

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

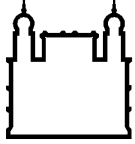
*Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical*

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS HLA-B, HLA-DR  
E KIR ENTRE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE COINFECTADOS  
PELO HIV-1 NA BUSCA DE MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE  
À IRIS**

**NATHALIA BEATRIZ RAMOS DE SÁ**

*Rio de Janeiro*

*Março de 2015*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

*NATHALIA BEATRIZ RAMOS DE SÁ*

*Avaliação da distribuição dos genótipos HLA-B, HLA-DR e KIR entre indivíduos com tuberculose coinfectados pelo HIV-1 na busca de marcadores de susceptibilidade à IRIS*

*Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical*

**Orientador (es):** *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado*  
*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sylvia Lopes Maia Teixeira*

**RIO DE JANEIRO**

*Março de 2015*

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S111 Sá, Nathalia Beatriz Ramos de

Avaliação da distribuição dos genótipos HLA-B, HLA-DR e KIR entre indivíduos com tuberculose coinfectados pelo HIV-1 na busca de marcadores de susceptibilidade à IRIS / Nathalia Beatriz Ramos de Sá. – Rio de Janeiro, 2015.

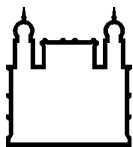
xviii, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.

Bibliografia: f. 93-110

1. HIV. 2. Tuberculose. 3. HLA. 4. KIR. I. Título.

CDD 616.995



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***NATHALIA BEATRIZ RAMOS DE SÁ***

### **AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS HLA-B, HLA-DR E KIR ENTRE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE COINFECTADOS PELO HIV-1 NA BUSCA DE MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE À IRIS**

**ORIENTADOR (ES): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sylvia Lopes Maia Teixeira**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

#### **EXAMINADORES:**

*Membros da banca:*

**Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto - Presidente (FIOCRUZ/RJ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Feres Saad - (FIOCRUZ/RJ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana Cardoso de Oliveira - (UERJ)**

*Suplentes:*

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Chester Cardoso - (UFRJ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Dalma Maria Banic - (FIOCRUZ/RJ)**

*Rio de Janeiro, 10 de Março de 2015*

***Esse trabalho é dedicado à minha  
amada tia Valéria de Sá, por todo carinho e afeto que  
sempre demonstrou. Tenho certeza que estaria muito feliz por mais essa  
conquista que é nossa!!***

## AGRADECIMENTOS

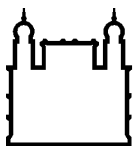
- *À Deus em primeiro lugar pela vida e pela oportunidade de trilhar o caminho o qual me encontro hoje, por todas as conquistas e oportunidades, por sempre renovar minhas forças e por ser meu melhor amigo;*
- *À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Mariza Morgado pela oportunidade e por confiar na minha capacidade para a realização desse trabalho. Obrigada!;*
- *À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Sylvia Teixeira pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, paciência e alegrias é claro. Obrigada!;*
- *Ao meu esposo, amigo, companheiro, Guilherme Almeida. Obrigada por partilhar esses anos comigo, aguentar meus momentos difíceis e de muito trabalho. Obrigada por estar sempre presente na minha vida, me ajudando em tudo que eu precisava, me fazendo rir nas horas difíceis, compartilhando sonhos e metas. Agradeço sempre a Deus por você estar na minha vida. Não há palavras para descrever o quanto você foi, é, e será o melhor companheiro que uma pessoa pode ter na vida. Obrigada, obrigada e obrigada. Te Amo!!;*
- *À minha avó Mathilde que merecia um capítulo a parte na dissertação por sempre me incentivar, dar apoio e me ajudar em tudo àquilo que eu precisava muito obrigada!! Te amo!;*
- *À melhor mãe do mundo Vera de Sá por estar comigo em todos os momentos me apoiando e me ajudando em tudo que eu precisava. Você é parte fundamental dessa conquista. Obrigada por todo amor e carinho! Te amo demais;*
- *Ao meu pai Odail Ramos, por sempre incentivar meus estudos, acreditando que eu chegaria mais longe. Não há palavras para descrever o quanto você foi importante nesse processo. Obrigada pelo amor e carinho. Te amo;*
- *Aos meus irmãos Odail Junior, Maria Carolina e Tatá pelas brincadeiras, gargalhadas e bobagens na hora certa. Obrigada por todo amor e carinho que vocês sentem por mim e que podem ter certeza que sinto por vocês, obrigada por me ajudar sempre a relaxar no shopping ou dormindo no sofá da casa de vocês ou usando suas roupas hahaha. Vocês são maravilhosos e sei que vamos compartilhar ainda muitas histórias juntas, até porque agora temos o nosso gatinho lindo e fofo Luigi. Amo vocês!!;*
- *Aos meus amigos do LABAIDS Thatá, Bianca e Diogo por todas as risadas, brincadeiras, conversas e caronas é claro!! Tenho certeza que vamos estar juntos em muitas jornadas científicas pela vida!!;*

- *À Tatiana que gentilmente cedeu as amostras para o presente estudo e ajudou em dúvidas e questionamentos acerca do projeto;*
- *À todos os amigos e colegas do LABAIDS pelos momentos que passamos juntos e por toda ajuda direta ou indireta que recebi;*
- *À todos os amigos da pós-graduação em Medicina Tropical pelas manhãs, tardes e noites de estudos e estímulos. Obrigada turma!!;*
- *À equipe do laboratório de micobacterioses do INI/FIOCRUZ;*
- *À plataforma de sequenciamento pelo apoio ao projeto. Obrigada Aline, Bia e Renata!;*
- *Aos pacientes que concordaram em participar do estudo;*
- *Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro;*
- *À todos que estiveram presentes em minha vida colaborando para o desenvolvimento desse trabalho.*

***“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente  
entendam que a mão do Senhor fez isto.”***

***Isaías 41:2***





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

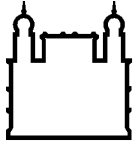
*Avaliação da distribuição dos genótipos HLA-B, HLA-DR e KIR entre indivíduos com tuberculose coinfectados pelo HIV-1 na busca de marcadores de susceptibilidade à IRIS*

### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**NATHALIA BEATRIZ RAMOS DE SÁ**

*Atualmente, a tuberculose (TB) e a síndrome da imunodeficiência humana (HIV) são as duas principais doenças infecciosas que levam à óbito no mundo. A infecção pelo HIV aumenta o risco de adoecimento por TB, sendo essa uma das mais frequentes doenças oportunistas. Em certos pacientes com tuberculose e infectados pelo HIV-1 que recebem tratamento para os dois agravos, uma profunda reação patológica inflamatória pode surgir, causando um efeito contrário ao esperado. Esse quadro patológico paradoxal é denominado IRIS (Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune). Os fatores associados ao risco da IRIS ainda não estão completamente compreendidos. Estudos sobre a patogênese desta síndrome relatam que tanto a combinação da carga antigênica quanto a susceptibilidade genética do hospedeiro podem influenciar o aparecimento da síndrome. No presente estudo, avaliamos a distribuição e o impacto dos genótipos HLA-B, HLA-DRB1 e KIR em indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1, além do papel desses genes na ocorrência da IRIS. O estudo é retrospectivo, e incluiu 61 pacientes acompanhados no período de 2006 a 2012 no âmbito do projeto "Síndrome de reconstituição imune: avaliação da resposta imune em pacientes com tuberculose em uso de HAART", conduzido em colaboração com o Instituto Nacional de Infectologia (INI/FIOCRUZ). Os dados das frequências gênicas dos pacientes foram comparados com dados disponíveis para a população brasileira. Os alelos HLA-B mais frequentes foram: B\*15; B\*44; B\*35 e B\*07, enquanto que os alelos HLA-DRB1 mais frequentes no estudo foram: DRB1\*07, DRB1\*11, DRB1\*04 e DRB1\*15. Esses resultados corroboram com estudos prévios da população Brasileira e, apesar de terem sido observadas algumas diferenças nas frequências alélicas entre os grupos com IRIS e sem IRIS, estas não atingiram significância estatística. Uma tendência à significância envolvendo o alelo HLA-B\*42 foi observada entre os grupos IRIS x não IRIS ( $p=0,064$ ). Com relação às frequências dos genes KIR, estas foram semelhantes às descritas para a população Brasileira, porém não houve diferenças estatisticamente significativas relativas à distribuição das frequências dos diferentes genótipos KIR e seus haplótipos quando se comparou o grupo de pacientes com IRIS versus sem IRIS. Portanto, com base nestes achados, não foi possível inferir associações entre estes marcadores genéticos e a ocorrência de IRIS. Contudo, esse trabalho foi pioneiro na descrição da distribuição dos alelos HLA-B, HLA-DRB1 e KIR em indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 que, no seu conjunto, visam contribuir para a discussão sobre o impacto de genes do hospedeiro no contexto dos dois agravos estudados e na ocorrência da IRIS.*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

*Evaluation of distribution of HLA-B, HLA-DR and KIR genotypes among individuals with tuberculosis coinfecting by HIV-1 in search of markers of susceptibility to IRIS*

### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE**

**NATHALIA BEATRIZ RAMOS DE SÁ**

Currently, tuberculosis (TB) and human immunodeficiency syndrome (HIV) are the two major infectious diseases that lead to death in the world. HIV infection increases the risk of TB illness, being one of the most frequent opportunistic diseases. In some patients with tuberculosis and HIV-1 that received treatment for the two diseases, a deep pathological inflammatory reaction can arise, causing an effect contrary to the expected. This paradoxical pathological condition is called IRIS (inflammatory syndrome of reconstitution immunity). The factors associated with the risk of IRIS are not yet completely understood. Studies on the pathogenesis of this syndrome report that both the combination of antigenic load and the genetic susceptibility of the host can influence the appearance of the syndrome. In the present study, we evaluated the distribution and the impact of HLA-B, HLA-DRB1 and KIR genotypes in individuals with tuberculosis infected with HIV-1, as well as the role of these genes in the occurrence of IRIS. This study is retrospective and included 61 patients followed up between 2006 and 2012 in the context of the project "Immune reconstitution syndrome: evaluation of immune response in patients with tuberculosis in use of HAART", held in collaboration with the National Infectology Institute (INI/FIOCRUZ). The gene frequency data of patients were compared with data from the Brazilian population. HLA-B alleles more frequent were B\*15; B\*44; B\*35 and B\*07, while HLA-DRB1 alleles frequent in the study were DRB1\*07, DRB1\*11, DRB1\*04 and DRB1\*15. These results corroborate previous studies in the Brazilian population and, although some differences in the allele frequencies could be observed between the groups with and without IRIS, none of these was statistically significant. A trend to significance involving the allele HLA-B\*42 was observed between IRIS x non-IRIS groups ( $p=0.064$ ). Concerning KIR genes frequencies, they were similar to those described for the Brazilian population, but no statistically significant difference in the distribution of KIR genotypes and haplotypes was observed in the comparison of IRIS versus non-IRIS patients. Therefore, based on our findings it was not possible to infer any association between these genetic markers and the occurrence of IRIS. However, this study was pioneer in describing the distribution of HLA-B, HLA-DRB1 and KIR alleles among individuals with tuberculosis infected with HIV-1. These results contribute to the discussion of the impact of host genes in the context of the two diseases studied and in the occurrence of IRIS.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS.....	1
1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV): CARACTERÍSTICAS ESTRUTURA E GENÉTICAS .....	3
1.3 HISTÓRIA NATURAL E IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1 .....	6
1.4 A TUBERCULOSE E O <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ( <i>Mtb</i> ): CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	12
1.5 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE .....	14
1.6 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO <i>MYCOBACTERIUM</i> <i>TUBERCULOSIS</i> .....	16
1.7 AIDS E TUBERCULOSE .....	18
1.8 SÍNDROME INFLAMATÓRIA DA RECONSTITUIÇÃO IMUNE (IRIS)....	20
1.9 IMUNOGENÉTICA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E <i>Mtb</i> .....	23
1.10 OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) .....	24
1.11 AS CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) E OS GENES KIR.....	29
1.12 GENES KIR E HLA COMO MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE/PROTEÇÃO À AIDS E À TUBERCULOSE .....	35
1.13 JUSTIFICATIVA.....	39
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 CASUÍSTICA: .....	41
3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE: .....	42
3.3 RECRUTAMENTO:.....	43
3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:.....	43
3.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO: .....	44

