



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

TATIANA PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RECONSTITUIÇÃO  
IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS HIV/TB SUBMETIDOS A  
TRATAMENTO PARA TUBERCULOSE E TERAPIA  
ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ATIVA (HAART)  
INCLUINDO EFAVIRENZ.**

Rio de Janeiro

2014

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA DE  
INDIVÍDUOS HIV/TB SUBMETIDOS A TRATAMENTO PARA  
TUBERCULOSE E TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ATIVA  
(HAART) INCLUINDO EFAVIRENZ.**

TATIANA PEREIRA DA SILVA

Tese apresentada com vista à obtenção do título  
de Doutor em ciências na área de concentração:  
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dra. Mariza Gonçalves Morgado  
Dra. Valeria Cavalcanti Rolla.

Rio de Janeiro

2014

Tatiana Pereira da Silva

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RECONSTITUIÇÃO IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS  
HIV/TB SUBMETIDOS AO TRATAMENTO PARA TUBERCULOSE E TERAPIA  
ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE ATIVA (HAART) INCLUINDO EFAVIRENZ.**

Orientadores: Dra. Mariza Gonçalves Morgado – IOC-FIOCRUZ

Dra. Valeria Cavalcanti Rolla – IPEC-FIOCRUZ

**Banca Examinadora**

---

Dra. Carmem Beatriz W. Giacoia Gripp- IOC-FIOCRUZ

---

Dra. Cynthia Silveira Horn- IPEC-FIOCRUZ

---

Dra. Roberta Olmo Pinheiro-IOC-FIOCRUZ  
(revisora)

---

Dra. Thaís Porto Amadeu- UERJ

---

Dra. Maria Helena Feres Saad- IOC-FIOCRUZ

Suplente:

---

Dra. Cynthia Chester Cardoso- UFRJ

**“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro” (Albert Einstein).**

## **Agradecimentos:**

- Agradeço primeiramente àquele que tudo pode e que muito me ajudou dando ânimo a cada dia pra sempre prosseguir e sorrir: DEUS;
- Às minhas orientadoras Mariza e Valeria que me deram a oportunidade e confiaram em minha capacidade para realização deste trabalho;
- Ao meu marido Thiago que tanto me incentivou a seguir em frente e querer sempre mais do que a vida possa me dar e que se mostra a cada dia um excelente companheiro e pai do nosso maior amor – meu filho “Arthur”;
- Aos meus pais e meu irmão, pelo incentivo, amor e carinho dedicado a mim durante todos os anos e que sempre acreditaram que eu conseguiria. Em especial a minha mãe, que sempre esteve presente;
- À minha tia Iara e meu primo Felipe pelo apoio, carinho e atenção dados a mim e a minha família durante todo o período em que estamos juntos;
- À minha sogra Ângela pelo amor incondicional ao meu filho Arthur, dedicando se a cuidar dele a qualquer hora e nas horas das enfermidades, quando eu não pude estar presente;
- À minha amiga Cristiane Braga por todo carinho e apoio que sempre foi dado...
- À Fernanda, pela amizade, carinho e ajuda nos experimentos, muito obrigada!!!! Acho que nem o meu “muito obrigada” consegue agradecer às conversas que muito me despertaram para a vivência científica e pessoal... Adoro você ! 🧠😊
- À amiga Sylvia, por ter me selecionado para fazer parte da equipe Labaids, pelas várias conversas científicas e pessoais e por todo carinho dedicado a mim e a minha família. Valeu e muito obrigada; 🧠😊
- À Thatá por me aturar nas infinitas caronas dadas; 😊
- Às amigas Sylvia, Fernanda, Priscilla, Isadora e outras menos frequentes pelos momentos descontraídos do almoço, pelas várias trocas de experiências ao longo dos anos e pelo convívio diário;
- Aos amigos e colegas que conquistei no laboratório durante minha jornada: Carmem, Monick, Deise, Ziza, Gonzalo, José Pilotto, Carlos, Rafael, Edson, Suwellen, Bianca, Carlos Augusto, Nathalia, Isabel, Diogo, Caroline, Roberta, Isabel (Cabo Verde), Carine, Andressa, Ana Paula, Paula, Geane, Adriana, Karen, Joana e Joanna Reis.

- A todos os meus amigos e colegas do prédio de Hanseníase que fizeram parte da minha jornada científica, contribuindo para minha formação acadêmica e pessoal, em especial às amigas Ariane, Ana Carol e a Roberta. -- Vocês todos são muito importantes para mim!!!! Muito obrigada por tudo!!!
- Às médicas Flávia e Carolina por toda dedicação ao projeto, pela atenção dada às minhas constantes dúvidas clínicas e pelo atendimento dados aos pacientes do estudo;
- À equipe do laboratório de micobacterioses do IPEC;
- Ao Julio e a Juliana pelo apoio estatístico;
- Aos pacientes que concordaram em participar deste estudo;
- À Priscilla, secretária da pós-graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do IPEC;
- Enfim, a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes em minha vida colaborando para o desenvolvimento deste trabalho...

## Lista de Abreviaturas

aids	Do inglês, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APOBEC	Do inglês enzima editora do RNAm da apolipoproteína B
AZT	Azidotimidina ou zidovudina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BD	Becton, Dickinson
CBA	Do inglês, Cytometric Bead-Array
CCR5	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CC tipo 5
CCR7	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CC tipo 7
CD	Do inglês, grupo de diferenciação
CFP-10	Do inglês, Antígeno filtrado de cultura de 10 kDa
CMV	Citomegalovírus
CPG	Do inglês, ligação citosina- fosfato-guanina
CTLA-4	Do inglês, Receptor de linfócitos T para antígeno 4
CTLs	Do inglês, linfócitos T CD8 <sup>+</sup> citotóxicos
CV	Carga viral
CXCR4	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CXC
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Do inglês, Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Do inglês, Deoxinucleotídeo Trifosfato
EBV	Do inglês, Vírus Epstein-Barr
ELISpot	Do inglês, Enzima ligadora a <i>ImmunoSpot</i>
ESAT-6	Do inglês, <i>Early Secreted Antigenic Target of 6 KDa</i>
FBS	Do inglês, Soro Fetal Bovino
FoxP3	Do inglês, Fator de Transcrição da Família <i>Forkhead</i>
gag	Do inglês, Grupo de Antígeno Específico
Gp	Do inglês, Glicoproteína do envelope do HIV-1
HAART	Do inglês, Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV-1	Do inglês, Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HLA-DR	Do inglês, Antígeno leucocitário humano do tipo II
IFN- $\gamma$	Do inglês, Interferon gama
IGRAs	Do inglês, Ensaio de liberação de IFN- $\gamma$
IL	Do inglês, Interleucina
INNTRs	Do inglês, Inibidores Não Nucleosídicos da Transcriptase Reversa
INTRs	Do inglês, Inibidores Nucleosídicos/Nucleotídios da Transcriptase Reversa
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IQR	Interquartis
IRIS	Do inglês, Síndrome inflamatória da reconstituição imune
iTreg	Linfócitos T regulatórios induzidas por antígeno
LPS	Do inglês, Lipopolissacarídeo
MAC	complexo <i>Mycobacterium avium</i>
Man-LAM	Do inglês, manose capped lipoarabinomannan
MC	Memória Central
ME	Memória Efetora
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NF- $\kappa$ B	Do inglês, Fator de transcrição nuclear kappa B

PBMC	Do inglês, Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Do inglês, Tampão Fosfato-Salino
pDCs	Do inglês, células dendríticas plasmocitóides
pol	Do inglês, polimerase
PPD	Do inglês, Derivado Proteico Purificado de <i>Mtb</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
RNA	Do inglês, Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura. Do inglês, “ <i>Instituto Roswell Park Memorial</i> ”
SFC	Do inglês, Célula Formadora de Spot
TB	Tuberculose
TCR	Do inglês, Receptor de células T
TEMRA	Linfócito T efector altamente diferenciado
TGF- $\beta$	Do inglês, Fator de crescimento tumoral beta
Th	Do inglês, Linfócito T auxiliares
Th17	Do inglês, Linfócito T auxiliar produtor de interleucina 17
TLRs	Do inglês, Receptores do tipo Toll
TNF	Do inglês, Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócitos T regulatórios
VJC	vírus John Cunningham

## Lista de Figuras

Figura 1- Incidência de tuberculose em adultos em 2012.....	2
Figura 2- Ciclo replicativo do vírus HIV-1.....	4
Figura 3- Representação gráfica do curso da infecção pelo HIV -1.....	5
Figura 4- Fluxograma descritivo dos pacientes recrutados e o motivo de descontinuação no estudo.....	3
Figura 5- Representação gráfica do ganho de células T CD4+ em pacientes infectados por <i>Mtb</i> e HIV-1 ao longo da terapias.....	38
Figura 6- Gráfico representativo da trajetória de marcadores imunológicos e virológicos em pacientes TB/HIV ao longo do tratamento para TB e HAART.....	40
Figura 7- Perfil de ativação de células T CD8+ em pacientes TB/HIV.....	41
Figura 8- Representação gráfica do ganho de células TCD4+ em pacientes com contagens iniciais de células TCD4 < e $\geq 200$ céls/mm <sup>3</sup> acompanhados ao longo dos tratamentos..	44
Figura 9- Representação gráfica da trajetória do perfil ativação imune em células T de pacientes TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART, distribuídos de acordo com as contagens de células TCD4+ (< e $\geq 200$ céls/mm <sup>3</sup> ).....	45
Figura 10- Perfil de ativação de células T CD8+ marcadas com HLA-DR+ e CD38+ em grupo de pacientes com CD4+ (<200 e $\geq 200$ céls/mm <sup>3</sup> ) no início do estudo, acompanhados ao longo da terapia para tuberculose e HAART.....	46
Figura 11- Representação gráfica da trajetória das citocinas anti e pró-inflamatórias em pacientes TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART, distribuídas de acordo com as contagens de células TCD4 (< e $\geq 200$ céls/mm <sup>3</sup> ).....	47
Figura 12- Produção de IFN- $\gamma$ em resposta aos antígenos de <i>Mtb</i> pelo ensaio de ELISPOT em pacientes TB/HIV ao longo da terapia para tuberculose e HAART.....	48
Figura 13 - Ensaio de ELISPOT realizado em pacientes TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART.....	49
Figura 14- Células produtoras de IFN- $\gamma$ em resposta aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 pelo ensaio de ELISPOT em pacientes com TB/HIV ao longo das terapias, distribuídas de acordo com as contagens de células TCD4+ (< e $\geq 200$ céls/mm <sup>3</sup> ) no início do estudo.....	50
Figura 15- Células produtoras de IFN- $\gamma$ em resposta aos antígenos PPD e 38KDa/CFP-10 pelo ensaio de ELISPOT em pacientes com TB/HIV ao longo das terapias, distribuídas de acordo com IRIS e não IRIS.....	51
Figura 16- Dot Plots Representativos das análises realizadas para determinação das populações de células naive, MC, ME e TEMRA expressando as moléculas CCR7 e CD45 em células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	53

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1- Caracterização dos fenótipos de acordo com marcador de superfície.....	31
Tabela 2- Dados demográficos, clínicos imunológicos e virológicos de pacientes com diagnóstico de TB infectados pelo HIV-1 no IPEC Fiocruz .....	36
Tabela 3- Dados imunológicos e virológicos de pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados pelo HIV-1 ao longo dos tratamentos .....	39
Tabela 4- Características demográficas, clínicas, imunológicas e virológicas de pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados por HIV-1 distribuídas de acordo com as contagens de células T CD4+ no início do estudo.....	43
Tabela 5- Análise multivariada de fatores associados com a resposta de produção de IFN- $\gamma$ frente a estimulação antigênica em pacientes coinfectados TB/HIV ao longo do tratamento.....	52
Tabela 6- Análise fenotípica de pacientes com diagnóstico de TB infectados pelo HIV-1 ao longo das terapias e de acordo com seus status de imunossupressão (contagens de células T CD4+) no início do estudo.....	56

## Índice

Agradecimentos .....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	ix
Índice .....	x
Resumo .....	xii
Abstract.....	xiii
1-Introdução.....	1
1.1-Patogênese do HIV .....	2
1.2-Terapia antirretroviral.....	6
1.3-Resposta imune celular na infecção por HIV .....	7
1.4- Patogênese da infecção por <i>Mtb</i> .....	13
1.5- Coinfecção HIV-1/ <i>Mtb</i> .....	17
1.6-Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune .....	20
2- Justificativa .....	25
3- Objetivos.....	27
4- Materiais e Métodos .....	28
4.1 Desenho do estudo .....	28
4.1.1Casuística .....	28
4.1.2 Elegibilidade do estudo .....	28
4.1.2.1 Critérios de inclusão .....	28
4.1.2.2 Critério de exclusão .....	28
4.1.3 Etapas do estudo .....	29
4.2 Metodologia dos procedimentos para avaliação da resposta imune .....	30
4.2.1 Obtenção de amostras de sangue periférico e células mononucleares .....	30
4.2.2 Obtenção e criopreservação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	30
4.2.3 Fenotipagem de células T por citometria de fluxo. ....	31
4.2.4 Determinação da carga viral plasmática.....	31
4.2.5 Ensaio de ELISPOT para quantificação de células secretoras de IFN- $\gamma$ em resposta a antígenos de <i>Mtb</i> . ....	32
4.2.6 Dosagem de biomarcadores solúveis no plasma .....	32
4.3 Plano de Análise: .....	32

4.3.1 Linhas de tendência .....	33
4.3.2 Modelos Longitudinais .....	33
5- Resultados .....	35
5.1 Reconstituição imune, ativação celular e perfil de citocinas em pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e a HAART .....	37
5.2 Avaliação da resposta imune aos antígenos de <i>Mtb</i> na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e HAART .....	48
5.3 Avaliação fenotípica de subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e a HAART .....	53
6- Discussão .....	57
7- Conclusões .....	66
8- Referências bibliográficas .....	67
9- Anexos .....	79

## Resumo

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) são dois patógenos intracelulares que manipulam o sistema imune para gerar infecções persistentes. Ambas as infecções causam imunossupressão e ativação imune e, com a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), eventos como a síndrome da reconstituição imune (IRIS) podem ocorrer. Este estudo teve como objetivo avaliar os mecanismos de reconstituição imunológica de indivíduos com tuberculose (TB) e aids, em resposta aos respectivos tratamentos, analisando as subpopulações de células T, bem como os marcadores de ativação imunológica, o perfil de citocinas anti e pró-inflamatórias e a resposta aos antígenos de *Mtb* durante seis meses após a introdução da HAART. Estes parâmetros foram também avaliados de acordo com o status de imunossupressão dos pacientes no início do tratamento (células TCD4<sup>+</sup> <200 ou ≥200 céls/mm<sup>3</sup>) e pelo desenvolvimento ou não da IRIS. Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram restauração imune, com ganho de células TCD4<sup>+</sup>, redução da carga viral e da ativação imune, após a introdução da HAART. Entretanto, não observamos predomínio dos perfis de citocinas avaliadas na população geral e nem quanto ao grau de imunossupressão. Na avaliação da resposta imune específica aos antígenos de *Mtb*, observamos que a resposta ao PPD foi mais frequente e de maior magnitude comparada com o ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 ao longo do tempo. A resposta ao antígeno 38KDa/CFP-10 mas não ao PPD apresentou associação com as contagens de células TCD4<sup>+</sup> e carga viral em uma análise multivariada. Não observamos diferenças nos parâmetros analisados entre os pacientes que vieram a desenvolver IRIS em comparação com os que não vieram a desenvolver a síndrome. A avaliação dos fenótipos celulares funcionais de subpopulações de células T revelou frequências mais elevadas de células TCD4<sup>+</sup> *naive* e de memória central (MC) do que na população de células TCD8<sup>+</sup>. Além disso, foi observado um predomínio de células TCD4<sup>+</sup> memória efetora (ME) e de TCD8<sup>+</sup> ME e efetoras altamente diferenciadas (TEMRA) por seis meses de HAART. Como conclusão, observamos em nosso estudo que a infecção por HIV-1 em associação com a TB leva a uma profunda alteração imunológica, que pode ser parcialmente reconstituída com a introdução da HAART associada à terapia para a TB, independentemente do *status* de imunossupressão no início do tratamento.

## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and human immunodeficiency virus (HIV) are two intracellular pathogens that manipulate the immune system in order to generate persistent infections. Both infections cause immunosuppression and immune activation and, under Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), events like immune reconstitution syndrome (IRIS) may occur. The objective of this study was to evaluate the immune reconstitution mechanisms among individual with tuberculosis (TB) and aids, in response to treatment to both diseases, based on the analyses of the T cell subsets, immune activation markers, anti and pro-inflammatory cytokine profiles and responses to *Mtb* antigens along six months after the introduction of HAART. These parameters were also evaluated according to the patients immunosuppression status at baseline ( $CD4^+ < 200$  or  $\geq 200$  cells/mm<sup>3</sup>) and the development or not of IRIS.

The patients included in this study presented immune restoration, with gain of  $CD4^+$  T cells and reduction of viral load and immune activation after introduction of HAART. However, no predominance of cytokine profile in response to the therapies or according to the degree of immunosuppression at baseline were observed. Concerning the immune response to the *Mtb* antigens, the frequency and magnitude in response to PPD were higher when compared with the ESAT-6 or 38KDa/CFP-10 antigens along treatment. 38KDa/CFP-10 but not PPD antigen responses showed association with  $CD4^+$  T cell counts and viral load in the multivariate analyses. No specific immunological profile was observed when IRIS and non-IRIS cases were compared. The evaluation of the functional profile of T cell subsets revealed higher frequencies of  $CD4^+$  naïve and central memory cells compared to the  $CD8^+$  subsets. Moreover, the predominance of  $CD4^+$  T cell effector memory (EM) and  $CD8^+$  EM and differentiated effector memory (TEMRA) along time were observed. In conclusion, our data show that HIV-1 infection in combination with TB leads to a profound immunological disorder which can be at least partially restored upon the introduction of HAART associated with TB therapy, independent of the immunosuppression status at baseline.

### 1- Introdução

O Vírus da Imunodeficiência Humana, o HIV, é um membro da família *Retroviridae* e subfamília Lentivírus. Existem dois tipos conhecidos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 encontra-se globalmente distribuído e é o principal responsável pela epidemia mundial de HIV/aids. A infecção pelo HIV-2 tem uma disseminação menor, mais restrita a região oeste do continente africano, e está associado a um menor grau de infectividade e virulência (revisado por SHARP; HAHN, 2011).

A infecção por HIV-1 é a causa majoritária da síndrome de imunodeficiência adquirida (aids) no mundo. Em 2012 foram estimados cerca de 35 milhões de pessoas infectadas por HIV-1 e cerca de 2,3 milhões de novos casos registrados no mundo, mostrando um declínio de 33% no número de novas infecções quando comparado a 2001 (3,4 milhões de novos casos). Ao mesmo tempo, o número de mortes causadas por aids também está em declínio, com 1,6 milhão de mortes no mundo em 2012, uma queda de 2,3 milhões comparados com dados de 2005. Esta redução da mortalidade se deu principalmente pelo uso da terapia antirretroviral, que evitou a morte de 6,6 milhões de pessoas com aids no mundo de 1996 à 2012 (UNAIDS, 2013).

No Brasil, a epidemia de aids apresenta, em média, 36 mil casos/ano, sendo de aproximadamente 656 mil casos notificados até junho de 2012, com média de 11,5 mil óbitos por ano e com uma taxa de prevalência de infecção pelo HIV-1 de 0,4 na população geral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os pacientes infectados por HIV-1, em estado avançado de imunodeficiência, ficam mais suscetíveis a infecções oportunistas, destacando-se dentre estas o CMV (Citomegalovírus), MAC (complexo *Mycobacterium avium*), *Cryptococcus neoformans*, e o *M. tuberculosis (Mtb)* em pacientes imunossuprimidos, entre outras.

A tuberculose (TB) é uma enfermidade de grande importância para saúde pública, pois estima-se que aproximadamente 1/3 da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB e, no Brasil, em 2012, foram estimados 70.047 novos casos de TB (Figura 1) (WHO, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A TB é, de fato, uma das mais frequentes doenças oportunistas em pacientes infectados por HIV (CAHN, 2003). Em 2012, cerca de 6 milhões de pessoas estavam com TB no mundo, destas 20% eram coinfectadas com HIV. No Brasil, 82 mil casos de TB foram notificados e 20% destes eram de pessoas coinfectadas com HIV (UNAIDS, 2014a; UNAIDS, 2014b).

Tanto o HIV como o *Mtb* são microorganismos intracelulares que infectam células envolvidas na resposta imune levando a um profundo comprometimento imunológico nos pacientes infectados. Os principais mecanismos imunológicos associados com a infecção por HIV, por *Mtb* e na associação entre as duas infecções serão detalhadas nos tópicos seguintes.

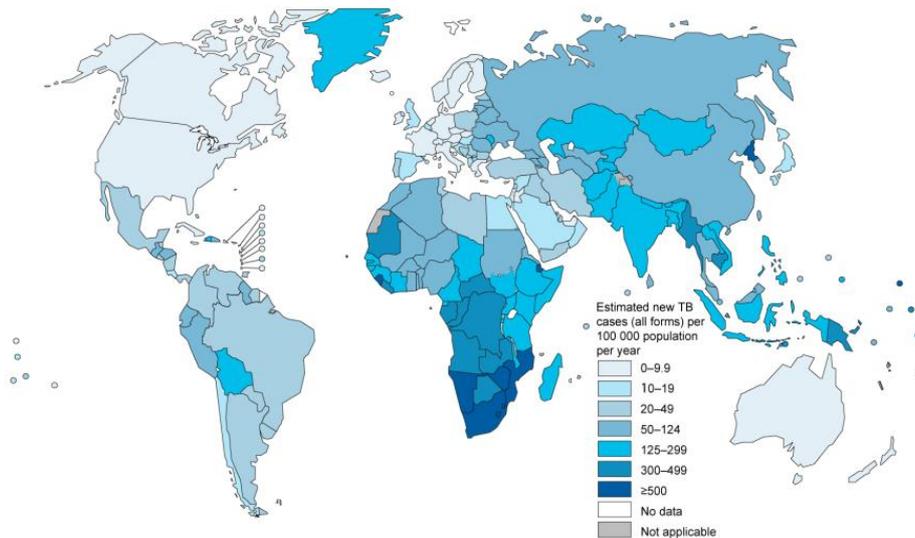


Figura 1- Incidência de tuberculose em adultos em 2012. Figura adaptada do site World Health Organization. (<http://www.who.int/en>, acesso em: 12/12/2013).

### 1.1 –História natural da infecção pelo HIV-1

A patogênese da infecção por HIV-1 envolve a entrada e a replicação do vírus no interior de células do hospedeiro. As principais células-alvo do HIV-1 são as que expressam a molécula CD4 em sua superfície, como linfócitos TCD4<sup>+</sup>, monócitos, macrófagos e células dendríticas (revisto por GROSSMAN et al., 2002). Além da molécula de CD4, para entrar na célula-alvo, o HIV-1 precisa associar-se também aos seus correceptores, que são moléculas receptoras de quimiocinas, tais como o CCR5,

que é mais frequentemente utilizado pelo HIV-1, ou o CXCR4, que é expresso em vários tipos celulares (APPAY; SAUCE, 2008; RIJ et al., 2003).

No processo de entrada do HIV-1, um complexo glicoproteico do envelope viral formado por seis subunidades, três gp120 e três gp41 interagem especificamente com a molécula de CD4<sup>+</sup> e com o correceptor de entrada na membrana plasmática da célula-alvo (revisto por KWONG et al., 1998). Após a adsorção, o peptídeo de fusão se insere na membrana celular, rompendo e desorganizando a composição desta. Com a fusão, acontece a internalização do capsídeo, que é degradado, liberando o genoma e as proteínas virais no citoplasma. Após a liberação do material genético viral no citosol, ocorre a transcrição reversa, mediada pela enzima transcriptase reversa, onde o RNA viral é decodificado para DNA. Durante a integração ocorre a incorporação da fita dupla de DNA pró-viral ao DNA humano no núcleo celular, catalisada pela enzima integrase. Na transcrição o DNA pró-viral é transcrito em RNA viral, podendo sofrer tradução em poliproteínas virais ou ser incorporado a vírions imaturos, que passam por maturação e brotam pela membrana celular. A maturação exige a atuação da enzima protease. Depois desse processo, os vírions maduros podem, então, infectar outras células suscetíveis. A falta de sistema de correção da transcriptase reversa e a interação do genoma viral com membros da família APOBEC são os principais mecanismos que possibilitam a ocorrência de mutações, levando à diversidade viral e, como consequência, ao escape da resposta imune do hospedeiro e à resistência aos antirretrovirais (Figura 2) (COFFIN, 1995; SIERRA et al., 2005; revisto por HOGAN; HAMMER, 2001; DESIMMIE et al., 2013).

