopio confocal.

Posterior a la detección de HPgV en los PBMCs, se realizó infección por VIH en los PBMCs del donador con viremia de HPgV. Estas células se procesaron para FISH con las sondas diseñadas previamente. Encontramos presencia de ambos virus (HPgV y VIH) colocalizando en algunas células, aunque pocas (Fig. 19).

Figura 19. Coinfección HPgV/VIH en PBMCs de donador virémico sano infectado *ex vivo* con VIH e identificado mediante FISH

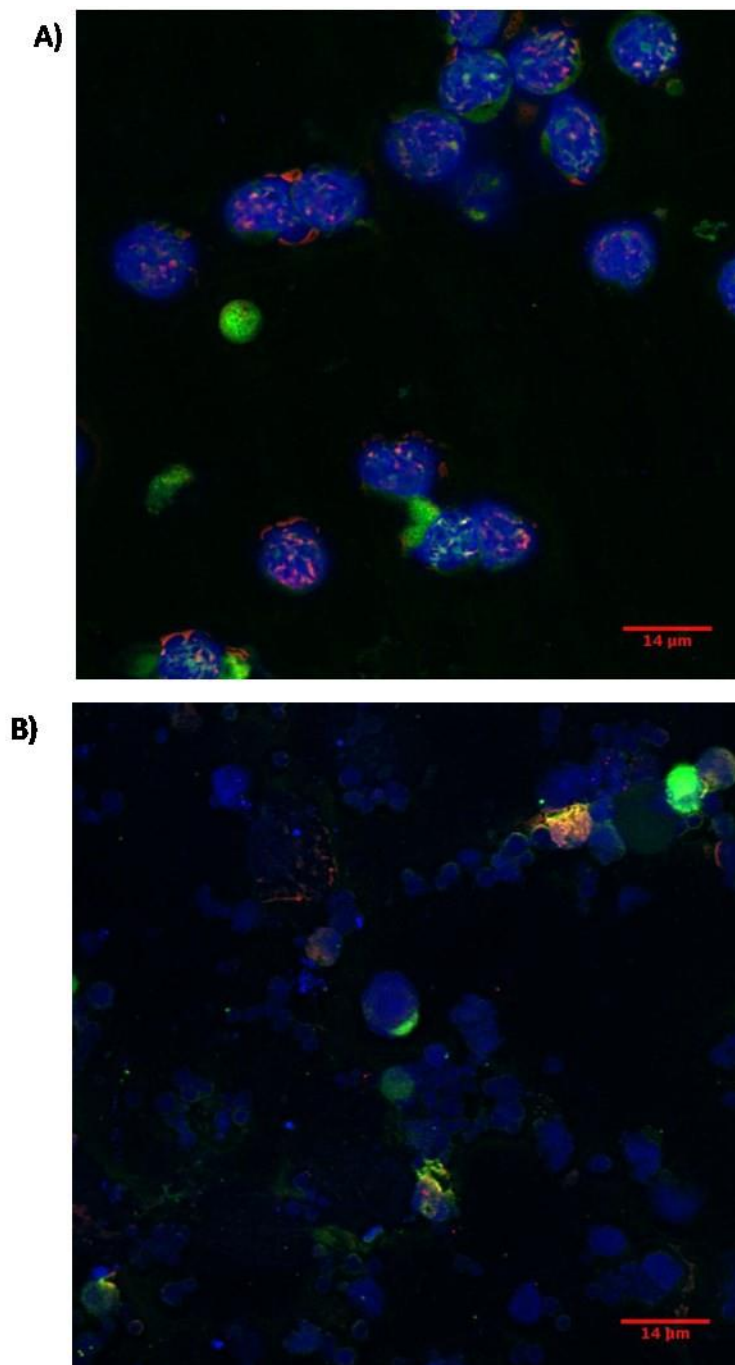


Figura 19. En las imágenes podemos observar los PBMCs teñidos con DAPI (azul), la sonda hibridada con el genoma de VIH (rojo), la sonda que hibrida con el genoma de HPgV (verde) y la colocización de ambos (amarillo). (A y B) ensayos de infección de VIH *ex vivo* en PBMCs de un donador sano con viremia de HPgV.

Se solicitó al donador con carga viral alta y PBMCs positivos para HPgV donación de medula ósea y biopsia de hueso de crestas iliacas, encontrando en los estudios de RT-PCR en tiempo real y FISH presencia de HPgV en la medula ósea - biopsia de hueso. Estos estudios fueron comparados con medula ósea de pacientes HPgV negativos (Fig. 20).

Figura 20. Identificación de HPgV en biopsias de hueso (medula ósea).

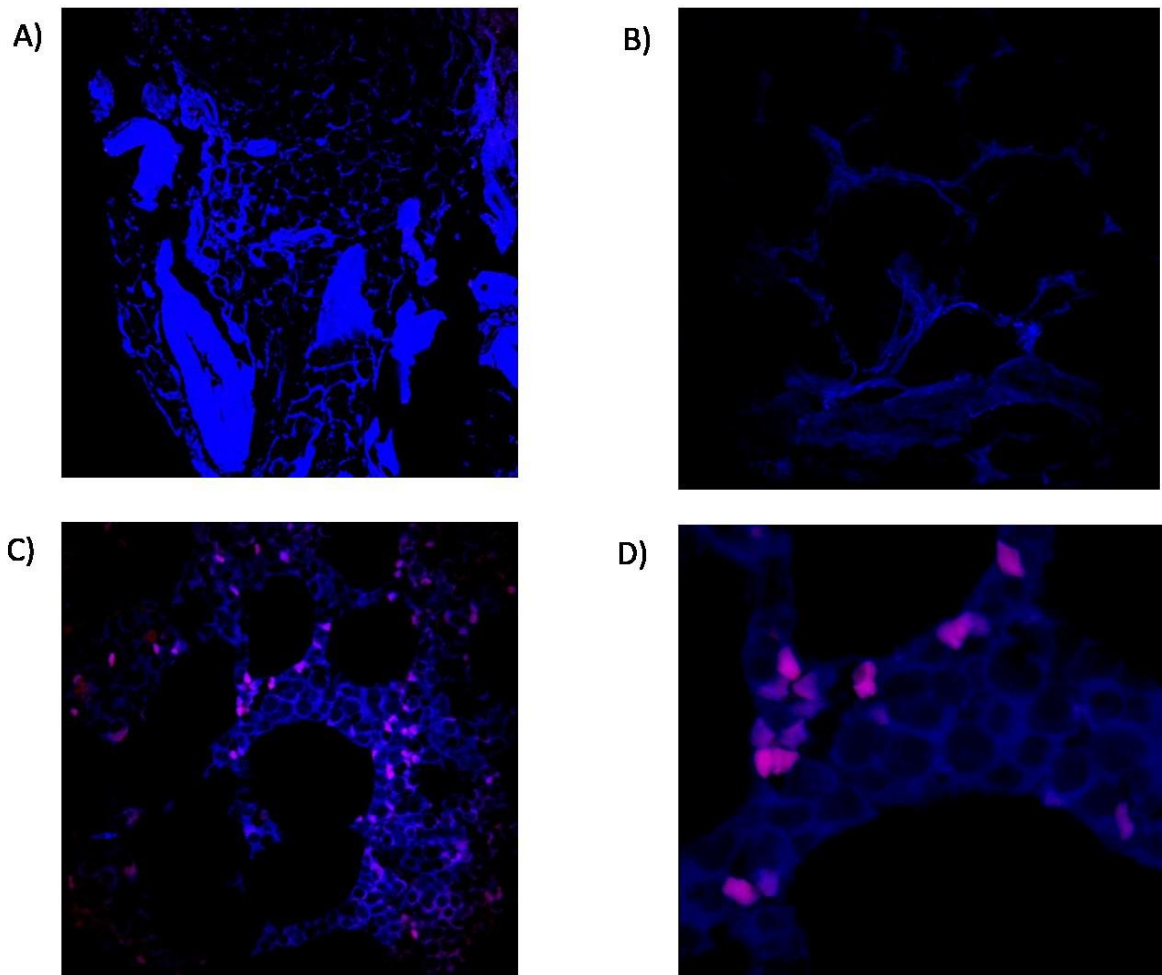


Figura 20. En las imágenes podemos observar las células teñidas con DAPI (azul), la sonda hibridada con el genoma de HPgV (rosa) (A y B) Control, biopsia de hueso de paciente HPgV negativo, (C y D) biopsia de hueso de donador HPgV virémico sano.

Desarrollo de un modelo *in vitro* para estudiar la interacción HPgV-hospedero-VIH.

Para tener un modelo que permitiera el estudio de la coinfección *in vitro*, era fundamental mantener la replicación de HPgV *in vitro* por periodos prolongados. El primer paso del abordaje fue analizar de forma comparativa el genoma de los flavivirus y en específico de los pegivirus que son cultivables y los que no eran. Posterior a este análisis, detectamos la ausencia de segmentos del genoma que codifican para proteínas virales que pudieran estar relacionados con la deficiente replicación de HPgV *in vitro*.

El siguiente paso en la estrategia fue complementar el segmento faltante con otro virus que fuera compatible; para identificarlo, buscamos entre virus de la misma familia.

Una vez localizados los candidatos, se acoplaron con las secuencias de HPgV verificando que mantuviera las características de los flavivirus: Tener 1 ORF compatible, evitar codones de paro intermedios, generar una poliproteína con la totalidad del genoma (sin tomar en cuenta las regiones UTR), no presentar modificaciones en los sitios de corte para la poliproteína. La sección 5'UTR es parte del "virus X" utilizado para formar el quimérico y la mayor parte de la región codificante, así como la región 3'UTR pertenece a HPgV.

De entre los candidatos, la quimera entre HPgV y el "virus X"; pasó todas las pruebas y se decidió sintetizarlo y replicarlo *in vitro* mediante la bacteria E.coli, para posteriormente purificarlo (Fig. 21).

Figura 21. Modelo construcción del plásmido GB-Quim1

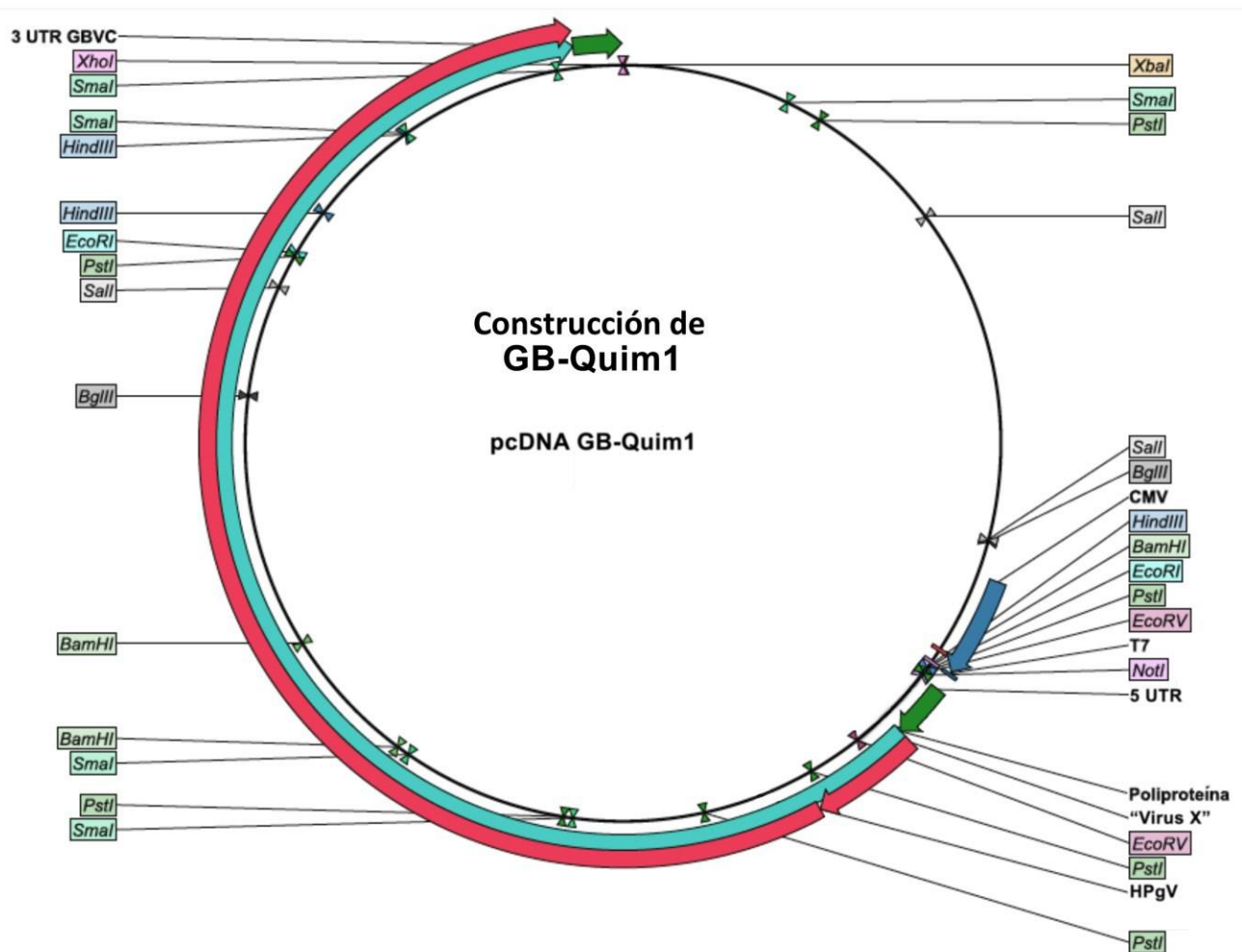


Figura 21. El modelo muestra el plásmido pcDNA3.1+ y la inserción del genoma quimérico diseñado. El promotor de CVM (flecha azul), promotor T7 (línea azul), regiones no transcritas del virus quimérico (flechas verdes) regiones transcritas del virus quimérico (flecha corta y larga roja), poliproteína (flecha aqua)

Posterior a la purificación, el plásmido se transfectó en células HEK293T, que fueron cultivadas por triplicado durante 30 días, colectando el sobrenadante cada 2 días. Mediante RT-PCR en tiempo real, encontramos persistencia de "GB-Quim1" en sobrenadante hasta 25 días post transfección, en cargas virales no superiores a 1×10^4 .

Para corroborar el ensamblaje del virus quimérico, se cosecharon las células de una de las botellas de cultivo del triplicado el día 25; éstas fueron procesadas para ensayos de inmunofluorescencia en microscopía confocal y TIRF (Fig.22), microscopía electrónica (Fig. 23) e inmunoelectromicroscopía (Fig. 24), encontrando la colocación de proteínas de ambos virus en las células en las que se transfectó “GB-Quim1”, además de obtener fotografías de microscopia electrónica sugerentes de formación de partículas virales.