3.6	QUANTIFICAÇÃO DO DNA: .....	44
3.7	GENOTIPAGEM KIR: .....	44
3.8	TIPAGEM DOS ALELOS HLA DE CLASSE I B E II DRB1: .....	46
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA: .....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	48
4.2	FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA-B .....	50
4.3	HOMOZIGOSE E HETEROZIGOSE DOS ALELOS HLA-B.....	60
4.4	FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA-DRB1 .....	61
4.5	FREQUÊNCIA DOS GENES KIR .....	68
4.6	HAPLÓTIPOS KIR .....	74
5	DISCUSSÃO	76
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	78
5.2	GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (HLA-B) .....	79
5.3	GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (HLA-DRB1) .....	83
5.4	GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (KIR) .....	86
6	PERSPECTIVAS	90
7	CONCLUSÕES	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9	ANEXOS	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa global de adultos e crianças vivendo com HIV em 2013. Fonte: UNAIDS, 2014. Disponível em: <a href="http://www.unaids.org">www.unaids.org</a> .....	1
Figura 2: Distribuição dos casos de aids detectados (por 100 mil habitantes) por região do Brasil no período de 2004 a 2013. Fonte: Boletim Epidemiológico 2014. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível em: <a href="http://aids.gov.br">aids.gov.br</a> . ....	3
Figura 3: Representação esquemática da partícula madura do HIV-1. Fonte: <a href="http://celulando.blogspot.com">http://celulando.blogspot.com</a> . ....	4
Figura 4: Representação esquemática do genoma do provírus. As proteínas codificadas pelos genes gag, pol e env também se encontram representadas. Fonte: <a href="http://www.scistyle.com/">http://www.scistyle.com/</a> .....	5
Figura 5: Classificação molecular do HIV. Fonte: Adaptado de Robertson <i>et al.</i> , 2000 e Plantier <i>et al.</i> , 2009. ....	6
Figura 6: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1. Fonte: Adaptado de Peterlin e Trono, 2003. ....	7
Figura 7: Curso típico da infecção pelo HIV, na ausência de terapia antirretroviral. (Adaptado An e Winkler, 2010).....	9
Figura 8: Perfis distintos de progressão para a aids: progressores rápidos (PR), progressores típicos (PT) e não progressores de longo termo (LTNP). (Adaptado de Poropatich & Sullivan, 2011). ....	10
Figura 9: <i>Mycobacterium</i> corado (laranja-escuro) em amostra de escarro. Fonte: Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Disponível em: <a href="http://www.cdc.gov">www.cdc.gov</a> . ....	13
Figura 10: Estimativa da incidência global da TB em 2013. Fonte: WHO, 2014.	14
Figura 11: Taxa de incidência de TB por região do Brasil. Número de casos por 100 mil habitantes em 2012. Fonte: Ministério da Saúde, 2012.....	15
Figura 12: Visão geral dos mecanismos imunológicos na infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Adaptado de Ulrichs & Kaufmann 2006. ....	17
Figura 13: Estimativa da prevalência de infectados pelo HIV entre os casos novos de tuberculose no mundo em 2013. Fonte: Adaptado de WHO, 2014.....	19
Figura 14: Localização e organização do complexo HLA no cromossomo 6. Este complexo é convencionalmente dividido em três regiões: I, II e III. Retirado de Klein & Sato, 2000.....	26

Figura 15: Estrutura das moléculas HLA de classe I e classe II, com representação de seus respectivos domínios $\alpha$ e $\beta$ formando as fendas de ligação do peptídeo. A cadeia $\beta$ 2-microglobulina é a cadeia leve das moléculas de classe I. Retirado de Klein & Sato, 2000.....	28
Figura 16: Relação entre a célula NK e a célula alvo, de acordo com a presença ou ausência de ligantes HLA. Fonte: Adaptado de Jost & Altfeld, 2013. ....	30
Figura 17: Disposição dos genes no cromossomo 19, indicando o complexo de receptores leucocitários (LCR) e a localização dos genes KIR na posição 19q13.4. Fonte: <a href="http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html">http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html</a> .....	32
Figura 18: Representação esquemática dos haplótipos A e B dos genes KIRs. Os genes que codificam KIRs ativadores estão em rosa, os KIRs inibitórios estão em azul e os pseudogenes em verde. KIR2DL4, que tem característica tanto ativatória quanto inibitória, está em laranja (Adaptado de Matin & Carrington, 2013).....	33
Figura 19: (A) Estrutura de um gene KIR típico e do seu receptor codificado. (Iannello <i>et al.</i> , 2008). (B) Receptores KIR inseridos na membrana celular (MC). (Jobim <i>et al.</i> , 2008). ....	34
Figura 20: Fluxograma dos pacientes recrutados no estudo. (Adaptado de Silva <i>et al</i> 2013). ....	42
Figura 21: Fluxograma das etapas às quais os pacientes inscritos no estudo foram submetidos .....	43
Figura 22: Worksheet utilizada para determinar os alelos presentes em cada amostra. ....	45
Figura 23: Frequência dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 incluídos no estudo. ....	52
Figura 24: Distribuição dos alelos específicos do gene HLA-B encontrados nos grupos alélicos predominantes em nosso estudo. ....	53
Figura 25: Frequência dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 incluídos no estudo. ....	62
Figura 26: Distribuição dos alelos específicos do gene HLA-DRB1 encontrados nos grupos alélicos predominantes em nosso estudo.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos 61 pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados pelo HIV-1 do INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.....	49
Tabela 2: Genótipos HLA-B e HLA-DRB1 dos pacientes incluídos no estudo. .	50
Tabela 3: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B entre os indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1. ....	54
Tabela 4: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 entre caucasianos e não-caucasianos.....	56
Tabela 5: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e da população Brasileira (dados do REDOME) estratificada em grupos étnicos.....	58
Tabela 6: Frequência dos grupos Bw4, Bw6 e Bw4/Bw6 entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS.....	61
Tabela 7: Distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-DRB1 entre os indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1. ....	64
Tabela 8: Distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 entre caucasianos e não-caucasianos.....	65
Tabela 9: Distribuição das frequências dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e da população Brasileira (dados do REDOME) estratificada em grupos étnicos.....	67
Tabela 10: Genótipos KIR, motivos HLA-B e haplótipos dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 sem IRIS.....	69
Tabela 11: Genótipos KIR, motivos HLA-B e haplótipos dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 com IRIS. ....	71
Tabela 12: Frequências gênicas KIR entre indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1.....	73
Tabela 13: Distribuição das frequências do gene KIR nos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e a população Brasileira (dados do <i>Allele Frequencies Net Database</i> ). ....	74
Tabela 14: Frequência dos Haplótipos A e B entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS. ....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	<i>Graus Celsius</i>
μL	<i>Microlitros</i>
AIDS/SIDA	<i>Acquired Immune deficiency Syndrome /Síndrome da Imunodeficiência Humana</i>
ARV	<i>Antirretroviral</i>
pb/bp	<i>Pares de base/base pair</i>
CCR5	<i>CC-chemokine receptor 5 / Receptor de quimiocina tipo 5</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4 / Cluster de Diferenciação 4</i>
CRF/FRC	<i>Circulant Recombinant Form / Forma Recombinante Circulante</i>
CXCR4	<i>CXC-chemokine receptor 4 / Receptor de quimiocina tipo 4 domínio C-X-C</i>
ddNTP	<i>Dideoxynucleotídeo trifosfatado</i>
DEPC	<i>Diethyl-pyrocabonato (Diethyl pyrocarbonate)</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotídeo trifosfatado</i>
DST	<i>Doença Sexualmente Transmissível</i>
FIOCRUZ	<i>Fundação Oswaldo Cruz</i>
gag	<i>Gene codificador das proteínas estruturais do Capsídeo, Nucleocapsídeo e Matriz</i>
gp120	<i>Glicoproteína 120</i>
gp160	<i>Glicoproteína 160</i>
gp41	<i>Glicoproteína 41</i>
HAART	<i>Terapia antirretroviral de alta eficácia</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus /Vírus da Imunodeficiência Humana</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type-1 /Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1</i>
HIV-2	<i>Human Immunodeficiency Virus type-2 /Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens / Antígenos leucocitários humanos</i>



<i>IFN-γ</i>	<i>Interferon gama</i>
<i>Int</i>	<i>Gene codificador da proteína integrase</i>
<i>ITAM</i>	<i>Imunorreceptores Ativadores Baseados em Tirosina</i>
<i>ITIM</i>	<i>Imunorreceptores Inibitórios Baseados em Tirosina</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleucina 6</i>
<i>IL-18</i>	<i>Interleucina 18</i>
<i>KIR</i>	<i>Killer-cell immunoglobulin-like</i>
<i>LTNP</i>	<i>Não Progressores de Longo Termo</i>
<i>LTR</i>	<i>Sequência terminal longa e repetitiva/Long Terminal Repeated</i>
<i>MA</i>	<i>Matriz</i>
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>Cloreto de magnésio</i>
<i>MHC</i>	<i>Major Histocompatibility Complex / Complexo Principal de Histocompatibilidade</i>
<i>nef</i>	<i>Gene codificador da proteína Nef</i>
<i>ng</i>	<i>Nanograma</i>
<i>NK</i>	<i>Células Natural Killer</i>
<i>nm</i>	<i>Nanômetro</i>
<i>PR</i>	<i>Progressores Rápidos</i>
<i>PT</i>	<i>Progressores Típicos</i>
<i>p17</i>	<i>Proteína 17/proteína da Matriz</i>
<i>p24</i>	<i>Proteína 24/ proteína do Capsídeo</i>
<i>p6</i>	<i>Proteína 6</i>
<i>p7</i>	<i>Proteína 7/proteína do Núcleocapsídeo</i>
<i>pb</i>	<i>Pares de base</i>
<i>PCR/RCP</i>	<i>Polimerase Chain Reaction /Reação em cadeia da polimerase</i>
<i>pol</i>	<i>Gene codificador das enzimas virais Transcriptase Reversa, Protease e Integrase</i>
<i>PR</i>	<i>Protease</i>
<i>rev</i>	<i>Gene codificador da proteína Rev</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucléico</i>
<i>RNA<sub>m</sub></i>	<i>RNA mensageiro</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>RT/TR</i>	<i>Reverse Transcriptase /Transcriptase Reversa</i>