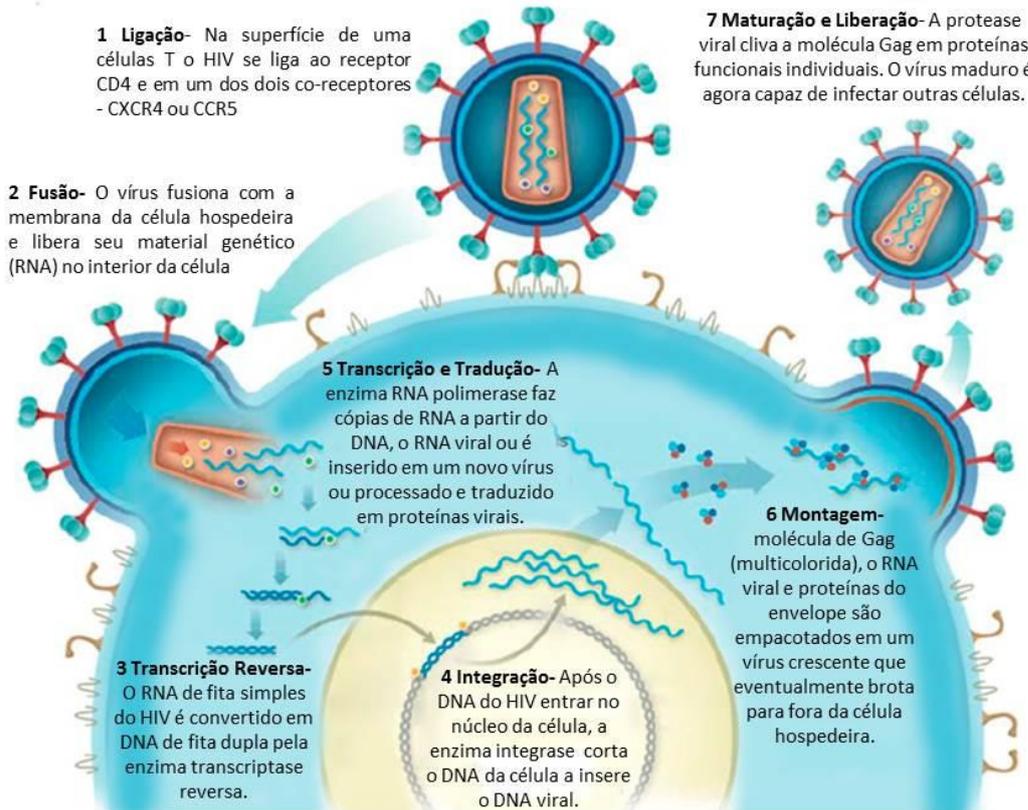


Figura 2 – Ciclo replicativo do vírus do HIV-1.  
Adaptado de SHATTOCK; ROSENBERG (2012).

Durante a infecção primária por HIV-1, altos níveis de viremia são observados, já nas primeiras semanas (PIATAK et al., 1993) e cerca 40-90% dos indivíduos apresentam sintomas, que geralmente incluem febre, fadiga, faringite, perda de peso, transpiração noturna excessiva, linfadenopatia, mialgias, dor de cabeça, náuseas e diarreia (KAHN JO; WALKER BD, 1998; SCHACKER T et al., 1996; WALENSKY RP et al., 2001). Ao final desta fase, com o estabelecimento da resposta imune, a viremia começa a declinar até alcançar um estágio conhecido como “*set point*”, o qual marca o início da fase crônica (assintomática) da infecção, que pode durar vários anos, evoluindo, posteriormente, na ausência de terapia antirretroviral, para um quadro de aids, que se caracteriza pelo agravamento do estado de imunodeficiência, que favorece a ocorrência de doenças oportunistas e neoplasias, podendo ou não chegar ao óbito (Figura 3).

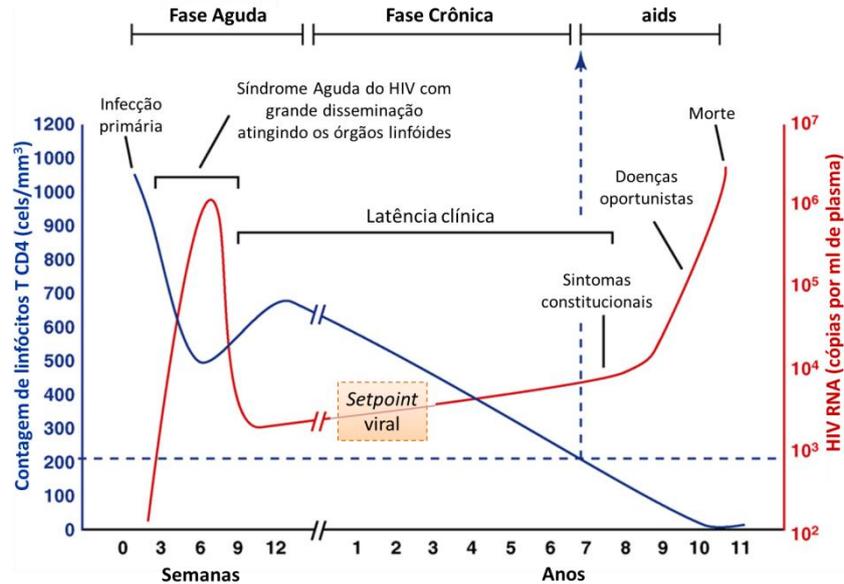


Figura 3- Representação gráfica do curso da infecção pelo HIV-1, indicando as três fases. (I) Indivíduos infectados com HIV-1. (II) fase aguda de duração de aproximadamente 6-12 semanas, com sintomas gripais, viremia acentuada e queda nas contagens de células T CD4. (III) fase assintomática crônica com duração aproximada de 7 a 10 anos. Após a replicação do vírus a fase aguda atinge um nível constante de replicação conhecido como o "set point". (IV) o início da aids está associado com aumento da replicação viral e declínio das contagens de células T CD4; o tempo até a ocorrência de aids varia entre indivíduos de 2 anos a mais de 15 anos após a soro conversão. Fonte: adaptado de An and Winkler (2010).

O controle da viremia ocorre naturalmente, ao longo da fase crônica, para uma parcela minoritária dos indivíduos infectados, os chamados controladores de elite, ou através do uso de drogas antirretrovirais. Além disto, a terapia antirretroviral de alta eficácia (HAART), através do controle da replicação viral, permite o reestabelecimento e a manutenção da resposta imune contra uma grande variedade de patógenos (HIRSCH et al., 2004).

### 1.2 -Terapia antirretroviral

A primeira droga utilizada para o tratamento da infecção por HIV-1 em adultos foi a zidovudina (AZT), na forma de monoterapia. Embora eficiente em diminuir a mortalidade e a frequência de infecções oportunistas, o AZT teve seu uso limitado devido à rápida emergência de isolados virais resistentes ao tratamento. Com o desenvolvimento de novas drogas, surgiram combinações de drogas antirretrovirais que foram capazes de induzir, de modo eficiente, a redução da morbidade e da mortalidade associadas à infecção por HIV-1. A HAART é composta pela associação de drogas antirretrovirais, reduzindo a carga viral plasmática, através da ação sobre potenciais alvos do ciclo replicativo do HIV-1, impedindo assim a formação de novas partículas virais ou mesmo a infecção de novas células (revisto por ARTS, HAZUDA, 2012; MENÉNDEZ-ARIAS, 2013)

Atualmente, existem 26 drogas antirretrovirais disponíveis para o tratamento do HIV/aids, divididas em diferentes classes:

**Inibidores de entrada:** Os inibidores desta classe em uso atualmente na clínica atuam como antagonistas do correceptor CCR5 (maraviroc) ou como um peptídeo de fusão que interage com a gp41 (enfuvirtide). Outros fármacos em desenvolvimento atuam inibindo a ligação celular, a interação com o CD4 ou com o complexo gp120/gp41, dentre outros (MENÉNDEZ-ARIAS, 2013)

**Inibidores de transcriptase reversa:** Estes podem ser classificados como inibidores nucleosídicos/nucleotídicos da transcriptase reversa (INTRs) e inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTRs). Os INTRs são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que dentro da célula são convertidos em derivados trifosfato que competem com dNTPs naturais na incorporação da nova cadeia de DNA, impedindo a continuidade da síntese de DNA devido a ausência da extremidade 3'OH na ribose, como por exemplo, a zidovudina, lamivudina e tenofovir. Já os INNTRs , como o efavirenz, nevirapina e outros, inibem a retrotranscrição do HIV-1 ao ligar-se a bolsa hidrofóbica próxima ao sítio ativo da transcriptase (MENÉNDEZ-ARIAS, 2013; SIERRA; WALTER, 2012).

**Inibidores de Protease:** Estes têm como alvo a enzima protease e agem ao ligar-se à protease viral no lugar do substrato natural, bloqueando, assim, o

processamento das poliproteínas gag e pol necessárias à formação das partículas virais maduras.

**Inibidor de Integrase:** A integrase retroviral catalisa a inserção do DNA pró-viral gerada durante a transcrição reversa no cromossomo do hospedeiro, consequentemente, bloqueando esta fase do ciclo replicativo do vírus (revisado por SIERRA; WALTER, 2012).

### 1.3 – Patogênese do HIV-1.

A infecção por HIV-1 é caracterizada pela diminuição progressiva tanto quantitativa quanto funcional da imunidade do hospedeiro, uma vez que o principal alvo são os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, protagonistas da imunidade adaptativa e que desempenham importante papel na resposta imune contra o HIV (revisado por PERREAU et al., 2013).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> contribuem para o controle das infecções virais indiretamente, através de auxílio na indução e/ou manutenção das respostas de células T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B e macrófagos e/ou pela mediação direta de suas funções efetoras antivirais, tais como a produção de citocinas e, eventualmente, citólise (revisado por HOGAN; HAMMER, 2001).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> têm papel importante no reconhecimento de células infectadas por HIV-1, sendo capazes de induzir a morte destas células, levando a um declínio da viremia (revisado por MCDERMOTT; KOUP, 2012). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) atuam diretamente no aumento da imunidade antiviral e na supressão da infecção através do mecanismo de lise celular direta e na secreção de citocinas e quimiocinas (BETTS et al, 2006; MIGUELES et al., 2002; HERSPERGER et al., 2010).

A cooperação entre as respostas das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> parece ser essencial para o controle da infecção promovida pelo HIV, uma vez que as células TCD4<sup>+</sup> são células efetoras-chave na resposta imune do hospedeiro, e sofrem replicação e destruição na fase inicial da infecção, o que se intensifica na fase crônica, levando a uma profunda imunossupressão que é clinicamente conhecida como aids (HOGAN; HAMMER, 2001).

O processo de depleção de células TCD4<sup>+</sup> está correlacionado tanto com os níveis de viremia, quanto com o fenômeno de hiperativação crônica destas células (HAZENBERG MD et al., 2003; MCCUNE, 2001; GROSSMAN et al., 2002). Os

mecanismos propostos para a perda de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, em função da ativação celular crônica, são a aceleração da senescência destas células, a exaustão clonal e a morte celular induzida por ativação (DOCKRELL et al., 1999; GROSSMAN et al., 2002; RIBEIRO et al., 2002; YATES et al., 2007). Em geral, observa-se uma perda progressiva de células TCD4<sup>+</sup> e altos níveis de ativação de células T causada pelo vírus em indivíduos virgens de tratamento antirretroviral. De modo geral, os dados mais atuais mostram que essa perda ocorre em grande intensidade já na fase aguda da infecção pela destruição dos linfócitos T de memória expressando a molécula CCR5, que se encontram no tecido linfoide da mucosa intestinal (OKOYE; PICKER, 2013). O fenômeno de ativação imunológica observada durante o curso da infecção é de tamanha extensão que envolve outros mecanismos não relacionados diretamente ao HIV e contribui de forma importante para a depleção dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> ao longo da evolução para a aids (APPAY; SAUCE, 2008).

Num estudo pioneiro desenvolvido por Kolter e colaboradores (1984), em indivíduos com aids, foram observadas, anormalidades histológicas na mucosa do trato gastrointestinal, má absorção e depleção de linfócitos, eventos estes que poderiam causar um importante prejuízo na função da barreira do intestino, como defesa contra microrganismos do lúmen intestinal, patogênicos ou não. Mais recentemente foi demonstrado que alterações importantes nesta barreira ocorrem ao longo da infecção por HIV-1, o que leva à translocação microbiana de produtos como lipopolissacarídeos (LPS), diretamente correlacionada à ativação imune e à progressão da doença (revisto por DOUEK et al., 2009). Os produtos bacterianos, tais como LPS, flagelina e CpG DNA, levam a uma profunda ativação da resposta imune inata. Estes são ligantes de receptores do tipo *toll* (TLR) e são conhecidos por estimularem diretamente macrófagos periféricos e células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ ), podendo levar a uma ativação sistêmica e à diferenciação de linfócitos e monócitos.

Além disto, produtos gênicos do HIV-1 podem induzir diretamente a ativação de linfócitos e macrófagos, e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, a glicoproteína do envelope gp120 pode ser capaz de ativar células ou aumentar sua responsividade à ativação, mesmo na falta de infecção direta destas, através da ligação a molécula de CD4 ou aos correceptores (RIECKMANN et al., 1991; LEE et al., 2003). A proteína acessória Nef é também capaz de levar à ativação dos

linfócitos diretamente (WANG et al., 2000; SIMMONS et al., 2001), ou através da infecção de macrófagos (SWINGLER et al., 1999).

Uma consequência direta da ativação de células T é o aumento dos níveis do fator de transcrição nuclear intracelular kappa B (NF-κB), o qual aumenta a transcrição do vírus integrado ao genoma celular e a produção de novos virions que podem infectar novos alvos. Um ciclo vicioso é, então, estabelecido, durante o qual a replicação do HIV-1 promove a ativação imune, principalmente as células T, e a ativação imune induz a replicação do HIV-1 (KAWAKAMI et al., 1988).

Ao longo da epidemia de aids tem-se discutido a utilização de alguns marcadores de ativação e/ou imaturidade celular, dentre outros, que pudessem ser de valor prognóstico de evolução da doença. O aumento na expressão de moléculas CD38 e HLA-DR em linfócitos T ativados (HERTOGHE et al., 2000), assim como as contagens de células T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> circulantes se correlacionam fortemente com os níveis elevados de RNA plasmáticos, podendo diminuir com a supressão da replicação viral obtida através do uso de HAART (BENITO et al., 2004). Desta maneira, especula-se que os níveis de ativação possam ser considerados preditores mais fidedignos da progressão para a aids, do que a própria carga viral plasmática (GIORGI et al., 1999). Dados da literatura mostram que mesmo em pacientes com carga viral indetectável por vários anos, tanto por tratamento antirretroviral como por controle natural, ainda assim e possível se evidenciar um grau importante de ativação celular (POIZOT-MARTIN et al., 2013; GAARDBO et al., 2013). Portanto, durante a infecção por HIV-1, o estabelecimento da ativação imune e de processos inflamatórios envolve muitos mecanismos que estão direta ou indiretamente relacionados com a replicação viral.

As citocinas são moléculas-chave na resposta imune e seu padrão pode influenciar diretamente o estágio imunológico dos pacientes infectados por HIV-1, podendo levar à progressão da doença. As citocinas pró-inflamatórias têm papel importante na infecção pelo HIV-1, onde os níveis aumentados de IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, IL-18, interferon alfa (IFN-α), IFN-γ e fator de necrose tumoral (TNF-α) influenciam diretamente a replicação viral, montagem da resposta imune e a patogênese. A IL-15 e o IFN-α foram descritos no contexto da coestimulação de células T humanas e a IL-15 em presença dos antígenos estimula a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos soropositivos para o HIV-1. Os interferons do tipo I (13 tipos de IFN-α, 1 tipo de IFN-β, -ω, -δ, -τ, e -κ) apresentam diferentes

impactos na ativação de células T induzida por antígenos, dependendo da presença ou ausência de células apresentadoras de antígenos. As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são, provavelmente, a principal fonte de IFN- tipo I na infecção causada por HIV-1 (HOSMALIN; LEBON, 2006). A combinação de IL-2, IL-6 e TNF pode ativar tanto células T *naive* quanto de memória (revisto por HAAS et al., 2011).

Avaliando o perfil de células Th2 ativadas na patogênese da infecção por HIV-1 observa-se aumento na produção de IL-4, que foi associada com a piora clínica após o tratamento antirretroviral (SUBRAMANYAM et al., 2004). Outros estudos mostraram que há um aumento da IL-4 e uma diminuição da produção da IL-2 durante a progressão para aids, assim como foi mostrado que, apesar de não haver produção aparente de IL-2, há expressão de IL-4 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e células dos nódulos linfáticos, de indivíduos infectados ou não por HIV-1. No entanto, o papel dos linfócitos Th2 na infecção pelo HIV-1 não está bem estabelecido e a inversão do perfil Th1/Th2 ao longo da evolução para a aids, como especulado por alguns autores, ainda é controverso (KLEIN et al., 1997; FAKOYA et al., 1997; BOURGARIT et al., 2006).

A infecção por HIV tem os linfócitos T como principais células da resposta imune, e estas células se apresentam em diferentes fenótipos. As células linfocitárias apresentam diferenças entre si quanto a expressão de diferentes moléculas na superfície dos linfócitos T durante os estágios de diferenciação celular. As células *naive* são células que ainda não tiveram contato com antígenos. Estas células podem ser identificadas pela expressão dos marcadores de superfície CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, CD28 e CTLA-4, e pela falta de expressão de CD25, CD69 e HLA-DR (CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2005). Em geral, na literatura diferentes combinações de anticorpos são utilizadas para classificar estas células, tais como: CD45RA+CCR7+ (SALLUSTO et al., 1999), CD45RA+CCR7+CD27+CD28+ (APPAY et al., 2008), CD45RA+CD62L+ (NANICHE et al., 2011) entre outras. Portanto, as células TCD4<sup>+</sup> *naive* são exemplos de células que podem se diferenciar em diferentes fenótipos como linfócito T *helper*1 (Th1), Th2, Th9, Th17 e T regulatórias (Treg), de acordo com a expressão de citocinas locais. A citocina IL-12 favorece a diferenciação de células T *naive* para o perfil de células Th1, através de fator de transcrição T-bet, a citocina IL-4 favorece a diferenciação para o perfil Th2, através do fator de transcrição GATA-3, enquanto que as citocinas IL-2 e TGF- $\beta$  favorecem

células *naive* a se diferenciarem em células iTregs através do fator de transcrição Foxp3. A combinação de TGF- $\beta$  e IL-6 induz a diferenciação em células Th17, através do fator de transcrição ROR $\gamma$ t, embora a IL-21 possa substituir a IL-6 para promover a diferenciação de células Th17 nesta condição (revisto por ZHENG, 2013).

As células de memória são células de longa vida que surgem na resposta imune antígeno-específica, após o encontro com o antígeno, durante a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos em resposta a uma estimulação antigênica (STOCKINGER et al., 2006). Os linfócitos de memória conferem proteção imediata em caso de reencontro com o antígeno gerando uma resposta qualitativa e quantitativamente aumentada se comparada as células *naive* (revisto por AHMED; GRAY, 1996). As células T de memória podem ser identificadas pela presença dos marcadores CD45RO, CD57 e CD95 e/ou pela expressão positiva ou negativa da molécula CCR7 na superfície dos linfócitos T, caracterizando suas subpopulações de memória central (MC), efetora (ME) e efetora altamente diferenciada (TEMRA) (revisto por CHATTOPADHYAY; ROEDERER, 2005).

As células de memória central são identificadas por expressarem em sua superfície a molécula de CCR7, residirem nos órgãos linfoides secundários e pela falta de função efetora imediata com secreção de IFN- $\gamma$  e/ou função citotóxica em resposta direta ao antígeno, embora elas prontamente se proliferem e se diferenciem em células efetoras em resposta a estimulação de antígenos. Neste processo, as células T de memória efetora se caracterizam por não apresentarem a molécula CCR7 na superfície da célula, por migrarem para os tecidos periféricos exercendo uma função efetora com rápida produção de citocinas em resposta a re estimulação (SALLUSTO et al., 2004; STOCKINGER et al., 2006). As células TEMRA são células T específicas a antígenos que apresentam o fenótipo CCR7<sup>-</sup> e CD45RA<sup>+</sup> em sua superfície, secretam IFN- $\gamma$ , além de altos níveis de perforina, sendo estes *subset* com pouca representação (5%) dentro das populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específica para HIV-1 (CHAMPAGNE et al., 2001).

Cada fenótipo de células T está adaptado para um determinado tipo de resposta imune, na qual desempenham distintas ou similares funções contra diferentes tipos de patógenos. SRINIVASULA e colaboradores (2011) analisaram o efeito da carga viral e as contagens de células TCD4<sup>+</sup> na diferenciação dos fenótipos *naive* e memória nas populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com HIV-1. Estes

autores observaram que o *turnover* de células TCD8<sup>+</sup> *naive* e de memória é dependente da carga viral, mas não está associado à depleção de células TCD4<sup>+</sup> nos pacientes infectados. No entanto, o principal motivo para a *turnover* das populações de células TCD4<sup>+</sup> *naive* é a depleção das células T CD4<sup>+</sup> totais e não pelo efeito da carga viral. Entretanto, análises *in vivo* do ciclo celular através da incorporação de bromodeoxiuridina, mostraram que células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas resultam em aumento nas taxas proliferativas de células memória, enquanto as células *naive* mostraram baixo *turnover* (SRINIVASULA et al., 2011). Diferenças substanciais na resposta imune TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> específicas para os vírus EBV, CMV e infecções por HIV-1 têm sido descritas. Estes estudos têm proposto que as diferenças na resposta de células T CD8<sup>+</sup> específicas de HIV-1 podem ser resultado de uma maturação enviesada de células de memória, da senescência de replicação e do tipo de patógeno/vírus influenciando especificamente no desenvolvimento das distintas populações de células de memória (HARARI et al., 2014).

As células T reguladoras conhecidas como Treg Foxp3<sup>+</sup> são essenciais para tolerância imune e tem papel crucial em limitar uma excessiva resposta imune e inflamatória executada pelas células T auxiliares (revisto por ZHENG, 2013). As Treg induzidas por antígeno (iTreg) são funcionalmente similares às Treg naturais derivadas do timo: são anérgicas, supressoras e capazes de inibir doenças *in vivo* (revisto por ZHENG, 2013) Recentemente, as linhagens de células Th17 vem sendo descritas por produzirem IL-17 e IL-22. Uma das características atribuídas às células Tregs é que elas podem se converter em células Th17 e outras células efetoras em certos ambientes e que células Th17 derivadas de células Treg partilham características comuns com Th17 gerada por precursores *naive* (AFZALI et al., 2010; ZHENG, 2013). Embora as células Treg e Th17 tenham funções completamente diferentes na resposta imune, a diferenciação de ambas as populações de células precisa de TGF- $\beta$  (ZHENG, 2013). A população de células Th17 é um subconjunto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores que na forma mais simples pode ser definida como uma célula que libera IL-17, embora produza várias outras citocinas (IL-21, IL-22) e fatores de transcrição (AFZALI et al., 2010).

Os pacientes infectados por HIV-1 apresentam maciça perda de células T auxiliares, particularmente nas mucosas e persiste ao longo do tratamento com pouca repopulação deste repertório. A destruição de células TCD4<sup>+</sup> na mucosa está

acompanhada pela mudança no microambiente e é caracterizada pela diminuição da população de células Th17 (BIXLER; MATTAPALLIL, 2013), conduzindo a um concomitante aumento de células Treg (revisto por HAAS et al., 2011). Entretanto, o uso de HAART pode resultar em restauração de células Th17 no trato gastrointestinal, que pode ser associado com melhor prognóstico da doença (KLATT; BRENCHLEY, 2010), embora ainda não exista um consenso na literatura sobre o efeito da HAART no estabelecimento da população de células Th17 em indivíduos infectados com HIV (BIXLER; MATTAPALLIL, 2013).

Embora a infecção causada por HIV-1 leve a uma desordem imunológica, o surgimento de uma resposta inflamatória que venha a restabelecer as populações linfocitárias e a produção de citocinas, associado ao controle da replicação viral natural ou via tratamento antirretroviral, é de grande importância para que ocorra uma melhora clínica e imunológica. No entanto, a introdução da terapia antirretroviral pode permitir também a exacerbação de processos patogênicos subclínicos e/ou piora de comorbidades em tratamento, sendo este fenômeno denominado de síndrome inflamatória de reconstituição imune, que será abordado mais à frente.

### **1.4 – A patogênese da infecção por *Mtb***

A TB humana é uma doença infecciosa e contagiosa causada principalmente pelo *Mtb*, uma micobactéria patogênica e aeróbia que estabelece sua infecção normalmente nos pulmões. A progressão da infecção por *Mtb* é fundamentalmente regulada pela integridade do sistema imune do hospedeiro, o qual pode ter êxito, através da imediata eliminação microbiana e/ou latência, ou falha, resultando no desenvolvimento de doença ativa (DUCATI; RUFFINO-NETTO, 2006).

A terapia usada no tratamento da TB atualmente no Brasil é composta pela associação de 4 fármacos: rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E), esquema atualmente utilizado em doses fixas combinadas para todos os casos de TB (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). Foi observado que o uso da terapia para TB atua na restauração imune, influenciando no ganho de células TCD4 em pacientes com TB avançada sem HIV, ajudando na homeostase destas células (SKOGMAR et al., 2013).