Figura 22. Fotografía del virus GB-Quim1 en superresolución (TIRF)

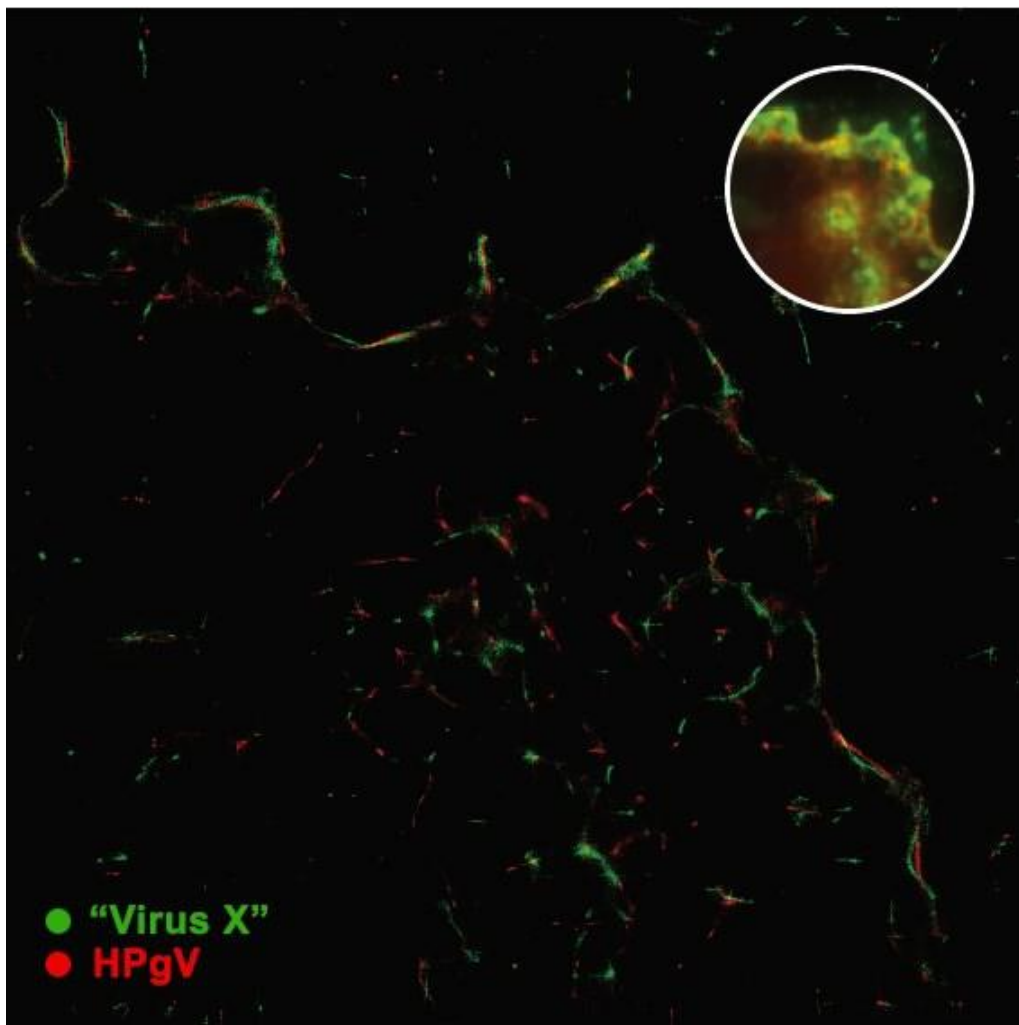


Figura 22. La fotografía muestra dos imágenes, en un círculo blanco la membrana de una célula HEK293T y el GB-Quim1 identificado con dos anticuerpos, uno dirigido contra una proteína del “virus X” (verde) y el otro contra una proteína de HPgV (rojo). Y en el cuadro grande el aumento de esa porción de la membrana en superresolución. La colocalización de proteínas del Virus X y HPgV se observa en amarillo.

Figura 23. Fotografía de GB-Quim1 en microscopía electrónica.

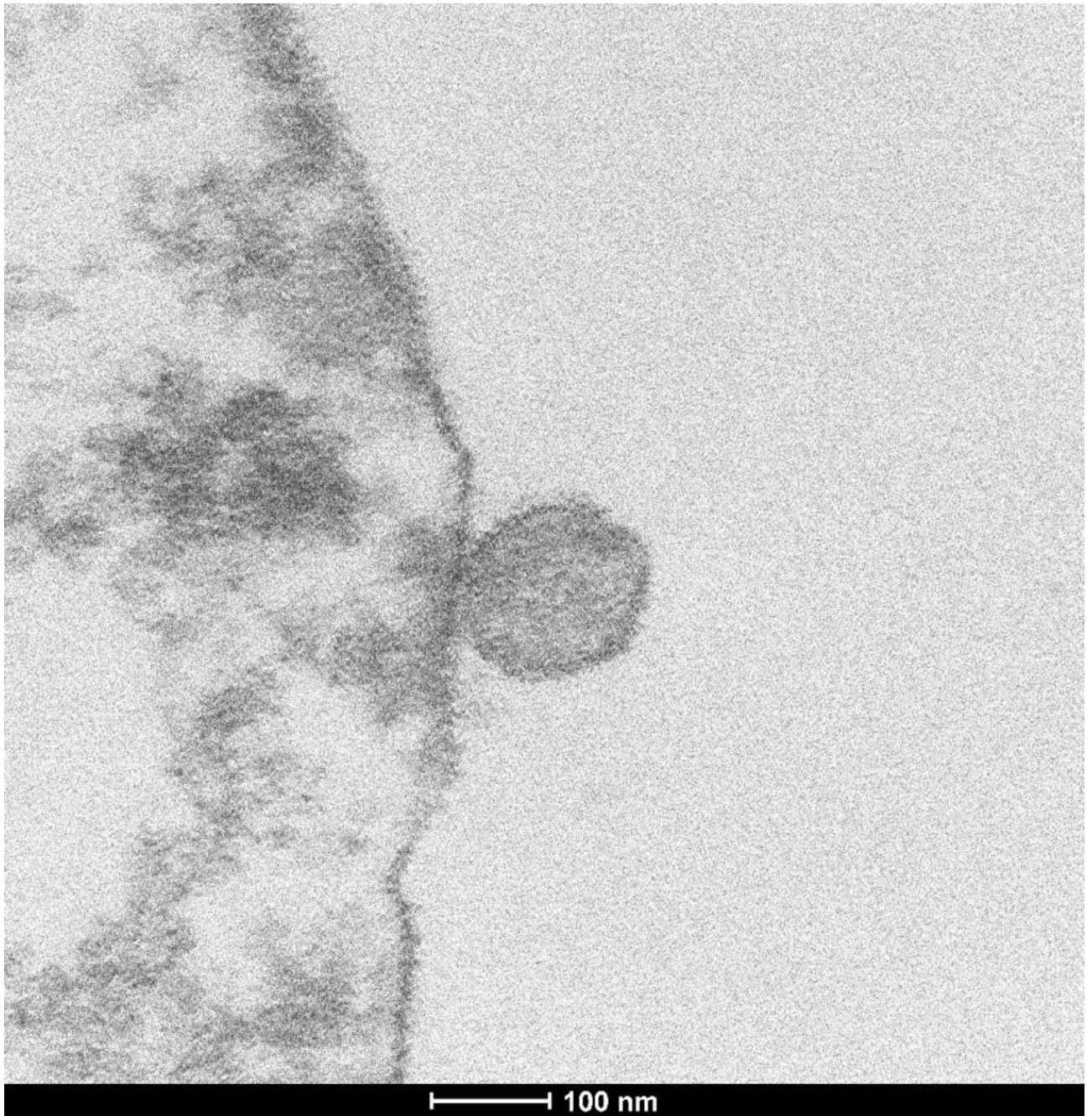


Figura 23. Fotografía de microscopía electrónica donde se observa una porción de la membrana de una célula HEK293T y el virus GB-Quim1 en la superficie de la membrana celular.

Figura 24. Fotografía de GB-Quim1 identificado mediante anticuerpos en inmunomicroscopía electrónica

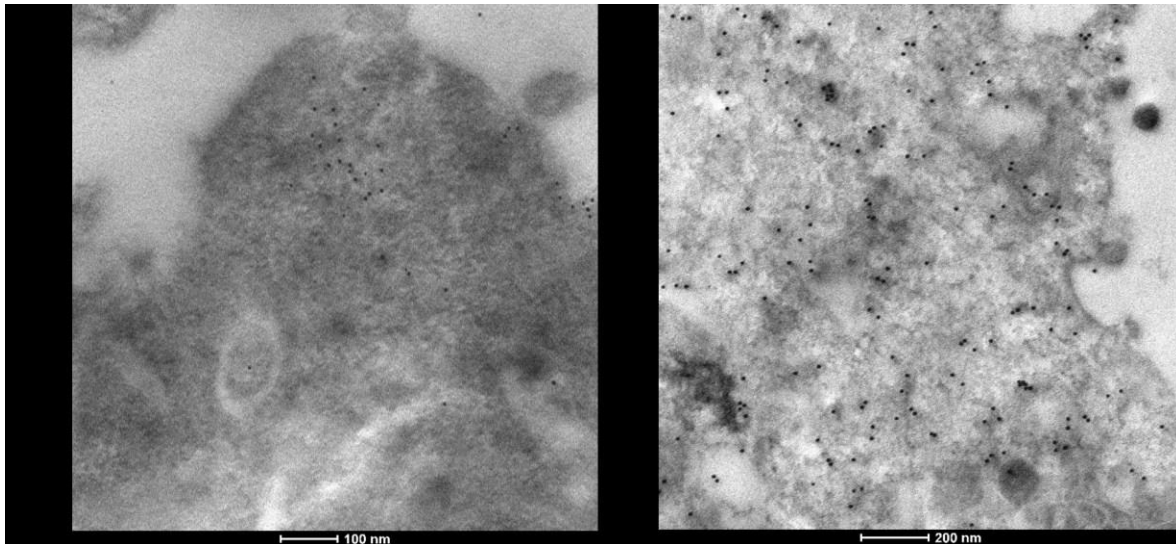


Figura 24. Fotografía de células HEK293T transfectadas con GB-Quim1, identificado con anticuerpos dirigidos contra las proteínas del “virus X” y HPgV. La reacción fue revelada con inmunooro de 5 μm para HPgV (A) y 10 μm para el “virus X” (B).

DISCUSIÓN

El desarrollo de un modelo *in vitro* que permita el correcto estudio de la interacción VIH-hospedero-HPgV exige determinar el nicho ideal para HPgV. Para lograr lo anterior, fue necesario desarrollar las herramientas para la detección y diferenciación de HPgV y VIH en las células humanas. Esta necesidad nos impulsó a desarrollar una nueva técnica para el marcaje fluorescente de VIH y el diseño de sondas para FISH de cadena específica para HPgV y VIH.

La detección en las células se realizó mediante RT-PCR tiempo real, FISH y microscopía confocal, encontrando dificultad para el cultivo de HPgV en células completamente diferenciadas (PBMCs), como lo han reportado otros. Debido a esto se intentó realizar con PBMCs de donador positivo a HPgV-alto; sin embargo, aunque se logró detectar el virus

mediante FISH en PBMCs y medula ósea, coincidiendo con reportes anteriores, se encontró en pocas células.

PBMCs del donador HPgV positivo fueron infectados por VIH, y se logró identificar ambos virus por FISH y microscopía confocal. Sin embargo, aunque se logró determinar la colocalización de ambos virus en una célula, fueron pocas las células que presentaban coinfección, probablemente debido a la baja replicación de HPgV *in vitro*, quizá por no corresponder los PBMCs a la célula blanco de HPgV [41]. Repetir estos ensayos, después de lograr cultivar HPgV *in vitro* con cargas virales altas, será fundamental para determinar la coinfección a nivel celular.

Finalmente, siendo el principal problema para el modelo *in vitro*, la replicación transitoria de HPgV *in vitro*, se diseñó un virus quimérico, basado en la combinación de HPgV y otro virus relacionado, “virus X”. Una vez definida la secuencia para el virus quimérico “GB-Quim1” los codones de la misma se optimizaron para su utilización en humano, proceso que resulto en la eliminación de la mayoría de los motivos antivirales que presentaba, lo cual podría reducir su inmunogenicidad al ser utilizado en humanos.

Finalmente, después de las pruebas *in silico* y las pruebas *in vitro*, determinamos que el virus quimérico “GB-Quim1” es capaz de replicarse durante periodos prolongados (25 días) *in vitro*, sin embargo, y aunque estos resultados suenan prometedores, la tasa de replicación continúa siendo baja, $\leq 10 \times 10^4$ copias/ml. Con el objetivo de mejorar la tasa de replicación, se tiene contemplado explorar otras estirpes celulares para el cultivo de “GB-Quim1”. Aúnno se probó la infectividad del “GB-Quim1”, por lo que no podemos asegurar que los virus producidos sean replicantes o que solo hayamos creado un replicón de HPgV.

CAPITULO V. Conclusiones

La importancia clínica de la infección por HPgV radica en su efecto benéfico en la progresión de la enfermedad causada por el VIH [1] y VCH [35,36], así como en la disminución de la mortalidad en la infección por virus del Ébola [37]. Contrariamente, la infección por HPgV se ha asociado con el desarrollo a largo plazo de linfoma no Hodgkin [32,34,147]. Aunque existe evidencia en la literatura de la asociación entre la infección por HPgV y retraso en la progresión de la enfermedad ocasionada por la infección de VIH en pacientes coinfectados, los mecanismos subyacentes, la relación que guardan entre sí y las interacciones entre HPgV, el hospedero y VIH, no han sido descritas del todo[2]. Por ello, los objetivos de esta tesis se centraron en estudiar cómo ocurre la coinfección de forma natural y generar herramientas para el estudio de la coinfección, así como definir el camino a seguir para descifrar las interrogantes que permanecen.

De este estudio podemos concluir:

1. La prevalencia de HPgV en México, en pacientes con VIH y donadores de sangre sanos, es similar a la reportada en otras partes del mundo.
2. La composición genética de la población mexicana la hace susceptible a infección por HPgV de dos genotipos principales, 2 y 3.
3. La carga viral de HPgV durante la infección tiene un comportamiento bimodal, con un punto de corte bien definido.
4. El comportamiento bimodal no es dependiente del genotipo de HPgV ni de la coinfección por VIH.
5. Los efectos benéficos de la infección por HPgV en la coinfección con VIH ocurren en los pacientes con cargas virales de HPgV por encima del punto de corte.
6. Los efectos benéficos de la coinfección HPgV-VIH no son genotipo-dependientes.