<i>TARV</i>	<i>Terapia antirretroviral</i>
<i>tat</i>	<i>Gene codificador da proteína tat</i>
<i>TBE</i>	<i>Tampão composto por Tris, ácido bórico e EDTA</i>
<i>TCR</i>	<i>Receptores de Células T</i>
<i>TLR</i>	<i>Receptores Toll-like</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis fator / Fator de necrose tumoral</i>
<i>UDI</i>	<i>Usuários de Drogas Injetáveis</i>
<i>UNAIDS</i>	<i>Jointed United Nations Programme on HIV/AIDS /</i>
<i>URF/FRU</i>	<i>Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS</i>
<i>vif</i>	<i>Gene codificador da proteína Vif</i>
<i>vpr</i>	<i>Gene codificador da proteína Vpr</i>
<i>vpu</i>	<i>Gene codificador da proteína Vpu</i>
<i>Vpu</i>	<i>Proteína viral U/Viral Protein U</i>
<i>WHO/OMS</i>	<i>World Health Organization / Organização Mundial de Saúde</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS

De acordo com o Programa das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS), aproximadamente 35 milhões de pessoas estavam infectadas com o HIV em 2013 no mundo (UNAIDS, 2014) (Figura 1). Desde o início da epidemia, cerca de 78 milhões de pessoas foram infectadas com o HIV e 39 milhões morreram de doenças relacionadas com a infecção. Os casos de novas infecções por HIV caíram 38% desde 2001. Em 2013, 1.5 milhões de pessoas morreram por complicações relacionadas com a aids no mundo, em comparação com 2.4 milhões de mortes em 2005. Representando uma redução de 35%. O número de pessoas vivendo com HIV aumentou devido ao sucesso no uso da terapia antirretroviral (TARV) que reduziu a mortalidade e a morbidade relacionadas à doença. Em 2013, aproximadamente 12,9 milhões de pessoas vivendo com HIV tiveram acesso à TARV, representando 37% de todas as pessoas que vivem com o HIV no mundo (UNAIDS, 2014).

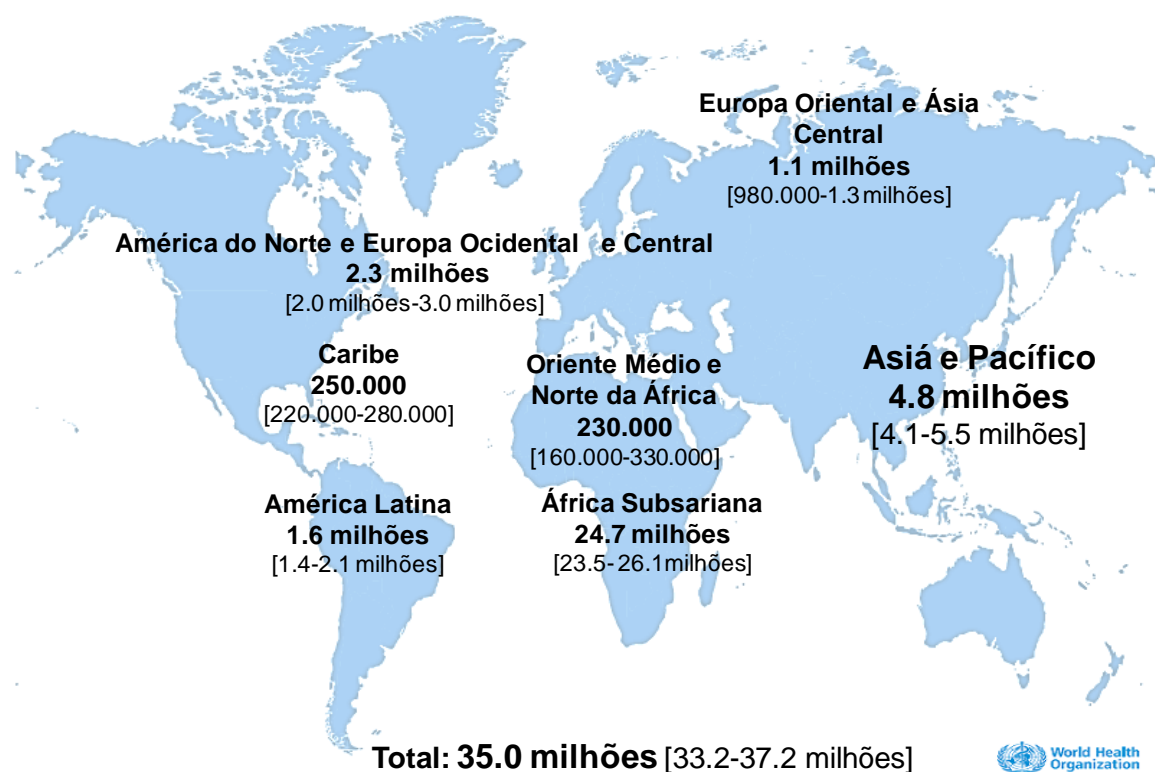


Figura 1: Estimativa global de adultos e crianças vivendo com HIV em 2013. Fonte: UNAIDS, 2014. Disponível em: [www.unaids.org](http://www.unaids.org).

Na América Latina em 2013, 1.6 milhões de pessoas viviam com o HIV. As novas infecções pelo HIV diminuíram 3% no período de 2005 a 2013 nessa região e aproximadamente 47.000 mil pessoas morreram de causas relacionadas à aids. Entre 2005 e 2013, o número de mortes relacionadas à essa doença diminuiu em 31%. A cobertura do tratamento já atinge 45% das pessoas que vivem com HIV na América Latina (UNAIDS, 2014).

No Brasil, desde o início da epidemia (1980), até dezembro de 2013, foram registrados 278.306 óbitos tendo como causa básica a aids, e, segundo estimativas do Ministério da Saúde, desde o início da epidemia de aids no Brasil até junho de 2014, foram registrados no país 757.042 casos de aids, onde a taxa de detecção apresenta uma média de 20,5 casos para cada 100 mil habitantes (Boletim Epidemiológico, 2014). O número de pacientes em TARV até outubro de 2014 atingiu a faixa de 400.000 de pessoas, um aumento de aproximadamente 12% quando comparado a 2013 e mais do que o dobro do observado em 2009. Observando-se a epidemia por região, podemos notar uma tendência à estabilização da taxa de detecção de aids no Brasil ao longo dos últimos anos. Porém é importante ressaltar que o número de casos notificados no país não se distribui de forma homogênea entre as regiões. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul (31.1), seguida pela Região Norte (26.1), Região Sudeste (18.7), Região Nordeste (16.0) e Região Centro-Oeste (8.6) (Figura 2). Observa-se a estabilização da taxa na região Sul, enquanto que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam uma tendência linear de crescimento significativa. A região Sudeste é a única que apresenta tendência de queda significativa nos últimos dez anos.

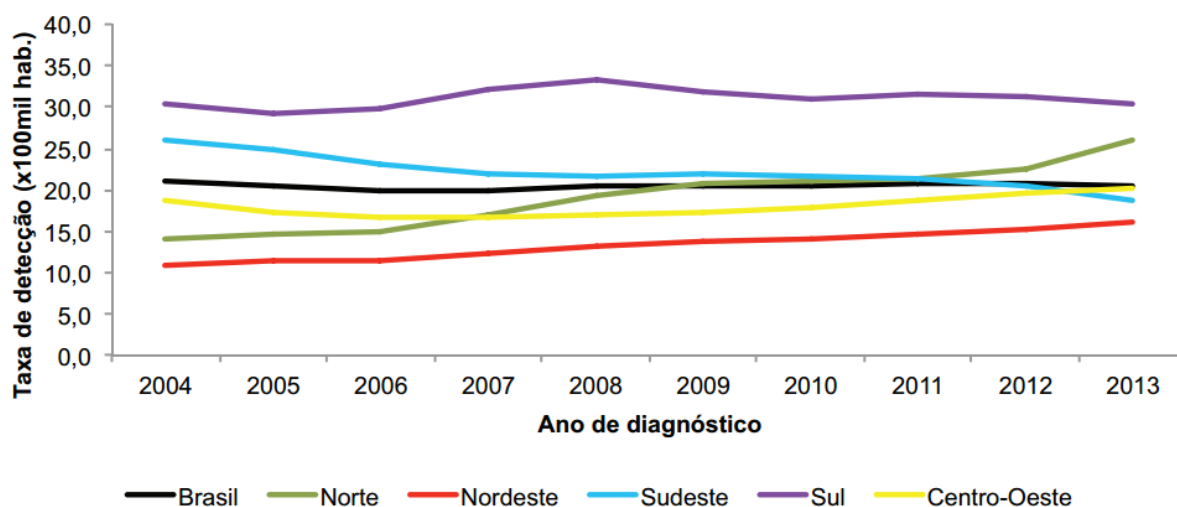


Figura 2: Distribuição dos casos de aids detectados (por 100 mil habitantes) por região do Brasil no período de 2004 a 2013. Fonte: Boletim Epidemiológico 2014. Programa Nacional de DST e AIDS. Disponível em: [aids.gov.br](http://aids.gov.br).

## 1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV): CARACTERÍSTICAS ESTRUTURA E GENÉTICAS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*, causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos que necessitam, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia de DNA, que pode então se integrar ao genoma do hospedeiro. O HIV infecta células que possuem receptores do tipo CD4+ na sua superfície como, por exemplo, os linfócitos T CD4+ (helper), os macrófagos e as células dendríticas (revisado por Grossman et al., 2002). O HIV se caracteriza por uma enorme variabilidade genética e antigênica. Dois tipos principais foram caracterizados em humanos (Revisado por Hu et al., 1996): o tipo 1 (HIV-1), predominante em todo o mundo e responsável pela pandemia de aids; e o tipo 2 (HIV-2), reportado primeiramente na África Ocidental (Clavel et al., 1986) e menos patogênico que o HIV-1 (Marlink et al., 1994).

A partícula viral do HIV madura possui cerca de 110nm de diâmetro (Figura 3) com simetria icosaédrica. O HIV possui a partícula envelopada e esférica a qual é oriunda da célula hospedeira durante o processo de brotamento dos vírions (Nakai & Goto, 1996). Além disso, no envelope viral encontram-se as glicoproteínas gp120 (superfície) e gp41 (transmembranar), essas glicoproteínas codificadas pelo gene do envelope (*env*) desempenham um importante papel nas etapas de adsorção, fusão e posterior entrada na célula hospedeira (Nakai & Goto, 1996).

Internamente ao envelope viral, encontra-se a matriz, formada pela proteína p17. Essa proteína é essencial para a integridade do vírion e participa da maturação da partícula viral pela incorporação das glicoproteínas do envelope no vírion maduro (Rubbert et al., 2005). O capsídeo viral possui a forma cônica e é constituído pela proteína p24 (Marx et al., 1988). Envoltos pelo capsídeo encontram-se o nucleocapsídeo, as enzimas virais (protease, transcriptase reversa e integrase) e as

proteínas acessórias, as quais estão intimamente ligadas às duas fitas de RNA (Revisto por Wigg, 2008).