A forma mais frequente de transmissão do *Mtb* é através da inalação de aerossóis de um paciente com TB pulmonar bacilífera. Entre os indivíduos expostos ao bacilo,

menos de 10% irá desenvolver a doença clínica ao longo da vida, mas, uma vez que a doença se desenvolva e permaneça sem tratamento, ela se torna fatal em 50% dos pacientes (KAUFMANN, 2001).

A forma latente da TB é resultado da exposição ao *Mtb*, seguida pela resposta imune do hospedeiro para controlar o crescimento do bacilo, forçando-o a um estado de quiescência no tecido infectado. Isso é caracterizado pela redução no metabolismo bacteriano, como consequência da ação da resposta imune, que pode, na maioria das vezes conter, mas não erradicar a infecção (DUCATI; RUFFINO-NETTO, 2006).

Por outro lado, a TB ativa pode evoluir localmente nos pulmões, causando a TB pulmonar, mas pode também se manifestar em qualquer local do corpo causando as chamadas formas extrapulmonares (BLOOM, 1994) tais como: pleural, ganglionar, meningite tuberculosa, urogenital, cutânea, oftálmica, óssea entre outros.

A infecção pelo *Mtb* ocorre após a inalação do bacilo, onde grande parte fica contido na porta de entrada do aparelho respiratório. Os poucos bacilos que escapam dessa barreira física de contenção enfrentam os mecanismos alveolares, sendo a fagocitose pelos macrófagos alveolares o mais importante destes mecanismos. Caso não sejam degradados pelos mecanismos de defesa os bacilos entram em multiplicação, constituindo o cancro de inoculação ou complexo de Gohn, a partir do qual se faz a disseminação linfática e a inflamação do gânglio regional, constituindo o chamado complexo primário. A partir da disseminação por via sanguínea, os bacilos se instalam em outros órgãos até o surgimento da imunidade adquirida ou adaptativa, na qual a resposta de defesa é especificamente dirigida contra componentes do *Mtb* (LAPA E SILVA, 2012).

Em geral, na forma pulmonar os bacilos de *Mtb* são direcionados aos pulmões, onde alcançam os macrófagos alveolares e iniciam a replicação no interior dos fagossomas, antes do desenvolvimento da resposta imune específica (ZHANG, 2008). Uma vez alojada no sítio da infecção, o mecanismo de sobrevivência da micobactéria é baseado na sua capacidade de interferir com o processo de fusão do fagossoma com o lisossoma, impedindo a acidificação do fagossoma. Na maioria dos pacientes imunocompetentes ocorre o recrutamento de macrófagos e células T e o estabelecimento de uma resposta imune secundária (DUCATI; RUFFINO-NETTO, 2006). Entretanto, células hospedeiras e tecidos adjacentes reagem produzindo lesões

típicas caseosas, caracterizadas pela formação de granuloma constituído de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células T e B (ZHANG 2008).

Os macrófagos e células dendríticas, uma vez infectados, secretam as citocinas IL-12, IL-23, IL-7, IL-15, TNF e apresentam antígenos para as variadas populações de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> (KAUFMANN et al., 2006). Todas estas células T produzem a citocina efetora IFN- $\gamma$ , que ativa os macrófagos em conjunto com TNFs, para efetuar a morte da micobactéria, através de reativos de oxigênio e nitrogênio. Além disso, as células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas podem matar as micobactérias através da granzima e perforina (ZHANG 2008).

No entanto, as células CD4<sup>+</sup> Th2 produzem citocinas como, IL-4 e células T regulatórias produzem IL-10 e TGF- $\beta$  a fim de suprimir IFN- $\gamma$ . Estas citocinas agem na regulação do mecanismo efetor e da inflamação, o que pode permitir que as micobactérias sobrevivam. Uma interessante observação é que a micobactéria pode atuar diretamente na estimulação de células Treg a produzirem as citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- $\beta$  (HOUGARDY et al., 2007).

Os estudos que avaliam os perfis de células T de memória de pacientes com TB em geral usam células T circulantes *ex vivo* ou após estímulo, onde observam um perfil de células T de memória efetora e células efectoras (CACCAMO et al, 2009, MUELLER et al., 2008, WANG et al., 2010). Em células estimuladas com antígenos de *Mtb* ocorre uma redução na frequência de células T de memória central (CD45RO+CD27+) e aumento de células T *naive* (CD45RO-CD27+) em pacientes com TB (MARIN et al., 2012). O *subset* de células Th17 secretoras de IL-17 pode recrutar neutrófilos, monócitos e células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , estimulando a expressão de quimiocinas. Contudo, o IFN- $\gamma$ , por sua vez, pode suprimir células Th17 produtoras de IL-17, que podem ser importantes no controle da infecção induzida pela micobactéria (TORRADO; COOPER, 2010).

Existe apenas uma vacina disponível contra TB, a BCG, que apesar de estar disponível quase no mundo todo, não previne a ocorrência de TB. Em crianças a vacina previne as formas graves de TB (meningite e TB disseminada), porém em adultos a vacina não é eficaz e portanto deve ser administrada apenas ao nascimento (TRUNZ et al., 2006). Diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito protetor da BCG contra a TB pulmonar. Esses estudos apontam enorme variação na proteção conferida

pela vacina, assim como, o seu tempo de duração e o papel protetor da primeira dose de BCG, ocasionando possíveis reflexos no controle de TB (BARRETO et al., 2006) .

Em indivíduos infectados por *Mtb*, a melhor forma de diagnosticar a infecção latente é o teste tuberculínico que é um derivado proteico purificado (PPD), cujo resultado é observado através da induração cutânea e revela a hipersensibilidade do tipo tardio contra antígenos micobacterianos (DUCATI; RUFFINO-NETTO, 2006). O PPD é formado por uma mistura de antígenos do *Mtb*, muitos dos quais são compartilhados com o *M. bovis* e algumas micobactérias não tuberculosas, o que o torna pouco específico para uso na clínica ou em crianças (MAZUREK et al., 2010; PAI et al., 2004). A resposta ao PPD nas populações vacinadas com BCG, torna-se de difícil interpretação, pois a vacinação recente pode interferir nessa resposta. Há evidências na literatura de que um teste tuberculínico positivo não representa imunidade induzida pela vacina, ou seja, a presença de reações de hipersensibilidade do tipo tardio não está associada à proteção vacinal, mas possivelmente à infecção pelo bacilo da TB (BARRETO et al., 2006).

Outros testes vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de discriminar entre uma infecção causada pelo bacilo da TB ou pela vacina BCG. O teste PPD tem muitas limitações, buscando-se outro método mais específico para o diagnóstico de TB latente. Uma das alternativas é um ensaio baseado na liberação de IFN- $\gamma$  (IGRAs- Interferon-Gamma Release Assays) em células T *in vitro*. Os ensaios baseiam-se no princípio de que as células T de indivíduos sensibilizados com antígenos do *Mtb* produzem IFN- $\gamma$  quando reencontram antígenos micobacterianos (PAI et al., 2004). Dentre os antígenos utilizados nos IGRAs destaca-se a proteína secretada ESAT-6, a qual está presente somente em *Mtb* e *M. bovis*. Estudos com modelos animais mostraram que o ESAT-6 induz respostas fortes de células T em camundongos, conferindo imunidade protetora contra o *Mtb* (VINCENTI et al., 2003). Outro componente utilizado nesse testes é o antígeno de 38 kDa, que é uma lipoproteína exposta na superfície micobacteriana, sendo utilizado em combinação com outros antígenos para detectar respostas específicas ao *Mtb*, além de induzir resposta proliferativa de células T (MEHRA et al., 1996). Alguns antígenos micobacterianos como, ESAT-6, CFP-10 e PPD estão sendo utilizados como testes de diagnóstico, assim como na fabricação de vacinas contra o *Mtb*, devido à sua capacidade de estimular resposta imune (MAZUREK et al., 2010, DIEHL et al., 2011).

A dificuldade de se identificar e tratar os casos de TB são fatores que contribuem amplamente para o aumento da incidência de TB no mundo, assim como a interação de epidemias por HIV-1 e *Mtb* (CAHN, 2003).

### 1.5- Coinfecção HIV-1/*Mtb*

O HIV-1 aumenta a suscetibilidade à infecção por *Mtb*. Esse risco aumenta à medida em que aumenta o estado de imunossupressão. Entretanto, tem sido proposto que a TB pode atuar como um cofator para acelerar o curso clínico da infecção por HIV (revisto por SWAMINATHAN et al., 2000). Mostrando assim, que a coinfecção HIV-1/*Mtb* age sinergicamente.

A infecção por HIV-1 causa depleção seletiva de células TCD4<sup>+</sup>. Entretanto, a infecção causada por *Mtb* também causa alterações nas contagens de células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico, sendo observado um contínuo aumento durante o tratamento da TB (SKOGMAR et al., 2013).

A TB clínica em pacientes infectados com HIV-1 resulta em contínua ativação celular, que por sua vez leva a condições que favorecem a replicação viral e progressão da doença (HANNA et al., 2009). Os marcadores solúveis e celulares de ativação imune são fortes preditores de progressão para aids. As células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam CD38<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> são marcadores clássicos de ativação imune em pacientes com HIV-1 associado ou não com outros patógenos. Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam um aumento na expressão de moléculas CD38<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> em sua superfície, assim como, os coinfectados TB/HIV (RODRIGUES et al., 2003; ZHANG et al., 2006; MAHAN et al., 2010). Assim como, na coinfecção ocorre aumento na frequência de células T CD8<sup>+</sup> ativadas apresentando uma correlação inversa com a queda dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo um marcador de evolução para aids.

Os indivíduos infectados por HIV-1 apresentam depleção e modulação em diferentes subtipos de linfócitos T. São observadas alterações nas células T CD4<sup>+</sup> *naive* as quais se encontram reduzidas em estágios avançados da infecção (RODRIGUES et al., 2003; ESPINOSA et al., 2013). Embora não-primadas, estas células constituem um *pool* diversificado de precursores celulares prontos a se tornarem células efetoras/de memória, uma vez em contato com estímulos antigênicos (APPAY et al., 2006). RODRIGUES e colaboradores (2003) avaliaram a subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> em

peças com infecção por *Mtb* (reatores ao teste tuberculínico) e pacientes com TB (antes e após o tratamento), encontrando uma grande recuperação de células T CD4<sup>+</sup>, mas não foram observadas diferenças nos percentuais de células de memória efetora e *naive*. As células T de memória têm sua importância por estarem envolvidas em resposta secundária e proteção de longo prazo, no caso das células T de memória central e, de proteção imediata, como as células T de memória efetora e TEMRA, que se diferenciam com base na expressão de moléculas de superfície como CCR7<sup>-</sup> e CD45RA<sup>+</sup> e na capacidade de produzir citocinas e proliferar (ESPINOSA et al., 2013)

Um ponto importante a ser destacado é que estes fenótipos podem não ser totalmente estáveis. As células de memória central têm o potencial de se diferenciarem em um perfil de células efectoras, especialmente após estimulação de seus receptores de interação com o antígeno (TCR) (SIEG et al., 2005). Poucos trabalhos descrevem o perfil fenotípico de células T em pacientes HIV e HIV/TB, embora ROSIGNOLI e colaboradores (2009) descrevam que as células *naive*, memória central, efetora e TEMRA diferem entre indivíduos HIV<sup>+</sup> e HIV<sup>-</sup>, na população de células T CD8<sup>+</sup>. Os trabalhos *in vitro* descrevem uma expansão de células *naive* e de memória central (MC) e uma redução de células efectoras em pacientes com HIV-1 em resposta ao PPD após introdução da HAART (WILKINSON et al., 2009), já em pacientes com TB ativa e TB latente a maioria das células T CD8<sup>+</sup> específicas para *Mtb* apresentam um perfil de células efectoras e de memória efetora (ME) (ROZOT et al., 2013).

A subpopulação linfocitária de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Treg) expressam em sua superfície a molécula de CD25<sup>+</sup> e a molécula intracelular de FoxP3<sup>+</sup>, entre outras. Estas células exercem um papel crítico no controle da tolerância, regulando a homeostasia imunológica e a ativação imune (SIMONETTA; BOURGEOIS, 2013), e têm sido relacionadas à patogênese da infecção por HIV-1 (BURTON et al., 2011). A frequência destas células encontra-se aumentada em pacientes quando comparado aos controles saudáveis, sendo estas capazes de suprimir a proliferação e produção de citocinas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a proliferação em resposta a estímulos (SEMPERE et al., 2007; JI; CLOYD, 2009; SIMONETTA; BOURGEOIS, 2013).

O efeito das células Treg na infecção por *Mtb* e em indivíduos coinfectados é discutível. Resultados discrepantes foram apresentados em um workshop da área. O grupo de Clerici (Milan, Italy) observou uma progressiva diminuição nos percentuais de

células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> em indivíduos com infecção somente por *Mtb*, somente por HIV-1 e nos coinfectados, comparados com indivíduos saudáveis. Em contraste, o grupo de Hirsch (Cleveland, OH) apresenta um estudo mostrando aumento do percentual de células Treg em sangue de indivíduos infectados por HIV-1 e com TB pulmonar comparado com indivíduos somente infectados com HIV-1 (CHOUGNET; SHEARER, 2007). No entanto, não existem dados posteriores na literatura dando respaldo a estes resultados.

A rigor, pelo seu papel biológico, as células Treg podem suprimir tanto a ativação celular crônica, como a resposta imune aos antígenos de HIV-1, tendo assim, uma dualidade entre seu papel benéfico e deletério no controle da infecção. A ocorrência simultânea e/ou sequencial destes eventos, assim como sua origem através de subpopulações fenotípicas é objeto de recente discussão na literatura, pois o fato de pouco se saber sobre o efeito destas células na infecção por HIV-1 e em infecções concomitantes como na TB, pode se dar devido a falta de especificidade da atividade destas células (SIMONETTA; BOURGEOIS, 2013). Durante a TB primária, IFN- $\gamma$  e IL-17 são induzidos, sendo ambas potentes citocinas inflamatórias capazes de induzir a expressão de quimiocinas que promovem o recrutamento celular e organização do granuloma na infecção (TORRADO; COOPER, 2010). Embora as células Th17 desempenhem importante papel na infecção por *Mtb*, assim como na infecção por HIV-1, até o momento não se conhece profundamente a ação destas células na interação entre TB e HIV.

Em indivíduos com TB/HIV parece que não ocorre um balanço da resposta Th1 e Th2, pois estas infecções estão associadas a uma profunda desregulação do sistema imune e a alterações no perfil destas citocinas, com predomínio de um perfil pró-inflamatório, sendo algo que suscita vários debates. Alguns estudos mostraram que o TNF tem um papel importante na patogênese do HIV-1, sendo encontrado em grandes quantidades em infecções crônicas e agudas do HIV-1 (GRAZIOSI et al., 1996; LAWN; BUTERA, 2001). Na coinfeção TB/HIV, os macrófagos liberam baixas concentrações de TNF e induzem menos apoptose dependente de TNF do que os infectados somente por *Mtb* (PATEL et al., 2007). Entretanto, a coinfeção TB/HIV atua sinergisticamente na diminuição da viabilidade de macrófagos e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Estes fenômenos parecem ser causados especificamente por *Mtb* e não por outras espécies de micobactérias (SHANKAR et al.,

2013), sugerindo um impacto do HIV-1 na habilidade de células T específicas para TB em agirem na manutenção da micobactéria no seu nicho celular.

Em indivíduos infectados ou não por HIV-1 com TB ativa, foi observado uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 e baixa proliferação de células T específicas de *Mtb* (HERTOGHE et al., 2000; GELDMACHER et al., 2008). Estudos utilizando imunohistoquímica em células individualizadas mostraram um decréscimo no percentual das células T CD4<sup>+</sup> que expressam IL-2 e IFN- $\gamma$  e um aumento das células que produzem IL-4 e IL-10, o que apoiaria a mudança do perfil Th1 para Th2 durante a infecção por HIV-1 (SILVEIRA et al., 1997).

Achados recentes mostram que em indivíduos coinfectados com TB/HIV a produção de IL-10 foi significativamente maior após estímulo com *Mtb*, sugerindo que a infecção crônica por HIV-1 poderia tornar a imunidade mediada por células ineficiente contra o *Mtb*. Além disso, houve menor produção de IL-2 e maior produção de MIP-1 $\beta$  por células T CD4<sup>+</sup> específicas para *Mtb* em pacientes infectados por HIV-1, em comparação com não infectados, suportando o fato que o HIV-1 infecta e depleta células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2 e é parcialmente inibidor da depleção de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de MIP-1b (revisto por SHANKAR et al., 2013).

Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a fagocitose de *Mtb* induz a ativação de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, que são conhecidas por aumentar a replicação viral (SHANKAR et al., 2013).

### **1.6- Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune**

A introdução da HAART em pacientes infectados por HIV-1 resulta em uma rápida supressão e potente da viremia, acompanhada de aumento nas contagens de células CD4<sup>+</sup> circulantes com um predomínio do fenótipo de células de memória (CD45RO<sup>+</sup>), devido à redistribuição celular a partir do tecido linfóide. Esta redistribuição das populações celulares se mantém à medida que a supressão da replicação viral é mantida, ocorrendo um aumento constante de linfócitos não primados (CD45RA), refletindo uma restauração da atividade tímica (LIPMAN; BREEN, 2006). Uma consequência da rápida restauração linfocitária é a ocorrência de uma maior resposta imune devido a abundância de antígenos microbianos vivos ou mortos, que passam a ser reconhecidos por um grande número de células específicas para antígenos

funcionalmente ativadas (LIPMAN; BREEN, 2006). Esse incremento nas populações linfocitárias pode resultar em um nítido declínio na incidência de infecções oportunistas em pacientes infectados por HIV.

Este restabelecimento do sistema imune após o início do tratamento, associado à rápida queda da carga viral pode, em alguns pacientes, levar à ocorrência do fenômeno descrito como IRIS. Esta síndrome é usualmente uma consequência da ativação exacerbada do sistema imune contra antígenos persistentes ou patógenos viáveis (revisto por (MÜLLER et al., 2010).

A IRIS, que é uma reação inflamatória exacerbada ao ponto de se tornar patológica, desenvolve-se frente a infecções tratadas previamente e, nesse caso, é denominada IRIS paradoxal. Esse fenômeno pode ocorrer também em infecções subclínicas que podem ser reveladas com a reconstituição da resposta imune pela HAART e, nesta situação, é denominada de IRIS desmascarada (MEINTJES et al., 2008).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da IRIS são as baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, associado ao rápido controle da carga viral (revisto por HUIS IN 'T VELD et al., 2012). Em pacientes coinfectados por HIV-1 a forma disseminada de TB em sítios extrapulmonares é, provavelmente, um fator de risco devido a maior carga bacteriana de *Mtb* nestes casos (revisto por LAUREILLARD et al., 2013). Fatores como aumento na suscetibilidade genética do hospedeiro ou um defeito funcional de células T regulatórias são outros potenciais mecanismos que podem estar envolvidos no desenvolvimento de IRIS (revisto por HUIS IN 'T VELD et al., 2012).

Os critérios diagnósticos de IRIS foram apresentados por ROBERTSON em 2006. Entre os critérios figurava a queda de CV > 1 log, um aumento na contagem de células TCD4<sup>+</sup> de ao menos 25 células, uma biópsia mostrando granuloma com necrose caseosa exuberante e a exclusão de outras doenças oportunistas e resistência ao tratamento anti-TB. Estes, entretanto, foram muito criticados pelos pesquisadores porque poucos eram os casos que podiam ser definidos desta forma, uma vez que para preencher os critérios os pacientes necessitavam de contagem de CD4, CV e uma biópsia o que demanda uma boa infraestrutura e disponibilidade dos exames. Isto não era possível principalmente para países de poucos recursos e a maioria dos casos de IRIS ficava não classificado. Desta forma, um comitê de experts foi formado para criar

uma definição mais clínica e permitir uma padronização do que é denominado IRIS (MEINTJES et al., 2008). Pela definição de MEINTJES passou a ser denominado IRIS os casos que preenchem os seguintes critérios: confirmação do diagnóstico de infecção por HIV-1, quadro clínico temporalmente relacionado com o início de terapia antirretroviral, redução da carga viral, aumento das contagens de células T CD4<sup>+</sup> ou outro marcador de reconstituição imune como, por exemplo, a reação ao teste tuberculínico em indivíduo que era inicialmente anérgico e exclusão de outras causas que possam explicar a piora clínica observada, tais como a resistência aos antimicrobianos usados para o tratamento da TB, reação de hipersensibilidade à droga ou outras infecções oportunistas não diagnosticadas (MEINTJES et al., 2008).

As manifestações clínicas mais frequentes em pacientes com diagnóstico de IRIS são o surgimento ou agravamento de linfadenopatia com sinais flogísticos, agravamento de lesões pulmonares preexistentes e febre. Manifestações abdominais também são comuns, incluindo dor abdominal, hepatomegalia e ascite. Em alguns pacientes são observadas manifestações neurológicas resultantes de agravamento de lesões do sistema nervoso central (revisto por LAUREILLARD et al., 2013).

A incidência de IRIS em indivíduos que começam HAART varia. A proporção de pacientes que desenvolve IRIS é alta naqueles indivíduos com citomegalovírus, meningite criptocócica, leucocefalopatia multifocal progressiva e TB e, menos comum em pessoas com sarcoma de kaposi ou herpes zoster (revisto por MÜLLER et al., 2010). A patogênese da IRIS também é fortemente determinada pela ação do patógeno. Em infecções virais, como, por exemplo, por vírus John Cunningham (VJC), citomegalovírus (CMV) e HIV-1 ocorre ação predominantemente de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Já em infecções causadas por micobactérias, assim como outros organismos intracelulares, a resposta T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 é exacerbada, com aumento do número de células T produtoras de IFN- $\gamma$  e citocinas circulantes, causando reação granulomatosa. Além destes, especula-se a importância da imunidade inata na IRIS relacionada ao *Mtb* e sua ação na patogênese da síndrome (revisto por HUIS IN 'T VELD et al., 2012).

A IRIS paradoxal em geral ocorre em pacientes coinfectados por HIV-1 e *Mtb*, virgens de tratamento antirretroviral e quando ambas as terapias são iniciadas simultaneamente ou em um curto intervalo de tempo (BOURGARIT et al., 2006). Entretanto, já foi observado que o desenvolvimento de IRIS independe do intervalo do início do tratamento com tuberculostáticos e HAART entre indivíduos que vieram a

desenvolver a IRIS, dos não IRIS (BRETON et al., 2004), outros apontaram uma diferença significativa entre os grupos (NAVAS et al., 2002; SHELBURNE et al., 2006). Em um estudo comparando a introdução precoce *versus* Tardia da HAART no Camboja, mostrou-se claramente a superioridade da introdução precoce de HAART (2 semanas) depois de iniciar o tratamento da TB. Os pacientes foram acompanhados, por um período médio de 26 meses. Os dados demonstraram que a mortalidade entre os pacientes no braço do "tratamento precoce" foi significativamente menor que no braço de "tratamento tardio". O risco de morte foi reduzido em 34% no braço do "tratamento precoce". Entretanto, a incidência de IRIS no braço precoce foi maior do que no braço de tardio (BLANC et al., 2011). Em geral, a IRIS ocorre em indivíduos que iniciaram HAART dentro de dois meses após o início da terapia anti-*Mtb* (NAVAS et al., 2002; SHELBURNE; HAMILL, 2003).

Estudos conduzidos com pacientes coinfectados HIV/TB mostraram uma exacerbação da resposta Th1 específica para *Mtb* na patogênese da IRIS, com eventos pró-inflamatórios durante a reconstituição imune. Nestes, foram avaliados a resposta Th1 específica para *Mtb* após a introdução da HAART, onde pacientes infectados por HIV-1 que desenvolveram IRIS apresentaram aumento da resposta Th1 para antígenos *Mtb* antes de começarem a HAART e que esta foi amplificada após sua introdução (visto por SHANKAR et al., 2013). Já BOURGARIT e colaboradores (2006) avalia células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para PPD após o início de HAART, observando aumento no número destas células, dados que corroborando com MEINTJES e colaboradores (2008) que observou a associação entre TB/IRIS e a resposta de células específicas para antígenos *Mtb* em uma análise transversal, embora uma análise longitudinal revele que células T produtoras de IFN- $\gamma$  apresentam um padrão similar de expansão e contração em ambos os grupos (IRIS e não IRIS) ao longo do tempo (MEINTJES et al., 2008).

Esta exarcebação da resposta Th1 poderia ser explicada pela maior carga micobacteriana e por uma suscetibilidade adquirida em pacientes que desenvolveram IRIS. Esta suscetibilidade adquirida pode estar relacionada com perturbações na resposta imune inata que tem estado associada a IRIS, com elevada produção de IL-18 que é um potente estimulador da resposta Th1 e CXCL10 um bem conhecido quimioatrativo de células Th1 (revisto por SHANKAR et al., 2013).