7. HPgV y VIH modifican la expresión génica del hospedero, compitiendo por generar un ambiente más favorable para su replicación.
8. El ambiente necesario para la replicación de HPgV es contrario al necesario para la replicación de VIH.
9. HPgV se localiza principalmente en células no diferenciadas.
10. Localizar la célula blanco de HPgV es fundamental para su replicación *in vitro*.
11. Es posible mejorar la replicación de HPgV *in vitro* mediante el uso de genes accesorios.

PROSPECCIÓN

Aún no se han caracterizado completamente los efectos de la infección de HPgV en humanos, por lo que es necesario profundizar en el estudio de este virus, su relación con el hospedero y los mecanismos de sus efectos benéficos en coinfección con otros virus.

La caracterización completa de este fenómeno debe realizarse desde varios frentes, comprendiendo el comportamiento de HPgV-hospedero-VIH en monoinfección y en coinfección. El conocimiento de VIH y su relación con el hospedero actualmente es amplio y profundo; sin embargo, para HPgV es aún superficial y su relación con el hospedero más aún.

Comprender la causa del comportamiento bimodal de la carga viral de HPgV es de suma importancia. Tenemos planeado realizar la secuenciación del genoma completo de HPgV en ambos grupos, HPgV-bajo y HPgV-alto, para verificar la existencia de subgrupos virales como probables causantes de este fenómeno, en caso negativo, investigaremos la existencia de factores del hospedero que propicie ya sea la replicación o inhibición de la replicación de HPgV.

Es importante conocer el nicho donde habita HPgV y la célula blanca que permite su replicación *in vivo*. Para esto analizaremos medula ósea humana combinando el FISH con

marcaje por anticuerpos específicos para diferenciar estirpes celulares; además, con la finalidad de implementar un modelo de coinfección *in vitro*, reproduciremos las condiciones del nicho para HPgV y VIH mediante el desarrollo de órganos en chips (medula ósea y ganglio linfático) que simulen las condiciones de infección natural tanto por HPgV como por VIH. Realizaremos infecciones en estos órganos en chips para verificar la replicación de HPgV silvestre, “GB-Quim1” y VIH, permitiéndonos la completa caracterización del fenómeno de coinfección

Para continuar por este trayecto es necesario trabajar en ensayos de expresión génica más amplios y con mayor número de muestras, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En este rubro, se planea realizar estudios de transcriptoma completo en pacientes coinfectados para comprender mejor la interacción HPgV-hospedero-VIH y determinar los genes “maestros” que controlan el fenómeno. Posteriormente, planeamos hacer la reproducción *in vitro* de este perfil de expresión génica benéfico, utilizando herramientas como CRISPR dCas9, para verificar la influencia de las modificaciones en la expresión para el establecimiento de los efectos benéficos de HPgV durante la infección por VIH.

Finalmente, considero que el aprovechamiento de este conocimiento será fundamental para identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar estrategias innovadoras para el combate o prevención de esta infección y sentar el precedente del uso de un virus como tratamiento o profilaxis para otra infección viral.

REFERENCIAS

1. 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: 173–180. doi:10.1111/j.1468-1293.2006.00366.x
2. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol.* 2012;20: 124–130. doi:10.1016/j.tim.2012.01.004
3. Arroyave JC, Pujol FH, Navas MC, Cortés-Mancera FM. [Interaction between HIV-1 and GB virus type-C during coinfection status]. *Rev Chil Infectol.* 2013;30: 31–41. doi:10.4067/S0716-10182013000100005
4. Lodish HF. *Molecular cell biology* [Internet]. W.H. Freeman; 2000. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>
5. DaPalma T, Doonan BP, Trager NM, Kasman LM. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res.* 2010;149: 1–9. doi:10.1016/j.virusres.2010.01.002
6. UNAIDS. 2017 Global HIV Statistics. 2018; 5. Available: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf
7. SECRETARIA DE SALUD. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA Actualización al 3er. trimestre del 2017. *Dir Gen Epidemiol Secr Salud.* 2017; 23. doi:http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/20_2012_Manual_PatBucal_vFinal.pdf
8. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med.* 2004;350: 981–990. doi:10.1056/NEJMoa030107
9. Delbrück M. INTERFERENCE BETWEEN BACTERIAL VIRUSES III. THE MUTUAL EXCLUSION EFFECT AND THE DEPRESSOR EFFECT“2 A MIXTURE OF VIRUSES ALPHA AND DELTA PLATED WITH A MIXTURE OF THE INDICATOR STRAINS, A AND D. Available: <http://jb.asm.org/>
10. Sarrazin C, Roth WK, Zeuzem S. [GB virus-C/hepatitis G virus--discovery, epidemiology, diagnosis and clinical relevance]. *Z Gastroenterol.* 1998;36: 997–1008. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880826>
11. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* (80-). 1996;271: 505–508. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8560265>
12. Mphahlele MJ, Lau GK, Carman WF. HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver.* 1998;18: 143–155. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716223>
13. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J Infect Dis.* 2006;193: 451–454. doi:10.1086/499435
14. Kew MC, Kassianides C. Hepatology - hgv - hepatitis g virus or harmless g virus. *Lancet.* 1996;348: 2):S1110.
15. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodniy M, Stapleton JT. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells *in vivo* and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious *in vitro*. *J Gen Virol.* 2014;95: 1307–1319. doi:10.1099/vir.0.063016-0
16. Naito H, Hayashi S, Abe K. The entire nucleotide sequence of two hepatitis G virus isolates belonging to a novel genotype: isolation in Myanmar and Vietnam. *J Gen Virol.* 2000;81: 189–194. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640557>
17. AbuOdeh RO, Al-Absi E, Ali NH, Khalili M, Al-Mawlawi N, Hadwan TA, et al. Detection and phylogenetic analysis of human pegivirus (GBV-C) among blood donors and patients infected with

- hepatitis B virus (HBV) in Qatar. *J Med Virol.* 2015; doi:10.1002/jmv.24289
18. Blackard JT, Ma G, Polen C, DuBois JC, Gast J, Radens CM, et al. Recombination among GB virus C (GBV-C) isolates in the United States. *J Gen Virol.* 2016;97: 1537–1544. doi:10.1099/jgv.0.000477
 19. Neibecker M, Schwarze-Zander C, Rockstroh JK, Spengler U, Blackard JT. Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol.* 2011;83: 685–694. doi:10.1002/jmv.22029
 20. Desassis JF, Laperche S, Girault A, Kolko A, Bouchardeau F, Zins B, et al. Prevalence of present and past hepatitis G virus infection in a French haemodialysis centre. *Nephrol Dial Transpl.* 1999;14: 2692–2697. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534514>
 21. Ross RS, Viazov S, Schmitt U, Schmolke S, Tacke M, Ofenloch-Haehnle B, et al. Distinct prevalence of antibodies to the E2 protein of GB virus C/hepatitis G virus in different parts of the world. *J Med Virol.* 1998;54: 103–106. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9496367>
 22. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat.* 2009;16: 757–768. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01194.x
 23. Huang CC, Lin CL, Lien JM. High prevalence of GB virus-C infection in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl.* 1999;14: 1802–1803. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435904>
 24. Hofer H, Aydin I, Neumueller-Guber S, Mueller C, Scherzer TM, Staufer K, et al. Prevalence and clinical significance of GB virus type C/hepatitis G virus coinfection in patients with chronic hepatitis C undergoing antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2011;18: 513–517. doi:10.1111/j.1365-2893.2010.01340.x
 25. Whitby K, Ferns RB, Garson JA, Bailey M, Howell D, Barbara JA, et al. GBV-C prevalence in blood donors and transfusion recipients in South East England. *Vox Sang.* 2000;79: 246. doi:56739
 26. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Ávila-Ríos S, García-Morales C, Reyes-Terán G, et al. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One.* 2017;12. doi:10.1371/journal.pone.0184494
 27. Bourlet T, Berthelot P, Grattard F, Genin C, Lucht FR, Pozzetto B. Detection of GB virus C/hepatitis G virus in semen and saliva of HIV type-1 infected men. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8: 352–357. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084103>
 28. Zanetti AR, Tanzi E, Romanó L, Principi N, Zuin G, Minola E, et al. Multicenter trial on mother-to-infant transmission of GBV-C virus. The Lombardy Study Group on Vertical/Perinatal Hepatitis Viruses Transmission. *J Med Virol.* 1998;54: 107–112. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9496368>
 29. Merle P, Elghouzzi MH, Pradat P, Vidal F, Boiret E, Trépo C. [Hepatitis G virus and labile blood products: role of transfusional transmission]. *Transfus Clin Biol.* 2004;11: 75–80. doi:10.1016/j.tracli.2004.02.002
 30. Scallan MF, Clutterbuck D, Jarvis LM, Scott GR, Simmonds P. Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *J Med Virol.* 1998;55: 203–208. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624607>
 31. Giannoulis E, Economopoulos T, Mandraveli K, Giannoulis K, Nikolaides C, Zervou E, et al. The prevalence of hepatitis C and hepatitis G virus infection in patients with B cell non-Hodgkin lymphomas in Greece: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Acta Haematol.* 2004;112: 189–193. doi:10.1159/000081270
 32. Chang CM, Stapleton JT, Klinzman D, McLinden JH, Purdue MP, Katki HA, et al. GBV-C infection and risk of NHL among U.S. adults. *Cancer Res.* 2014;74: 5553–5560. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0209
 33. Stapleton JT, Chaloner K. GB virus C infection and non-Hodgkin lymphoma: important to

know but the jury is out. *Int J Cancer*. 2010;126: 2759–2761. doi:10.1002/ijc.25194

34. Fama A, Xiang J, Link BK, Allmer C, Klinzman D, Feldman AL, et al. Human Pegivirus infection and lymphoma risk and prognosis: A North American study. *British Journal of Haematology*. 2018: 1–10. doi:10.1111/bjh.15416
35. 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: 536–544. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.021
36. Feng Y, Liu L, Feng YM, Zhao W, Li Z, Zhang AM, et al. GB Virus C infection in Patients With HIV/Hepatitis C Virus Coinfection: Improvement of the Liver Function in Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon*. 2014;14: e14169. doi:10.5812/hepatmon.14169
37. Lauck M, Bailey AL, Andersen KG, Goldberg TL, Sabeti PC, O'Connor DH. GB virus C coinfections in west African Ebola patients. *J Virol*. 2015;89: 2425–2429. doi:10.1128/JVI.02752-14
38. Leary TP, Muerhoff S, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the flaviviridae associated with human Non-A-E hepatitis. *J Med Virol*. 1996;48: 60–67. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199601)48:1<60::AID-JMV10>3.0.CO;2-A
39. Genus: Flavivirus - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). In: *ICTV Virus Taxonomy* [Internet]. 2017 [cited 2 Oct 2018]. Available: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus
40. Baltimore D. Expression of Animal Virus Genomes. 1971;35: 235–241. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC378387/pdf/bactrev00075-0012.pdf>
41. 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: 52–58. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745232>
42. 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: 233–246. doi:10.1099/vir.0.027490-0
43. Kapoor A, Kumar A, Simmonds P, Bhuvu N, Chauhan LS, 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. doi:10.1128/mBio.01466-15
44. Tillmann HL, Manns MP. GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Antivir Res*. 2001;52: 83–90. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672817>
45. Supapol WB, Remis RS, Raboud J, Millson M, Tappero J, Kaul R, et al. Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but not maternal GB virus C infection. *J Infect Dis*. 2008;197: 1369–1377. doi:10.1086/587488
46. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: Mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10: 279–290. doi:10.1038/nrmicro2747
47. Levy JA. *El VIH y la patogenesis del SIDA*. Fondo De Cultura Economica USA; 2008.
48. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; doi:10.1101/cshperspect.a006866
49. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, et al. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS*. 2007;21: 645–647. doi:10.1097/QAD.0b013e32803277c7
50. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol*. 2010;185: 4496–4505. doi:10.4049/jimmunol.1001980

51. Eissmann K, Mueller S, Sticht H, Jung S, Zou P, Jiang S, et al. HIV-1 fusion is blocked through binding of GB Virus C E2-derived peptides to the HIV-1 gp41 disulfide loop [corrected]. *PLoS One*. 2013;8: e54452. doi:10.1371/journal.pone.0054452
52. Schwarze-Zander C, Neibecker M, Othman S, Tural C, Clotet B, Blackard JT, et al. GB virus C coinfection in advanced HIV type-1 disease is associated with low CCR5 and CXCR4 surface expression on CD4⁺ T-cells. *Antivir Ther*. 2010;15: 745–752. doi:10.3851/IMP1602
53. Hattori J, Okumura N, Yamazaki Y, Uchiyama M, Hamaguchi M, Nishiyama Y, et al. Beneficial effect of GB virus C co-infection in Human Immunodeficiency Virus type 1-infected individuals. *Microbiol Immunol*. 2007;51: 193–200. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310087>
54. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4⁺ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 15570–15575. doi:10.1073/pnas.0604728103
55. Chang Q, McLinden JH, Stapleton JT, Sathar MA, Xiang J. Expression of GB virus C NS5A protein from genotypes 1, 2, 3 and 5 and a 30 aa NS5A fragment inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in a CD4⁺ T-lymphocyte cell line. *J Gen Virol*. 2007;88: 3341–3346. doi:10.1099/vir.0.83198-0
56. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, Chang Q, Kaufman TM, Klinzman D, et al. Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4⁺ cells. *J Immunol*. 2009;183: 7860–7869. doi:10.4049/jimmunol.0902276
57. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, et al. GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS*. 2009;23: 605–10. doi:10.1097/QAD.0b013e32831f1b00
58. Lassen KG, Lobritz MA, Bailey JR, Johnston S, Nguyen S, Lee B, et al. Elite suppressor-derived hiv-1 envelope glycoproteins exhibit reduced entry efficiency and kinetics. *PLoS Pathog*. 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000377
59. Gonzalo-Gil E, Ikediobi U, Sutton RE. Mechanisms of virologic control and clinical characteristics of HIV⁺ elite/viremic controllers. *Yale J Biol Med*. 2017;90: 245–259.
60. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. Molecular mechanisms of HIV entry. *Adv Exp Med Biol*. 2012; doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_10
61. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001; doi:10.1023/A:1021070512287
62. Esté JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*. 2007. doi:10.1016/S0140-6736(07)61052-6
63. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; doi:10.1101/cshperspect.a007161
64. Goto T, Nakai M, Ikuta K. The Life-cycle of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Science* (80-). 1998; doi:S0968-4328(98)00002-X [pii]
65. Esposito F, Corona A, Tramontano E. HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Mol Biol Int*. 2012; doi:10.1155/2012/586401
66. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, et al. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J*. 2007; doi:10.1038/sj.emboj.7601740
67. Babaahmady K, Oehlmann W, Singh M, Lehner T. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4⁺ T cells by microbial HSP70 and the peptide epitope 407-426. *J Virol*. 2007;81: 3354–60. doi:10.1128/JVI.02320-06
68. Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res*. 2008; doi:10.1016/j.virusres.2008.01.002
69. Imran M, Manzoor S, Saalim M, Resham S, Ashraf J, Javed A, et al. HIV-1 and hijacking of