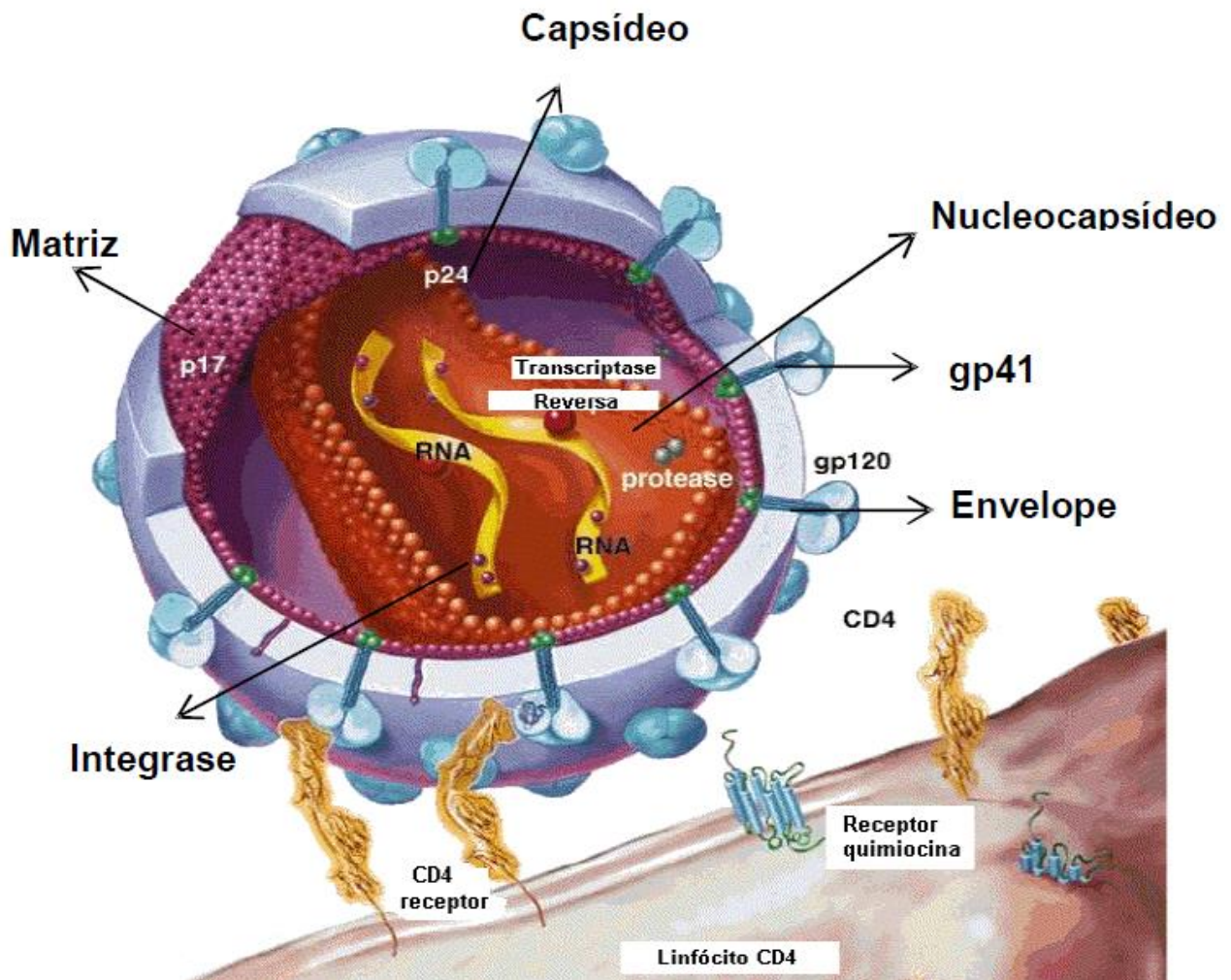


Figura 3: Representação esquemática da partícula madura do HIV-1. Fonte: <http://celulando.blogspot.com>.

O genoma do HIV é composto por nove regiões gênicas: três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) que estão presentes em todos os retrovírus e fazem parte da estrutura viral; dois genes reguladores (*tat* e *rev*); quatro acessórios (*vif*, *vpr*, *nef* e *vpu* ou *vpx*) (Figura 4). O gene *gag* é o primeiro gene do quadro de leitura e codifica quatro proteínas estruturais: p6, p17 (matriz), p24 (capsídeo) e p7 (nucleocapsídeo) (revisto por Ferguson et al, 2002), as principais funções dessas proteínas são proteger o material genético, empacotamento do RNA viral, formar a estrutura funcional do vírus e, estimular a liberação de novas partículas virais (Huang et al., 1995; revisto por Freed et al., 2001). O gene *pol* é responsável por codificar as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (INT), essas proteínas estão envolvidas no processo de maturação, retrotranscrição e

integração ao genoma viral, respectivamente (revisto por Freed et al., 2001). Por fim, o gene *env* codifica uma poliproteína precursora (gp160), que é glicosilada e clivada por proteases celulares em duas proteínas, uma de superfície (gp120) e uma transmembranar (gp41). Essas glicoproteínas atuam nas etapas de adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira (revisto por Goto et al, 1998). Além disso, quando integrado no DNA da célula hospedeira, o genoma do vírus (provírus), apresenta repetições terminais longas, denominadas LTR (Long terminal repeats). Essas regiões não codificam proteínas, porém exercem funções regulatórias importantes, como a participação na retrotranscrição e na integração com o genoma do hospedeiro (revisto por Freed et al., 2001).

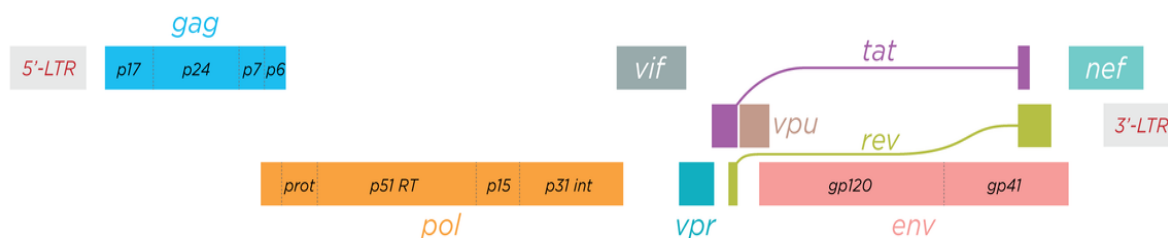


Figura 4: Representação esquemática do genoma do provírus. As proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env* também se encontram representadas. Fonte: <http://www.scistyle.com/>.

Com relação às características genéticas, as análises de diferentes linhagens do HIV-1 revelaram a grande diversidade do vírus, sendo divididos em grupos, subtipos e formas recombinantes circulantes (“Circulating Recombinant Forms”, CRFs), baseando-se nas diferenças filogenéticas encontradas (Kantor e Katzenstein, 2004; Sanches et al., 2007) (Figura 5). Esses grupos foram originados por eventos independentes de transmissão para os humanos (Geretti, 2009). Atualmente o HIV-1 é classificado em quatro grupos distintos: grupo M (major), grupo O (outlier), grupo N (“não-M/não-O”) e grupo P (Simon et al., 1998; Roques et al., 2004; Ayoub et al., 2001; Plantier et al., 2009). O grupo M é o dominante na epidemia e é composto por nove subtipos (A-D, F-H, J e K), sub-subtipos (F1, F2 e A1-A5) e formas recombinantes circulantes e formas recombinantes únicas (Vidal et al., 2009). Assim como o HIV-1, o HIV-2 também é classificado em subtipos (A-H) (Cunha et al., 2012).

A alta variabilidade genética do HIV-1 tem grande impacto na progressão para a aids, transmissão, diagnóstico, resposta à terapia antirretroviral, resposta imune e portanto, no desenvolvimento de vacinas (Hemelaar et al., 2011).

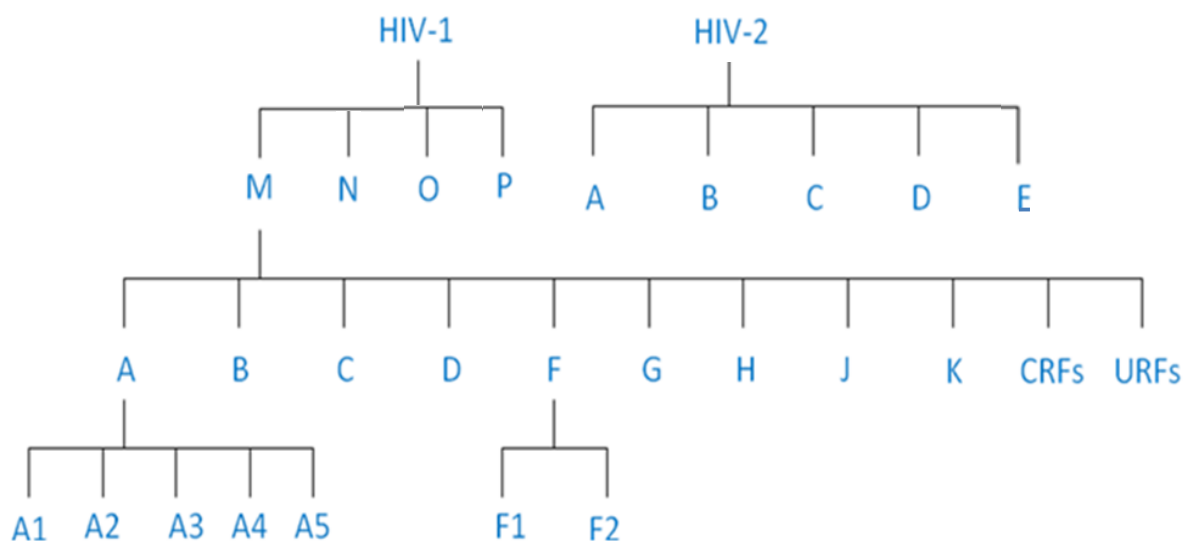


Figura 5: Classificação molecular do HIV. Fonte: Adaptado de Robertson et al., 2000 e Plantier et al., 2009.

### 1.3 HISTÓRIA NATURAL E IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1

O processo patogênico da infecção pelo HIV-1 e sua história natural são complexos e dependem de diversos fatores relacionados à interação do vírus com o hospedeiro (Pantaleo et al., 1993). Essa relação reflete diretamente na heterogeneidade considerável da epidemia de aids, pois entre os indivíduos expostos ao HIV-1, nem todos são infectados, e dentre os infectados, a duração e o curso da doença podem variar consideravelmente.

A patogênese da infecção pelo HIV-1 envolve a entrada e a replicação do vírus no interior de células do hospedeiro que expressam a molécula CD4, tais como linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células dendríticas e macrófagos. Além disso, para entrar nas células o HIV necessita de correceptores de entrada. Os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 foram identificados como os principais correceptores para o HIV-1 (Hogan et al., 2001).



No processo de infecção da célula pelo HIV-1 há a interação entre as proteínas virais gp120 e gp41 com os receptores da célula hospedeira, CD4 e CCR5 ou CXCR4 (Choe et al., 1996). A glicoproteína gp120 liga-se ao receptor CD4 e ao co-receptor, o que faz com que ocorram mudanças conformacionais na própria gp120, expondo outra glicoproteína do envelope viral, a gp41, o que leva a fusão das membranas viral e da célula hospedeira (Sattentau et al., 1993). Essa fusão leva à internalização do capsídeo viral para o citoplasma celular (Stein et al., 1987). Após a adsorção, o capsídeo é degradado liberando o genoma e as proteínas virais no citoplasma, a partir daí inicia-se a transcrição reversa, onde o RNA viral é decodificado para DNA. O DNA reversamente transcrito é transportado pelo citoplasma até o núcleo celular, onde ocorre sua integração com o DNA humano, catalisado pela enzima integrase. Após sua integração, o DNA viral passa a ser denominado provírus. Na transcrição o provírus é transcrito em RNA, podendo sofrer tradução em proteínas virais (revisto por Morrow et al., 1994). Posteriormente, há a montagem dos componentes virais para a formação dos vírions e sua liberação da célula através do processo de brotamento e maturação em partículas infecciosas que podem, então, infectar outras células suscetíveis (Figura 6).