Outra população de células T que tem sido investigada com um potencial papel na IRIS são as células Treg, as quais são críticas em manter a homeostasia das células T. Em estudo de MEINTJES e colaboradores (2008) não foi observado diferença entre os grupos TB-IRIS e não IRIS e um resultado similar foi encontrado por ANTONELLI e colaboradores (2010).

Durante a IRIS ocorre uma produção aguda de citocinas e quimiocinas de perfil Th1 e pró inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IP-10 e MIG. Além de TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, RANTES e MCP-1, sendo nenhuma citocina de perfil Th2 identificada (BOURGARIT et al., 2006). Foi observado uma excessiva restauração da resposta Th1 específica frente ao antígeno PPD, sem balanço Th2, ocorrendo assim, aumento das lesões do granuloma que foi associado com uma liberação aguda de citocinas pró inflamatórias não-específicas e quimiocinas, induzindo assim, uma síndrome inflamatória sistêmica (BOURGARIT et al., 2006). Estes dados sugerem não haver um balanço da resposta de célula T durante a IRIS.

Alguns marcadores vêm sendo indicados como preditores para IRIS, como os níveis de degranulação de células NK em pacientes coinfectados após a iniciação de HAART (PEAN et al., 2012), aumento plasmático de citocina IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17, IL-18 e IL-22 (STONE et al., 2002, revisto por LAI et al., 2013), assim como, aumento da frequência de polimorfismo de nucleotídeo único em TNFA-1031\*, SLC11A1 D543\*G, IL18-607\*G e em VDR FokI (F/f)\*T (AFFANDI et al., 2013).

Os fatores de risco, tais como a carga de antígeno e contagem de células T CD4<sup>+</sup>, tem sido associados com a IRIS, embora biomarcadores preditivos ainda estejam por ser identificados. De fato, a incidência de IRIS descrita na literatura varia de 11-39% em diferentes populações (SILVA et al., 2013; PEAN et al., 2012; BOURGARIT et al., 2006; HADDOW et al., 2011; SERRA et al., 2007), tanto com *backgrounds* genéticos distintos, como com características clínicas e epidemiológicas próprias. Isso gera uma limitação no que concerne ao tamanho amostral e dificulta a identificação de biomarcadores de prognóstico. Além disso, existem muitos estudos que têm melhorado nossa compreensão da patogênese da IRIS e é evidente que a conectividade entre a resposta inata e adaptativa está envolvida neste processo. Várias evidências sugerem que a IRIS surge como resultado de mudanças rápidas na resposta inata com consequente influência sobre a resposta adquirida.

## 2- Justificativa

A infecção por HIV-1 leva a uma profunda desregulação imunológica, com a depleção da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo o seu marcador principal. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenham um importante papel no estabelecimento do controle viral logo após a fase aguda da infecção (CHAKRABARTI; SIMON, 2010). Os pacientes infectados com HIV-1 apresentam ativação celular é reduzida após a introdução da HAART (ZHANG et al., 2006). A literatura cita as citocinas como mediadoras em um número importante de funções imunomoduladoras que atuam na patogênese da infecção por HIV-1, como por exemplo, o IFN- $\gamma$  que é uma citocina antiviral com funções estimulatórias e inibitórias sobre a replicação do HIV-1. O TNF associado à patogênese, é encontrado em infecções crônicas e agudas causadas pelo vírus, e, a IL-4 e IL-2, que são antagônicas durante a progressão para aids, entre outras estudadas que também participam da resposta ao HIV-1 (TASCA et al., 2012; LAWN; BUTERA, 2001; SILVEIRA et al., 1997).

A infecção por HIV-1 causa uma imunossupressão que abre portas para que ocorram infecções oportunistas e uma das mais frequentes vem a ser a TB, causada pelo *Mtb* que, em associação ao HIV-1, causa um agravamento no *status* imunológico levando a um quadro de imunossupressão gravíssimo. Este quadro de imunossupressão vem a ser controlado/revertido com o uso de HAART combinado com o tratamento com tuberculostáticos.

Este restabelecimento do sistema imunitário após o início dos tratamentos está associado a uma rápida recuperação de células T CD4<sup>+</sup> e diminuição da carga viral que em alguns pacientes, pode levar à ocorrência da IRIS, que é uma reação inflamatória patológica (MEINTJES et al., 2008). Embora a patofisiologia da IRIS não esteja ainda totalmente elucidada, existem fortes evidências de que esta síndrome estaria associada com a restauração da resposta imune de linfócitos T aos antígenos micobacterianos, ou por recirculação ou proliferação de células de memória após a introdução da HAART e o controle da viremia plasmática (SHELBURNE et al., 2006).

O presente estudo está sendo conduzido com o intuito de avaliar a reconstituição imune em indivíduos com TB/HIV em tratamento para TB e aids, caracterizando as subpopulações de células T ativadas e o perfil de citocinas, cujos resultados já foram publicados (SILVA, et al., 2013), assim como a resposta imune aos antígenos do *Mtb*, e as subpopulações de células T *naive* e de memória. Este projeto encontra-se acoplado a

um ensaio clínico conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, intitulado “Estudo da eficácia, antirretroviral, tolerância e outras interações medicamentosas do análogo não nucleosídeo efavirenz associado a rifampicina no tratamento de pacientes com aids e TB” e justifica se pela possibilidade de gerar conhecimento sobre a dinâmica de reconstituição imune em pacientes HIV/TB ao longo da resposta aos tratamentos, assim discutir o papel de possíveis marcadores que possam ser preditivos de melhor evolução clínica e imunológica destes pacientes, assim como indicativos da ocorrência de IRIS.

### **3- Objetivo:**

#### **Geral**

Avaliar o perfil de reconstituição imunológica de indivíduos com TB/HIV em resposta ao tratamento para TB e HAART a fim de identificar marcadores que possam ser preditivos de melhor evolução clínica e imunológica.

#### **Específicos**

Avaliar a reconstituição imune, a ativação celular e o perfil de citocinas em pacientes TB/HIV submetidos às terapias para TB e HAART, estratificando os de acordo com o seu estado de imunossupressão no início do tratamento (frequência de células T CD4+  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> ou  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>) e pelo desenvolvimento ou não da “Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune” (IRIS).

Avaliar a resposta imune aos antígenos de *Mtb* na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e HAART ao longo do tempo, assim como de acordo com seu estado de imunossupressão no início do tratamento (frequência de células T CD4+  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> ou  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>) e pelo desenvolvimento ou não da IRIS.

Avaliar os fenótipos de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e a HAART ao longo do tempo, assim como de acordo com seu estado de imunossupressão no início do tratamento (frequência de células T CD4+  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> ou  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>).

## **4- Métodos**

### 4.1-Desenho do estudo

Prospectivo longitudinal em uma coorte de pacientes TB/HIV virgens de tratamento antirretroviral.

#### 4.1.1Casuística

O presente estudo é sub-projeto do estudo “Síndrome de reconstituição imune: avaliação da resposta imune em pacientes com TB em uso de HAART”, que está aninhado ao ensaio clínico “Estudo da eficácia, antirretroviral, tolerância e outras interações medicamentosas do análogo não nucleosídeo efavirenz associado a rifampicina no tratamento de pacientes com AIDS e tuberculose”, conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas sendo aprovado no IPEC com o CAE: 0017.0.009.000-03. O presente estudo “Avaliação do perfil de reconstituição imunológica de indivíduos HIV/TB submetidos a tratamento para tuberculose e Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) incluindo Efavirenz”, obteve o CAE 0052.0.009.000-10.

#### 4.1.2 Elegibilidade do estudo

##### 4.1.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes HIV+ virgens de tratamento antirretroviral, ter contagens de células TCD4 <350 cels/mm<sup>3</sup>, com diagnóstico recente de TB, com idade superior a 18 anos que aceitem participar do estudo e assinem um termo de consentimento livre e esclarecido.

##### 4.1.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes nos quais o diagnóstico de TB não for confirmado por prova terapêutica positiva ou cultura;

As gestantes (pela teratogenicidade do efavirenz);

Pacientes que apresentem provas de função hepática alteradas (> grau 2);

Todos os pacientes selecionados para este protocolo foram incluídos no estudo imunológico “Avaliação do perfil de reconstituição imunológica de indivíduos HIV/TB

submetidos a tratamento para tuberculose e Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) incluindo efavirenz”, entretanto ao final do estudo excluímos alguns voluntários de acordo com os critérios abaixo:

Pacientes que foram perdidos de acompanhamento, sendo estes os pacientes que não compareceram a ao menos 3 visitas

Pacientes que tiveram baixa adesão ao tratamento de TB e/ou para a HAART. Foram considerados pacientes com baixa adesão ao tratamento aqueles que não apresentavam redução da carga viral plasmática após a introdução da HAART e os que tiveram relato médico de que não estavam tomando a medicação para TB e/ou HIV.

### 4.1.3 Etapas do estudo

O estudo consiste da seleção de pacientes para um ensaio clínico randomizado (do qual selecionamos nossa casuística) provenientes do Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacterioses do IPEC, com suspeita de TB, em seguida diagnosticados e o tratamento iniciado. Após os 15 primeiros dias de tratamento para TB (dia -15 em relação ao início do tratamento antirretroviral) foi feita uma pré-seleção dos pacientes para o ensaio clínico onde foi confirmado o diagnóstico de TB, e avaliado as contagens de linfócitos T e a quantificação da carga viral do HIV-1. Após um mês de tratamento para TB os pacientes elegíveis foram randomizados e o tratamento antirretroviral (HAART) começou (2 INTR+1 INNTR) sendo o INNTR o efavirenz 600 ou 800mg (Dia 0) e o acompanhamento seguiu por um período de 6 meses. Durante o período de tratamento com HAART e o esquema tuberculostático (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) foram realizadas as consultas pós randomização (D0): Dia 30, Dia 60, Dia 90, Dia 120, Dia 150 (final do tratamento da TB) e Dia 180 (quando o tratamento da TB já terminou e o paciente está sob HAART). Durante essas visitas as amostras para o presente estudo foram coletadas e as células foram armazenadas. Consultas adicionais foram realizadas em caso de eventos adversos (incluindo-se a IRIS) ou aparecimento de doenças associadas ao HIV/aids.

Ao longo das visitas foram coletadas amostras de sangue para quantificação de linfócitos TCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como carga viral. Foram ainda realizadas genotipagens das amostras colhidas em D0 e em D180, neste caso para aquelas com carga viral >1000 cópias (dados não incluídos neste estudo). Em cada visita as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram criopreservadas, assim como as

amostras de plasma e sangue total para realização de experimentos descritos no projeto (ELISPOT, citometria de fluxo e quantificação de citocinas).

### 4.2 Metodologia dos procedimentos para avaliação da resposta imune

#### 4.2.1 Obtenção de amostras de sangue periférico e células mononucleares

A cada visita do estudo, foram coletados de todos os participantes 27 mL de sangue heparinizado estéril para obtenção de células mononucleares, e 12 mL de sangue-EDTA para os testes de carga viral e citometria de fluxo para as diferentes populações celulares. Alíquotas de sangue total e de plasma foram estocadas a -80°C, até o momento de uso neste projeto.

#### 4.2.2 Obtenção e criopreservação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As PBMC foram obtidas por gradiente de densidade, como se segue: a amostra de sangue foi adicionada ao Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma–Aldrich, USA) e centrifugada a 1.500 rpm (438G) por 30 min a temperatura de 22°C. O anel que se forma contendo os linfócitos foi coletado cuidadosamente e transferido para um tubo e adicionado solução salina, seguindo de centrifugação a 1.500 rpm (438G) por 10 min a 22°C. Após a lavagem fez-se a ressuspensão do sedimento (*pellet*) celular em 1,0mL de solução salina para contagem das células em corante azul de Tripán (Sigma–Aldrich, USA).

Para a criopreservação, as PBMC obtidas foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em meio para congelamento [10% de DMSO (Sigma–Aldrich, USA) e 90% soro fetal bovino (FBS-Gibco, Invitrogen, USA),] a uma concentração de  $10^7$  céls./tubo. Os criotubos contendo as células criopreservadas foram resfriados em um recipiente contendo isopropanol e levados à temperatura de -80° C *overnight* para posterior estocagem em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido.

Para o descongelamento, as células foram colocadas a 37°C em banho-maria, vertidas em meio com 10% FBS, lavadas por duas vezes em PBS, e os *pellets* obtidos ressuspensos em RPMI/10% FBS. A viabilidade das células foram avaliada através de contagem com corante azul de Tripán.

4.2.3 Fenotipagem de células T por citometria de fluxo.

Para análise dos fenótipos envolvidos foram utilizados PBMC e/ou sangue fresco por citometria de fluxo, usando métodos padrões, como a avaliação das populações CD4<sup>+</sup> APC, CD8<sup>+</sup> PE, CD3<sup>+</sup> FITC e CD45<sup>+</sup> PerCP (Multitest, Beckton-Dickson BD, San Diego, USA), e combinações adicionais de anticorpos que permitam avaliar diferentes populações celulares como mostra a tabela 1. As células foram analisadas em FACScalibur® (BD) equipado com os programas Multiset e CellQuest (BD) (demais marcações). Estas populações celulares foram avaliadas nos momentos D0, D30, D60, D90 e D180 do estudo.

Tabela 1 Caracterização dos fenótipos de acordo com marcador de superfície.

Populações	Anticorpos	
Células TCD4 PeCy5 e CD8 PeCy5	CD45RA FITC	CCR7 PE
<i>Naive</i>	+	+
Memória Efetora (ME)	-	-
Memória Central (MC)	-	+
Efectoras Altamente Diferenciadas (TEMRA)	+	-
Células T CD8 FITC	CD38 PE	HLA-DR PerCP
Ativadas	+	+
Ativadas	+	-
Células T CD3 FITC	HLA-DR PE	
Ativadas	+	

4.2.4 Determinação da carga viral plasmática

A quantificação do RNA viral foi feita a partir de 1 mL de plasma, em amostras colhidas em todas as visitas previstas no estudo, através da técnica b-DNA de amplificação de sinal (Versant HIV RNA 3.0 Assay, Siemens, Milano, Itália).

### 4.2.5 Ensaio de ELISPOT para quantificação de células secretoras de IFN- $\gamma$ em resposta a antígenos de *Mtb*.

Para avaliação da resposta imune aos antígenos de *Mtb* e HIV-1, utilizamos o ensaio de ELISPOT para IFN- $\gamma$  adaptado de (BOURGARIT et al., 2006). Para tal, utilizamos células mononucleares obtidas dos pacientes em todas as visitas incluídas no estudo. Como antígenos são utilizados a proteína purificada derivada de *Mtb* (PPD) (Statens Serum Institut-Denmark), ESAT-6 (Statens Serum Institut-Denmark) e 38KDa/CFP10 (dado pela Dra. Maria Helena Saad do IOC-FIOCRUZ/RJ) e como controle positivo a fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Para a realização destes experimentos foi utilizado PBMC de pacientes na concentração de  $10^5$  céls./poço estimulados com os antígenos e seguindo a técnica recomendada pelo fabricante (Diaclone, France). Os *spots* foram contados utilizando um leitor de ELISPOT (CTL Analyzers LLC, Cellular Technology). O número específico de células T respondedoras, expresso como *spot-forming cells* (SFC)/ $10^6$ , foi calculado após subtração dos valores do controle negativo. Foram considerados respondedores para os antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10, os indivíduos com  $\geq 50$  spots/ $10^6$  células.

### 4.2.6 Dosagem de biomarcadores solúveis no plasma

A fim de avaliar a resposta de citocinas pró e anti-inflamatórias, as amostras plasmáticas foram dosadas pela técnica de CBA (Cytometric Bead Array). Foram selecionadas para análise inicial as citocinas IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, IL-10 e TNF através de kit comercial (CBA, BD™, San Jose.CA) que permitem caracterizar os perfis Th1(pró-inflamatória) e Th2 (anti-inflamatório).

### 4.3 Plano de Análise

Os indivíduos incluídos no estudo foram avaliados ao longo das visitas após a introdução da HAART. Os mesmos foram distribuídos em dois grupos de acordo com as contagem de células T CD4<sup>+</sup> no início da HAART, sendo o grupo de pacientes com contagens de células TCD4  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> e grupo de pacientes com contagens de células TCD4  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup> e, por fim, de acordo com a ocorrência ou não de IRIS. As análises foram realizadas utilizando testes paramétricos e não paramétricos no programa estatístico SPSS e os gráficos o programa Graphpad prisma 5.0. A avaliação

longitudinal foi analisada utilizando o teste não-paramétrico pareado de Wilcoxon, comparando os valores de cada ponto de acompanhamento com o seu posterior no estudo. Já o teste de Mann-Whitney foi utilizado na comparação entre os grupos. Os testes paramétricos como testes t, Fisher e chi-quadrado foram também utilizados para variáveis categóricas. O P valor considerado significativo foi de  $P \leq 0,05$ . Os valores de P foram representados com 1-3 asteriscos de acordo com o grau de significância (\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  e \*\*\* $P \leq 0,001$ ).

### 4.3.1 Linhas de tendência

As trajetórias dos marcadores foram estimadas através de mínimos quadrados ordinários, utilizando o tempo (número da visita) como um *spline* cúbico e ajustando por diferentes variáveis de interesse, em formato de variáveis *dummy*. O ajuste foi replicado 500 vezes com o método *bootstrap*, tratando tanto as variáveis de interesse como o tempo como aleatórias. As amostras são selecionadas conjuntamente por meio do tempo, da variável de interesse e o vetor resposta, para desta forma obter distribuições incondicionais.

A amostragem do *bootstrap* baseou-se em amostras com reposição retiradas a partir das variáveis de interesse, ao invés de por indivíduo, o que garante que esta mesma amostra estará representada por pelo menos um indivíduo dentro de cada categoria da variável de interesse. Esta amostragem por categoria da variável de interesse capta qualquer estrutura de correlação que possa haver dentro de cada categoria, assim os limites de confiança são corrigidos pela correlação intra-categorias/grupos. Dentro de determinadas condições dos dados, a estimativa de mínimos quadrados ordinários irá obter resultados robustos e eficientes.

### 4.3.2 Modelos Longitudinais

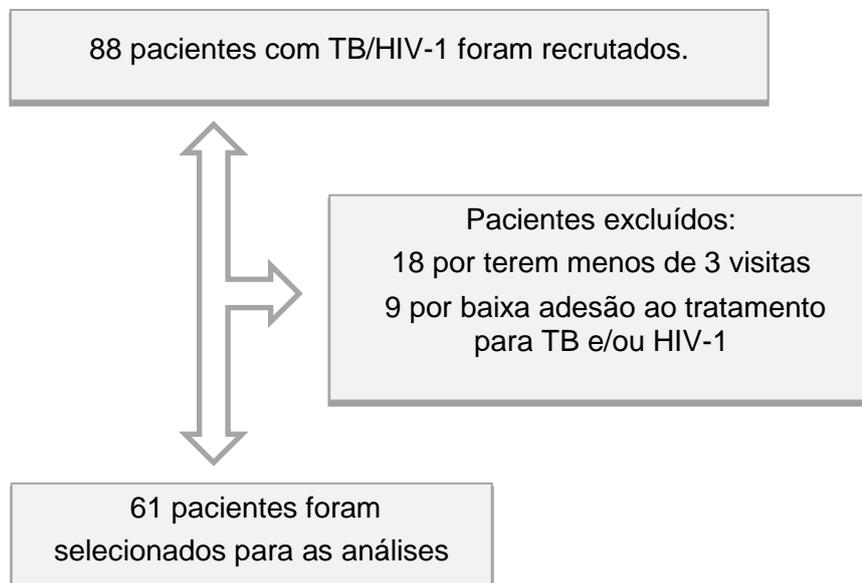
Modelos longitudinais são aqueles em que as diversas variáveis utilizadas para explicar determinado fenômeno são medidas para os mesmos indivíduos em, pelo menos, dois pontos distintos do tempo, permitindo assim analisar a mudança temporal de comportamento. Este modelo longitudinal foi adaptado com ajuste na forma estrutural, transformando a variável dependente em log natural (modelo log-linear). Também foi modelada a estrutura de correlação intra-pacientes e a estrutura de autocorrelação temporal individualmente, supondo um AR (1). Para encontrar o modelo

mais adequado, foram incluídas simultaneamente as variáveis de interesse: Contagem de células TCD4<sup>+</sup> no início do tratamento, carga viral, forma clínica, sexo, idade, raça, dosagem do efavirenz, ativação celular (% CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> e % CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>), IFN- $\gamma$  plasmático e ocorrência de IRIS. Em seguida, a medida em que algumas variáveis se mostraram estatisticamente não significativas, foram uma a uma retiradas, até que no fim deste processo somente restassem variáveis significativas.

## 5 - Resultados

Foram recrutados para o estudo um total de 88 pacientes com TB e infectados por HIV-1, no período de 2006 a 2012. A figura 4 apresenta o fluxograma evidenciando as exclusões que ocorreram durante o estudo. Ao final, foram analisados 61 pacientes cujos dados clínicos, demográficos e laboratoriais estão apresentados na tabela 2.

Figura 4- Fluxograma descritivo dos pacientes recrutados e os motivos de descontinuação no estudo



Foi observado que a maioria dos pacientes era do sexo masculino e a proporção de TB disseminada e pulmonar era semelhante (Tabela 2). A mediana de células T CD4<sup>+</sup> antes da introdução da HAART era de 98 céls/mm<sup>3</sup> e carga viral de 5,14 log<sub>10</sub> cópias/mL, respectivamente, embora tenha sido observado um maior número de pacientes (67%) imunossuprimidos graves (CD4 <200 céls/mm<sup>3</sup>). Nesta casuística, sete pacientes (11%) vieram a desenvolver IRIS e, a síndrome desenvolveu-se em um tempo mediano de 59 dias (IQR 27-89) após a introdução da HAART.

Todos os pacientes deste estudo foram tratados com doses distintas de efavirenz (600 ou 800mg/dia) e dois análogos do nucleosídeo/nucleotídeo durante todo o estudo.

Apesar da diferença no tratamento, não foram observadas diferenças imunológicas e virológicas nas análises realizadas, de modo que esses dados foram tratados como um único grupo, independente da dose utilizada.

Tabela 2- Dados demográficos, clínicos imunológicos e virológicos de pacientes com diagnóstico de TB infectados pelo HIV no IPEC Fiocruz

Características	Pacientes (n= 61)
Idade (anos), média	37
Sexo, n (%)	
Feminino	12 (20)
Masculino	49 (80)
Forma clínica, n (%)	
Pulmonar	27 (44)
Disseminada	29 (48)
Extrapulmonar	5 (8)
Diagnóstico de tuberculose n (%)	
Cultura positiva	39 (63)
Critério Histopatológico	5 (9)
Critério Clínico	17 (28)
Dosagens efavirenz, n (%)	
600 mg	28 (46)
800 mg	33 (54)
IRIS, n (%)	
Sim	7 (11)
Não	54 (89)
CD4 céls/mm <sup>3</sup> , n (%)	
<200	41 (67)
≥200	20 (33)
CD4 céls/mm <sup>3</sup> (mediana e IQR)	98 (35-235)
<200	51 (30-100,5)
≥200	275,5 (234,2-361,7)
Carga Viral (log <sub>10</sub> copias/ml), mediana (IQR)	5,14 (4,48-5,51)

n= número de casos, IRIS= síndrome inflamatória da reconstituição imune, CD4 céls/mm<sup>3</sup> = contagens de linfócitos TCD4 céls/mm<sup>3</sup>, IQR= interquartil

### **5.1 Reconstituição imune, ativação celular e perfil de citocinas em pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e a HAART**

A reconstituição imunológica, caracterizada pela dinâmica das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, ativação celular e o perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias em resposta ao tratamento para a TB e a HAART, assim como a comparação destes parâmetros nos pacientes com células T CD4<sup>+</sup> <200/mm<sup>3</sup> e ≥200/mm<sup>3</sup> no início do estudo e com ou sem o quadro de IRIS, deram origem ao trabalho: “T cell activation and cytokine profile of tuberculosis and HIV-positive individuals during antituberculous treatment and efavirenz based regimens” (Anexo 1).

A análise dos dados de CD4<sup>+</sup>, carga viral, ativação celular e dosagem de citocinas no início do estudo e ao longo do tratamento não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os casos de IRIS e não-IRIS. Por conseguinte, os casos de IRIS foram incluídos no conjunto da casuística analisada.

Os valores medianos dos marcadores imunológicos e de carga viral obtidos dos pacientes selecionados ao longo do tratamento estão apresentados na tabela 3, onde é possível observar um aumento significativo nas contagens de células T CD4<sup>+</sup> e diminuição da carga viral após 30 dias de HAART, efeito este que se manteve ao longo do tratamento.

Nestes pacientes foi possível observar que ocorre um incremento das contagens de células TCD4<sup>+</sup> ao final do primeiro mês. Esse incremento com 30 dias de HAART não se sustenta nos meses subsequentes, ocorrendo uma redução significativa de ganho após o intervalo de 30 a 90 dias de terapia (Figura 5).