- the host immune system: the current scenario. *Apmis*. 2016;124: 817–831. doi:10.1111/apm.12579
70. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; doi:10.1101/cshperspect.a006890
 71. Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, Kutluay SB, Zang T, Wilson SJ, et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013; doi:10.1038/nature12653
 72. Busnadiego I, Kane M, Rihn SJ, Preugschas HF, Hughes J, Blanco-Melo D, et al. Host and Viral Determinants of Mx2 Antiretroviral Activity. *J Virol*. 2014; doi:10.1128/JVI.00214-14
 73. Di Santo R. Inhibiting the HIV integration process: Past, present, and the future. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. doi:10.1021/jm400674a
 74. Cullen BR. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell*. 1986; doi:10.1016/0092-8674(86)90696-3
 75. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J*. 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7600900
 76. Fluor C, De Milito A, Fry TJ, Vivar N, Eidsmo L, Atlas A, et al. Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection. *J Immunol*. 2007; doi:10.1188/8/5340 [pii]
 77. Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Current HIV/AIDS Reports*. 2011. doi:10.1007/s11904-010-0066-0
 78. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8⁺T cells. *Immunity*. 2001; doi:10.1016/S1074-7613(01)00246-1
 79. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto KC, et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. *AIDS*. 2009;23: 2277–2287. doi:10.1097/QAD.0b013e32832d7a11
 80. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RMM. CD4 T Cell Depletion Is Linked Directly to Immune Activation in the Pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but Only Indirectly to the Viral Load. *J Immunol*. 2002; doi:10.4049/jimmunol.169.6.3400
 81. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10: 563–572. doi:10.1586/eri.12.37
 82. Moenkemeyer M, Schmidt RE, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heiken H. GBV-C coinfection is negatively correlated to Fas expression and Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infected patients. *J Med Virol*. 2008;80: 1933–1940. doi:10.1002/jmv.21305
 83. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Landay AL, Chivero ET, Stapleton JT. GB virus C particles inhibit T cell activation via envelope E2 protein-mediated inhibition of TCR signaling. *J Immunol*. 2013;190: 6351–6359. doi:10.4049/jimmunol.1300589
 84. 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 Clim Assoc*. 2014;125: 14–16. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125715>
 85. Walker-Sperling VEK, Buckheit RW, Blankson JN. Comparative analysis of the capacity of elite suppressor CD4⁺ and CD8⁺ T cells to inhibit HIV-1 replication in monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 2014;88: 9789–9798. doi:10.1128/JVI.00860-14
 86. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, et al. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*. 2007; doi:10.1016/j.stem.2007.02.001
 87. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4⁺ T cells during HIV infection. *Nat Med*. 2008; doi:10.1038/nm1728
 88. Blankson JN. Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: Highly active immune

- responses? *Antiviral Res.* 2010;85: 295–302. doi:10.1016/j.antiviral.2009.08.007
89. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology.* 2015. doi:10.1038/nrmicro3490
90. Timmons CL, Shao Q, Wang C, Liu L, Liu H, Dong X, et al. GB virus type C E2 protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 assembly through interference with HIV-1 gag plasma membrane targeting. *J Infect Dis.* 2013;207: 1171–1180. doi:10.1093/infdis/jit001
91. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, et al. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell.* 2009; doi:10.1016/j.cell.2009.08.039
92. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 2008; doi:10.1038/nature06553
93. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog.* 2009; doi:10.1371/journal.ppat.1000574
94. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; doi:10.1101/cshperspect.a006965
95. Sabin CA, Lundgren JD. The natural history of HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2013. doi:10.1097/COH.0b013e328361fa66
96. Altfeld M, Gale M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat Immunol.* 2015;16: 554–562. doi:10.1038/ni.3157
97. Borrow P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2011. doi:10.1097/COH.0b013e3283495996
98. Lalle E, Sacchi A, Abbate I, Vitale A, Martini F, D’Offizi G, et al. Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21: 161–171. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336742>
99. Oxenius A, Price DA, Hersberger M, Schlaepfer E, Weber R, Weber M, et al. HIV-specific cellular immune response is inversely correlated with disease progression as defined by decline of CD4⁺ T cells in relation to HIV RNA load. *J Infect Dis.* 2004;189: 1199–1208. doi:10.1086/382028
100. Lalle E, Sacchi A, Abbate I, Vitale A, Martini F, D’Offizi G, et al. Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21: 161–171. doi:10.1177/039463200802100118
101. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med.* 2003;139: 26–30. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834315>
102. 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: 69–72. doi:10.1093/infdis/jis312
103. Lanteri MC, Vahidnia F, Tan S, Stapleton JT, Norris PJ, Heitman J, et al. Downregulation of Cytokines and Chemokines by GB Virus C After Transmission Via Blood Transfusion in HIV-Positive Blood Recipients. *J Infect Dis.* 2015;211: 1585–1596. doi:10.1093/infdis/jiu660
104. Lewthwaite P, Wilkins E. Natural history of HIV/AIDS. *Medicine.* 2009. doi:10.1016/j.mpmed.2009.04.015
105. Vahidnia F, Petersen M, Stapleton JT, Rutherford GW, Busch M, Custer B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. *Clin Infect Dis.* 2012;55: 1012–1019. doi:10.1093/cid/cis589
106. Fauci AS. Immunopathogenic Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus (HIV)

- Infection. *Ann Intern Med.* 1991;114: 678. doi:10.7326/0003-4819-114-8-678
107. Gregson J, Tang M, Ndembu N, Hamers RL, Marconi VC, Brooks K, et al. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: A multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016; doi:10.1016/S1473-3099(15)00536-8
 108. Ferreyra C, Yun O, Eisenberg N, Alonso E, Khamadi AS, Mwau M, et al. Evaluation of Clinical and Immunological Markers for Predicting Virological Failure in a HIV/AIDS Treatment Cohort in Busia, Kenya. *PLoS One.* 2012; doi:10.1371/journal.pone.0049834
 109. Al-Jabri AA. Mechanisms of host resistance against HIV infection and progression to AIDS. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2007;7: 83–96.
 110. Okoye AA, Picker LJ. CD4⁺T-Cell Depletion In Hiv Infection: Mechanisms Of Immunological Failure. *Immunol Rev.* 2013; doi:10.1111/imr.12066
 111. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: Scientific principles and clinical applications. *Drugs.* 2012. doi:10.2165/11633630-000000000-00000
 112. Wang B. Viral factors in non-progression. *Frontiers in Immunology.* 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00355
 113. Liu P, Shi ZX, Zhang YC, Xu ZC, Shu HS, Zhang XY. A prospective study of a serum-pooling strategy in screening blood donors for antibody to hepatitis C virus. *Transfusion.* 1997;37: 732–736. Available: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=9225938>
 114. 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: 25–31. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000218>
 115. Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J Virol Methods.* 2001;91: 3–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164480>
 116. AbuOdeh RO, Al-Absi E, Ali NH, Khalili M, Al-Mawlawi N, Hadwan TA, et al. Detection and phylogenetic analysis of human pegivirus (GBV-C) among blood donors and patients infected with hepatitis B virus (HBV) in Qatar. *J Med Virol.* 2015;87: 2074–2081. doi:10.1002/jmv.24289
 117. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. doi:10.1093/molbev/mst197
 118. Teel C, Park T, Sampson AR. EM Estimation for Finite Mixture Models with Known Mixture Component Size. doi:10.1080/03610918.2013.824091
 119. McLachlan G, Peel D. Finite Mixture Models [Internet]. *Technometrics.* 2000. p. 419. doi:10.1198/tech.2002.s651
 120. Figueiredo MAT, Jain AK. Unsupervised learning of finite mixture models. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* 2002;24: 381–396. doi:10.1109/34.990138
 121. Young D, Benaglia T, Chauveau D, Hunter D, Elmore R, Hettmansperger T, et al. Package ‘mixtools.’ 2017; Available: <https://cran.r-project.org/web/packages/mixtools/mixtools.pdf>
 122. Schleicher SB, Flehmig BF. Genotyping of GB virus C by restriction pattern analysis of the 5′ untranslated region. *J Med Virol.* 2003;71: 226–232. doi:10.1002/jmv.10474
 123. Keys JR, Leone PA, Eron JJ, Alexander K, Brinson M, Swanstrom R. Large scale screening of human sera for HCV RNA and GBV-C RNA. *J Med Virol.* 2014;86: 473–477. doi:10.1002/jmv.23829
 124. Anggorowati N, Yano Y, Subronto YW, Utsumi T, Heriyanto DS, Mulya DP, et al. GB virus C infection in Indonesian HIV-positive patients. *Microbiol Immunol.* 2013;57: 298–308. doi:10.1111/1348-0421.12033
 125. Dmitriev PN, Tsikina MN, Moiseeva A V, Serkov IL, Pronin AI., Popova OE, et al. [GBV-C infection in HIV-infected patients in the Russian Federation]. *Vopr Virusol.* 2010;55: 23–26.

Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364667>

126. Quirós E, Piédrola G, Maroto MC. GBV-C RNA presence in several high-risk groups of Spain. *Eur J Epidemiol.* 1998;14: 617–619. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794130>

127. Rè V, Spinsati I, Joison A, Bepre H, Contigiani M. GB virus C infection in blood donors from Córdoba, Argentina. *Vox Sang.* 2001;81: 54. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520419>

128. Rubi-castellanos R, Martí G, Mun F, Gonza A, Cerda-flores RM, Anaya-palafox M. Pre-Hispanic Mesoamerican Demography Approximates the Present-Day Ancestry of Mestizos Throughout the Territory of Mexico. 2009;294: 284–294. doi:10.1002/ajpa.20980

129. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Nakano T, Kato T, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection among Colombian native Indians. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59: 462–467. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749645>

130. Alvarado-Mora M V, Botelho L, Nishiya A, Neto RA, Gomes-Gouvêa 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. *Virol J.* 2011;8: 345. doi:10.1186/1743-422X-8-345

131. Loureiro CL, Alonso R, Pacheco BA, Uzcátegui MG, Villegas L, León G, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus genotype 3 among autochthonous Venezuelan populations. *J Med Virol.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002;68: 357–362. doi:10.1002/jmv.10211

132. Tucker TJ, Smuts HE. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J Med Virol.* 2000;62: 82–83. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10935992>

133. Björkman P, Flamholc 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: 1641–1643. doi:10.1097/QAD.0b013e32823bc9b7

134. Avila-Ríos S, García-Morales C, Tapia-Trejo D, Meza RI, Nuñez SM, Parham L, et al. HIV drug resistance surveillance in Honduras after a decade of widespread antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2015;10: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0142604

135. Avila-Ríos S, García-Morales C, Garrido-Rodríguez D, Ormsby CE, Hernández-Juan R, Andrade-Villanueva J, et al. National prevalence and trends of hiv transmitted drug resistance in Mexico. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0027812

136. Somanchi SS, Senyukov V V, Denman CJ, Lee DA. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *J Vis Exp.* MyJoVE Corporation; 2011; doi:10.3791/2540

137. Qiagen. Technical Guide to QIAGEN PCR Arrays. 2016; Available: <https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=0d01ffb7-e6ab-48ec-bd34-87a91f656b5d&lang=en>

138. Purification and analysis of Group VI (ss)RNA-RT viruses: Retroviridae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus – 1 (HIV-1) and lentivirus vectors [Internet]. Available: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/V34.pdf>

139. Dettenhofer M, Yu XF. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J Virol.* 1999;73: 1460–1467. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882352>

140. Coleman JE, Huentelman MJ, Kasparov S, Metcalfe BL, Paton JFR, Katovich MJ, et al. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use *in vivo*. *Physiol Genomics.* 2003;12: 221–228. doi:10.1152/physiolgenomics.00135.2002

141. Vicenzi E, Poli G. Infection of CD4 + Primary T Cells and Cell Lines, Generation of Chronically Infected Cell Lines, and Induction of HIV Expression. *Current Protocols in Immunology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. doi:10.1002/0471142735.im1203s69

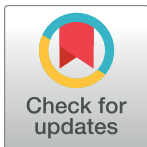
142. Patrikar S, Basannar D, Bhatti CV, Kotwal CA, Gupta CR, Grewal BR. Rate of decline in CD4 count in HIV patients not on antiretroviral therapy. *Med J Armed Forces India*. 2014;70: 134–138. doi:10.1016/j.mjafi.2013.08.005
143. Keyvani H, Mohammadi A, Ghannad MS, Hajabdolbaghi M, Sabouri Ghannad M, Hajabdolbaghi M. The Effect of GBV-C Infection on CD4 Count and Viral Loads in Patients Infected With HIV. *Hepat Mon*. 2012;12: 38–41. doi:10.5812/kowsar.1735143X.817
144. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, et al. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol*. 2017; doi:10.1002/jmv.24836
145. Bergsdorf C, Beyer C, Umansky V, Werr M, Sapp M. Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Lett*. No longer published by Elsevier; 2003;536: 120–124. doi:10.1016/S0014-5793(03)00039-5
146. Coakley E, Reeves JD, Huang W, Mangas-Ruiz M, Maurer I, Harskamp AM, et al. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2009;53: 4686–93. doi:10.1128/AAC.00229-09
147. Wiwanitkit V. Individuals with HGV-RNA are at high risk of B cell non-Hodgkin's lymphoma development. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6: 215–216. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101337>

ANEXO

RESEARCH ARTICLE

High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression

Gibran Horemheb-Rubio^{1☯}, Pilar Ramos-Cervantes^{1☯}, Hugo Arroyo-Figueroa^{1☯}, Santiago Ávila-Ríos^{2‡}, Claudia García-Morales^{2‡}, Gustavo Reyes-Terán^{2‡}, Galileo Escobedo³, Gloria Estrada^{4‡‡}, Trinidad García-Iglesias^{5‡}, Nayeli Muñoz-Saucedo^{5‡}, David Kershenobich⁶, Patricia Ostrosky-Wegman⁷, Guillermo M. Ruiz-Palacios^{1*}



1 Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, **2** Infectious Diseases Research Center, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico, **3** Liver Pancreas and Intestinal Motility Laboratory, Hospital General de México, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **4** Blood Bank, Hospital General de México, Mexico City, Mexico, **5** Immunology Laboratory, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico, **6** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, **7** Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Citation: Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Ávila-Ríos S, García-Morales C, Reyes-Terán G, et al. (2017) High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. PLoS ONE 12(9): e0184494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494>

Editor: Jason Blackard, University of Cincinnati College of Medicine, UNITED STATES

Received: May 24, 2017

Accepted: August 24, 2017

Published: September 14, 2017

Copyright: © 2017 Horemheb-Rubio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: We did not receive any specific funding for this research work, except for a PhD scholarship from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico), fellowship no. 323782, for the first author, Gibran Horemheb-Rubio, MD.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

☯ These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Research and normativity, Instituto Nacional de la Transfusión Sanguínea, Mexico city, Mexico

‡‡ These authors also contributed equally to this work.