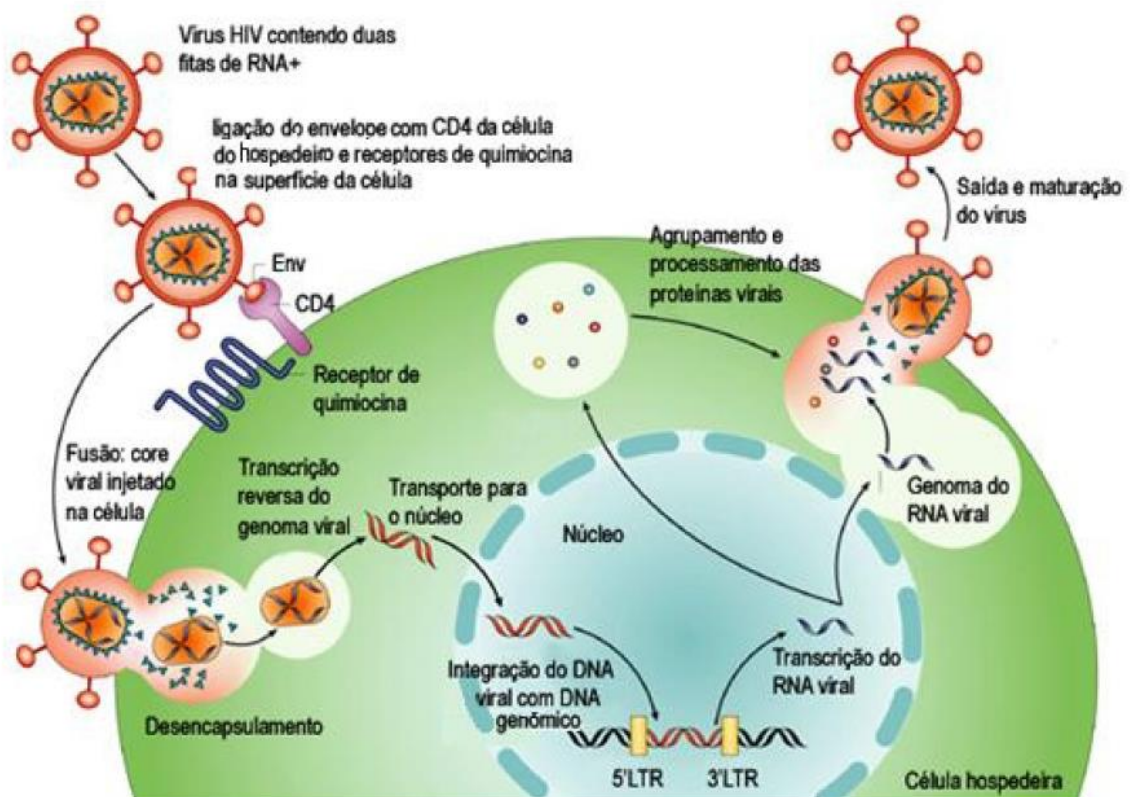


Figura 6: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1. Fonte: Adaptado de Peterlin e Trono, 2003.

*Clinicamente a infecção pelo HIV pode ser dividida em três fases com características distintas: fase aguda, fase crônica e fase de aids (Figura 7).*

*A fase aguda ou infecção primária compreende o período das primeiras semanas após infecção pelo HIV, até o aparecimento dos anticorpos anti-HIV (soroconversão), que costuma ocorrer por volta da quarta semana após a infecção. (Kahn & Walker, 1998). É geralmente assintomática e caracteriza-se por uma carga viral elevada e resposta imunológica intensa. Nessa fase há a disseminação do vírus para diversos sítios do corpo (principalmente os tecidos linfoides) e o estabelecimento da infecção em vários tipos de células, tais como: macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4+. Concomitantemente, ocorre uma intensa resposta imune, caracterizada pela diminuição transitória do número de linfócitos T CD4+, assim como um decréscimo sutil no número de células T CD8+ e células B (Piatak et al. 1993).*

*Com o fim da fase aguda, a infecção entra num período crônico geralmente assintomático, conhecido como fase de latência. Esse período caracteriza-se pela replicação viral persistente e depleção lenta e gradativa de linfócitos T CD4+ (Geskus et al. 2007). Sua duração é extremamente variável, e perfis de progressão distintos podem ser observados entre os indivíduos infectados pelo HIV (Revisto por Casado et al., 2010). A maioria deles (70-80%), denominados progressores típicos progride para a AIDS em quatro a dez anos. Cerca de 10% dos indivíduos, conhecidos como progressores rápidos, desenvolvem aids no prazo de até 3 anos (Phair et al., 1992; Anzala et al., 1995). Uma fração pequena de pacientes (cerca de 5%), denominados de não progressores de longo termo (LTNPs) permanece assintomáticos por mais de 10 anos, mesmo na ausência de tratamento, mantendo a viremia baixa e contagem de linfócitos T CD4+ em níveis normais (Sheppard et al., 1993; Sharma et al., 2011) (Figura 8).*

*Ao final da fase crônica, o número de células T CD4+ entra em declínio. Quando as contagens de células T CD4+ atingem valores muito baixos (na maioria das vezes abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>) inicia-se uma fase da doença denominada AIDS, que se caracteriza pelo aparecimento de doenças oportunistas (por exemplo, tuberculose, toxoplasmose, pneumocistose, dentre outras) e aumento dos níveis de replicação viral (alta viremia). Essa etapa marca o início da fase sintomática, a qual sem o emprego da terapia antirretroviral leva ao óbito (Bartlett & Moore 1999, Staprans & Feinberg 2004).*

Com a introdução da terapia antirretroviral, o curso clínico da infecção pelo HIV pode ser alterado. Esses medicamentos suprimem a replicação viral atuando em diversas etapas do ciclo replicativo, impedindo a multiplicação do vírus no organismo, proporcionando o reestabelecimento e manutenção da resposta imune contra uma grande variedade de patógenos, além do aumento da sobrevida e qualidade de vida dos indivíduos infectados (Hirsch et al., 2004).

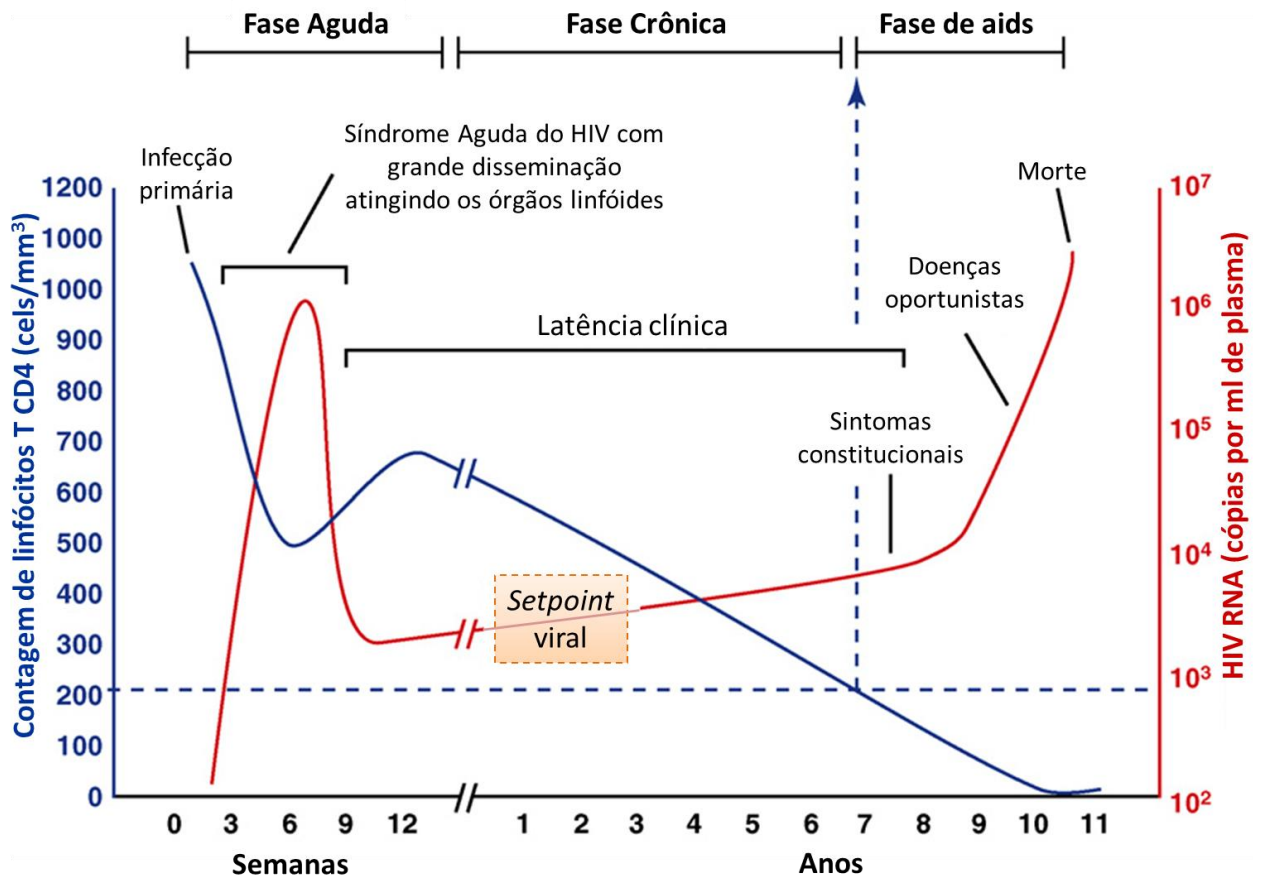


Figura 7: Curso típico da infecção pelo HIV, na ausência de terapia antirretroviral. (Adaptado An e Winkler, 2010).