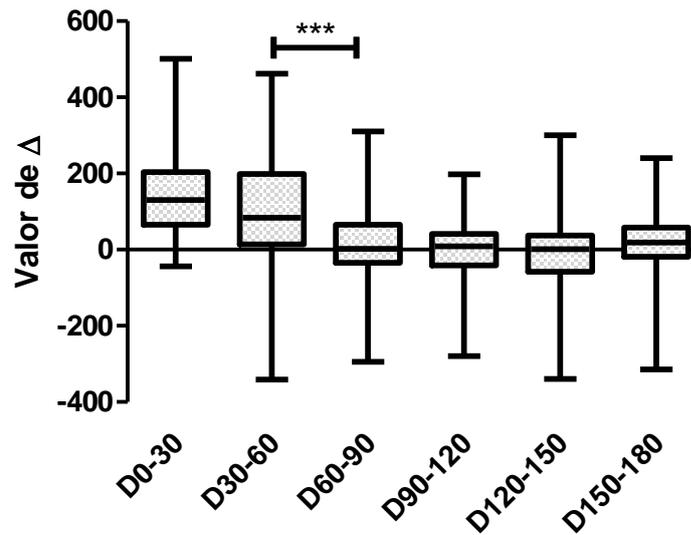


Figura 5- Representação gráfica do ganho de células T CD4<sup>+</sup> em pacientes infectados por *Mtb* e HIV-1 ao longo das terapias. O gráfico box-plot mostra a variação (valor de  $\Delta$ ) de células TCD4<sup>+</sup> entre as visitas de acompanhamento. Os valores de  $\Delta$  positivos refletem um incremento e os valores negativos refletem um decréscimo no ganho de células TCD4<sup>+</sup>. A linha horizontal marca o valor de  $\Delta$  zero. Os box-plots são representados pela mediana e seus interquartis (25-75%). \*P $\leq$ 0,05, \*\*P $\leq$ 0,01 e \*\*\*P $\leq$ 0,001. Foi utilizado o teste estatístico Wilcoxon na comparação entre as visitas D0-D30, D30-D60, D60-D90 e D90-D180.

Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados, expressando a moléculas CD38<sup>+</sup> e os linfócitos T totais CD3<sup>+</sup> expressando HLA-DR<sup>+</sup> verificamos uma alta frequência no sangue periférico nas amostras obtidas no início do estudo com uma redução ao longo do tratamento. Quanto às citocinas não observamos um perfil predominante entre as de natureza anti- e pró inflamatórias, com exceção do IFN- $\gamma$  que apresentou uma redução significativa ao longo do tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 Dados imunológicos e virológicos de pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados pelo HIV-1 ao longo dos tratamentos.

Variável	Acompanhamento em dias após a introdução da HAART				
	0	30	60	90	180
Céls T CD4 <sup>+</sup>	112 (46-236)	245 (151-452)	264 (151-403)	287 (144-478)	291 (167-439)
Carga viral HIV-1	5,0 (4,4-5,5)	2,2 (1,8-2,7)	1,7 (1,7-1,8)	1,7 (1,7-1,7)	1,7 (1,7-1,7)
CD3 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	39,6 (28-60)	45 (29-62)	42 (28-57)	29 (20-59)	24 (16-38)
CD8 <sup>+</sup> /CD38	90 (79-97)	86 (72-92)	85 (75-94)	77 (62-89)	70 (50-80)
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	1,9 (0,0-10,1)	2,0 (0,0-11,8)	1,1 (0,0-7,7)	0,25 (0,0-5,4)	0,01 (0,0-5,3)
TNF (pg/mL)	2,2 (0,0-3,1)	2,3 (0,0-3,2)	2,2 (0,0-3,1)	2,2 (0,0-2,9)	2,4 (0,5-3,4)
IL-2 (pg/mL)	10,8 (8,0-12,6)	10,7 (8,3-14,8)	10,8 (8,6-14,3)	10,7 (8,5-12,2)	10,8 (9,0-13,5)
IL-6 (pg/mL)	4,3 (1,5-9,4)	5,2 (2,6-12,7)	3,6 (1,7-6,5)	2,5 (0,8-5,0)	3 (1,3-5,0)
IL-10 (pg/mL)	2,6 (0,3-6,0)	2,9 (0,5-7,0)	2,4 (0,8-4,9)	2,0 (0,4-3,7)	2,5 (1,4-3,9)
IL-4 (pg/mL)	4,3 (1,4-8,5)	5,1 (2,1-9,0)	5,9 (1,6-8,0)	4,8 (0,7-8,7)	3,3 (0,3-8,9)

Valores são expressos em mediana e seus Interquartis (IQR); contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> céls/mm<sup>3</sup> (céls T CD4<sup>+</sup>); Carga viral HIV-1 - log<sub>10</sub> cópias/ml (Carga viral HIV-1); % de molécula de HLA-DR<sup>+</sup> em células T CD3<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>); % de moléculas de CD38<sup>+</sup> em células TCD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>); IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma; TNF: Tumor necrosis factor-alpha; IL: Interleucina.

Os dados obtidos dos pacientes foram analisados ao longo do tratamento para TB e HAART através de curvas de tendência, onde as trajetórias dos marcadores biológicos e imunológicos estão representadas na Figura 6.

A curva de tendência de células TCD4<sup>+</sup> apresenta um aumento exponencial, enquanto que a de carga viral um decréscimo nos primeiros trinta dias de tratamento, que se mantém ao longo do tempo (Figura 6A-B). Para os marcadores de ativação CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> é possível observar um decréscimo mais discreto ao longo do tempo (Figura 6C-D). Já as dosagens de citocinas apresentam perfis variados, onde aparentemente as curvas mostram uma redução de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, aumento de IL-4 e ausência de alteração para TNF e IL-2 plasmáticos ao longo do tratamento (Figura 6E-J).

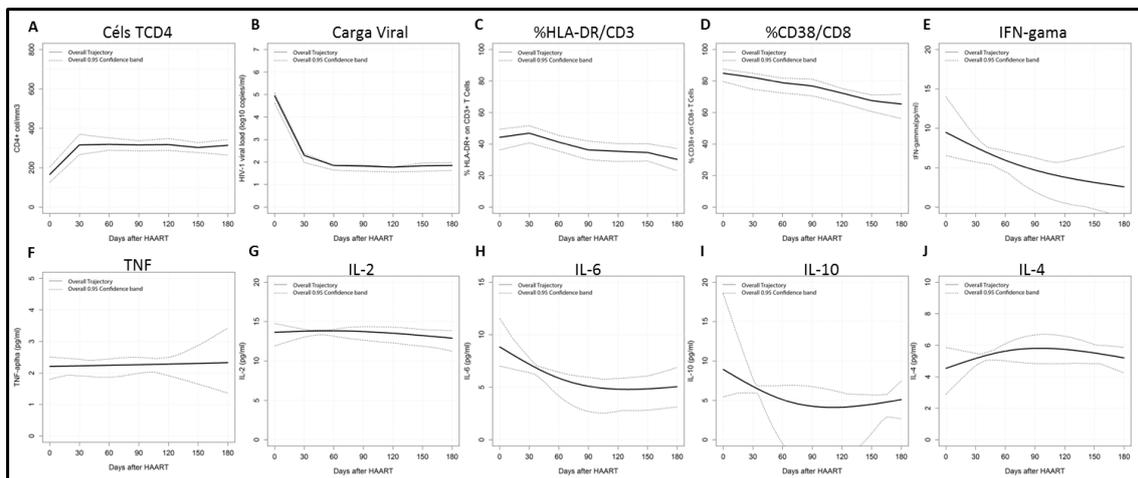


Figura 6- Gráfico representativo da trajetória de marcadores imunológicos e virológicos em pacientes com TB/HIV ao longo do tratamento para TB e HAART. (A) Contagem de células TCD4<sup>+</sup>; (B) Carga viral; (C) % de molécula de HLA-DR<sup>+</sup> em células T CD3<sup>+</sup>; (D) % de moléculas de CD38<sup>+</sup> em células TCD8<sup>+</sup>; (E) IFN- $\gamma$ ; (F) TNF, (G) IL-2, (H) IL-6, (I) IL-10 e (J) IL-4.

Para uma avaliação mais acurada do perfil de ativação celular, usamos adicionalmente a concomitância de marcação das moléculas CD38<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> para análise de um subconjunto de pacientes incluídos no estudo. Nestes, verificamos que os níveis de ativação são elevados reduzindo após a introdução da HAART (Figura 7), conforme observado quando as populações celulares expressando isoladamente estes marcadores foram analisadas.

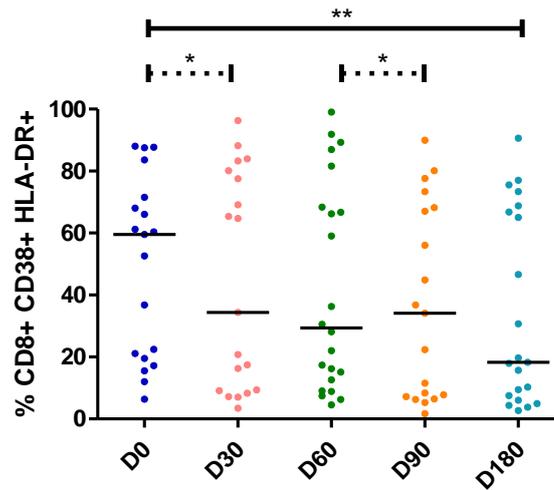


Figura 7- Perfil de ativação de células T CD8+ em pacientes TB/HIV. As linhas horizontais representam os valores medianos\*P≤0,05 e \*\*P≤0,01. Wilcoxon foi usado como teste estatístico entre as visitas D0-D30, D30-D60, D60-D90, D90-D180 e D0-180.

A fim de avaliar se o estado de imunossupressão antes da introdução da HAART teria impacto sobre o perfil de ativação imune e de citocinas plasmáticas, os pacientes foram divididos de acordo com a contagem de células T CD4<sup>+</sup> antes da introdução da HAART: <200 céls/mm<sup>3</sup> e ≥200 céls/mm<sup>3</sup>. A análise comparativa dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais entre os dois grupos está apresentada na Tabela 4. Exceto para as contagens de células T CD4<sup>+</sup>, carga viral e IFN-γ plasmático, nenhum outro parâmetro apresentou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4 Características demográficas, clínicas, imunológicas e virológicas de pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados por HIV distribuídas de acordo com as contagens de células T CD4+ no início do estudo.

Características	CD4<200 céls/mm <sup>3</sup> (N=33)	CD4≥200 céls/mm <sup>3</sup> (N=21)	P valor*
Idade (anos), mediana (IQR)	38 (32-43)	35 (31-40)	0,43 <sup>a</sup>
Sexo, n (%)			
Masculino	26 (79)	16 (76)	0,54 <sup>b</sup>
Feminino	7 (21)	5 (24)	
Forma clínica, n (%)			
Pulmonar	14 (43)	10 (48)	0,78 <sup>c</sup>
Disseminada	17 (51)	9 (43)	
Extrapulmonar	2 (6)	2 (9)	
Diagnóstico de tuberculose n (%)			
Cultura positiva	22 (67)	13 (62)	0,47 <sup>c</sup>
Critério Histopatológico	4 (12)	1 (5)	
Critério Clínico	7 (21)	7 (33)	
IRIS, n (%)			
Sim	5 (15)	1 (4)	0,24 <sup>b</sup>
Não	28 (85)	20 (96)	
Dosagens efavirenz, n (%)			
600mg	16 (48)	11 (52)	0,46 <sup>b</sup>
800mg	17 (52)	10 (48)	
CD4 céls/mm <sup>3</sup> (mediana e IQR)	55 (33-104)	262 (231-389)	0,00 <sup>a</sup>
Carga Viral (log <sub>10</sub> copias/ml), mediana (IQR)	5,2 (4,8-5,7)	4,8 (4,1-5,2)	0,01 <sup>a</sup>
HLA-DR <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> mediana (IQR)	39,6 (29,7-62,8)	38,5 (21,1-55)	0,33 <sup>a</sup>
CD38 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> mediana (IQR)	89,3 (79-97,8)	87,7 (70,5-90,4)	0,09 <sup>a</sup>
IFN-γ mediana (IQR)	2,4 (0-16)	0 (0-5,2)	0,01 <sup>a</sup>
TNF mediana (IQR)	1,4 (0-3,1)	2,5 (1,9-3)	0,22 <sup>a</sup>
IL-2 mediana (IQR)	10,9 (7,9-17,9)	10,6 (10-11)	0,75 <sup>a</sup>
IL-6 mediana (IQR)	5,7 (0-12,3)	3,8 (2,5-5,3)	0,29 <sup>a</sup>
IL-10 mediana (IQR)	3,8 (0-11,7)	2,2 (1,8-4,9)	0,66 <sup>a</sup>
IL-4 mediana (IQR)	4,3 (2,3-7,8)	6,1 (0,2-9,2)	0,78 <sup>a</sup>

N=número de casos; IQR= Interquartis; IRIS= Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune; CD4<sup>+</sup>céls/mm<sup>3</sup> =contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup>céls/mm<sup>3</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> = % de molécula de HLA-DR<sup>+</sup> em células T CD3<sup>+</sup>; CD38<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> = % de moléculas de CD38<sup>+</sup> em células TCD8<sup>+</sup>; IFN-γ= Interferon-gama; TNF = Fator de Necrose Tumoral -alpha; IL: Interleucina  
Testes de Mann Whitney<sup>a</sup>, exato de Fisher's<sup>b</sup> e Chi-quadrado<sup>c</sup>.

Foi observado que após a introdução da HAART os pacientes apresentam um aumento nas contagens de células TCD4<sup>+</sup> na visita de 30 dias de acompanhamento, mas que a mesma proporção de ganho não se mantém ao longo do tratamento. Entretanto, quando analisado o ganho destas células entre os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < ou ≥ 200 céls/mm<sup>3</sup> é possível observar que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> reduz significativamente o ganho de células após 30 dias de HAART, enquanto que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> ≥200 céls/mm<sup>3</sup> incrementa significativamente este ganho até 60 dias de HAART (Figura 8 A-B).

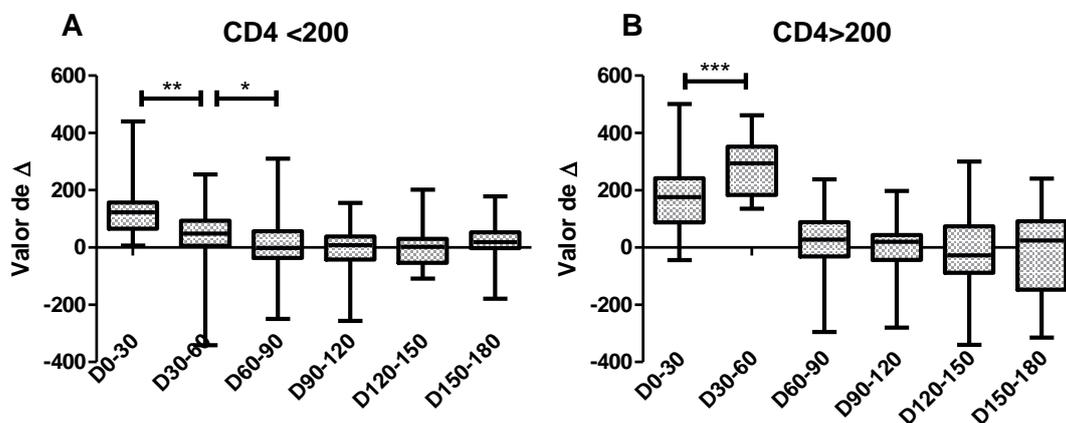


Figura 8- Representação gráfica do ganho de células TCD4<sup>+</sup> em pacientes com contagens iniciais de células TCD4<sup>+</sup> < e ≥ 200 céls/mm<sup>3</sup> acompanhados ao longo dos tratamentos. Os gráficos box-plot mostram a variação (valor de Δ) das células TCD4<sup>+</sup> entre as visitas de acompanhamento nos pacientes com células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> (A) e ≥200 céls/mm<sup>3</sup> (B). Os valores de Δ positivos refletem um incremento e os valores negativos refletem um decréscimo no ganho de células T CD4<sup>+</sup>. A linha horizontal marca o valor de Δ zero. Os box-plots são representados pela mediana e seus interquartis (25-75%). \*P≤0,05, \*\*P≤0,01 e \*\*\*P≤0,001. Foi utilizado o teste estatístico Wilcoxon na comparação entre as visitas D0-D30, D30-D60, D60-D90 e D90-D180.

Os perfis de ativação celular e de citocinas plasmáticas foram analisados ao longo do tempo para os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < ou ≥200 céls/mm<sup>3</sup> através das curvas de trajetória. Como é possível observar na figura 9, tanto a população de linfócitos TCD3<sup>+</sup> expressando a molécula de HLA-DR<sup>+</sup>, como a de linfócitos T CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> apresentam diferenças entres os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < ou ≥200 céls/mm<sup>3</sup> com 30 dias de uso da HAART, se igualando ao longo do tempo (Figura 9 A-B).

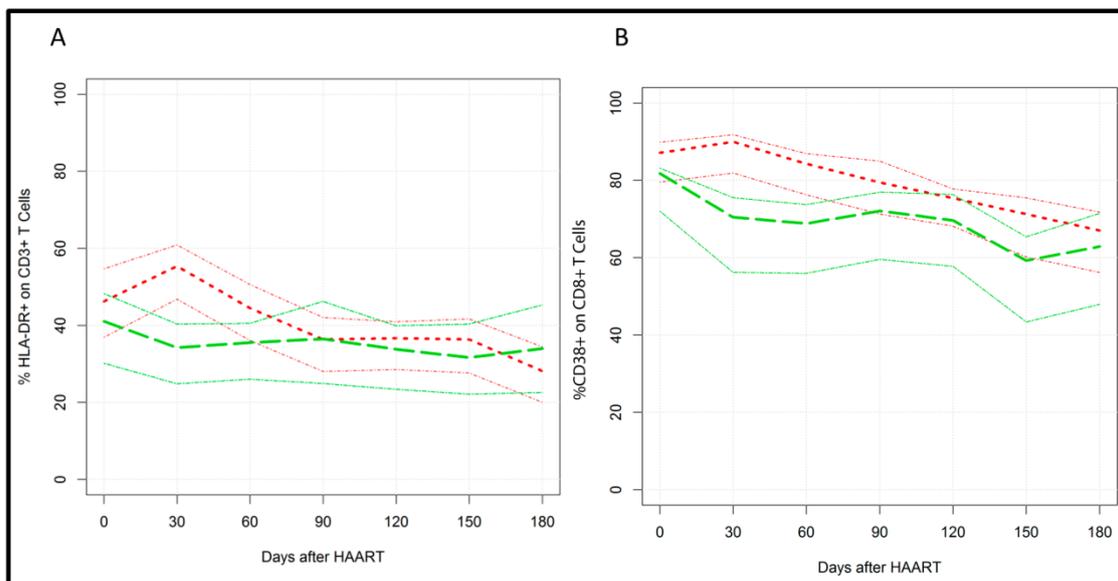


Figura 9- Representação gráfica da trajetória do perfil ativação imune em células T de pacientes com TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART, distribuídos de acordo com as contagens de células TCD4<sup>+</sup> (< e ≥ 200 céls/mm<sup>3</sup>). (A) % de da população de células TCD3<sup>+</sup> expressando HLA-DR<sup>+</sup>; (B) % de células TCD8<sup>+</sup> expressando a molécula CD38<sup>+</sup>. As trajetórias são representadas pela linha pontilhada vermelha para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4 <200 céls/mm<sup>3</sup> e linhas tracejadas em verde para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4 ≥200 céls/mm<sup>3</sup>. As linhas mais finas representam o intervalo de confiança de 95%.

A população avaliada de células T CD8<sup>+</sup> ativadas que apresentam na superfície as moléculas CD38<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup>, o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200cél/mm<sup>3</sup> mostra uma tendência geral de redução ao longo do tratamento [mediana 36,8 (IQR- 17-83,6) D0 vs mediana 18,1 (IQR- 8,9-68,4) D180; p 0,009], o mesmo não é observado para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> ≥200 células/mm<sup>3</sup> [mediana 60,4 (IQR-30-70,7) D0 vs mediana 30,7 (IQR-4,9-68,8) D180; p 0,078] (Figura 10).

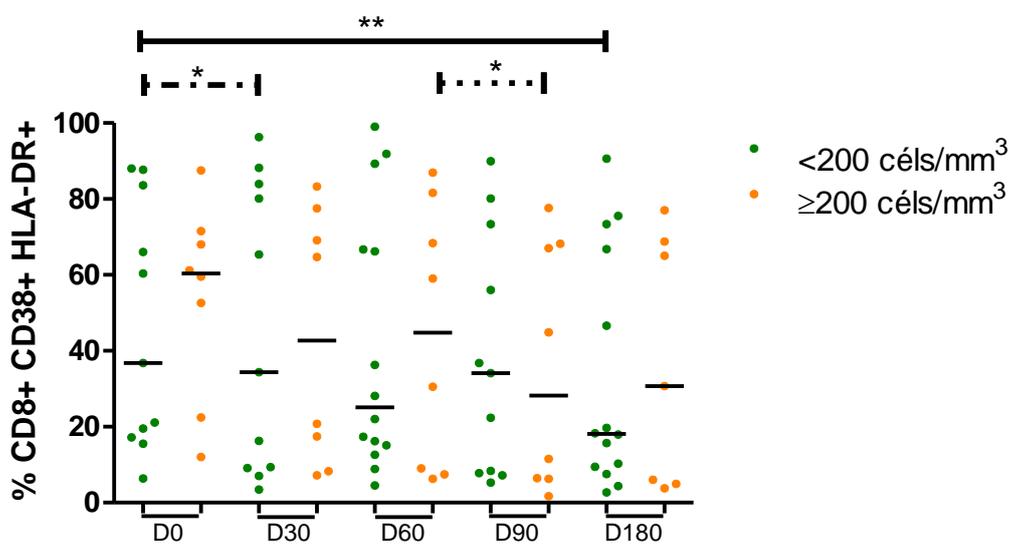


Figura 10- Perfil de ativação de células T CD8<sup>+</sup> marcadas com HLA-DR<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup> em grupo de pacientes com CD4<sup>+</sup> (<200 e ≥200cél/mm<sup>3</sup>) no início do estudo, acompanhados ao longo da terapia para tuberculose e HAART. Os pacientes com CD4<sup>+</sup> <200 células/mm<sup>3</sup> são representados pelas bolas verdes e os com CD4<sup>+</sup> ≥200 células/mm<sup>3</sup> pelas bolas laranja. As linhas horizontais representam os valores medianos. \*P≤0,05 e \*\*P≤0,01. Mann Whitney e Wilcoxon foram usados como teste.

As curvas de trajetória que ilustram o comportamento das citocinas plasmáticas não apontam de modo geral uma diferenciação entre os padrões anti ou pró-inflamatório entre os pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < e  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>. Maiores concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e IL-10 são observadas no grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> no início do estudo até pelo menos 30 dias após a introdução da HAART, tendo uma redução e se igualando ao grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> céls/mm<sup>3</sup> ao longo do tempo. O TNF e IL-4 não apresentam alteração entre os grupos (Figura 11 A-F).

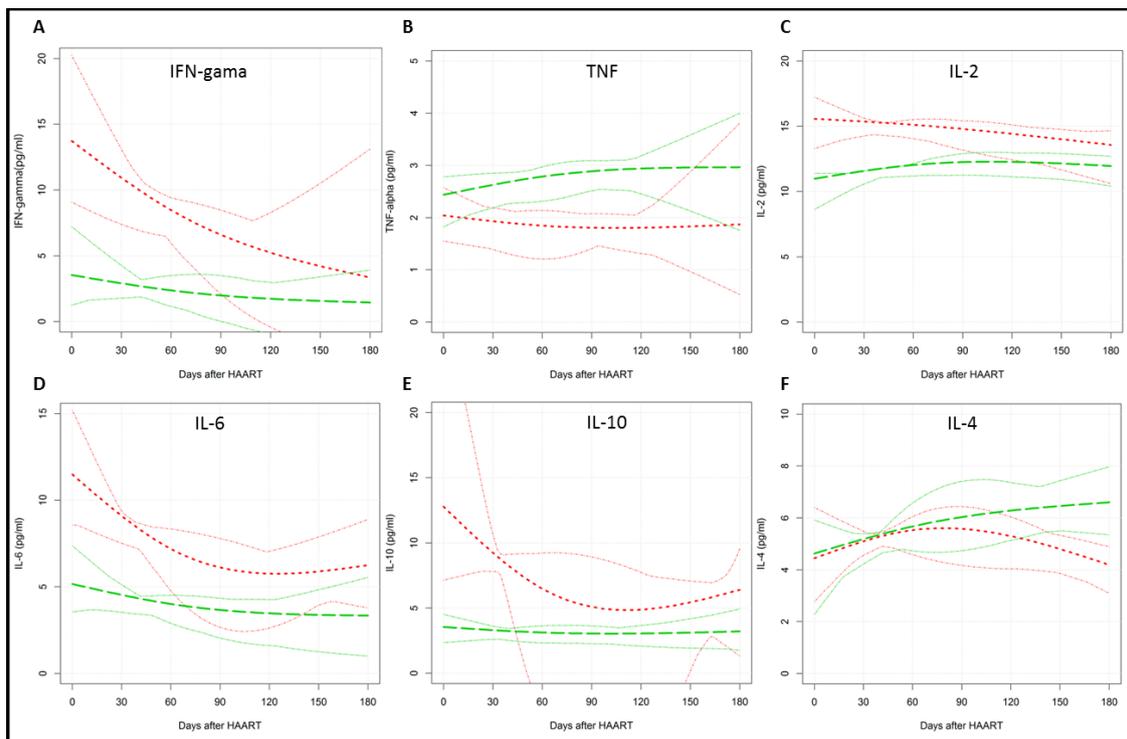


Figura 11- Representação gráfica da trajetória das citocinas anti e pró-inflamatórias em pacientes com TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART, distribuídas de acordo com as contagens de células TCD4<sup>+</sup> (< e  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>). (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-2, (D) IL-6, (E) IL-10 e (F) IL-4. As amostras de plasma foram testadas pelo teste *Cytometric Bead-Array* (CBA). A trajetória geral é representada pela linha pontilhada vermelha para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> e linhas tracejadas em verde para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>. As linhas finas representam o intervalo de confiança de 95%.