* gmrps@unam.mx

Abstract

Background

Human Pegivirus (HPgV) may have a beneficial effect on HIV disease progression in co-infected patients; however, the virologic characteristics of this infection are not well defined. In this study, we determined HPgV viremia prevalence in Mexico and provide new insights to understand HPgV infection and HPgV/HIV co-infection.

Methods

We analyzed and quantified 7,890 serum samples for HPgV viremia by One-Step RT-Real-Time PCR, 6,484 from healthy blood donors and 1,406 from HIV-infected patients. Data on HIV progression were obtained from patients' records. HPgV genotyping was performed in 445 samples by nested PCR of the 5'URT region. Finite Mixture Models were used to identify clustering patterns of HPgV viremia in blood donors and co-infected antiretroviral (ART)-naïve patients.

Results

HPgV was detected in 2.98% of blood donors and 33% of HIV patients, with a wide range of viral loads. The most prevalent genotypes were 3 (58.6%) and 2 (33.7%). HPgV viral loads from healthy blood donors and HPgV/HIV+ ART-naïve co-infected patients were clustered

into two component distributions, low and high, with a cut-off point of $5.07\log_{10}$ and $5.06\log_{10}$, respectively. High HPgV viremia was associated with improved surrogate markers of HIV infection, independent of the estimated duration of HIV infection or HIV treatment.

Conclusions

HPgV prevalence in Mexico was similar to that reported for other countries. The prevalent genotypes could be related to Mexico's geographic location and ethnicity, since genotype 2 is frequent in the United States and Europe and genotype 3 in Asia and Amerindian populations. HPgV viral load demonstrated two patterns of replication, low and high. The more pronounced beneficial response observed in co-infected patients with high HPgV viremia may explain discrepancies found between other studies. Mechanisms explaining high and low HPgV replication should be explored to determine whether the persistently elevated replication depends on host or viral factors.

Introduction

Human Pegivirus (HPgV), formerly GB virus C (GBV-C), was considered non-pathogenic, although this concept has changed due to its association with non-Hodgkin's lymphoma [1,2]. HPgV is classified in the genus Pegivirus within the *Flaviviridae* and it is the most prevalent flavivirus in the world [3]. The prevalence of HPgV viremia is 1–5% among healthy blood donors, although higher prevalences have been found in developing countries (up to 18%) [4]. Co-infection with HPgV occurs in 20–40% of HIV patients; both viruses share transmission routes: blood transfusion, sexual and vertical [5–8]. HPgV has 7 genotypes, geographically distributed: genotypes 1 and 5 predominate in Africa, genotype 2 in Europe and North America, genotype 3 in Asia and Amerindian populations, genotype 4 in the Philippines and Mainland Southeast Asia, genotype 6 in China and Japan, and 7 in China, although there is controversy in whether genotypes 6 and 7 are variations of genotype 4 [9–16]. Several studies have shown that co-infected patients have slower HIV progression, increased survival time, and decreased vertical HIV transmission, all of these described as HPgV beneficial effects. However, there are discrepancies among studies on the frequency of these effects, which have been extensively reviewed [17–20].

This research aimed to understand HPgV infection and HPgV/HIV co-infection in Mexico by studying the conditions under which these beneficial effects occur *in vivo*. We assessed HPgV viremia prevalence and viral load by One-Step RT-Real-Time PCR in healthy blood donors and HIV patients, analysed HPgV viral load distribution within the positive population, and determined the effect of HPgV on HIV viral load, CD4⁺ cell count, and CD4⁺/CD8⁺ ratio in HIV-positive antiretroviral (ART)-naïve patients.

Materials and methods

Serum samples' collection

We tested 7,890 serum samples for HPgV viremia, 6,484 from healthy blood donors and 1,406 from HIV-positive patients (770 ART-naïve and 636 on HAART). We obtained samples from blood donors during the periods of August–December 2009, March–June 2010, and January–August 2015, at the blood banks of four referral hospitals from central and western Mexico: National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubiran (INCMNSZ) and

General Hospital of Mexico in Mexico City; Old Civil Hospital Fray Antonio Alcalde and New Civil Hospital Juan I. Menchaca in Guadalajara, Jalisco. Written informed consent was signed by blood donors before sample collection. The study was approved by the research and ethics committees of each institution: Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Comité de Ética en Investigación del Hospital General de México, Comité de Ética en Investigación del Hospital Fray Antonio Alcalde, and Comité de Ética del Hospital Civil Juan I. Menchaca.

We collected 5 ml of blood from healthy blood donors at donation time. Blood samples were centrifuged at 3000xg and serum aliquots were made and stored at -70°C until tested. We obtained serum samples from HAART patients from the INCMNSZ HIV Clinic repository, collected from February 2004 to May 2010. Samples from HIV-positive ART-naïve patients, collected from October 2007 to July 2013, were obtained from the Infectious Disease Research Centre at the National Institute of Respiratory Diseases (INER-CIENI) repository in Mexico City.

Serum samples pooling and nucleic acid extraction

To test healthy blood donor samples for HPgV infection, we formed pools to save reagents [21,22], as follows (Fig 1): 200ul from each sample were mixed in one tube to make pools of 10 samples each; 500ul were taken from each pool and processed by an automatic nucleic acid extraction system (NucliSENS[®] easyMag[®], Biomerieux, France) according to the manufacturer's instructions. Nucleic acids were tested for HPgV viremia by One-Step RT-Real-Time PCR as described in the following section. We performed a second round of pools, mixing 200ul from the samples that were positive to HPgV in the first pool test to make up new 5-samples pools, which were re-tested. Then, to identify HPgV viremic donors we tested individually the positive samples from the second round of pools. Samples from HIV patients were tested one at a time, and viral load was quantified in the positive samples.

HPgV detection, quantification and genotyping

HPgV detection. We tested nucleic acids by One-Step RT-Real-Time PCR with a lower detection of 50 copies per ml of serum, as follows: retro-transcription at 50°C for 30 min, polymerase activation at 95°C for 2 min, 40 cycles of primer annealing at 95°C for 15 sec, and elongation-detection at 55°C for 1 min. Selected primers correspond to the 5' untranslated region (103–163nt) according to GenBank accession number AF121950: sense primer (103-122nt) 5' – GGC CAA AAG GTG GTG GAT GG – 3' [10]; antisense primer (188-163nt) 5' – CTT AAG ACC CAC CTA TAG TGG CTA CC – 3' ; and the probe (131-158nt) 5' – (FAM) TGA CCG GGA TTT ACG ACC TAC CAA CCC T (TAMRA) – 3' [23].

HPgV quantification. The One-Step RT-Real-Time PCR described above was used for HPgV quantification of the individual positive samples. A puc57 plasmid containing one copy of the PCR amplified 5'UTR HPgV region fragment (85-362nt) according to GenBank accession number AF121950, was used as a standard curve reference in concentrations ranging from 10⁹ to 10² copies.

HPgV genotyping. Genotyping was performed in 445 HPgV-positive samples. We extracted nucleic acids by standard procedures and performed nested PCR. Briefly, the first pair of primers amplified the HPgV 5' untranslated (5'UTR) region fragment (139-400nt) according to GenBank accession number U44402; a second PCR was done to differentiate genotypes 1–4 by molecular weight as described by Naito et al. [9]. Capillary sequencing of the 5'UTR region fragment was performed to test the samples that did not amplify or those with inconclusive results due to the presence of more than one genotype. HPgV genotype was established according to alignment with the reference sequences corresponding to genotypes 1 to 7

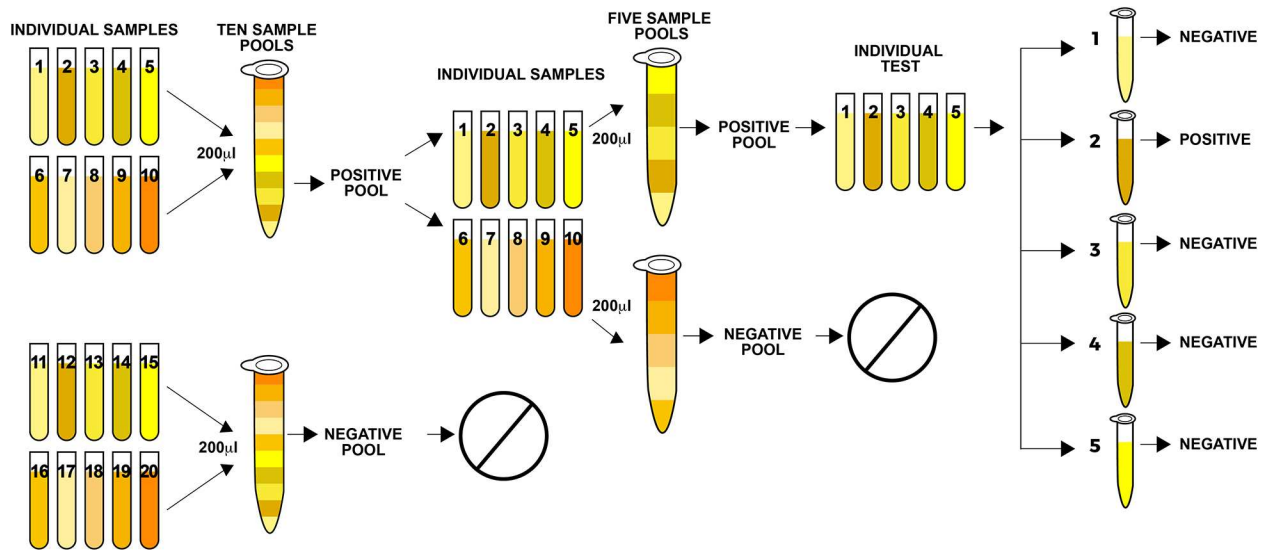


Fig 1. Diagram of pooling method for serum samples from blood donors. The diagram shows the construction of sample pools and analysis for HPgV viremia in healthy blood donors. Positive samples from the pool were re-tested in smaller pools each time until we detected the positive individual donor sample.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.g001>

[24], GenBank accession numbers: U59547 and AF131116, genotype 1; AB003289, U45966, U44402, U59520, U59521, U59519, AF131118, AY196904, AF104403, and U59518, genotype 2a; U59529, U59532, U59530, U59531, and U59533, genotype 2b; D87711, AB003288, D87251, D87710, AB008335, D87714, D87708, D87713, D87712, AB003290, D87709, and D90601, genotype 3; AB021287, HQ331172, and AB018667, genotype 4; AF131111, and AF131112, genotype 5; AB003292, genotype 6; HQ331234, HQ331233, and HQ331235, genotype 7. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were done using MEGA version 6 [25].

HIV quantification, CD4⁺ cell counts, CD4⁺/CD8⁺ ratio, and assessment of HIV infection time

HIV viral loads, CD4⁺ cell counts, CD4⁺/CD8⁺ ratio, and HIV infection time (defined as recent [<6 months] and late [≥ 6 months]) of the ART-naïve patients were previously determined and shared by CIENI-INER. Criteria to consider recent infections were: individuals with <1 year of diagnosis, CD4⁺ T cell counts ≥ 200 cells/ μL , plasma HIV viral load >400 RNA copies/ml, and HIV-1 Lag-Avidity EIA (Sedia, USA) ODn ≤ 1.5 (95% CI 118–142) with a seroconversion period window of 130 days. All samples were tested in duplicate. Individuals who did not meet these criteria were considered as having a late infection [26,27].

Statistical analysis

HPgV viral load heterogeneity. Due to the wide HPgV viral load heterogeneity among blood donors and the HIV-positive ART-naïve group, we verified the existence of clusters dependant of HPgV viral load. For this purpose, we performed a Finite Mixture Model (FMM) in R software (Version 3.1.3 released 2015-03-09), fitting a Gaussian distribution in both HPgV-positive populations (blood donors and HIV-positive ART-naïve) separately by using NormalmixEM and plot.mixEM functions contained in mixtools package (Version 1.0.3 released 2015-04-18) [28]. The optimal cut-off point is the value where the probability density curves of both clusters cross.

The NormalmixEM uses the Expectation-Maximization (EM) algorithm to determine, by repeating iterations, the joining likelihood between each sample's viral loads until the model converges. To improve the model and ensure that the analyses of HPgV viral load distribution of both populations (blood donors and HIV-positive ART-naïve) were comparable, we decided to specify the initial values of lambda and sigma instead of leaving them unsupervised [29,30].

The initial sigma value in the model was 1.4 for both populations, calculated as the standard deviation (SD) of HPgV viral load distributions within the entire healthy blood donors HPgV-positive population (SD = 1.4). By selecting only this population to determine the initial sigma value (standard deviation, determined as the initial factor for the FMM model for both groups), we avoided the influence of HIV infection on the SD of the whole population analysed. The initial lambda value (proportion of the subjects in each formed subgroup) used was 0.5, defined as an initial proportion for the formed clusters. This approach helped us reduce the number of iterations until the model converged, and increase the loglik at the estimate number [31]. Co-infected HAART patients were excluded to avoid treatment as a confounding factor. We then compared by Student's *t*-Test the means of HPgV viral load of HPgV -low and HPgV -high, controlling with HPgV genotypes 2 and 3.

Effect of HPgV viral load on surrogate markers of HIV progression. We compared the means of the following parameters: HIV viral load, CD4+ cell counts [32,33], and CD4⁺/CD8⁺ ratio [34]. These comparisons were performed according to HPgV major prevalent genotypes (2 and 3) and HPgV condition (HPgV-negative and HPgV-positive) by Student's *t*-Test, one-way ANOVA and Bonferroni multiple-comparison test in overall ART-naïve patient population and in the subsequent division into recent (< 6 months) and late (≥ 6 months) HIV infection time groups. Analyses and graphs were made in STATA and SIGMAPLOT software.