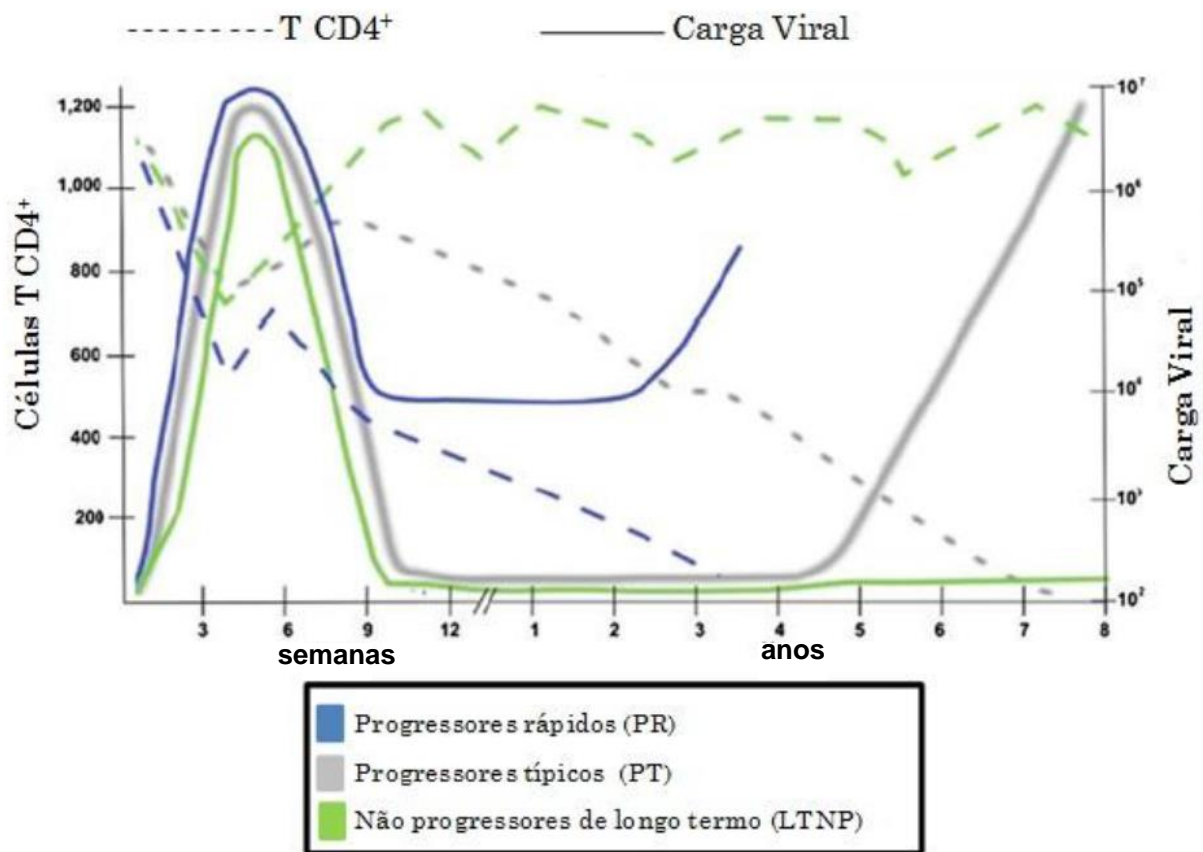


Figura 8: Perfis distintos de progressão para a aids: progressores rápidos (PR), progressores típicos (PT) e não progressores de longo termo (LTNP). (Adaptado de Poropatich & Sullivan, 2011).

Diversas células e moléculas do organismo estão envolvidas direta ou indiretamente na progressão, susceptibilidade, resistência ou proteção à infecção pelo HIV/aids (Fellay, 2010). A imunopatogênese da infecção pelo HIV é caracterizada pela dificuldade do sistema de defesa em suprimir completamente a replicação viral. O número de células T CD4 vai sendo reduzido progressivamente, como já mencionado anteriormente, e o organismo entra em um estado de hiperativação imunológica (Manches et al., 2008). No final da década de 80, foi reconhecido que a ativação é um fator determinante para a imunodeficiência observada na infecção (Ascher & Sheppard, 1988). Esses eventos são acompanhados por mudanças significativas no perfil de citocinas e quimiocinas, além da presença de marcadores de ativação em diversas células do organismo, tais como linfócitos T CD4, T CD8, B, células NK, macrófagos e células dendríticas (Appay & Sauce 2008).

*Ainda não estão completamente elucidadas as causas da ativação imunológica associada à infecção pelo HIV, porém fatores relacionados à ação do vírus podem ter influência nesse processo. Alguns estudos mostram que as glicoproteínas do envelope do HIV (gp120 e gp41) quando se ligam ao receptor CD4 e ao coreceptor CCR5 e/ou CXCR4 promovem a ativação de processos de sinalização intracelular que resultam na ativação do sistema imunológico do hospedeiro (Sailaja et al., 2007).*

*Como citado anteriormente, algumas células possuem função crucial no curso da infecção por serem ativadas na entrada do vírus no organismo. Dentre elas, as células dendríticas (DCs) que, após a captura do vírus, são capazes de migrar para os órgãos linfoides secundários, onde promovem a disseminação da infecção e transmissão do HIV às células T CD4 (Sabatte et al., 2007). Por outro lado, essas células podem produzir quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias em resposta à estimulação pelo HIV, contribuindo para uma resposta imune inata mais eficiente contra o vírus (Beignon et al., 2005; Greenwell- Wild et al., 2009). As células Natural Killer (NK) possuem uma grande capacidade lítica sobre células infectadas (atividade antiviral) e também produzem citocinas pró-inflamatórias que irão interagir com outras células (por exemplo, células T) e modular a magnitude da resposta imune (Mailliard et al., 2003). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são os principais responsáveis pela diminuição da carga viral na fase aguda da infecção pelo HIV (Koup et al., 1994; Migueles et al., 2008). Além disso, já foi demonstrado que a concentração de grânulos citotóxicos é maior nos não progressores em relação aos progressores (Migueles et al., 2008). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são células diretamente afetadas na infecção pelo HIV. Elas são ativadas tanto pela apresentação do antígeno, quanto pela produção de citocinas pró-inflamatórias por células da imunidade inata (Manches et al., 2008). A ativação, infecção e posterior morte dessas células vão provocar um alto nível de exaustão e conseqüentemente diminuição acentuada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue (Douek et al. 2002). Além disso, essas células ativam linfócitos T CD8<sup>+</sup> e, na ausência delas, a função das células T CD8<sup>+</sup> estará prejudicada (Douek et al. 2002).*

*Todas as células mencionadas possuem papel crítico na infecção pelo HIV, influenciando o curso da doença. A consequência principal da diminuição dessas células em decorrência da progressão da doença é o aparecimento de infecções*

*oportunistas que irão agravar - ou favorecer o aparecimento - dos sintomas que caracterizam a aids no indivíduo infectado.*

## **1.4 A TUBERCULOSE E O MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (Mtb): CARACTERÍSTICAS GERAIS**

*O Mycobacterium Tuberculosis (Mtb), também conhecido como Bacilo de Koch (BK), pertence à família Mycobacteriaceae, gênero Mycobacterium, causador da Tuberculose (TB). Pertence ao complexo Mycobacterium, que compreende as bactérias Mtb, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. caprae e M. pinnipedii (Palomino & Leão, 2007).*

*O Mtb é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, não encapsulado, intracelular facultativo, aeróbico estrito e de crescimento lento (Figura 9). Apresenta dimensões que variam de 0,2 a 0,6  $\mu$  por 1 a 10  $\mu$  de comprimento. Infecta preferencialmente os pulmões (tuberculose pulmonar), e aí se localiza, facilitando sua multiplicação e transmissão, porém, pode também se manifestar em qualquer outro lugar do corpo causando as formas extrapulmonares, tais como: pleural, ganglionar, de vias urinárias, cutânea, gastrointestinal, peritoneal, pericárdica, óssea, entre outros (Bloom, 1994). Essa bactéria não fica livre na natureza, dependendo do homem para sobreviver (Palomino & Leão, 2007).*



Figura 9: *Mycobacterium corado* (laranja-escuro) em amostra de escarro. Fonte: Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).

A transmissão do bacilo se dá através da via respiratória, através da tosse, fala ou espiro, quando um indivíduo elimina gotículas contaminadas e outro inala as partículas infectantes (Boletim epidemiológico, 2012). Os condicionantes para o contágio são estar desenvolvendo a forma pulmonar da doença, a viabilidade, infectividade e carga bacilar, além de condições ambientais, como, tempo de contato com o indivíduo infectado, condições de ventilação do ambiente e vulnerabilidade imunológica (Fiuza et al., 2005). Uma das características do *Mtb* é permanecer em suspensão no ar por longos períodos, aumentando a probabilidade de contágio (Marques, 2007). Normalmente o sistema imune é capaz de conter a multiplicação do bacilo, evitando sua disseminação em 90% dos casos. Cerca de 5% das pessoas infectadas irão desenvolver a doença nos dois primeiros anos, e outros 5% irão desenvolvê-la ainda mais tarde (durante o curso da vida) (Bloom, 1994; Sester et al., 2010). Dessa forma, a progressão da infecção é regulada pelo sistema imunológico do hospedeiro, que pode eliminar o agente, contê-lo, transformá-lo em uma infecção latente ou falhar, resultando no desenvolvimento de doença ativa (Ducati et al. 2006).

O período latente da TB caracteriza-se pelo intervalo entre a penetração do bacilo no organismo e o aparecimento da doença. Nesse período, a resposta imune

do hospedeiro tenta controlar o crescimento do bacilo, deixando em um estado de quiescência no tecido infectado, formando estruturas denominadas granulomas. Nesse momento, há a redução do metabolismo bacteriano, em decorrência da ação do sistema imune, que pode na maioria dos casos, conter, mas não erradicar a infecção (Ducati et al. 2006).

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose é conhecida desde a antiguidade, e até hoje mata milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que, no ano de 2013, 9 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1.5 milhões de pessoas morreram devido à doença (WHO, 2014) (Figura 10). A TB tem apresentado um lento declínio a cada ano e estima-se que 37 milhões de vidas foram salvas entre 2000 e 2013 por conta do diagnóstico e tratamento eficaz. Porém, dado que a maioria das mortes devido à TB são evitáveis, o número de mortos pela doença ainda é bastante elevado. Cerca de 60% dos casos de TB e das mortes ocorrem entre os homens, mas o número da doença entre as mulheres também é elevado. Em 2013, estima-se que 510 mil mulheres morreram em decorrência da TB, mais de um terço das quais eram HIV<sup>+</sup> (WHO, 2014).

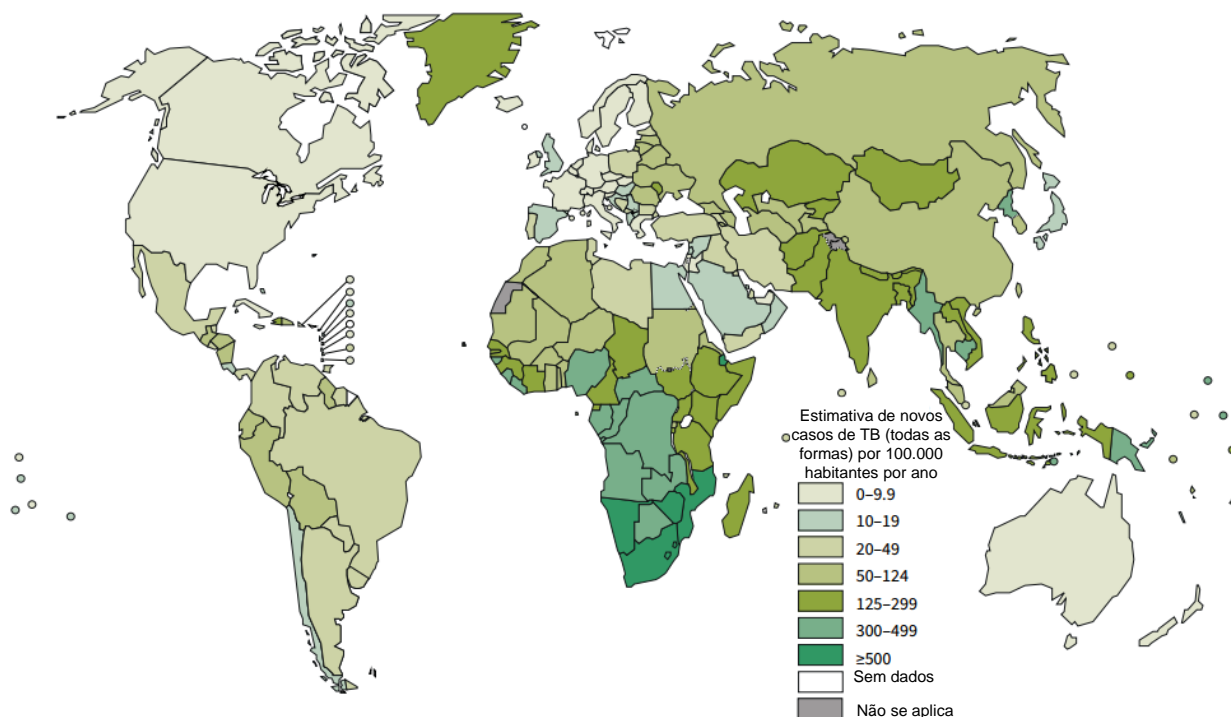


Figura 10: Estimativa da incidência global da TB em 2013. Fonte: WHO, 2014.