## 5.2 Avaliação da resposta imune aos antígenos de *Mtb* na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e HAART

No âmbito da avaliação da reconstituição imunológica dos pacientes TB/HIV em resposta ao tratamento aos dois agravos, foi possível analisar a resposta específica a antígenos do *Mtb* em 56 pacientes de nossa casuística, incluindo sete casos de IRIS. Para esta abordagem avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 do *Mtb* pelo teste de ELISPOT tanto para a magnitude de resposta como em relação a percentual de respondedores ao longo do tratamento.

No geral, verificamos que a produção de IFN- $\gamma$  apresenta aumento significativo frente aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP10 e a maior magnitude de resposta é observada nos primeiros 30 dias após a introdução da HAART. Observamos também uma redução significativa da resposta frente ao PPD e o ESAT-6 na visita de 180 dias pós HAART quando o tratamento da TB havia terminado (Figura 12 A-C).

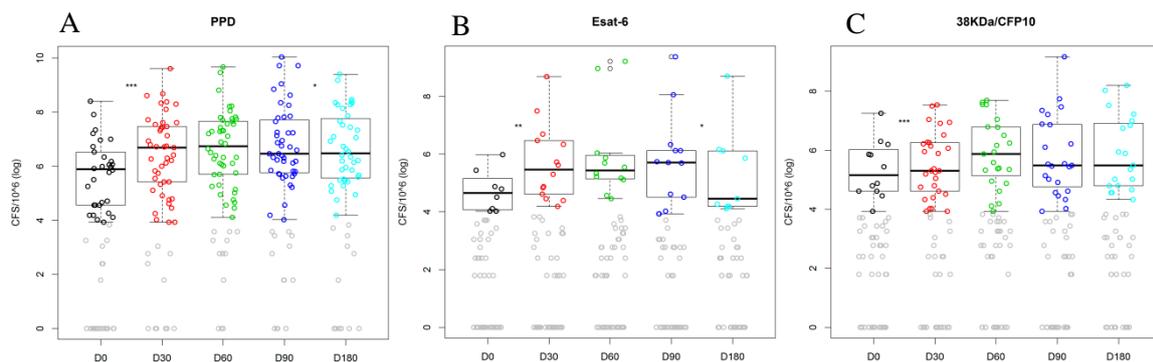


Figura 12- Células produtoras de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos de *Mtb* pelo ensaio de ELISPOT em pacientes TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART. (A) PPD, (B) ESAT-6 e (C) 38KDa/CFP-10. O resultado é expresso em células formadoras de spots (CFS), foram considerados respondedores para os antígeno indivíduos com  $\geq 50$  spots/ $10^6$  células. O gráfico é representado em  $\log$  onde os círculos coloridos representam a magnitude da resposta e os círculos cinza os não respondedores. As linhas horizontais representam os valores medianos. Wilcoxon foi usado como teste estatístico.

Quando avaliamos o percentual de indivíduos respondedores aos diferentes antígenos no início do estudo, antes da introdução da HAART, observamos que cerca de 59%, 13% e 21% eram capazes de responder, respectivamente, aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10. Apesar destas diferenças, verificamos um aumento significativo no número de indivíduos respondedores ao PPD e ao 38KDa/CFP-10 ( $p=0.0001$ ) 30 dias após a introdução da HAART (Figura 13). O percentual de respondedores ao PPD se manteve mais elevado do que aos demais antígenos ao longo do acompanhamento.

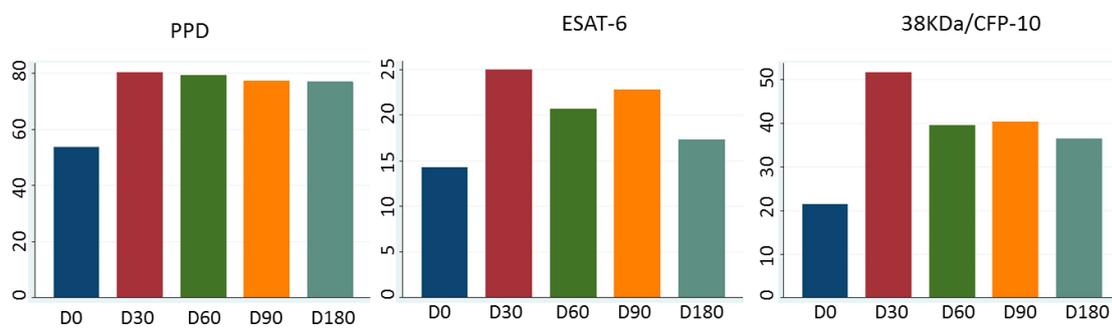


Figura 13- Ensaio de ELISPOT realizado em pacientes TB/HIV ao longo da terapia para TB e HAART. O resultado é expresso em percentual de indivíduos respondedores aos antígenos, PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 e foram considerados respondedores aqueles indivíduos com  $\geq 50$  spots/ $10^6$  células.

Com intuito de avaliar se o estado de imunossupressão inicial teria impacto sobre a resposta imune aos antígenos de *Mtb*, os pacientes foram distribuídos de acordo com a contagem basal absoluta de células T CD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> e ≥200 céls/mm<sup>3</sup> e os resultados da resposta de produção de IFN-γ por ELISPOT frente aos três antígenos foram avaliados ao longo do tempo através das curvas de trajetória (Figura 14). Com base nesta análise foi possível observar que não houve diferença entre as trajetórias de resposta aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 entre os dois grupos, embora a curva correspondente ao grupo <200 céls/mm<sup>3</sup> apresente um incremento mais acentuado de resposta aos antígenos pós a introdução da HAART e consequente aumento de células TCD4<sup>+</sup>.

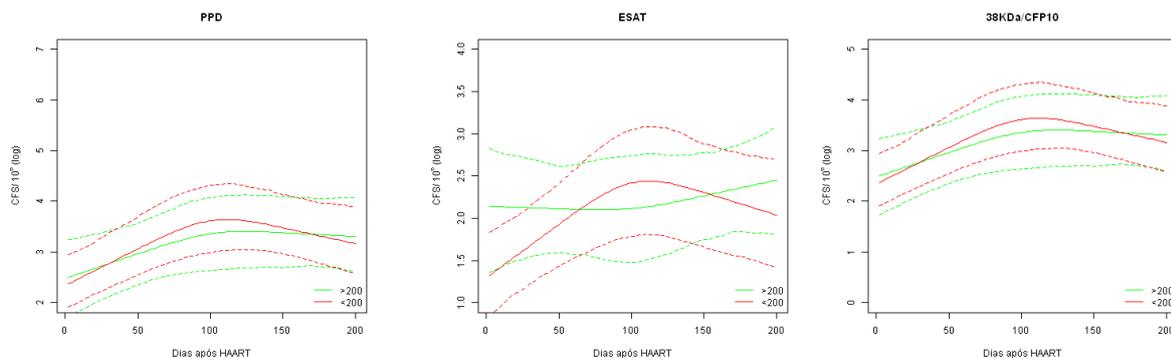


Figura 14- Células produtoras de IFN-γ em resposta aos antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10 pelo ensaio de ELISPOT em pacientes com TB/HIV ao longo das terapias, distribuídas de acordo com as contagens de células TCD4<sup>+</sup> (< e ≥ 200 céls/mm<sup>3</sup>) no início do estudo. Os resultados são expressos em células formadoras de spots (CFS) e distribuídos por log. A trajetória geral está representada pela linha vermelha para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> e linhas em verde para o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> ≥200 céls/mm<sup>3</sup>. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95%.

Da mesma forma, os pacientes que apresentaram um quadro de IRIS ao longo do tratamento e os sem ocorrência de IRIS foram avaliados quanto à produção de IFN-γ frente aos antígenos de *Mtb* no início do tratamento e ao longo do acompanhamento. Entre os sete pacientes classificados como IRIS, observamos resposta para o PPD (n=5), ESAT-6 (n=1) e 38KDa/CFP10 (n=1) antes da introdução da HAART. Enquanto que para o PPD e o 38KDa/CFP10 observamos um incremento para 7 e 6 , respectivamente,

no número de respondedores ao longo do tempo, o número de pacientes respondedores ao ESAT-6 não foi alterado em função da melhora no *status* imunológico deste pacientes. A Figura 15 apresenta as curvas de trajetória de resposta aos antígenos PPD e 38KDa/CFP10 comparando o grupo de IRIS com não-IRIS. Não houve diferença quanto à resposta a estes antígenos entre os dois grupos no início do tratamento, entretanto é observado que as curvas deixam de se sobrepor ao longo do tratamento, indicando uma maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  nos pacientes com IRIS ao longo da terapia. Não foi possível avaliar a resposta dos pacientes frente ao antígeno ESAT-6 posto que apenas um paciente dos que desenvolveram IRIS respondeu a este antígeno.

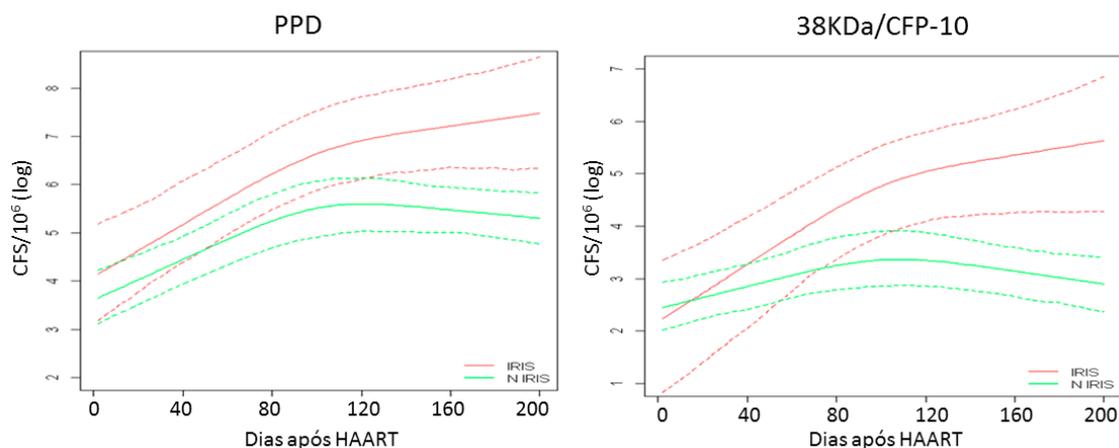


Figura 15- Células produtoras de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos PPD e 38KDa/CFP-10 pelo ensaio de ELISPOT em pacientes com TB/HIV ao longo das terapias, distribuídas de acordo com IRIS e Não IRIS. Os resultados são expressos em células formadoras de *spots* (CFS) e distribuídos por log. A trajetória geral está representada pela linha vermelha para o grupo IRIS e linhas em verde para o grupo não IRIS. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95%.

Para determinar os fatores que poderiam estar associados à resposta de produção de IFN- $\gamma$  frente aos estímulos antigênicos (PPD e 38KDa/CFP-10) ao longo do tempo foi realizada uma análise multivariada incluindo as variáveis; contagem de células TCD4<sup>+</sup> no início do tratamento, carga viral, forma clínica, sexo, idade, raça, dosagem do efavirenz, ativação celular (% CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> e % CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>), IFN- $\gamma$  plasmático e ocorrência de IRIS. O modelo mostrou que as contagens de células T CD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup>, a carga viral e o percentual das moléculas CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> influenciam a produção de IFN- $\gamma$  frente ao antígeno 38KDa/CFP-10 (Tabela 5). Entretanto, nenhuma variável se mostrou associada à produção de IFN- $\gamma$  frente ao antígeno PPD (dados não mostrados). Não foi possível realizar estas análises com o antígeno ESAT-6 devido ao pequeno número de respondedores.

Tabela 5 Análise multivariada de fatores associados com a resposta de produção de IFN- $\gamma$  frente a estimulação antigênica em pacientes com TB/HIV ao longo do tratamento.

Produção de IFN- $\gamma$ frente a estimulação antigênica		
Variáveis	38KDa/CFP10	
	Exponencial do coeficiente	P
Contagens de céls T CD4 (<200 céls/mm <sup>3</sup> )	4,021	0,013
Carga viral HIV-1 (log <sub>10</sub> copias/ml)	0,439	0,004
% Células T CD8 <sup>+</sup> /38 <sup>+</sup>	1,019	0,050
Não IRIS	1	
IRIS	4,056	0,107

% células TCD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>= % de moléculas de CD38<sup>+</sup> em células TCD8<sup>+</sup>; IRIS= síndrome inflamatória da reconstituição imune

### 5.3 Avaliação fenotípica das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na reconstituição imune de pacientes TB/HIV submetidos à terapia para TB e a HAART

No âmbito da avaliação da reconstituição imunológica dos pacientes TB/HIV em resposta ao tratamento aos dois agravos, foi possível avaliar o perfil funcional de subpopulações *naive*, memória central, memória efetora e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA), com base na expressão das moléculas CD45RA e CCR7 em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em amostras de PBMC de 22 pacientes incluídos no estudo. Um exemplo do tipo de análise realizada para as populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é apresentado na Figura 16.

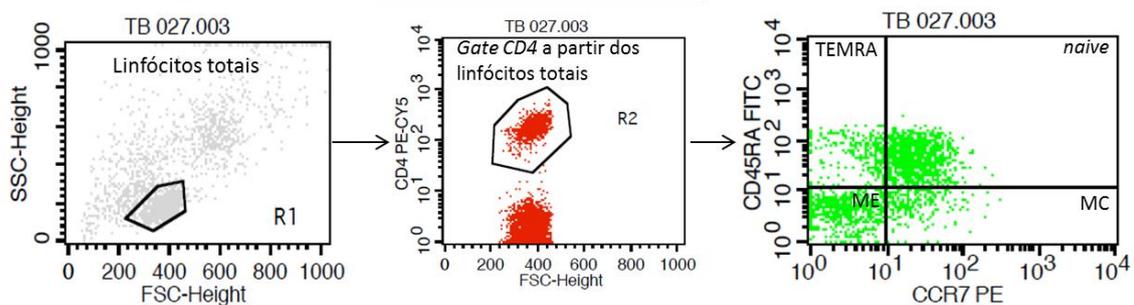


Figura 16- Dot Plots representativo das análises realizadas para determinação das populações de células *naive*, MC, ME e TEMRA expressando as moléculas CCR7 e CD45 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A região 1 (R1) representa a população de linfócitos totais e a região 2 (R2) representa a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup>. A partir da região 2 (R2) foram definidos os fenótipos celulares.

O perfil funcional das populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (*naive*, memória e TEMRA) em PBMC de pacientes coinfectados TB- /HIV-1 foi avaliado no início do estudo e nas visitas ao longo das terapias. A fim de avaliar se o estado de imunossupressão antes da introdução da HAART teria impacto sobre os fenótipos celulares, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a contagem de células T CD4<sup>+</sup> antes da introdução da HAART, pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < e  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup>.

Apesar da inversão CD4/CD8 (mediana-0,11; IQR 0,05-0,30), o fenótipo de células *naive* na população de células T CD4<sup>+</sup> foi mais elevada do que na população de células TCD8<sup>+</sup> (11,5 [IQR-2-28] vs 2,8 [IQR-0,4-10]; p= 0,04). Verificou-se, ainda, uma redução significativa na população de células TCD8<sup>+</sup> *naive* após 30 dias da HAART, enquanto que não houve alteração nos percentis das células TCD4<sup>+</sup> *naive* ao longo dos tratamentos (Tabela 6). Comparando os dois grupos de acordo com o estado de imunossupressão, verificamos que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200céls/mm<sup>3</sup> apresentou porcentagens significativamente inferiores de células TCD4<sup>+</sup> *naive*, quando comparado ao grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$ céls/mm<sup>3</sup>. No entanto o mesmo perfil não é observado para as células TCD8<sup>+</sup> *naive* (Tabela 6).

A população de células de memória central apresenta perfil similar às células *naive*, sendo observado maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> comparadas com as células T CD8<sup>+</sup>, sem variação ao longo da HAART, assim como entre os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < e  $\geq 200$ céls/mm<sup>3</sup>. O uso da HAART no geral, não parece alterar a dinâmica desta subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Tabela 6).

O perfil fenotípico das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que se diferenciam em células de memória efetora apresentam porcentagens de expressão próximas, embora as células T CD4<sup>+</sup> apresentem um aumento significativo após a introdução da HAART, que aparentemente se mantém ao longo do acompanhamento. Analisando de acordo com o grau de imunossupressão no início do estudo, observamos que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200céls/mm<sup>3</sup> apresentam porcentagens maiores de células de memória efetora (ME) CD4<sup>+</sup> do que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$ céls/mm<sup>3</sup>. Sendo que com 60 dias de HAART os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < e  $\geq 200$ céls/mm<sup>3</sup> apresentam diferenças estatisticamente significativas dentro da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e este perfil se mantém ao

longo do estudo. Para os linfócitos TCD8<sup>+</sup> ME observamos flutuação entre os grupos e ao longo do tratamento (Tabela 6).

A população de células efectoras altamente diferenciadas (TEMRA) apresenta-se em porcentagens maiores nas células TCD8<sup>+</sup> do que nas células TCD4<sup>+</sup>, porém após a introdução da HAART nenhuma diferença foi observada para ambas as populações. Entretanto, o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200cél/mm<sup>3</sup> apresenta percentual menor do que o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> ≥200cél/mm<sup>3</sup> para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> TEMRA, sendo observada uma diferença significativa após a introdução da HAART entre os grupos. Não foi possível observar nenhuma alteração evidente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com o fenótipo TEMRA entre os grupos (Tabela 6).

## Análise fenotípica de pacientes com diagnóstico de TB infectados pelo HIV-1 ao longo das terapia e de acordo com seu status de imunossupressão (contagens de células T CD4+ no início do estudo)

	Células T CD4 <sup>+</sup>					Células T CD8 <sup>+</sup>					
	D0	D30	D60	D90	D180	D0	D30	D60	D90	D180	
<b>Naive</b>	<b>Total<sup>#</sup></b>	12,2 (3,9-31,0)	15,1 (5,1-22,8)	12,3 (0,9-31)	7,2 (1,2-19,4)	10,9 (4,0-21,3)	2,5 (0,5-6,3)	0,9 (0,3-3,9)	0,8 (0,3-3,1) <sup>b</sup>	0,9 (0,2-1,6)	0,5 (0,2-3,5)
	<b>&lt;200</b>	8,8 (1,9-19,7)	14,6 (2,7-21,2)	3,9 (0,8-22,9)	3,6 (0,6-11,4)	7 (3,3-16,1)	1,2 (0,3-7,4)	0,9 (0,2-2,4)	0,5 (0,3-2)	0,4 (0,2-1,3)	0,4 (0,2-4,9)
	<b>≥200</b>	37,4 (11,8-49,1) <sup>c</sup>	23,7 (11,6-39,4) <sup>d</sup>	31,7 (15,6-42,3) <sup>e</sup>	19,4 (13,6-44,4) <sup>f</sup>	22,8 (16,9-49,2) <sup>g</sup>	4,1 (2-6,4)	0,9 (0,5-6,3)	1,2 (0,6-4,1)	1,5 (0,6-3)	1,4 (0,3-2,9)
<b>MC</b>	<b>Total<sup>*</sup></b>	15,4 (6,8-28,4)	13,4 (9,3-21,3)	9,7 (6-17,8)	9,9 (4,7-15,8)	10,2 (5,9-20,4)	0,2 (0,1-1,7)	0,1 (0,1-0,5)	0,1 (0,1-1)	0,1 (0,1-1)	0,1 (0,1-1)
	<b>&lt;200</b>	11,1 (5,3-28,8)	13,2 (10,5-24,8)	9,7 (5,5-19,8)	9,5 (3,1-15,6)	12,1 (5,2-20,2)	0,2 (0,1-1,1)	0,1 (0,1-0,5)	0,1 (0,1-0,7)	0,1 (0,0-0,5)	0,2 (0,1-0,8)
	<b>≥200</b>	19,1(8,9-36,9)	13,4 (8,1-15,4)	11,9 (6,6-16,9)	9,9 (7-16,5)	9,9 (7,3-24,4)	0,5 (0,2-2,9)	0,1 (0,1-0,5)	0,1 (0,1-1,2)	0,1 (0,0-0,2)	0,1 (0,1-0,5)
<b>ME</b>	<b>Total</b>	51,7(29,8-65,3)	51,8 (40,2-68,3) <sup>a</sup>	59,1 (36,8-84)	65,7(42-85,5) <sup>h</sup>	62,5 (42,3-77,8) <sup>i</sup>	37,8 (19,9- 51,3)	38,8 (19,2-54,3)	43,2 (21,9-62,5)	42,7 (19,7-53,5)	38,7 (24,2-54,4)
	<b>&lt;200</b>	60 (46,8-86,3)	58,9 (44,8-72,1)	70 (53,8-89,7)	77,1 (51,2-91,4)	68,5 (43,6-81,2)	36,5 (20,6-46,8)	34,7 (17,3-48,8)	40,6 (21,8-61,7)	41,5 (11-52)	36,4 (19,8-53,5)
	<b>≥200</b>	30 (16,5-47,3)	48,7 (33,2-60,3)	37 (30-57,7) <sup>e</sup>	42 (26,9-59,4) <sup>f</sup>	45,1 (41,9-60,8) <sup>g</sup>	45,4 (19,8-53,9)	52,6 (33,8-56,2)	44,8 (23,3-64)	43,9 (20,3-62,3)	48,0 (27,6-72,7)
<b>TEMRA</b>	<b>Total<sup>*</sup></b>	5,6 (2,2-17)	7,4 (2-16,3)	8,9 (2,5-16,4)	6,5 (1,9-16)	9,3 (3,6-18,7)	53,7 (35,9-74,6)	55,9 (42,7-77,6)	51 (34,8-75,5)	55,8 (39,8-75,4)	55,7 (38,5-71)
	<b>&lt;200</b>	5 (2,1-17,8)	4,1 (1-16,3)	5,6 (1,1-13,6)	4,1 (1,7-14,6)	6,6 (2,7-12,3)	53,9 (21,7-75,8)	61,1 (46,4-81,8)	55,7 (33,4-77,6)	56,3 (41-75,5)	55,9 (41,7-72,1)
	<b>≥200</b>	8,8 (2-19,3)	10,9 (6,4-19,4) <sup>d</sup>	12,1 (8-22,1) <sup>e</sup>	15,4 (9,8-30) <sup>f</sup>	18,0 (10,7-22,2) <sup>g</sup>	46,2 (39,9-74,7)	46,4 (39,6-65,2)	49,41(35,9-74,5)	54,4 (37,5-76,8)	47,2 (27,2-7)

Os valores apresentados na tabela são mediana e interquartis (IQR) da porcentagem de moléculas expressas nas subpopulações de linfócitos T.

Os fenótipos celulares foram classificadas em *naive*, memória efetora (ME), memória central (MC) e células efetoras altamente diferenciadas (TEMRA).

Os grupos foram divididos de acordo com as contagens de células T CD4<sup>+</sup> no início da HAART, com células T CD4 abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> (<200) e acima de 200 céls/mm<sup>3</sup> (≥200).

<sup>a</sup>Significância estatística entre as visitas D0-30, pelo teste estatístico wilcoxon com p valor <0,05.

<sup>b</sup> Significância estatística entre as visitas D30-60, pelo teste estatístico wilcoxon com p valor <0,05.

<sup>c</sup> Significância estatística entre os grupos <200 e ≥200 na visita D0, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05.

<sup>d</sup> Significância estatística entre os grupos <200 e ≥200 na visita D30, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05.

<sup>e</sup> Significância estatística entre os grupos <200 e ≥200 na visita D60, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05.

<sup>f</sup> Significância estatística entre os grupos <200 e ≥200 na visita D90, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05.