Results

HPgV viremia, viral load and genotyping

One of the aims of this study was to characterise HPgV infection in Mexico. We determined the prevalence of HPgV viremia, viral load and genotype in healthy blood donors and HIV-positive patients by One-Step RT-Real Time PCR (S1 Fig). HPgV viremia was detected in 191 (2.94%) of 6,484 samples from blood donors and 473 (33.64%) of 1,406 samples from all HIV-positive patients included (ART-experienced and ART-naïve). We found a wide range of viral loads in positive samples, 10^2 – 10^8 genome equivalents (GE). HPgV genotype was determined in 445 samples (72/191 from healthy blood donors and 373/473 HIV-positive patients from which 165/180 were ART-experienced and 208/293 were ART-naïve). The most prevalent genotypes were 3 (261, 58.6%) and 2 (150, 33.7%). We found coinfection with genotypes 2/3 (30, 6.7%), from which 20 (4.5%) were genotype 2a/3 and 10 (2.2%) were 2b/3 (S5 Fig). We also found a low prevalence of genotypes 1 and 4 (with 2 samples each, 0.45%). There were no significant differences in means of HIV viral load ($p > 0.05$), CD4+ cell counts ($p > 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ ratio ($p > 0.05$) and HPgV viral load ($p > 0.05$) from HIV positive ART-naïve patients, between major HPgV genotypes 2 and 3 in HPgV -low or HPgV -high tested by one-way ANOVA and confirmed by Bonferroni test (Table 1).

HIV quantification, CD4⁺ cell counts, CD4⁺/CD8⁺ ratio, and the assessment of HIV infection time

To compare the HPgV effect on surrogate markers of HIV infection, we used the previously determined results shared by CIENI-INER [26,27] of HIV viral loads, CD4⁺ cell counts and

Table 1. Surrogate markers of HIV progression compared between genotypes 2 and 3, according to the low or high HPgV viral loads in HIV-positive ART-naïve patients.

Condition Genotype	HPgV—low			HPgV—high		
	2 (n = 23*)	3 (n = 76)	p-value	2 (n = 22)	3 (n = 54)	P-value
Mean of HIV viral load, GE(log10)/ml	4.98 95%CI (4.66–5.28)	4.80 95%CI (4.63–4.97)	0.33	4.70 95%CI (4.39–4.99)	4.44 95%CI (4.25–4.63)	0.15
Mean of CD4+ cell counts	323 95%CI (215–431)	293 95%CI (233–352)	0.63	344 95%CI (251–437)	394 95%CI (335–453)	0.37
Mean of CD4+/CD8+ ratio	.325 95%CI (.231 - .418)	.286 95%CI (.234 - .337)	0.46	.379 95%CI (.271 - .485)	.394 95%CI (.324 - .462)	0.82
Mean of HPgV viral load, GE (log10)/ml	3.35 95%CI (3.04–3.64)	3.58 95%CI (3.41–3.74)	0.18	6.42 95%CI (6.11–6.72)	6.43 95%CI (6.23–6.62)	0.96

The table shows the differences between HPgV genotypes 2 and 3 (by Student’s t-Test and Bonferroni multiple comparison test) in means of HIV viral load, CD4+ cell counts, CD4+/CD8+ ratio and HPgV viral load. HIV and HPgV viral loads are expressed as genomic equivalents (GE)/ml (log10).

*One patient (ID 667) was excluded from this part of the analysis due to his outlier CD4+ cell count. Statistical significance was considered at p<0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.t001>

CD4+/CD8+ ratio from 770 HIV-positive ART-naïve patients and HIV infection time from 303 HIV-positive ART-naïve patients.

HPgV viral load heterogeneity

Our prevalence results show a wide heterogeneity of HPgV viral load. To verify the existence of subgroups, we analysed the HPgV viral load distribution patterns in healthy blood donors and co-infected ART-naïve patients (S2 Fig). By using the FMM analysis, we found that subjects were clustered into two component distributions with similar cut-off points, 5.07log₁₀ for blood donors and 5.06log₁₀ for ART-naïve patients. We named these clusters HPgV-low and -high conditions. Then, we determined the population density distribution of each cluster. We found that 34% of the blood donors belonged to the HPgV-low and 66% to the HPgV-high cluster (Fig 2A); while among the co-infected ART-naïve population 66.3% belonged to the HPgV-low and 33.6% to the HPgV-high clusters (Fig 2B). To assess whether HPgV viral load clustering was determined by the genotype, we analysed the genotyped samples from HIV-positive ART-naïve patients corresponding to the major prevalent HPgV genotypes (2 and 3). From these, 100 corresponded to the HPgV low-viral load cluster, from which 76 (76%) were

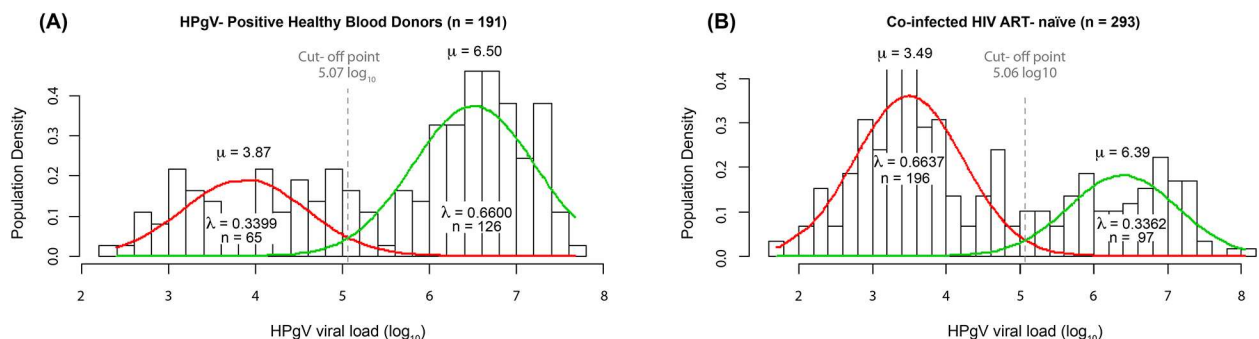


Fig 2. Two-component cluster mixture model fit for weighted HPgV viral load from healthy blood donors and co-infected ART-naïve patients. Density distribution (bars) of HPgV viral load (log₁₀ genome equivalents) from healthy blood donors (A) and co-infected ART-naïve patients (B). Gaussian curves indicate the fitted low (red line), high (green line), mean component curves (μ), the number of patients (n) and proportion (λ) in each population component. The clusters’ cut-off point for healthy blood donors (A) and co-infected ART-naïve patients (B), is the intersection of the curves.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.g002>

genotype 3 and 24 (24%) were genotype 2. Of 76 genotyped samples corresponding to HPgV high- viral load cluster, 54 (71%) were genotype 3 and 22 (29%) were genotype 2.

Effect of HPgV viral load on surrogate markers of HIV progression

Studies have shown the effect of HPgV on surrogate markers of HIV progression (HIV viral load, CD4⁺ cell counts, and CD4⁺/CD8⁺ ratio); however, the majority of these studies have not considered HPgV viral load and discrepancies remain [17]. To determine the role that HPgV viral load and the cluster distribution pattern play in the effect of HPgV on HIV, we compared in the ART-naïve population the means of markers of HIV progression by one-way ANOVA, divided according to HPgV viral load conditions (-negative, -low and -high) (S3 Fig). We found statistically significant differences between means of HIV viral load ($p < 0.05$) (Fig 3A), CD4⁺ cell counts ($p < 0.05$) (Fig 3B) and CD4⁺/CD8⁺ ratio ($p < 0.05$) (Fig 3C). We then used Bonferroni comparison test to verify the specific effect of each HPgV condition on HIV progression markers, using the HPgV-negative as a comparison reference. We found significantly lower means of HIV viral loads ($p < 0.05$) in the HPgV-low (-0.17 HIV copies/ml log₁₀) and HPgV-high (-0.44 HIV copies/ml log₁₀) conditions; significantly higher means of CD4⁺ cell counts ($p < 0.05$) in the HPgV-low (+53 CD4⁺/mm³) and HPgV-high (+140 CD4⁺/mm³)

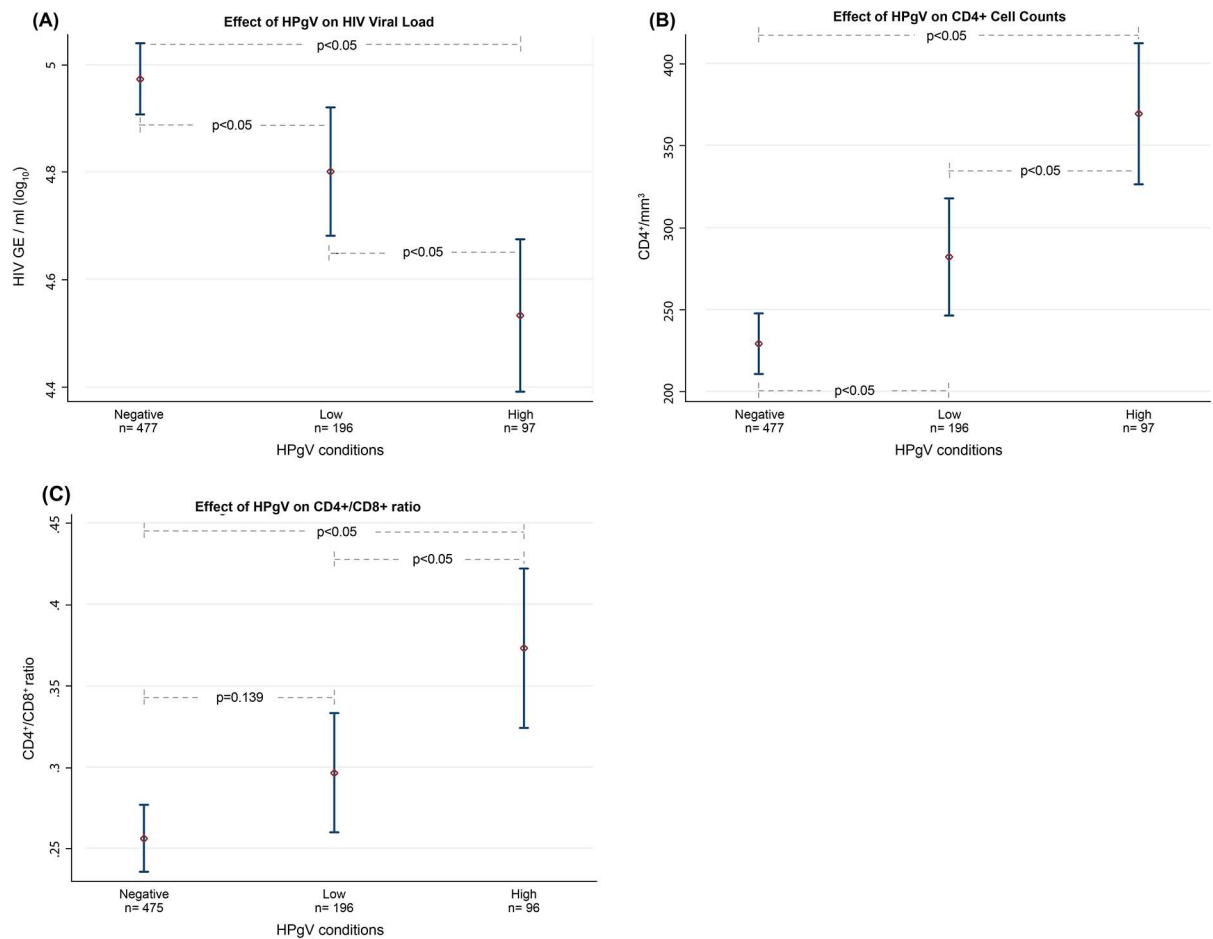


Fig 3. Effects of HPgV on surrogate markers of HIV progression. Each graph shows the differences between the means of: (A) HIV viral load/ml (log₁₀), (B) CD4⁺ cell counts (CD4⁺/mm³), and (C) CD4⁺/CD8⁺ ratio, in the ART-naïve population according to their HPgV condition (-negative, -low, or -high). Significant differences are considered at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.g003>

conditions; and significantly higher CD4⁺/CD8⁺ ratio ($p < 0.05$) only in the HPgV-high condition (+0.11).

To determine the influence of HPgV genotype on surrogate markers of HIV progression, we compared the means of HIV viral load, CD4⁺ cell counts and CD4⁺/CD8⁺ ratio from HIV positive ART-naïve patients by one-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test between HPgV -negative -low or -high in samples corresponding to genotypes 2 or 3. We found that only genotype 3 was associated with a significant effect on all three markers of HIV progression. There was a significantly lower HIV viral load in HPgV genotype 3 -high ($p < 0.01$, -0.53 HIV copies/ml log₁₀) compared with HPgV -negative, and in genotype 3 -high ($p < 0.05$, -0.36 HIV copies/ml log₁₀) compared with genotype 3 -low (Fig 4A). When we compared means of HIV viral load in HPgV genotype 2 samples, we did not find significant differences between any of the HPgV conditions (-negative, -low and -high) ($p > 0.05$) (Fig 4B). When comparing means of CD4⁺ cell counts between HPgV conditions in samples of patients with genotype 3, we found significantly higher CD4⁺ counts in HPgV-high ($p < 0.01$, +166) compared with -negative; and in -high ($p < 0.05$, +101) compared with -low (Fig 4C). We also found significantly higher CD4⁺ counts in samples of patients with HPgV genotype 2 -high ($p < 0.05$, +115) compared with HPgV-negative (Fig 4D). Furthermore, significantly higher means of CD4⁺/CD8⁺ ratio were found in samples from patients with HPgV genotype 3 -high ($p < 0.01$, +0.137) compared with HPgV -negative, and ($p < 0.05$, +0.108) compared with -low (Fig 4E). The only significant effect of genotype 2 was seen in CD4⁺/CD8⁺ ratio: the mean ratio was significantly higher in genotype 2 -high as compared with HPgV- negative ($p < 0.05$, +0.122) (Fig 4F).

To determine whether HIV infection time was a confounding factor and the specific effect of each HPgV condition, we sub-divided the ART-naïve population into recent (<6 months) or late (≥ 6 months) HIV infection subgroups (S3 Fig). We tested these subgroups by the Bonferroni test to compare the means of HIV markers within all possible combinations of HPgV viral load conditions and HIV subgroups. We found significantly lower means of HIV viral load in the HIV-late/HPgV-high (-0.85 HIV copies/ml log₁₀) compared to HIV-late/HPgV-negative ($p < 0.05$), and in the HIV-late/HPgV-high (-0.79 HIV copies/ml log₁₀) compared to HIV-recent/HPgV-negative ($p < 0.05$) (Table 2).

We also found significantly lower means of CD4⁺ cell counts in the HIV-late/HPgV-negative (-228 CD4⁺/mm³) compared to HIV-recent/HPgV-negative ($p < 0.05$), and in the HIV-late/HPgV-low (-268 CD4⁺/mm³) compared to HIV-recent/HPgV-low ($p < 0.05$). However, CD4⁺ cell counts were not significantly lower in the HIV late/HPgV-high (-133 CD4⁺/mm³) compared to HIV-recent/HPgV-high ($p = 1.0$) (Table 3).