No nível mundial, Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, representam aproximadamente 50% dos casos de tuberculose (Boletim epidemiológico, 2012).

O Brasil registrou 71.123 novos casos de tuberculose em 2013. A taxa de incidência da doença no país ficou em 35,4 casos para cada 100 mil habitantes, o que indica queda de 20,3% em relação a 2003, quando a taxa era 44,4 casos para cada 100 mil pessoas (Ministério da Saúde, 2014). Os dados sobre o número de mortes por tuberculose referentes a 2012 indicam um total de 4.406 óbitos provocados pela doença. A taxa de mortalidade no país foi de 2,3 óbitos para cada 100 mil habitantes. Embora a região Sudeste concentre o maior número de casos, a região Norte apresentou as maiores taxas de incidência em todos os anos analisados. Em 2012, os estados do Amazonas e Rio de Janeiro apresentaram as maiores taxas de incidência do país, enquanto Tocantins e Distrito Federal apresentaram as menores taxas (Boletim epidemiológico, 2012) (Figura 11).

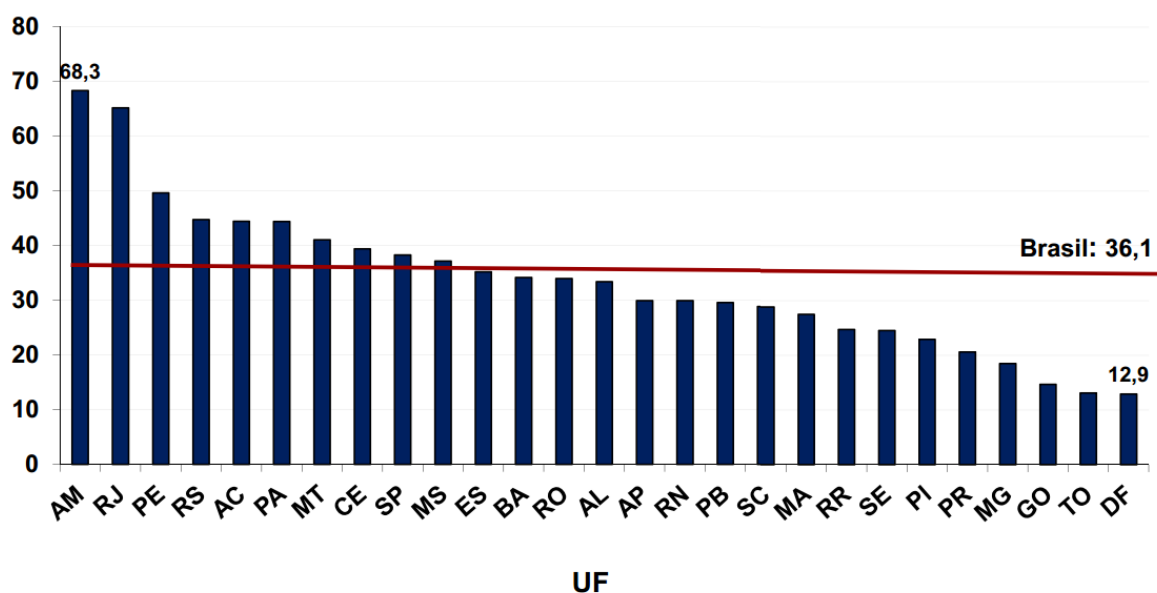


Figura 11: Taxa de incidência de TB por região do Brasil. Número de casos por 100 mil habitantes em 2012. Fonte: Ministério da Saúde, 2012.

Em 2012, no Estado do Rio de Janeiro, foram notificados 14.505 casos de tuberculose, incluindo todas as formas, e 739 óbitos. A taxa de incidência foi de aproximadamente 65 por 100.000 habitantes e a taxa de mortalidade, de 4,6 por 100.000 habitantes. Esse número elevado pode ser explicado, em parte, pela elevada proporção da população vivendo em áreas urbanas e alta densidade

demográfica. Aproximadamente 66% dos casos de tuberculose notificados no período foram do sexo masculino, proporção que segue a mesma em todo o país. A faixa de 20 a 34 anos de idade apresentou os maiores percentuais de casos no estado, com uma média de 33% dos casos notificados (Ministério da Saúde, 2014).

## **1.6 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Após a inalação do bacilo, a fagocitose do mesmo pelos macrófagos é o primeiro evento na relação da *Mtb* com o hospedeiro (Ulrichs & Kaufmann 2006). Essas células são responsáveis pela resposta inicial do sistema imunológico que, se eficaz, eliminará o patógeno do organismo (Kaufmann, 2005). Em alguns casos há a falha desse mecanismo de defesa, fazendo com que os bacilos se multipliquem e sejam liberados após o rompimento da célula infectada, ocorrendo destruição celular. Neste local, há uma reação inflamatória devido ao acúmulo de leucócitos polimorfonucleares que fagocitarão os bacilos liberados e retornarão à corrente sanguínea, promovendo a disseminação hematogênica do *Mtb* (Houben et al., 2006). A partir dessas células será também formado o granuloma, característico da doença (Kaufmann, 2005).

Durante o desenvolvimento dessa estrutura granulomatosa, macrófagos não infectados, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos circundam os macrófagos infectados pelo bacilo, formando a região central do granuloma. Na parte externa são observados linfócitos T e B que modulam a resposta dos macrófagos. Com o passar do tempo, mediante a replicação do *Mtb*, ocorre o crescimento do granuloma, causando uma necrose na região (Ulrichs & Kaufmann 2006).

Além dos macrófagos, outras células do sistema imune inato também estão envolvidas na patogênese da infecção pelo *Mtb*, como os neutrófilos, as células Natural Killer (NK) e as células dendríticas. Os neutrófilos participam da formação do granuloma e promovem o aumento da quimiotaxia (Edwards & Kirkpatrick 1986). As células NK podem lisar células infectadas pelo *Mtb*, como os monócitos e macrófagos, além de ativar outras células no sítio de infecção. As células dendríticas, além do seu papel de fagocitose semelhante ao dos macrófagos, também podem capturar os bacilos nos pulmões e migrar para os linfonodos para

que ocorra a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, montando então uma resposta adaptativa (Saunders & Cooper 2000).

Na resposta imune adaptativa, os linfócitos T exercem um dos papéis principais na eliminação do bacilo, liberando a citocina efetora IFN- $\gamma$  (interferon), que recruta os macrófagos para o local da infecção promovendo a morte da micobactéria. Além disso, as células T CD8<sup>+</sup> podem matar o Mtb diretamente através da produção de granzimas e perforinas (Saunders & Cooper 2000). A visão geral dos mecanismos imunológicos na infecção pelo Mtb está representada na Figura 12.

Apesar de todo o esforço do sistema imunológico em interromper a infecção, a micobactéria possui diferentes mecanismos para evadir-se da resposta imune no indivíduo infectado. Por exemplo, a presença do Mtb no interior das células infectadas, pode induzir a diminuição da expressão de moléculas MHC classe II da sua membrana, impedindo a apresentação de antígenos e consequentemente, favorecendo sua permanência dentro das células (Hmama et al., 1998). Além disso, o bacilo também é capaz de impedir a fusão do lisossoma com o fagossoma através da liberação de substâncias presentes na sua parede celular (trehalose 2-sulfato) (Ulrichs & Kaufmann 2006).

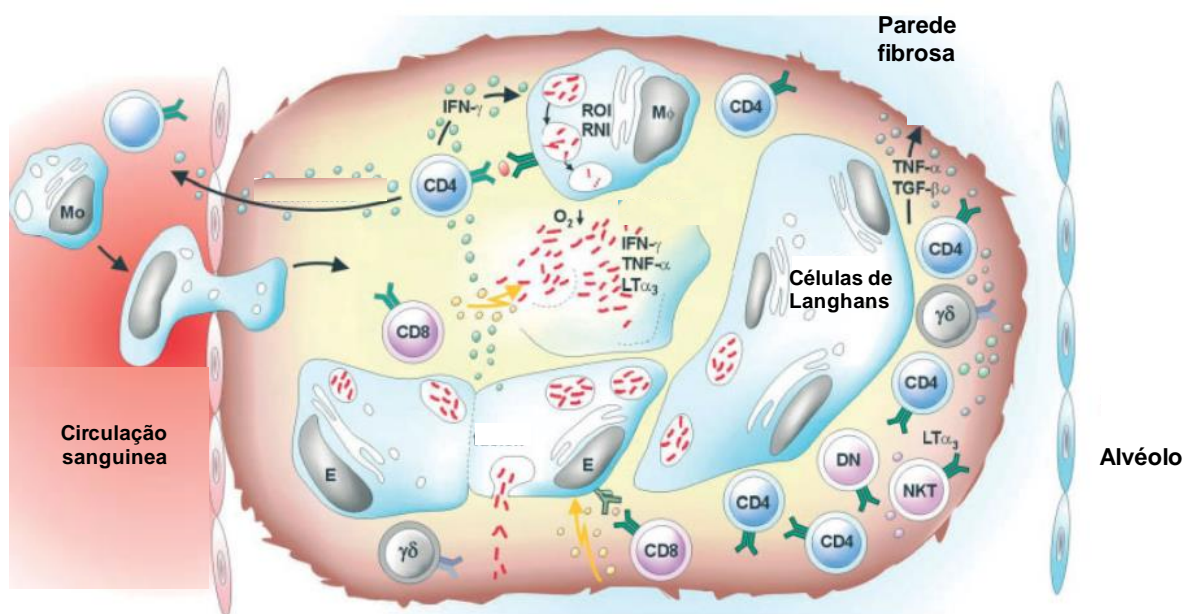


Figura 12: Visão geral dos mecanismos imunológicos na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de Ulrichs & Kaufmann 2006.