<sup>g</sup>Significância estatística entre os grupos <200 e ≥200 na visita D180, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05.

<sup>h</sup>Significância estatística entre as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na visita de D90, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05

<sup>i</sup> Significância estatística entre as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na visita de D180, pelo teste estatístico Mann Whitney com p valor ≤0,05

<sup>\*</sup> Significância estatística entre as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em todas as visitas com p valor ≤0,05

<sup>#</sup> Significância estatística entre as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para todas as vistas D0, 30, D60 e D180 com p valor ≤0,05.

## 6 - Discussão

Neste estudo foi avaliado o perfil de reconstituição imunológica de pacientes com TB/HIV em resposta a HAART e ao tratamento da TB, bem como a possível influência do estado imunológico no início do tratamento na reconstituição imunológica. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com (1) o grau de imunossupressão— baseando-se nas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (< 200 e ≥ 200 céls/mm<sup>3</sup>) no início do estudo – e (2) o desenvolvimento ou não da “Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune” (IRIS).

Nossos resultados mostram uma satisfatória recuperação da resposta imune celular após a introdução da HAART, onde as células T CD4<sup>+</sup> apresentam um incremento, enquanto a carga viral declina ao longo do tempo de tratamento, independente do grau de imunossupressão no início do tratamento, ou da ocorrência de IRIS, o que está de acordo com dados descritos na literatura (SEDDIKI et al., 2009 ;ANTONELLI et al., 2010).

Observamos também a diminuição da ativação celular em resposta às terapias administradas, através da redução da expressão das moléculas de CD38<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> na superfície das populações de linfócitos T totais e CD8<sup>+</sup>, corroborando com outros estudos (LAWN; BUTERA, 2001; SAVARINO et al., 2000). Já é sabido que apenas a terapia para TB já induz uma grande redução na expressão de CD38<sup>+</sup> e/ou HLA-DR<sup>+</sup> em células T CD8<sup>+</sup>, embora a redução da expressão nas células T CD4<sup>+</sup> não tenha sido tão intensa, sendo similar ao observado quando os pacientes são tratados para os dois agravos (MAHAN et al., 2010; LANCIONI et al., 2011). Em outras coinfeções como, por exemplo, em *Leishmania*/HIV, também é possível observar altos níveis de ativação celular em pacientes com quadros de imunossupressão grave mesmo sem haver correlação com a carga viral, pois, nesse estudo a mesma já tinha sido controlada sob HAART (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2010). Uma das hipóteses para a manutenção destes altos níveis de ativação em pacientes TB/HIV com níveis indetectáveis de carga viral é a possível presença de antígenos de *Mtb* circulantes, mas o papel que eles desempenham nesta ativação é uma questão em aberto.

As citocinas são importantes agentes imunomoduladores do sistema imune. O TNF e o IFN- $\gamma$  são produzidos por uma variedade de células exercendo funções tanto no sistema imune inato como no adaptativo. Sabe-se que o IFN- $\gamma$  e TNF apresentam importante atuação na infecção por *Mtb*/HIV-1 e estão associados com a organização do

granuloma, a proteção contra micobactérias intracelulares e a imunidade mediada por células (FLYNN et al., 1993; CASTRO CUNHA et al., 2005 e revisto por KWAN; ERNST, 2011). Nossos resultados mostram uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  ao longo do período de uso das terapias, embora não tenha sido observada nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de TNF. Diante destes dados, podemos especular que a reconstituição imune ocasionada pelo emprego conjunto das terapias leva a uma redução da resposta inflamatória causada pelas doenças.

As citocinas como IL-6, IL-10, IL-2, entre outras, têm sido descritas como possíveis marcadores para a progressão da aids (HADDOW et al., 2011; SILVEIRA et al., 1997), assim como possíveis marcadores no desenvolvimento de IRIS (STONE et al., 2002). O perfil das citocinas durante a infecção por HIV é algo que suscita ainda vários debates. Com base em estudos de estímulo celular *ex vivo*, KLEIN e colaboradores (1997) sugerem que ocorra uma mudança do perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório durante a infecção por HIV. No entanto, nossos dados, não mostram um perfil predominante nas citocinas pró e anti-inflamatórias. Nossos resultados mostram um sutil aumento nos níveis de IL-6 plasmáticos no período de 30 dias após HAART e diminuição ao longo do tratamento, dados que estão de acordo com os já descritos na literatura (LAWN et al., 2005). A citocina IL-6 vem sendo destacada pelo seu papel no desenvolvimento da resposta inflamatória durante a restauração imune e como um possível marcador para ativação imune persistente (STONE et al., 2002; MORLESE et al., 2003). Em nosso estudo não foi observado uma modulação significativa de IL-6 que possa ser correlacionada com a redução da carga viral plasmática e da carga bacilar da TB. Uma outra citocina avaliada foi a IL-2, que apresenta um comportamento quase que linear ao longo do tratamento. Nossos resultados não apontam para um balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, como sugerido na literatura (FAKOYA et al., 1997; BAL et al., 2005). As diferenças observadas podem ter ocorrido devido a uma possível degradação da amostra, por diferenças na sensibilidade dos métodos empregados na literatura e pelo uso de diferentes fontes de material biológico (plasma e sobrenadantes de cultura).

A IRIS pode estar associada com uma resposta Th1 contra antígenos micobacterianos, seguida pela desregulação da secreção de citocinas e da migração das células T para o local inflamatório (PAWLOWSKI et al., 2012). No presente trabalho,

encontramos uma prevalência de IRIS próxima ao descrito na literatura (TIEU et al., 2009). Apesar de nossa casuística ser constituída, em sua maioria, por pacientes com imunossupressão grave, os relatos de literatura mostram uma imunossupressão ainda mais grave que a observada em nossos casos (PEAN et al., 2012). ANTONELLI e colaboradores (2010) observaram que pacientes com IRIS apresentam uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> que expressam HLA-DR<sup>+</sup> do que os pacientes sem IRIS, mas nenhuma alteração na frequência das moléculas HLA-DR<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup> em células T CD8<sup>+</sup> foi observada (ANTONELLI et al., 2010). Entretanto, no presente estudo, não observamos alterações significativas nos resultados de CD4, CV, ativação celular e dosagem de citocinas ao longo das terapias nos casos de IRIS quando comparado aos pacientes que não desenvolveram IRIS. Uma possível hipótese para esta não diferença entre os pacientes que apresentaram IRIS e os que não apresentaram pode ser dada pelo tamanho amostral que, apesar da frequência de IRIS em nossa casuística ser próxima a descrita na literatura, o número de casos é pequeno, limitando análises estatísticas mais robustas.

Dados na literatura apontam para a equivalência da capacidade de recuperação imunológica dos pacientes com TB/HIV, apresentando contagens de células T CD4<sup>+</sup> < 50 ou < 200 céls/μl, quando comparados àqueles com contagens de células T CD4<sup>+</sup> mais elevadas, independentemente do tempo de HAART (SHRIHARI et al., 2011; LAWN et al., 2006). Em nosso estudo encontramos o mesmo potencial de ganho de células TCD4 para ambos os grupos, embora o grupo de pacientes com  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup> apresente ganho maior após 30 dias de HAART comparado com o grupo <200 céls/mm<sup>3</sup> se igualando ao longo do tempo. Dados estes esperados, uma vez que os pacientes com imunossupressão menos severa apresentam um repertório celular mais conservado, possibilitando uma restauração melhor a curto prazo. Já os com imunossupressão mais grave apresentam esta condição de restauração ao longo do tempo, após a introdução da HAART.

Em relação à ativação celular, estudos com outras coinfeções, tais como Hanseníase/HIV e Leishmaniose/HIV, onde em geral os pacientes apresentam quadro de imunossupressão com contagens de células T CD4<sup>+</sup> < 350 céls/μl, é possível observar uma proporção de células ativadas maior que nos pacientes com somente um agravo (GIACCOIA-GRIPP et al., 2011; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2010). Na nossa casuística observamos uma diminuição nos níveis de ativação independente do perfil

imunológico observado no início do tratamento, no entanto, os pacientes com imunossupressão mais grave apresentaram uma ativação celular inicial mais intensa que os menos imunossuprimidos. Esta ativação inicial no grupo mais imunossuprimido poderia vir a propiciar o fenômeno da IRIS. Corroborando com esta hipótese, 6 dos 7 casos de IRIS descritos ocorreram no grupo com  $<200$  céls/mm<sup>3</sup>. Entretanto, não observamos correlação entre a ocorrência de IRIS e ativação celular (dados não mostrados).

O padrão de citocinas produzidas por linfócitos T tem um importante papel na infecção por HIV e na suscetibilidade à TB, onde a ativação de linfócitos Th1, produção de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos são cruciais para defesa contra estes patógenos (BARNES; MODLIN, 1996; PERREAU et al., 2013). Verificamos baixos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  se comparados com outros estudos com pacientes TB/HIV (SUBRAMANYAM et al., 2004). Estes apresentaram-se maiores no grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> no período até 60 dias de HAART, se igualando ao grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup> ao longo das terapias. BENJAMIN e colaboradores (2013) encontram níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  iguais entre os grupos com contagens de células T CD4<sup>+</sup>  $<$  e  $\geq 200$  céls/ $\mu$ l em estudo longitudinal (BENJAMIN et al., 2013). Não houve diferenças entre os grupos com relação às dosagens plasmáticas de TNF em nosso estudo, diferindo de BENJAMIN e colaboradores (2013), que observaram níveis mais altos de TNF nos grupos com contagens de células T CD4<sup>+</sup>  $< 200$  céls/ $\mu$ l comparados com os indivíduos com T CD4<sup>+</sup>  $\geq 200$  céls/ $\mu$ l. Não existe um padrão nos perfis de IFN- $\gamma$  e TNF observados na literatura, que podem ocorrer devido a diferenças no padrão imune, no uso de células T estimuladas e nas metodologias utilizadas (OH et al., 2005; BAL et al., 2005). Embora, esperássemos que nossos pacientes com imunossupressão mais severa tivessem níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e TNF mais elevados que os outros pacientes menos imunossuprimidos.

Para o conjunto de citocinas plasmáticas analisadas em nosso estudo foi possível observar níveis mais altos de IL-2, IL-6 e IL-10 no grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $<200$  céls/mm<sup>3</sup> do que no grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup> no início do tratamento. Dados estes que corroboram com SUBRAMANYAM e colaboradores (2004) que mostram níveis plasmáticos de IL-10 e IL-2 superiores no grupo de pacientes com CD4<sup>+</sup>  $< 200$  céls/ $\mu$ l comparados com o

grupo CD4  $\geq 200$  céls/ $\mu$ l. Nossos resultados indicam que mesmo os pacientes com imunossupressão grave acometido com os dois agravos não apresentam uma predominante resposta Th1 antes da introdução da HAART, sugerindo um possível controle da exacerbação de resposta pró-inflamatória.

As citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$ , que vêm se destacando pelo seu papel na patogênese da síndrome, podendo ser possíveis marcadores para a IRIS (STONE et al., 2002; WORSLEY et al., 2010). No entanto, nossos dados não apontaram diferenças na expressão de nenhuma das citocinas avaliadas e nem mesmo justificam o uso de alguma delas como biomarcador para o desenvolvimento de IRIS.

No intuito de avaliarmos a resposta imune frente a antígenos específicos de *Mtb*, utilizamos o teste de ELISpot. Nossos resultados mostram uma maior magnitude de resposta para todos os antígenos usados, assim como o aumento de indivíduos respondedores após 30 dias de HAART. Verificou-se que os antígenos PPD e 38KDa/CFP10 possuem uma melhor resposta em magnitude e em proporção de indivíduos respondedores do que o ESAT-6. Estes dados estão de acordo com a literatura, uma vez que descrevem que a resposta ao antígeno PPD é melhor do que os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 em pacientes com TB sem HIV (MARIN et al., 2010; GIDEON et al., 2013). Apesar de serem poucos os trabalhos descrevendo os efeitos destes antígenos na população de pacientes com TB coinfectados com HIV, estes apontam para uma melhor resposta ao PPD (PAI et al., 2004; VINCENTI et al., 2003; BOURGARIT et al., 2006). Uma hipótese para a melhor resposta apresentada pelo antígeno PPD, pode ser a sua composição, pois não contém somente antígenos específicos ao *Mtb* e sim de outras micobacterias, podendo assim sua resposta ser melhor, mas não necessariamente específica para indivíduos infectados com *Mtb*.

A resposta celular específica frente aos antígenos de *Mtb*, foi avaliada em pacientes de acordo com as contagens absolutas de células TCD4<sup>+</sup> no início do estudo. Observamos que entre os grupos com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $< 200$  e  $\geq 200$  céls/ $\text{mm}^3$  as curvas de tendência se sobrepõem para todos os antígenos, não sendo possível observar diferença na magnitude de resposta entre os dois grupos. HAMMOND e colaboradores (2008) avaliaram grupos de indivíduos com contagens de células CD4<sup>+</sup>  $< 200$ , 200-500 e  $\geq 500$  frente aos antígenos PPD, ESAT-6 e CFP-10, e observaram que o grupo com CD4<sup>+</sup>  $< 200$  apresentou uma melhor resposta que os outros grupos avaliados. Tal achado está de acordo com o observado em nossos resultados para

grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup>, onde a análise da curva aponta para um incremento mais acentuado após a introdução da HAART.

Embora seja reconhecido que a IRIS ocorra como uma consequência da restauração da resposta imune contra antígenos de micobactérias, não está claro o porquê deste fenômeno afetar apenas alguns pacientes com TB/HIV. Nossas análises mostram que a resposta frente aos antígenos PPD e 38KDa/CFP-10 entre os paciente de IRIS e não-IRIS são inicialmente semelhantes, com magnitude aparentemente maior nos casos de IRIS ao longo do tratamento. A literatura aponta para um aumento da produção de IFN- $\gamma$  frente à estimulação com o antígeno PPD em pacientes com IRIS após 6 semanas de terapia antirretroviral, dados que estão de acordo com nossos achados (VIGNESH et al., 2013; TIEU et al., 2009; ELLIOTT et al., 2009). Entretanto, no nosso trabalho, não foi possível avaliar a resposta frente ao antígeno ESAT-6 devido ao pequeno número de pacientes respondedores. Estes dados apontam para uma satisfatória recuperação imune após a introdução da HAART, onde as células Th1 passam produzir IFN- $\gamma$  em resposta mais exacerbada aos antígenos de *Mtb* após os eventos associados com a IRIS.

A análise multivariada visando avaliar os fatores associados à produção de IFN- $\gamma$  pelas células T frente a estímulos antigênicos ao longo do tempo não apontou para a associação entre as variáveis analisadas e a resposta ao PPD. Realizamos análise multivariada. Dentre as variáveis selecionadas, incluímos contagem de células TCD4<sup>+</sup> no início do tratamento, carga viral, forma clínica, sexo, idade, raça, dosagem do efavirenz, ativação celular (% CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> e % CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>), IFN- $\gamma$  plasmático e ocorrência de IRIS como variáveis de interesse da nossa casuística. Embora seja observado na literatura que pacientes que desenvolvem IRIS e os com baixas contagens de células TCD4<sup>+</sup> apresentam alta produção de IFN- $\gamma$  em resposta ao PPD (ELLIOTT et al., 2009; TIEU et al., 2009), nesta análise, verificamos que a contagem de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup>, a carga viral e a população de células TCD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (marcadores de ativação) têm influência na produção de IFN- $\gamma$  por células T estimuladas frente ao antígeno 38KDa/CFP-10.

Nossa hipótese era que os pacientes mais imunossuprimidos, com seu repertório de células T ativadas e com presença de carga viral produzissem maiores quantidades de IFN- $\gamma$ , entretanto, estes fatores influenciaram células T específicas para TB a produzirem IFN- $\gamma$  frente ao PPD, mas não para 38KDa/CFP-10, que tiveram menor

frequência e magnitude de resposta. Trabalhos anteriores descrevem os antígenos CFP-10 e o ESAT-6 separadamente como sendo correlacionados com a infecção de *Mtb*, embora não exista um consenso quando utilizado em indivíduos imunocomprometidos (MAZUREK et al., 2010). O mais comum na literatura é o uso da combinação dos dois antígenos, mostrando sua influência na expressão/produção de IFN- $\gamma$  em pacientes TB<sup>+</sup>/HIV<sup>+</sup> com baixas contagens de células TCD4<sup>+</sup>, assim como, baixa expressão de IFN- $\gamma$  em pacientes TB<sup>+</sup>/HIV<sup>+</sup> comparados com os TB<sup>+</sup>/HIV<sup>-</sup> (HAMMOND et al., 2008; KASSA et al., 2013; KARAM et al., 2008). Podemos então especular que embora a resposta ao antígeno PPD seja maior na magnitude e no número de respondedores, comparado com o 38KDa/CFP-10, esta não foi correlacionada às variáveis que influenciam o quadro de imunossupressão em pacientes TB<sup>+</sup>/HIV<sup>+</sup>.

Cabe ressaltar a importância de estudar as populações celulares envolvidas nos mecanismos de resposta imune devido à capacidade que elas têm de se modificar e sobreviver às desordens existentes no sistema imune (SALLUSTO et al., 2004). Sabe-se que em pacientes HIV<sup>+</sup> ocorre uma depleção de células T CD4<sup>+</sup> e que as células T CD8<sup>+</sup> podem desempenhar papel na resposta específica mesmo na ausência de TCD4<sup>+</sup> (ESPINOSA et al., 2013). Em nosso estudo investigamos as subpopulações de células T *naive*, memória central (MC), memória efetora (ME) e efetoras altamente diferenciadas (TEMRA) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de PBMC de pacientes com TB/HIV.

Verificamos que as células TCD4<sup>+</sup> *naive* encontram-se em maior quantidade do que as células T CD8<sup>+</sup>, dados que estão de acordo com a literatura (LEDERMAN et al., 1998), embora as células T CD8<sup>+</sup> *naive* apresentem redução discreta nos percentuais após a introdução da HAART. Em pacientes coinfectados com HIV-1 e outras enfermidades, no entanto, não foi verificada esta redução nos percentis de células TCD8<sup>+</sup> *naive* ao longo do tratamento (ESPINOSA et al., 2013; LEDERMAN et al., 1998).

Os fenótipos de células de memória MC, ME e TEMRA diferem pela função e o tipo de molécula expressa na superfície dos linfócitos. Em nosso estudo observamos uma prevalência de células T CD4<sup>+</sup> MC quando comparada às células TCD8<sup>+</sup> MC. Apesar de termos evidenciado nestes pacientes um incremento dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, característico da reconstituição imune, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> MC apresentaram uma sutil redução no percentual ao longo da HAART. Dados na literatura, analisando os fenótipos de células MC e ME, evidenciaram um aumento nos percentis de células de

TCD4<sup>+</sup> MC e uma redução de ME em indivíduos HIV<sup>+</sup> após a HAART (WILKINSON et al., 2009). A população de células TCD8<sup>+</sup> TEMRA foi descrita por CHAMPAGNE e colaboradores (2001), onde o mesmo quantificou a porcentagem das populações de células T de memória em pacientes infectados por HIV-1, sendo observado que a população de TEMRA representava um percentual de distribuição muito pequeno (5%) dentro das células T de memória. Em nossas análises as populações de TEMRA encontram-se mais elevadas em linfócitos T CD8<sup>+</sup> que nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e as mesmas apresentam uma distribuição dentro dos fenótipos analisados de 57% e 6,1%, respectivamente.

Nossos dados sugerem que ocorra um considerável impacto do *Mtb* na diferenciação dos fenótipos celulares durante a coinfeção com HIV-1, uma vez que ocorre uma melhor resposta de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com predomínio de células de memória efetora (40%) e TEMRA (57%), entretanto as células T CD4<sup>+</sup> apresentam uma variação na distribuição dos fenótipos celulares, embora ocorra um predomínio de células de ME (57%). Quando avaliado se o controle da carga viral em nossos pacientes influenciava a restauração dos fenótipos celulares, observamos que mesmo após a carga viral estar em níveis indetectáveis (após 60 dias de HAART) não ocorre diferenças para nenhum dos fenótipos nas populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, embora ROSIGNOLI e colaboradores (2009) tenham observado que a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ME tenha sofrido impacto da viremia quando comparados com os não virêmicos (ROSIGNOLI et al., 2009). Podemos concluir que o controle da carga viral em nossos pacientes não apresenta impacto direto na restauração fenotípica dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Foi possível observar que os pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> apresentaram contagens de células TCD4<sup>+</sup> ME maiores e as células TCD4<sup>+</sup> *naive* e TEMRA menores quando comparados com o grupo de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> ≥200 céls/mm<sup>3</sup> nas populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Já os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentam flutuação entre os grupos de pacientes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> < e ≥200 céls/mm<sup>3</sup> ao longo do acompanhamento para todos os fenótipos celulares avaliados.

Com estes dados podemos especular que a população de pacientes imunossuprimidos graves (com contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup>) deve ter uma resposta mais voltada para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, uma vez que o grupo de pacientes

com contagens de células TCD4<sup>+</sup>  $\geq 200$  céls/mm<sup>3</sup> apresentou uma satisfatória recuperação celular de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfis *naive* e MC, o que já era esperado, uma vez que estas células estão associadas às duas ondas descritas de reconstituição imune, sendo via redistribuição dos clones periféricos de células T (MC) e repopulação a partir de emigrantes tímicos (GUIHOT et al., 2011).

O perfil fenotípico dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> classificados como *naive*, ME, MC e TEMRA foram avaliados em nossos pacientes de acordo com as formas clínicas da tuberculose: pulmonar e disseminada, ao longo do tempo de tratamento. Não foi observado predomínio fenotípico para nenhuma das formas da doença (dados não mostrados).

No decorrer de nosso estudo foram encontradas algumas limitações na condução do mesmo, tais como: 1- número limitado de casos de IRIS, possivelmente em função do tamanho da casuística analisada, 2- perda de pacientes por falta de acompanhamento, 3- uso limitado de células criopreservadas, 4- demora na aquisição do antígeno 38KDa/CFP-10 e 5- falta pontual no acompanhamento de alguns pacientes no decorrer da tese.

Como conclusão, observamos em nosso estudo, que a infecção por HIV-1 em associação com a TB leva a uma profunda alteração nos perfis fenotípicos e funcionais de linfócitos T. Além disso, a introdução da HAART associada à terapia para a TB aponta para um papel positivo na recuperação das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, independentemente do quadro de imunossupressão no início do tratamento. Com a redução da carga viral plasmática, esperava-se a modulação de um perfil de citocinas pró-inflamatório para anti-inflamatório, assim como a redução da ativação celular. No entanto, possivelmente por conta de curto espaço de tempo de acompanhamento destes pacientes, não foi possível evidenciar claramente estes fenômenos. A ocorrência de IRIS em nossa casuística foi restrita, quando comparada a dados da literatura (BOURGARIT et al., 2006; PEAN et al., 2012), possivelmente em função dos níveis mais aumentados de linfócitos T CD4<sup>+</sup> encontrados em nossos pacientes e do tamanho da casuística analisada.

## 7- Conclusões

- A introdução da HAART em pacientes TB/HIV em tratamento para a tuberculose levou à redução da carga viral, incremento da população de células TCD4<sup>+</sup> e redução da ativação celular;

- Não foi observada uma modulação no perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias em resposta ao controle viral;

- Os grupos de pacientes avaliados quanto ao status de imunossupressão no início da HAART (TCD4<sup>+</sup> < e  $\geq$  200 céls/mm<sup>3</sup>) apresentaram perfis diferentes quanto ao ganho de células TCD4<sup>+</sup>, os níveis de ativação celular e os perfis das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e IL-10 no primeiro mês de terapia antirretroviral apresentando, porém, perfis similares ao longo das terapias para tuberculose e aids;

- A resposta celular específica frente aos antígenos de *Mtb* foi avaliada usando os antígenos PPD, ESAT-6 e 38KDa/CFP-10, onde foi observado uma melhor magnitude de resposta e de frequência de respondedores para o antígeno PPD. Entretanto a resposta ao antígeno 38KDa/CFP-10 apresentou uma associação com a carga viral, contagens de células TCD4<sup>+</sup> <200 céls/mm<sup>3</sup> e ativação celular em uma análise multivariada;

- Os fenótipos de subpopulações de células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> avaliados em nossa casuística apontam para um predomínio de células TCD4<sup>+</sup> de memória efetora, enquanto as células TCD8<sup>+</sup> apresentam um perfil mas de memória efetora e efetora altamente diferenciada (TEMRA) ao longo das terapias;

- Os pacientes que vieram a desenvolver IRIS em nossa casuística não apresentaram diferenças no perfil de ativação celular e de citocinas, embora tenha sido observada uma diferença na resposta celular específica aos antígenos PPD e 38KDa/CFP-10 ao fim do tratamento para tuberculose e seis meses de HAART quando comparados aos demais pacientes.

Possivelmente por conta do tamanho amostral e da frequência de pacientes TB/HIV com CD4 <200mm<sup>3</sup>, foram evidenciados poucos casos de IRIS em nosso estudo, o que limitou uma análise mais aprofundada deste grupo.