In addition, there was a significantly higher CD4⁺/CD8⁺ ratio in the HIV-late/HPgV-high (+0.17) compared to the HIV-late/HPgV-negative ($p < 0.05$) (Table 4).

Discussion

The clinical relevance of HPgV infection resides in its beneficial effect on HIV and HCV disease progression and decrease in Ebola virus mortality [17,35–37]. On the other hand, HPgV infection has been associated with the long-term development of non-Hodgkin's lymphoma [1,2]. Although there is evidence that HPgV infection is associated with a delay in HIV disease progression in co-infected patients, the underlying mechanism of their interaction and relationship to the host remains unclear [18,38–40]. One of the aims of this study was to assess HPgV infection in Mexico. We found that the prevalence of HPgV viremia (2.9%) in healthy blood donors and (33%) in HIV patients was in the range of those reported from other countries [17,22,41–44]. The prevalent genotypes we found, 3 (58.6%) and 2 (33.7%), could be

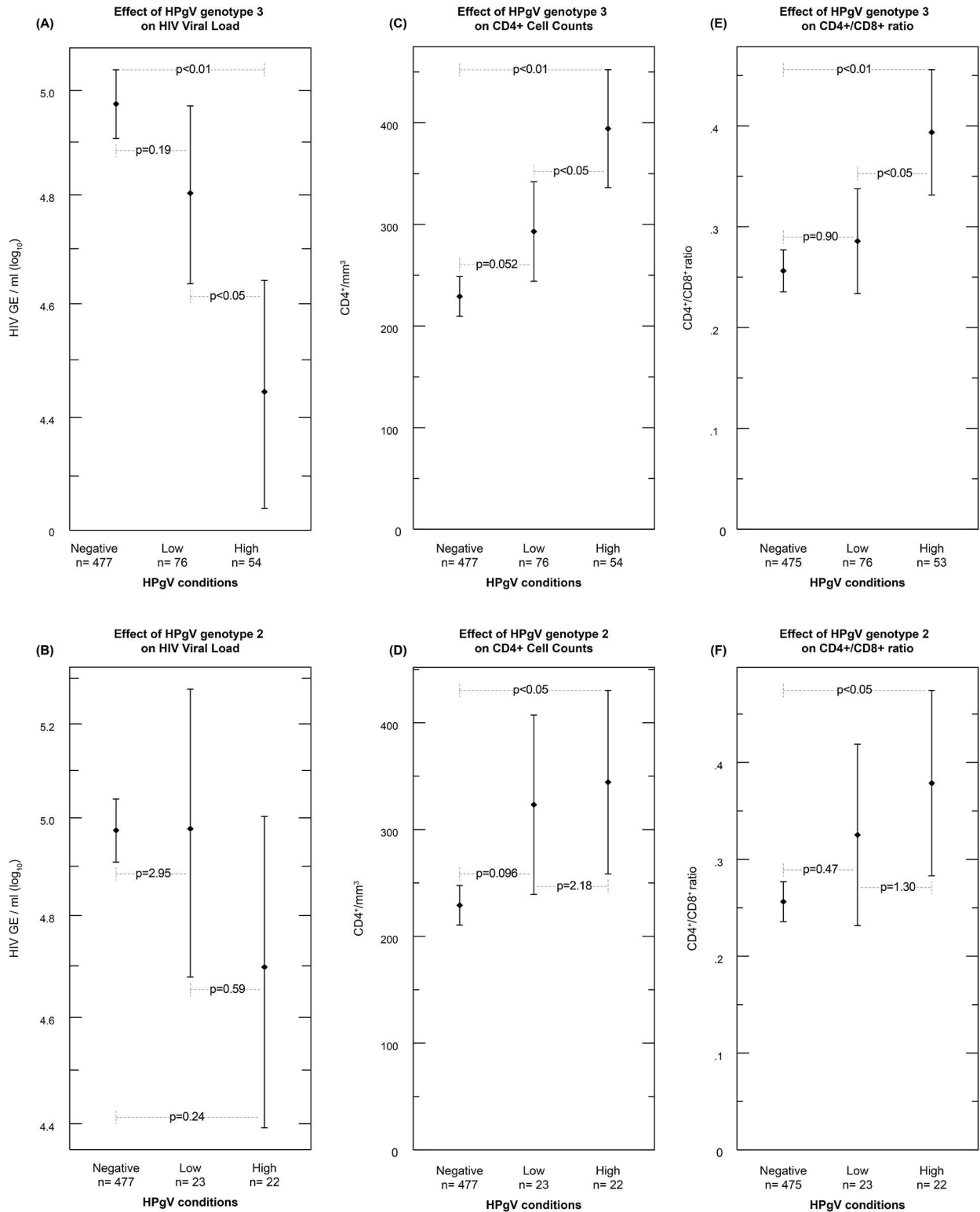


Fig 4. Effects of HPgV genotype (2 or 3) on surrogate markers of HIV progression. Each graph shows the differences between the means of: (A and B) HIV viral load/ml (\log_{10}), (C and D) CD4⁺ cell counts (CD4⁺/mm³), and (E and F) CD4⁺/CD8⁺ ratio, in the ART-naïve population according to their HPgV condition (-negative, -low, or -high) and genotype 3 (A, C and E) and genotype 2 (B, D and F). Significant differences are considered at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.g004>

Table 2. Mean difference of HIV viral load in co-infected subjects according to time of HIV infection and HPgV viral load conditions.

Conditions	HIV-recent HPgV-negative n = 29	HIV-late HPgV-negative n = 118	HIV-recent HPgV-low n = 37	HIV-late HPgV-low n = 82	HIV-recent HPgV-high n = 15
HIV-late HPgV-negative n = 118	+0.062016				
HIV-recent HPgV-low n = 37	-0.429253	-0.491269			
HIV-late HPgV-low n = 82	-0.212959	-0.274974	+0.216294		
HIV-recent HPgV-high n = 15	-0.455913	-0.517929	-0.02666	-0.242955	
HIV-late HPgV-high n = 22	-0.795124*	-0.85714*	-0.365871	-0.582166	-0.339211

The table shows the differences of HIV viral load means between the 6 formed conditions (Bonferroni comparison test). HIV viral loads are expressed as genomic equivalents (GE)/ml (\log_{10}).

* = ($p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.t002>

associated with our geographical location and population’s ethnicity, since these are the genotypes frequent in Europe and the United States [9,45]. Genotype 3 is frequent in Asia and has been associated with Amerindian ancestry [11,12,14,15].

At present, 93% of the Mexican population are mestizo, with a genetic heterogeneity conformed by an asymmetric admixture of three populations, i.e., Amerindians, European and Africans. The proportion of the genetic admixture varies from the country’s north to the south between Amerindian (38 to 75%), European (50 to 8.5%) and African (9.4 to 18.5%). The average genetic proportion in Mexico is 59% Amerindian, 33% European, and 13% African [46]. These proportions are similar to the prevalence of HPgV genotypes we found, suggesting a relationship of HPgV genotype with race. HPgV causes chronic infections, which could lead to co-infections or a recombination between different genotypes [24,47,48], especially in regions with a higher prevalence of more than one genotype. We found mixed infections with HPgV genotypes 2/3 in 30 of 445 (6.7%) genotyped samples. HPgV genotype co-infections should be

Table 3. Mean difference of CD4⁺ cell counts (CD4⁺/mm³) in co-infected subjects according to time of HIV infection and HPgV viral load conditions.

Conditions	HIV-recent HPgV-negative n = 29	HIV-late HPgV-negative n = 118	HIV-recent HPgV-low n = 37	HIV-late HPgV-low n = 82	HIV-recent HPgV-high n = 15
HIV-late HPgV-negative n = 118	-228.079*				
HIV-recent HPgV-low n = 37	+55.7465	+283.826 ‡			
HIV-late HPgV-low n = 82	-212.819 ‡	+15.2604	-268.565*		
HIV-recent HPgV-high n = 15	+55.1609	+283.24 ‡	-585586	+267.98 ‡	
HIV-late HPgV-high n = 22	-78.6724	+149.407	-134.419	+134.146	<u>-133.833</u>

The Table shows the differences of CD4⁺ cell count means between the 6 formed conditions (Bonferroni comparison test). CD4⁺ cell counts are expressed as (CD4⁺/mm³). **Underlined** = not statistically significant but relevant to HIV progression.

* = ($p < 0.05$).

‡ = statistically significant although not necessarily related to HPgV infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.t003>

Table 4. Mean difference of CD4⁺/CD8⁺ ratio in co-infected subjects according to time of HIV infection and HPgV viral load condition.

Conditions	HIV-recent HPgV-negative n = 29	HIV-late HPgV-negative n = 118	HIV-recent HPgV-low n = 37	HIV-late HPgV-low n = 82	HIV-recent HPgV-high n = 15
HIV-late HPgV-negative n = 118	-0.056481				
HIV-recent HPgV-low n = 37	-0.101481	-0.045			
HIV-late HPgV-low n = 82	-0.017579	+0.038902	+0.083902		
HIV-recent HPgV-high n = 15	-0.086815	-0.030333	+0.014667	-0.069236	
HIV-late HPgV-high n = 22	+0.118064	+0.174545*	+0.219545 [‡]	+0.135643	+0.204879

The Table shows the differences of CD4⁺/CD8⁺ ratio means between the 6 formed conditions (Bonferroni comparison test). CD4⁺/CD8⁺ ratio is expressed in natural numbers.

* = p<0.05.

‡ = statistically significant although not necessarily related to HPgV infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494.t004>

investigated to determine the implications of multiple HPgV co-infections. In our study, we also attempted to define the viral load pattern in HPgV-infected individuals and co-infected patients. When we analysed the density distribution of viremia levels in healthy blood donors and co-infected ART-naïve patients by Finite Mixture Models (Fig 2A and 2B), we clearly identified two independent clusters with low or high viral loads in both populations, with cut-off points that were almost identical (5.06log₁₀ for healthy blood donors and 5.07 log₁₀ for co-infected ART-naïve patients). The composition of -low and high-viral load clusters appeared to be independent of HIV infection, suggesting a differential regulation of HPgV replication. Although we found a bimodal pattern in HPgV viral load in ART-experienced patients (S4 Fig), we excluded co-infected HAART patients from this study to avoid HIV antiviral therapy as a confounding factor, since previous reports have found an increase of HPgV viral load in HIV co-infected patients on HAART [49], [49]. This bimodal pattern could be the result of distinct viral subtypes, or could be due to host immunity or anti-viral regulation or both. Since we also found no significant differences in the proportion of genotypes 2 and 3 belonging to HPgV-low or -high conditions, our results suggest that the bimodal pattern of HPgV viral load is independent of HPgV genotype.

Thus, it is important to characterise the whole genome sequence of strains belonging to the -low and -high viral load clusters, and also to characterise the cellular immune response expression of patients in each cluster.

To understand co-infection, we evaluated the effects of HPgV viremia on HIV progression markers (Fig 3A–3C). We compared the means of surrogate markers of HIV progression (HIV viral load, CD4⁺ cell counts, and CD4⁺/CD8⁺ ratio) between HPgV viral load conditions (-negative, -low, and -high). HPgV-positive patients compared to HPgV-negative patients had significantly lower HIV loads and higher CD4⁺ counts and CD4⁺/CD8⁺ ratios. Furthermore, enhanced beneficial effects were found in the HPgV-high condition patients, in all comparisons. These effects were also observed when surrogate markers of HIV progression were analysed according to the most prevalent genotypes, 3 and 2, although the effect was stronger with genotype 3 than with genotype 2 (Fig 4A–4F). Although these beneficial effects of HPgV co-infection with HIV were independent of HPgV genotype, our results suggest that genotypes could have different mechanisms for inducing such effects.

It is widely known that the progression of HIV disease is directly related with the time of infection, with late HIV infections associated with CD4⁺ cell depletion and increased HIV replication [50]. To determine whether the time of HIV infection was a confounding factor in our study, we analysed the effect of HPgV viral load conditions according to recent or late HIV infection (S1 Table). Using a multiple comparative analysis, we observed that in late HIV infection, high HPgV viremia was associated with a significant reduction of HIV viral load and significantly higher CD4⁺ counts (Tables 2 and 3). We also found that in late HIV infection, undetectable or low levels of HPgV viremia were associated with a significant decrease in CD4⁺ cell counts; in contrast, for high HPgV viremia in late HIV infection, the decrease in CD4⁺ count was not significant, supporting the protective effect of HPgV replication on CD4⁺ cell counts, as suggested by others [38]. These results could suggest a correlation between high HPgV viral loads and improved beneficial effects in co-infected patients regardless of HIV infection time.

Our results support other studies, which suggest that HPgV and HIV interfere with each other for replication, independent of HIV infection time [40,51–53]. Moreover, our findings suggest that HPgV plays a major role in this interaction. In this study, we found that a minimum threshold of HPgV viral load is required to induce a beneficial effect on some markers of HIV progression.

The strength of the study is the relatively large sample of healthy blood donors and HIV ART-naïve patients analysed as well as the major prevalence of two genotypes, 2 and 3, allowing us to compare the behaviour of each one. A limitation of this study is its cross-sectional design; a longitudinal design with multiple samples taken during a long follow-up period would be ideal.

The effects of HPgV infection in humans are not completely characterised, and more in-depth studies are needed to elucidate the underlying mechanisms of the beneficial effects described in co-infected patients and the factors that determine the differences in HPgV viral load levels. To continue this path, we are working on expression assays to understand the changes that occur in the host's immune activation and antiviral regulation during HPgV infection and HPgV/HIV co-infection. Another issue that should be explored is whether genome characteristics or host condition defines the two HPgV levels of replication (low and high).

The field of HPgV research must be encouraged, since the beneficial effects of HPgV may not be limited to HIV infection. Consistent with this, studies analyzing HPgV co-infection have shown a slower progression of liver fibrosis in Hepatitis C virus co-infected patients [36,37], and improved survival among those infected with Ebola virus [35]. Our study proposes that the viral load cut-off point should be considered for future HPgV co-infection studies.

Supporting information

S1 Table. Data reporting of HIV-positive ART-naïve patient. The Table shows each HIV-positive ART-naïve patient's ID, HIV and HPgV viral loads, CD4⁺ cell counts, CD4⁺/CD8⁺ ratio, HPgV viral load condition, and HIV infection time. N/D means not determined. Viral loads are reported in Genome Equivalents (GE)/ml. Patient ID is a consecutive number given for identification in this study and is not linked to any patient's Hospital files.
(PDF)

S1 Fig. Flowchart of samples analysed for HPgV. The flowchart shows the subset division of the samples used for HPgV viremia, viral load and genotype determination.
(TIF)

S2 Fig. Flowchart of samples included in the Finite Mixture Models analysis. FMM analysis of HPgV viral load heterogeneity in healthy blood donors and co-infected ART-naïve patients. The co-infected HIV patients in HAART were not included in this analysis.