## 8- Referências Bibliográficas

AFFANDI, J. S.; KUMAR, M.; AGARWAL, U.; SINGH, S.; PRICE, P. The search for a genetic factor associating with immune restoration disease in HIV patients co-infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Disease markers**, v. 34, n. 6, p. 445–9, 2013.

AFZALI, B.; MITCHELL, P.; LECHLER, R. I.; JOHN, S.; LOMBARDI, G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 159, n. 2, p. 120–30, 2010.

AHMED, R.; GRAY, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 54–60, 1996.

AN, P.; WINKLER, C.A., Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet.** 26(3):119-31. 2010

ANTONELLI, L. R. V; MAHNKE, Y.; HODGE, J. N.; et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3818–27, 2010.

APPAY, V.; REYNARD, S.; VOELTER, V.; et al. Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. **Journal of immunological methods**, v. 309, n. 1-2, p. 192–9, 2006.

APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **The Journal of pathology**, v. 214, n. 2, p. 231–241, 2008..

ARTS, E. J.; HAZUDA, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 4, p. a007161, 2012.

BAL, A. M.; LAKHASHE, S. K.; THAKAR, M. R.; TRIPATHY, S. P.; PARANJAPE, R. S. Dysregulation of proinflammatory and regulatory cytokines in HIV infected persons with active tuberculosis. **Cytokine**, v. 30, n. 5, p. 275–81, 2005.

BARNES, P. F.; MODLIN, R. L. Human cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 215, p. 197–219, 1996.

BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S45–54, 2006.

BENITO, J. M.; LÓPEZ, M.; LOZANO, S.; et al. CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 20(2):227-33, 2004.

- BETTS MR, NASON MC, WEST SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8 $\beta$  T cells. **Blood**;107:4781–4789, 2006.
- BIXLER, S. L.; MATTAPALLIL, J. J. Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. **Clinical & developmental immunology**, v. 2013, p. 852418, 2013.
- BLANC, F.-X.; SOK, T.; LAUREILLARD, D.; et al. Earlier versus Later Start of Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Adults with Tuberculosis. **N Engl J Med**. 20;365(16):1471-81, 2011
- BOURGARIT, A.; CARCELAIN, G.; MARTINEZ, V.; et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. **AIDS**, v. 20, n. 2, p. F1–7, 2006.
- BRETON, G.; DUVAL, X.; ESTELLAT, C.; et al. Determinants of immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV type 1-infected patients with tuberculosis after initiation of antiretroviral therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 11, p. 1709–12, 2004.
- BURTON, C. T.; WESTROP, S. J.; ECCLES-JAMES, I.; et al. Altered phenotype of regulatory T cells associated with lack of human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific suppressive function. **Clinical and experimental immunology**, v. 166, n. 2, p. 191–200, 2011.
- CACCAMO N, GUGGINO G, MERAVIGLIA S, GELSOMINO G et al., Analysis of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T-cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent infection. **PLoS One** 4:e5528. 2009
- CAHN, P. Tuberculosis and HIV: A Partnership Against the Most Vulnerable. **Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care (JIAPAC)**, v. 2, n. 3, p. 106–123, 2003.
- CASTRO CUNHA, R. M. DE; KALLAS, E. G.; RODRIGUES, D. S.; NASCIMENTO BURATTINI, M.; SALOMAO, R. Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha production by CD4+ T and CD8+ T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 140, n. 3, p. 491–7, 2005.
- CHAKRABARTI, L. A; SIMON, V. Immune mechanisms of HIV control. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 4, p. 488–96, 2010.
- CHAMPAGNE, P.; OGG, G. S.; KING, A S.; et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 106–11, 2001.
- CHATTOPADHYAY, P. K.; ROEDERER, M. Immunophenotyping of T cell subpopulations in HIV disease. **Current protocols in immunology**, v. Chapter 12, p. Unit 12.12, 2005.
- CHOUGNET, C. A; SHEARER, G. M. Regulatory T cells (Treg) and HIV/AIDS: summary of the September 7-8, 2006 workshop. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 7, p. 945–52, 2007.

- COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, n. 5197, p. 483–9, 1995.
- DESIMMIE, B. A.; DELVIKS-FRANKENBERRY, K. A.; BURDICK, R. C.; et al. Multiple APOBEC3 Restriction Factors for HIV-1 and One Vif to Rule Them All. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 6, p. 1220–1245, 2013.
- DIEL R, GOLETTI, D. FERRARA G., BOTHAMLEY G., CIRILLO D., KAMPMANN B., et al., Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis, **Eur Respir J**; 37: 88–99, 2011
- DOCKRELL, D. H.; BADLEY, A. D.; ALGECIRAS-SCHIMNICH, A.; et al. Activation-induced CD4<sup>+</sup> T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4<sup>+</sup> T cell count, and HIV plasma viral copy number. **AIDS research and human retroviruses**, v. 15, n. 17, p. 1509–18, 1999.
- DOUEK, D. C.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 471–84, 2009.
- DUCATI, R.; RUFFINO-NETTO, A. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006.
- ESPINOSA, E.; ROMERO-RODRÍGUEZ, D. P.; CANTORAL-DÍAZ, M.-T.; REYES-TERÁN, G. Transient expansion of activated CD8<sup>+</sup> T cells characterizes tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with HIV: a case control study. **Journal of inflammation**, v. 10, n. 1, p. 21, 2013.
- FAKOYA, A; MATEAR, P. M.; FILLEY, E.; et al. HIV infection alters the production of both type 1 and 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or 2 state. **AIDS**, v. 11, n. 12, p. 1445–52, 1997.
- FLYNN, J.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med** v. 178, n. , p. 2249–2254, 1993.
- GAARDBO, J. C.; HARTLING, H. J.; RONIT, A.; et al. Different immunological phenotypes associated with preserved CD4<sup>+</sup> T cell counts in HIV-infected controllers and viremic long term non-progressors. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63744, 2013.
- GELDMACHER, C.; SCHUETZ, A.; NGWENYAMA, N.; et al. Early depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific T helper 1 cell responses after HIV-1 infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 11, p. 1590–8, 2008.
- GIACOIA-GRIPP, C. B. W.; SALES, A. M.; NERY, J. A. D. C.; et al. Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28735, 2011.

- GIORGI, J. V.; HULTIN, L. E.; MCKEATING, J. A.; et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 4, p. 859–70, 1999.
- GRAZIOSI, C.; GANTT, K. R.; VACCAREZZA, M.; et al. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4386–91, 1996.
- GROSSMAN, Z.; MEIER-SHELLERSHEIM, M.; SOUSA, A. E.; VICTORINO, R. M. M.; PAUL, W. E. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? **Nature medicine**, v. 8, n. 4, p. 319–23, 2002.
- HAAS, A.; ZIMMERMANN, K.; OXENIUS, A. Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12102–13, 2011.
- HADDOW, L. J.; DIBBEN, O.; MOOSA, M.-Y. S.; BORROW, P.; EASTERBROOK, P. J. Circulating inflammatory biomarkers can predict and characterize tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **AIDS**, v. 25, n. 9, p. 1163–74, 2011.
- HANNA, L. E.; NAYAK, K.; SUBRAMANYAM, S.; et al. Incomplete immunological recovery following anti-tuberculosis treatment in HIV-infected individuals with active tuberculosis. **The Indian journal of medical research**, v. 129, n. 5, p. 548–54, 2009.
- HARARI, A.; VALLELIAN, F.; MEYLAN, P. R.; PANTALEO, G. Different Conditions of Antigen Exposure and Persistence **J Immunol.** 15;174(2):1037-45, 2005.
- HARBOE, M.; OETTINGER, T.; WIKER, H. G.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 16–22, 1996.
- HAZENBERG MD; OTTO SA; BENTHEM BH, VAN; et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. **AIDS**, v. 17 (13), p. 1881–8, 2003.
- HERSPERGER AR, PEREYRA F, NASON M, et al. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. **PLoS Pathogens**; 6:e1000917, 2010.
- HERTOGHE, T.; WAJJA, A; NTAMBI, L.; et al. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). **Clinical and experimental immunology**, v. 122, n. 3, p. 350–7, 2000.
- HIRSCH, H. H.; KAUFMANN, G.; SENDI, P.; BATTEGAY, M. Immune reconstitution in HIV-infected patients. **Clinical infectious diseases : an official**

publication of the **Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 8, p. 1159–66, 2004.

HOGAN, C. M.; HAMMER, S. M. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. **Annals of internal medicine**, v. 134, n. 10, p. 978–96, 2001.

HOSMALIN, A.; LEBON, P. Type I interferon production in HIV-infected patients Abstract: Type I IFNs display multiple biological, **J Leukoc Biol.** , ;80(5):984-93, 2006.

HOUGARDY, J.-M.; PLACE, S.; HILDEBRAND, M.; et al. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, n. 4, p. 409–16, 2007.

HUIS IN 'T VELD, D.; SUN, H.-Y.; HUNG, C.-C.; COLEBUNDERS, R. The immune reconstitution inflammatory syndrome related to HIV co-infections: a review. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 919–27, 2012.

KAHN JO; WALKER BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N Engl J Med.** , v. 339 (1), p. 33–9, 1998.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Review Immunology**. 1(1):20-30.2001

KAUFMANN, S. H. E.; BAUMANN, S.; NASSER EDDINE, A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. **The international journal of tuberculosis and lung disease**, v. 10, n. 10, p. 1068–79, 2006.

KAWAKAMI K, SCHEIDEREIT C., ROEDER R.G, Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 85(13):4700-4. 1988

KLATT, N. R.; BRENCHLEY, J. M. Th17 cell dynamics in HIV infection. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 2, p. 135–40, 2010.

KLEIN, S. A; DOBMEYER, J. M.; DOBMEYER, T. S.; et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. **AIDS**, v. 11, n. 9, p. 1111–8, 1997.

KOTLER D, GAETZ H, LANGE M, et al.. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med.** 101:421–28, 1984

KWAN, C. K.; ERNST, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 2, p. 351–76, 2011.

- KWONG, P. D.; WYATT, R.; ROBINSON, J.; et al. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 648–59, 1998.
- LAI, R. P. J.; NAKIWALA, J. K.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. The immunopathogenesis of the HIV tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. **European journal of immunology**, v. 43, n. 8, p. 1995–2002, 2013.
- LANCIONI, C.; MAHAN, C.; JOHNSON, D.; et al. Effects of antiretroviral therapy on immune function of HIV-infected adults with pulmonary tuberculosis and CD4+> 350 cells/mm<sup>3</sup>. **J Infect Dis**, v. 203, p. 992–1001, 2011..
- LAPA E SILVA, J. R. Novos Aspectos da Patogenia da Tuberculose. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 10–14, 2012.
- LAUREILLARD, D.; MARCY, O.; MADEC, Y.; et al. Paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome after early initiation of antiretroviral therapy in a randomized clinical trial. **AIDS**, v. 27, n. 16, p. 2577–86, 2013.
- LAWN, S. D.; BUTERA, S. T. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Infection**, v. 14, n. 4, p. 753–777, 2001.
- LAWN, S. D.; BEKKER, L.-G.; MILLER, R. F. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 6, p. 361–73, 2005.
- LAWN, S. D.; MYER, L.; BEKKER, L.-G.; WOOD, R. CD4 cell count recovery among HIV-infected patients with very advanced immunodeficiency commencing antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa. **BMC infectious diseases**, v. 6, n. 2005, p. 59, 2006.
- LEE, C.; LIU, Q.-H.; TOMKOWICZ, B.; et al. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 5, p. 676–82, 2003.
- LIPMAN, M.; BREEN, R. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 20–5, 2006.
- LYAKH, L.; TRINCHIERI, G.; PROVEZZA, L.; CARRA, G.; GEROSA, F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. **Immunological reviews**, v. 226, p. 112–31, 2008.
- MAHAN, C.; WALUSIMBI, M.; JOHNSON, D.; LANCIONI, C. Tuberculosis Treatment in HIV Infected Ugandans with CD4 Counts > 350 Cells/mm<sup>3</sup> Reduces Immune Activation with No Effect on HIV Load or CD4 Count. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. 1–6, 2010.

- MARÍN G.N.D., SARA C. PARÍS S.C., MAURICIO ROJAS M. AND LUIS F., Reduced Frequency of Memory T Cells and Increased Th17 Responses in Patients with Active Tuberculosis, **Clin. Vaccine Immunol.**, 19(10):1667, 2012
- MAZUREK GH, MD, JEREB J, VERNON A, LOBUE P, G. S. C. K. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 59, p. 1–25, 2010.
- MCCUNE, J. M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 974–9, 2001.
- MCDERMOTT, A. B.; KOUP, R. A. CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease. **AIDS**, v. 26, n. 10, p. 1281–92, 2012.
- MEHRA, V.; GONG, J. H.; IYER, D.; et al. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 174, n. 2, p. 431–4, 1996.
- MEINTJES, G.; LAWN, S.; SCANO, F. Tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome: case definitions for use in resource-limited settings. **The Lancet infectious**, v. 8, n. 8, p. 516–523, 2008.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. **Antiviral research**, v. 98, n. 1, p. 93–120, 2013.
- MIGUELES SA, LABORICO AC, SHUPERT WL, et al. HIV-specific CD8 $\beta$  T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. **Nat Immunol**; 3:1061–1068, 2002
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico HIV-AIDS. 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Plano Nacional de Controle da Tuberculose. 2000.
- MORLESE, J. F.; ORKIN, C.M.; ABBAS, R.; et al. Plasma IL-6 as a marker of mycobacterial immune restoration disease in HIV-1 infection. **AIDS**, v. 17, n. 9, p. 1411–3, 2003.
- MOUTINHO, I.L.D., Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença, **Rev Med Minas Gerais**; 21(1): 42-48, 2011
- MUELLER, H., DETJEN, A. K., SCHUCK, S. D., GUTSCHMIDT, A. et al.. Mycobacterium tuberculosis-specific CD4, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ \_multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF. **Cytokine** 43:143–148. 2008
- MÜLLER, M.; WANDEL, S.; COLEBUNDERS, R.; et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 251–61, 2010.

- NANICHE D., LETANG E., NHAMPOSSA T., DAVID C. , MENENDEZ C., ALONSO P., Alterations in T Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus–Infected Adults with Co-infections in Southern Mozambique, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 85(4), pp. 776–781, 2011,
- NAVAS, E.; MARTÍN-DÁVILA, P.; MORENO, L.; et al. Paradoxical reactions of tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome who are treated with highly active antiretroviral therapy. **Archives of internal medicine**, v. 162, n. 1, p. 97–9, 2002.
- OH, M.-D.; KANG, C.-I.; KIM, U.-S.; et al. Cytokine responses induced by Mycobacterium tuberculosis in patients with HIV-1 infection and tuberculosis. **International journal of infectious diseases** , v. 9, n. 2, p. 110–6, 2005.
- OKOYE, A. A; PICKER, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. **Immunological reviews**, v. 254, n. 1, p. 54–64, 2013.
- PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**, v. 4, n. 12, p. 761–76, 2004.
- PATEL, N. R.; ZHU, J.; TACHADO, S. D.; et al. HIV impairs TNF-alpha mediated macrophage apoptotic response to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology**, v. 179, n. 10, p. 6973–80, 2007.
- PAWLOWSKI, A.; JANSSON, M.; SKÖLD, M.; ROTTENBERG, M. E.; KÄLLENIUS, G. Tuberculosis and HIV co-infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002464, 2012.
- PEAN, P.; NERRIENET, E.; MADEC, Y.; et al. Natural killer cell degranulation capacity predicts early onset of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV-infected patients with tuberculosis. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3315–20, 2012.
- PERREAU, M.; LEVY, Y.; PANTALEO, G. Immune response to HIV. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 8, n. 4, p. 333–40, 2013.
- PIATAK, M.; SAAG, M. S.; YANG, L. C.; et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1749–54, 1993.
- POIZOT-MARTIN, I.; FAUCHER, O.; OBRY-ROGUET, V.; et al. Lack of correlation between the size of HIV proviral DNA reservoir and the level of immune activation in HIV-infected patients with a sustained undetectable HIV viral load for 10 years. **Journal of clinical virology** , v. 57, n. 4, p. 351–5, 2013.
- RIBEIRO, R. M.; MOHRI, H.; HO, D. D.; PERELSON, A. S. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15572–7, 2002.

RIECKMANN, P.; POLI, G.; FOX, C. H.; KEHRL, J. H.; FAUCI, A. S. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. **Journal of immunology**, v. 147, n. 9, p. 2922–7, 1991.

RIJ, R. P. V. A. N.; HAZENBERG, M. D.; BENTHEM, B. H. B. V. A. N.; et al. Early Viral Load and CD4<sup>+</sup> T Cell Count , But Not Associated with R5-to-X4 HIV Type 1 Virus Evolution. **AIDS research and human retroviruses**, v. 19, n. 5, p. 389–398, 2003.

ROBERTSON J, MEIER M, WALL J, YING J, FICHTENBAUM CJ. Immune reconstitution syndrome in HIV: validating a case definition and identifying clinical predictors in persons initiating antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis.** ;42:1639–46, 2006

RODRIGUES, D. D. S.; CUNHA, R. M. DE; KALLAS, E. G.; SALOMAO, R. Distribution of naive and memory/effector CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and expression of CD38 on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. **The Brazilian journal of infectious diseases** , v. 7, n. 2, p. 161–5, 2003.

ROZOT, V.; VIGANO, S.; MAZZA-STALDER, J.; et al. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8(+) T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. **European journal of immunology**, v. 43, n. 6, p. 1568–77, 2013.

SALLUSTO F., LENIG D. ,FORSTER R., LIPP, M., LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, **NATURE**, vol 401 ,14, 1999

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 745–63, 2004.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; GIACOIA-GRIPP, C. B. W.; ALEXANDRINO DE OLIVEIRA, P.; et al. High levels of T lymphocyte activation in Leishmania-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 358, 2010.

SAVARINO, A; BOTTAREL, F.; MALAVASI, F.; DIANZANI, U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? **AIDS**, v. 14, n. 9, p. 1079–89, 2000.

SCHACKER T; COLLIER AC; HUGHES J; SHEA T; COREY L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. **Ann Intern Med.**, v. 125 (4), p. 257–64, 1996.

SEDDIKI, N.; SASSON, S. C.; SANTNER-NANAN, B.; et al. Proliferation of weakly suppressive regulatory CD4<sup>+</sup> T cells is associated with over-active CD4<sup>+</sup> T-cell responses in HIV-positive patients with mycobacterial immune restoration disease. **European journal of immunology**, v. 39, n. 2, p. 391–403, 2009.

- SEMPERE, J. M.; SORIANO, V.; BENITO, J. M. T Regulatory Cells and HIV Infection Key words. **Aids Reviews**, p. 54–60, 2007.
- SERRA, F. C.; HADAD, D.; OROFINO, R. L.; et al. Immune reconstitution syndrome in patients treated for HIV and tuberculosis in Rio de Janeiro. **The Brazilian journal of infectious diseases** v. 11, n. 5, p. 462–5, 2007.
- SHANKAR, E. M.; VIGNESH, R.; ELLEGÅRD, R.; et al. HIV-Mycobacterium tuberculosis co-infection: A “danger-couple model” of disease pathogenesis. **Pathogens and disease**, p. 1–9, 2013.
- SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006841, 2011.
- SHATTOCK R.J, AND ROSENBERG Z., Microbicides: Topical Prevention against HIV, **Cold Spring Harb Perspect Med**, 4:a007385 2012.
- SHELBURNE, S. A; MONTES, M.; HAMILL, R. J. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 167–70, 2006.
- SHELBURNE, S. A.; HAMILL, R. J. The immune reconstitution inflammatory syndrome. **AIDS reviews**, v. 5, n. 2, p. 67–79, 2003.
- SHRIHARI, N.; BACT, K. S. D.; MARIRAJ, J.; KRISHNA, S. The CD4 cell count recovery in HIV and tuberculosis co-infected patients versus tuberculosis uninfected HIV patients in a tertiary care Hospital. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 12, n. 10, p. 10–13, 2011.
- SIEG, S. F.; RODRIGUEZ, B.; ASAAD, R.; et al. Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 1, p. 62–70, 2005.
- SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **Journal of clinical virology** , v. 34, n. 4, p. 233–44, 2005.
- SIERRA, S.; WALTER, H. Targets for Inhibition of HIV Replication: Entry, Enzyme Action, Release and Maturation. **Intervirolgy**, v. 55, n. 2, p. 84–97, 2012.
- SILVA, T. P. ; GIACOIA-GRIPP, C. B. W.; SCHMALTZ, C. A; et al. T Cell Activation and Cytokine Profile of Tuberculosis and HIV-Positive Individuals during Antituberculous Treatment and Efavirenz-Based Regimens. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66095, 2013.
- SILVEIRA, H.; ORDWAY, D.; DOCKRELL, H.; JACKSON, M.; VENTURA, F. Cell-mediated immune responses to mycobacterial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and HIV infection. **Clinical and experimental immunology**, v. 110, n. 1, p. 26–34, 1997.

SIMMONS, A.; ALUVIHARE, V.; MCMICHAEL, A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 763–77, 2001.

SIMONETTA, F.; BOURGEOIS, C. CD4+FOXP3+ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection. **Frontiers in immunology**, v. 4, , p. 215, 2013.

SKOGMAR, S.; SCHÖN, T.; BALCHA, T. T.; et al. CD4 Cell Levels during Treatment for Tuberculosis (TB) in Ethiopian Adults and Clinical Markers Associated with CD4 Lymphocytopenia. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83270, 2013.

SRINIVASULA, S.; LEMPICKI, R. A; ADELSBERGER, J. W.; et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 262–70, 2011.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. **Immunological reviews**, v. 211, p. 39–48, 2006.

STONE, S. F.; PRICE, P.; KEANE, N. M.; MURRAY, R. J.; FRENCH, M. A. Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. **HIV medicine**, v. 3, n. 1, p. 21–7, 2002.

SUBRAMANYAM, S.; HANNA, L. E.; VENKATESAN, P.; et al. HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. **Journal of interferon & cytokine research** , v. 24, n. 2, p. 101–6, 2004.

SWAMINATHAN, S.; RAMACHANDRAN, R.; BASKARAN, G.; et al. Risk of development of tuberculosis in HIV-infected patients. **The international journal of tuberculosis and lung disease** , v. 4, n. 9, p. 839–44, 2000.

SWINGLER, S.; MANN, A.; JACQUÉ, J.; et al. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. **Nature medicine**, v. 5, n. 9, p. 997–103, 1999.

TASCA, K. I.; CALVI, S. A.; SOUZA, R. DE. Immunovirological parameters and cytokines in HIV infection. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 6, p. 663–669, 2012.

TIEU, H. VAN; ANANWORANICH, J.; AVIHINGSANON, A.; et al. Immunologic markers as predictors of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV and tuberculosis coinfecting persons in Thailand. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 11, p. 1083–9, 2009.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–62, 2010.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1173–80, 2006.

UNAIDS. Global Report. 2013.

UNAIDS. Tuberculosis: Co-epidemics of TB and HIV by country. 2014a.

UNAIDS. Tuberculosis: Co-epidemics of TB and HIV by WHO region. 2014b.

VINCENTI D., CARRARA S., DE MORI P., PUCILLO L.P., PETROSILLO N. et al. Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis. **Mol Med.** 9(3-4):105-11, 2003.

WALENSKY RP; ROSENBERG ES; FERRARO MJ; et al. Investigation of primary human immunodeficiency virus infection in patients who test positive for heterophile antibody. **Clin Infect Dis**, v. 333 (4), p. 570–2, 2001.

WANG, J. K.; KIYOKAWA, E.; VERDIN, E.; TRONO, D. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 394–9, 2000.

WANG X, CAO Z, JIANG J, NIU H, DONG M, TONG A, CHENG X.. Association of mycobacterial antigen-specific CD4(+) memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis. **J. Infect.** 60:133–139, 2010

WILKINSON, K. A; SELDON, R.; MEINTJES, G.; et al. Dissection of regenerating T-Cell responses against tuberculosis in HIV-infected adults sensitized by Mycobacterium tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 180, n. 7, p. 674–83, 2009.

WORSLEY, C. M.; SUCHARD, M. S.; STEVENS, W. S.; RIE, A. VAN; MURDOCH, D. M. Multi-analyte profiling of ten cytokines in South African HIV-infected patients with Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS). **AIDS research and therapy**, v. 7, n. 1, p. 36, 2010.

YATES, A.; STARK, J.; KLEIN, N.; ANTIA, R.; CALLARD, R. Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. **PLoS medicine**, v. 4, n. 5, p. e177, 2007.

ZHANG, Y. Immunopathogenesis of tuberculosis: Implications for vaccine development. **Respirology**, v. 13, p. S81–S87, 2008.

ZHANG, Z.; SHANG, H.; JIANG, Y.; et al. Activation and coreceptor expression of T lymphocytes induced by highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV/AIDS patients. **Chinese medical journal**, v. 119, n. 23, p. 1966–71, 2006.

ZHENG, S. G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? **American journal of clinical and experimental immunology**, v. 2, n. 1, p. 94–106, 2013.

# ANEXO