(TIF)

S3 Fig. Flowchart of samples analysed to determine the effect of HPgV viral load on surrogate markers of HIV progression. The flowchart shows the subsets division of the samples according to HPgV conditions and HIV infection time.

(TIF)

S4 Fig. Two-component cluster mixture model fit for weighted HPgV viral load from co-infected ART-experienced patients. Density distribution (bars) of HPgV viral load (\log_{10} genome equivalents) from co-infected ART-experienced patients. Gaussian curves indicate the fitted low (red line), high (green line), mean component curves (μ), the number of patients (n) and proportion (λ) in each population component. The clusters' cut-off point is the intersection of the curves.

(TIF)

S5 Fig. Genetic diversity of mixed HPgV infections. The phylogenetic analysis was constructed from partial nucleotide sequences of 5'UTR region by using the neighbor-joining method with MEGA software version 6. Reference strains were selected from GenBank and included. Bootstrap values are percentages of 1000 iterations. Reference strains were labelled as follows: GenBank accession number + word "GEN" + corresponding HPgV genotype, e.g. AB003289 GEN 2a. Patients samples are identified by Patient ID* for genotypes 2 and Patient ID for genotypes 3.

(PDF)

Acknowledgments

We thank Beatriz Remus, MD, for reviewing the manuscript and Gioconda Vallarta, MA, for design of the manuscript's diagrams. Gibran Horemheb Rubio Quintanares, MD, is a doctoral student from Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship No. 323782 from CONACyT.

Author Contributions

Conceptualization: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Data curation: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Hugo Arroyo-Figueroa, Santiago Ávila-Ríos, Claudia García-Morales, Gustavo Reyes-Terán, Galileo Escobedo, Gloria Estrada, Trinidad García-Iglesias, Nayeli Muñoz-Saucedo.

Formal analysis: Gibran Horemheb-Rubio, Hugo Arroyo-Figueroa, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Funding acquisition: Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Investigation: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Santiago Ávila-Ríos, Claudia García-Morales, Gloria Estrada, Trinidad García-Iglesias, Nayeli Muñoz-Saucedo.

Methodology: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Galileo Escobedo, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Project administration: Gibran Horemheb-Rubio, David Kershenobich, Patricia Ostrosky-Wegman, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Resources: Gibran Horemheb-Rubio, Santiago Ávila-Ríos, Claudia García-Morales, Gustavo Reyes-Terán, Galileo Escobedo, Gloria Estrada, Trinidad García-Iglesias, Nayeli Muñoz-Saucedo, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Software: Gibran Horemheb-Rubio, Hugo Arroyo-Figueroa.

Supervision: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, David Kershenobich, Patricia Ostrosky-Wegman, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Validation: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Visualization: Gibran Horemheb-Rubio, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Writing – original draft: Gibran Horemheb-Rubio, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

Writing – review & editing: Gibran Horemheb-Rubio, Pilar Ramos-Cervantes, Guillermo M. Ruiz-Palacios.

References

1. Kraiden M, Yu A, Braybrook H, Lai AS, Mak A, Chow R, et al. GBV-C/hepatitis G virus infection and non-Hodgkin lymphoma: a case control study. *Int J Cancer*. 2010; 126: 2885–2892. <https://doi.org/10.1002/ijc.25035> PMID: 19904755
2. Chang CM, Stapleton JT, Klinzman D, McLinden JH, Purdue MP, Katki HA, et al. GBV-C infection and risk of NHL among U.S. adults. *Cancer Res*. 2014; 74: 5553–5560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0209> PMID: 25115299
3. 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: 233–246. <https://doi.org/10.1099/vir.0.027490-0> PMID: 21084497
4. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat*. 2009; 16: 757–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01194.x> PMID: 19758271
5. Björkman P, Naucmér A, Winqvist N, Mushahwar I, Widell A. A case-control study of transmission routes for GB virus C/hepatitis G virus in Swedish blood donors lacking markers for hepatitis C virus infection. *Vox Sang*. 2001; 81: 148–153. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703856> PMID: 11703856
6. Sentjens R, Basaras M, Simmonds P, Vrieling H, Reesink H. HGV/GB virus C transmission by blood components in patients undergoing open-heart surgery. *Transfusion*. 2003; 43: 1558–1562. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617315> PMID: 14617315
7. Zanetti AR, Tanzi E, Romanó L, Principi N, Zuin G, Minola E, et al. Multicenter trial on mother-to-infant transmission of GBV-C virus. The Lombardy Study Group on Vertical/Perinatal Hepatitis Viruses Transmission. *J Med Virol*. 1998; 54: 107–112. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9496368> PMID: 9496368
8. Nerurkar VR, Chua PK, Hoffmann PR, Dashwood WM, Shikuma CM, Yanagihara R. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection among homosexual men infected with human immunodeficiency virus type 1: evidence for sexual transmission. *J Med Virol*. 1998; 56: 123–127. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746067> PMID: 9746067
9. Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. *J Virol Methods*. 2001; 91: 3–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164480> PMID: 11164480
10. Schleicher SB, Flehmig BF. Genotyping of GB virus C by restriction pattern analysis of the 5' untranslated region. *J Med Virol*. 2003; 71: 226–232. <https://doi.org/10.1002/jmv.10474> PMID: 12938197
11. Loureiro CL, Alonso R, Pacheco BA, Uzcátegui MG, Villegas L, León G, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus genotype 3 among autochthonous Venezuelan populations. *J Med Virol*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002; 68: 357–362. <https://doi.org/10.1002/jmv.10211> PMID: 12226822

12. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Nakano T, Kato T, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection among Colombian native Indians. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 462–467. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749645> PMID: 9749645
13. Muerhoff AS, Leary TP, Sathar MA, Dawson GJ, Desai SM. African origin of GB virus C determined by phylogenetic analysis of a complete genotype 5 genome from South Africa. *J Gen Virol.* 2005; 86: 1729–1735. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80854-0> PMID: 15914851
14. Oubiña JR, Mathet V, Feld M, Della Latta MP, Ferrario D, Verdun R, et al. Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina. *Virus Res.* 1999; 65: 121–129. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581385> PMID: 10581385
15. Alvarado-Mora M V, Botelho L, Nishiya A, Neto RA, Gomes-Gouvêa 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. *Virology.* 2011; 8: 345. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-345> PMID: 21745373
16. Feng Y, Zhao W, Feng Y, Dai J, Li Z, Zhang X, et al. A Novel Genotype of GB Virus C: Its Identification and Predominance among Injecting Drug Users in Yunnan, China. *China PLoS ONE.* 2011; 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021151> PMID: 21998624
17. 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: 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00366.x> PMID: 16494631
18. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol.* 2012; 20: 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.004> PMID: 22325031
19. Handelsman E, Cheng I, Thompson B, Hershov R, Mofenson LM, Hollinger FB, et al. Impact of GB virus type C infection on mother-to-child HIV transmission in the Women and Infants Transmission Study Cohort. *HIV Med.* 2007; 8: 561–567. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2007.00510.x> PMID: 17944690
20. Kaye S, Howard M, Alabi A, Hansmann A, Whittle H, Schim van der Loeff M. No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 876–878. <https://doi.org/10.1086/428123> PMID: 15736023
21. Liu P, Shi ZX, Zhang YC, Xu ZC, Shu HS, Zhang XY. A prospective study of a serum-pooling strategy in screening blood donors for antibody to hepatitis C virus. *Transfusion.* 1997; 37: 732–736. Available: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=9225938> PMID: 9225938
22. Keys JR, Leone PA, Eron JJ, Alexander K, Brinson M, Swanstrom R. Large scale screening of human sera for HCV RNA and GBV-C RNA. *J Med Virol.* 2014; 86: 473–477. <https://doi.org/10.1002/jmv.23829> PMID: 24178362
23. Chivero ET, Bhattarai N, Rydze RT, Winters MA, Holodny M, Stapleton JT. Human pegivirus RNA is found in multiple blood mononuclear cells in vivo and serum-derived viral RNA-containing particles are infectious in vitro. *J Gen Virol.* 2014; 95: 1307–1319. <https://doi.org/10.1099/vir.0.063016-0> PMID: 24668525
24. AbuOdeh RO, Al-Absi E, Ali NH, Khalili M, Al-Mawlawi N, Hadwan TA, et al. Detection and phylogenetic analysis of human pegivirus (GBV-C) among blood donors and patients infected with hepatitis B virus (HBV) in Qatar. *J Med Virol.* 2015; 87: 2074–2081. <https://doi.org/10.1002/jmv.24289> PMID: 26058920
25. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> PMID: 24132122
26. Avila-Ríos S, García-Morales C, Garrido-Rodríguez D, Ormsby CE, Hernández-Juan R, Andrade-Villanueva J, et al. National prevalence and trends of hiv transmitted drug resistance in Mexico. *PLoS One.* 2011; 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027812> PMID: 22110765
27. Avila-Ríos S, García-Morales C, Tapia-Trejo D, Meza RI, Nuñez SM, Parham L, et al. HIV drug resistance surveillance in Honduras after a decade of widespread antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2015; 10: 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142604> PMID: 26558396
28. Young D, Benaglia T, Chauveau D, Hunter D, Elmore R, Hettmansperger T, et al. Package “mixtools.” 2017; <https://cran.r-project.org/web/packages/mixtools/mixtools.pdf>
29. Bishop CM. Mixture Models and EM. *Pattern Recognit Mach Learn.* 2006; 423–459.
30. Figueiredo MAT, Jain AK. Unsupervised learning of finite mixture models. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* 2002; 24: 381–396. <https://doi.org/10.1109/34.990138>
31. Biernacki C, Celeux G, Govaert G. Choosing starting values for the EM algorithm for getting the highest likelihood in multivariate Gaussian mixture models. *Comput Stat Data Anal.* Elsevier Science Publishers B. V.; 2003; 41: 561–575. [https://doi.org/10.1016/S0167-9473\(02\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9473(02)00163-9)

32. Liebert MA. Human immunodeficiency virus type 1 RNA level and CD4 count as prognostic markers and surrogate end points: a meta-analysis. HIV Surrogate Marker Collaborative Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000; 16: 1123–1133. <https://doi.org/10.1089/088922200414965> PMID: 10954887
33. Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*. 2002; 360: 119–129. PMID: 12126821
34. Lu W, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Li T, Routy JP. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*. 2015. <https://doi.org/10.7448/IAS.18.1.20052> PMID: 26130226
35. Lauck M, Bailey AL, Andersen KG, Goldberg TL, Sabeti PC, O'Connor DH. GB virus C coinfections in west African Ebola patients. *J Virol*. 2015; 89: 2425–2429. <https://doi.org/10.1128/JVI.02752-14> PMID: 25473056
36. Feng Y, Liu L, Feng YM, Zhao W, Li Z, Zhang AM, et al. GB Virus C infection in Patients With HIV/Hepatitis C Virus Coinfection: Improvement of the Liver Function in Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon*. 2014; 14: e14169. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.14169> PMID: 24693316
37. Berzsényi MD, Woollard DJ, McLean CA, Preiss S, Perreau VM, Beard MR, et al. Down-regulation of intra-hepatic T-cell signaling associated with GB virus C in a HCV/HIV co-infected group with reduced liver disease. *J Hepatol*. 2011; 55: 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.021> PMID: 21266183
38. Keyvani H, Mohammadi A, Ghannad MS, Hajabdolbaghi M, Sabouri Ghannad M, Hajabdolbaghi M. The Effect of GBV-C Infection on CD4 Count and Viral Loads in Patients Infected With HIV. *Hepat Mon*. 2012; 12: 38–41. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.817>
39. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, et al. GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS*. 2009; 23: 605–10. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32831f1b00> PMID: 19194270
40. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med*. 2004; 350: 981–990. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030107> PMID: 14999110
41. Anggorowati N, Yano Y, Subronto YW, Utsumi T, Heriyanto DS, Mulya DP, et al. GB virus C infection in Indonesian HIV-positive patients. *Microbiol Immunol*. 2013; 57: 298–308. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12033> PMID: 23590588
42. Dmitriev PN, Tsikina MN, Moiseeva A V, Serkov IL, Pronin AI., Popova OE, et al. [GBV-C infection in HIV-infected patients in the Russian Federation]. *Vopr Virusol*. 2010; 55: 23–26. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364667> PMID: 20364667
43. Quirós E, Piédrola G, Maroto MC. GBV-C RNA presence in several high-risk groups of Spain. *Eur J Epidemiol*. 1998; 14: 617–619. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794130> PMID: 9794130
44. Rè V, Spinsati I, Joison A, Bepre H, Contigiani M. GB virus C infection in blood donors from Córdoba, Argentina. *Vox Sang*. 2001; 81: 54. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520419> PMID: 11520419
45. Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol*. 1996; 25: 379–384. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895018> PMID: 8895018
46. Rubi-castellanos R, Martí G, Mun F, Gonza A, Cerda-flores RM, Anaya-palafox M. Pre-Hispanic Mesoamerican Demography Approximates the Present-Day Ancestry of Mestizos Throughout the Territory of Mexico. 2009; 294: 284–294. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20980> PMID: 19140185
47. Neibecker M, Schwarze-Zander C, Rockstroh JK, Spengler U, Blackard JT. Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol*. 2011; 83: 685–694. <https://doi.org/10.1002/jmv.22029> PMID: 21328384
48. Blackard JT, Ma G, Polen C, DuBois JC, Gast J, Radens CM, et al. Recombination among GB virus C (GBV-C) isolates in the United States. *J Gen Virol*. 2016; 97: 1537–1544. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000477> PMID: 27072634
49. 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: 1641–1643. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32823bc9b7> PMID: 17630561
50. Patrikar S, Basannar D, Bhatti CV, Kotwal CA, Gupta CR, Grewal BR. Rate of decline in CD4 count in HIV patients not on antiretroviral therapy. *Med J Armed Forces India*. 2014; 70: 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2013.08.005> PMID: 24843201

51. Vahidnia F, Petersen M, Stapleton JT, Rutherford GW, Busch M, Custer B. Acquisition of GB virus type C and lower mortality in patients with advanced HIV disease. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 1012–1019. <https://doi.org/10.1093/cid/cis589> PMID: 22752515
52. Lanteri MC, Vahidnia F, Tan S, Stapleton JT, Norris PJ, Heitman J, et al. Downregulation of Cytokines and Chemokines by GB Virus C After Transmission Via Blood Transfusion in HIV-Positive Blood Recipients. *J Infect Dis*. 2015; 211: 1585–1596. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu660> PMID: 25425697
53. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, et al. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol*. 2017; <https://doi.org/10.1002/jmv.24836> PMID: 28460153