A dificuldade de se identificar e tratar os casos de tuberculose são fatores que contribuem para o aumento da incidência dessa doença no mundo. Atualmente, existem diversos métodos de identificação do bacilo, tais como: baciloscopia direta,

*cultura (a partir do escarro), radiografia do tórax, histopatológico e métodos de biologia molecular (PCR). Dentre eles, o padrão-ouro continua sendo a cultura, por possuir um menor custo, maior sensibilidade e pela possibilidade de identificação da micobactéria, porém, a desvantagem se dá no tempo de espera do resultado que pode variar de 15 até 75 dias (Ministério da Saúde, 2010).*

*Quanto ao tratamento da tuberculose, se adequado, apresenta um percentual de cura de 99%, porém há uma alta taxa de abandono no meio do tratamento devido a sua longa duração, que é de 6 meses. Além disso, existe uma vacina disponível contra o bacilo, a BCG, cuja distribuição é ampla, praticamente em todo o mundo, porém, ela não previne a ocorrência da tuberculose pulmonar, que representa a maioria dos casos. Em crianças previne apenas as formas graves da doença e em adultos não induz proteção contra a TB, sendo administrada apenas no nascimento (Trunz et al., 2006).*

## **1.7 AIDS E TUBERCULOSE**

*Em 2013, dos nove milhões de pessoas que desenvolveram tuberculose, 1.1 milhões (13%) eram HIV<sup>+</sup> (WHO, 2014) (Figura 13). Dos casos HIV<sup>+</sup> com TB, aproximadamente 78% dos indivíduos encontram-se no continente Africano. O número de mortes associadas a essa coinfeção vem diminuindo substancialmente ao longo dos anos: em 2008, das 1.8 milhões de mortes associadas a TB, 500.000 foram em indivíduos HIV<sup>+</sup>; já em 2013 foram registradas 360.000 mil mortes por TB associadas ao HIV, o que equivale a 25% de todas as mortes por TB em 2013 (WHO, 2014).*

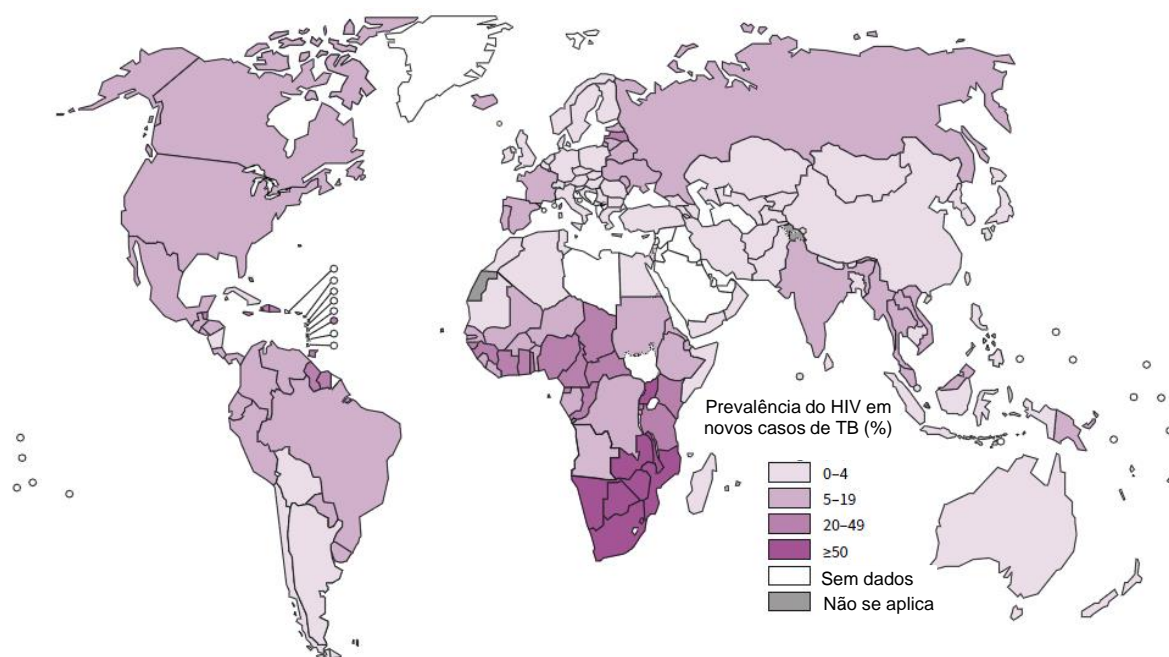


Figura 13: Estimativa da prevalência de infectados pelo HIV entre os casos novos de tuberculose no mundo em 2013. Fonte: Adaptado de WHO, 2014.

Nas Américas, apesar dos grandes avanços alcançados na redução dos casos e das mortes por TB e HIV, o número de coinfetados está aumentando. No ano de 2009 foram registrados 15.000 casos, já no ano de 2012 esse número aumentou para 31.000 novos casos de TB associada ao HIV nas Américas. A taxa de incidência dessas doenças nessa região gira em torno de 11.4 casos por 100.000 habitantes, a segunda maior taxa depois da região Africana. Em 2012, apenas 10 países das Américas foram responsáveis por 94 % dos casos estimados da coinfeção TB/aids: Brasil, Haiti, México, Colômbia, Guatemala, Venezuela, Equador, República Dominicana, Peru e Estados Unidos (PAHO, 2012). Neste mesmo ano, o Brasil apresentava-se em primeiro lugar dentre os países com maior número de novos casos de tuberculose com HIV nas Américas e em sétimo lugar dentre os países com maior taxa de incidência dessa coinfeção (PAHO, 2012). Estudos realizados em diversos estados brasileiros demonstraram que a prevalência da coinfeção tuberculose/HIV varia de 6,2% no Nordeste a 44,3% em São Paulo (Barbosa & Costa, 2013; Saita & Oliveira, 2012).

A tuberculose e a aids são as duas principais doenças infecciosas associadas a mortalidade no mundo (Friedland et al. 2007). O HIV-1 é o principal fator de risco à infecção pelo *Mtb*. Estima-se que uma pessoa infectada pelo HIV tenha entre 21 a 34 vezes maior probabilidade de desenvolver tuberculose do que uma pessoa

saudável, isso porque a imunossupressão aumenta o risco da reativação da infecção latente e a rápida progressão para a TB ativa (WHO, 2014). Enquanto a possibilidade de um indivíduo imunocompetente infectado pelo bacilo da TB desenvolver a doença é de cerca de 10% ao longo da vida, no indivíduo infectado pelo HIV e sem intervenção terapêutica essa probabilidade é de cerca de 10% ao ano (Daley et al., 1992).

A alta taxa de mortalidade da tuberculose em indivíduos infectados pelo HIV é explicada pela combinação de fatores associados à coinfeção. O HIV causa uma progressiva disfunção do sistema imune pela depleção seletiva de células T CD4<sup>+</sup>, tornando estas células incompetentes na defesa contra o *Mtb*, além disso, a diminuição do número dessas células compromete a função dos macrófagos e das células T CD8<sup>+</sup>, facilitando a dispersão do bacilo (Diedrich & Flynn 2011). A tuberculose por sua vez, além de também causar alterações no número de células T CD4<sup>+</sup>, acelera a replicação viral por meio da ativação de macrófagos, principalmente na região do granuloma e através da produção de citocinas (Naniche et al., 2011).

Dessa forma, a associação desta coinfeção é recíproca e sinérgica, impactando no curso das doenças. A TB promove uma contínua ativação celular, que leva a condições que favorecem o aumento da viremia plasmática e a progressão da doença e, por outro lado, o declínio da imunidade causado pelo HIV, promove a disseminação do bacilo, aumentando o risco do aparecimento de formas extrapulmonares, desenvolvimento de TB ativa, e aceleração da progressão da doença (Lemos, 2008).

## **1.8 SÍNDROME INFLAMATÓRIA DA RECONSTITUIÇÃO IMUNE (IRIS)**

A base terapêutica da infecção pelo HIV-1 é a terapia antirretroviral de alta eficácia (HAART) que, desde sua introdução, tem levado a um significativo declínio na mortalidade e morbidade associadas à aids (Palella et al., 1998). A HAART é uma combinação de três ou mais drogas antirretrovirais que agem controlando a replicação viral, levando ao aumento das contagens de células CD4 circulantes, por conta da redução da carga viral plasmática, além do estabelecimento e manutenção da resposta imune contra uma variedade de patógenos, incluindo micobactérias,

*citomegalovírus, vírus da hepatite B e C. (Shelburne et al., 2005; Rinaldo et al., 1999).*

*Por outro lado, em certos pacientes com tuberculose e infectados pelo HIV-1 que recebem tratamento para os dois agravos, uma profunda reação patológica inflamatória pode surgir, causando um efeito contrário ao esperado (Shelburne et al., 2005). Essa resposta inflamatória apresenta-se como um quadro de piora clínica que pode ser resultante de infecções com outros patógenos tratados previamente. Esse fenômeno é descrito como reação paradoxal ou “síndrome inflamatória da reconstituição imune” (IRIS) (Shelburne et al., 2005). Essa síndrome também pode ocorrer em infecções subclínicas reveladas pela reconstituição da resposta imune através da HAART; nessa situação, a IRIS é chamada de desmascarada (Meintjes et al., 2008). A incidência da IRIS varia de 7 a 43% em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV em diferentes populações (Narita et al., 1998; Wendel et al., 2001; Breen et al., 2004; Breton et al., 2004; Michailidis et al., 2005; Bourgarit et al., 2006; Manosuthi et al., 2006; Lawn et al., 2007; Elliott et al., 2009; Oliver et al., 2010).*

*Os fatores clínicos e laboratoriais associados ao início da IRIS paradoxal, foco do presente estudo, ainda não são claramente compreendidos. É sabido que alguns fatores, tais como: as baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a forma disseminada da TB em sítios extrapulmonares, um pequeno intervalo entre o início do tratamento para infecções oportunistas e início de HAART e genes de susceptibilidade à doença podem estar envolvidos no desenvolvimento da IRIS (French et al., 2004; Shelburne et al., 2005; Laureillard et al., 2013). Com relação aos fatores clínicos, vários estudos têm demonstrado, em proporções variáveis, a ocorrência de reações de reconstituição imunológica em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 em tratamento combinado para os dois agravos, caracterizadas por piora clínica, resposta imune exacerbada, linfadenopatia e fístula linfática, agravamento de lesões pulmonares preexistentes, febre, manifestações abdominais (dor abdominal, hepatomegalia e ascite) e manifestações neurológicas (Narita et al., 1998; Fernandes et al., 2004; Serra et al., 2007; Breton et al., 2004; Shelburne et al., 2005; Bourgarit et al., 2006).*

*A associação da tuberculose com a infecção pelo HIV-1 apresenta enormes desafios científicos e de saúde pública (Sester et al., 2010). Embora o uso da HAART durante o tratamento da tuberculose melhore a sobrevida dos pacientes, particularmente por restaurar a função imune, a administração simultânea com os*

*medicamentos anti-TB não é de fácil manejo, devido às interações farmacológicas e/ou o aparecimento da IRIS em alguns pacientes (Bourgarit et al, 2006). Dessa forma, a compreensão da patogênese da IRIS e a identificação de biomarcadores de prognóstico são de grande relevância para a melhoria do manejo clínico de pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1.*

*Dentre os vários mecanismos imunológicos que tentam explicar a IRIS, um deles envolve a susceptibilidade genética do hospedeiro a uma resposta imune exacerbada a estímulos antigênicos infecciosos e não infecciosos. Embora as evidências sejam limitadas, alelos HLA específicos foram associados com o desenvolvimento de IRIS a patógenos específicos (Price et al., 2001). Estudos recentes demonstraram que pacientes com IRIS apresentam níveis maiores de moléculas HLA-DR+ em relação a controles não-IRIS (Antonelli et al., 2010). Contudo, os dados sobre a dinâmica desse alelo na IRIS ainda são escassos na literatura, necessitando dessa forma de mais estudos nessa área na tentativa de caracterizar possíveis associações. Além disso, níveis de IL-6 aumentados em pacientes com IRIS já foram descritos na literatura (Bourgarit et al., 2006; Shelburne et al., 2003).*

*Algumas publicações indicam que a fisiopatologia das duas doenças e a ocorrência de IRIS podem ser explicadas por uma resposta exagerada das células da imunidade inata, particularmente as células NK e células T $\gamma\delta$  (Pean et al., 2012; Pitabut et al., 2013). Por outro lado, não são encontrados na literatura dados consistentes que associem alelos KIR e HLA com a IRIS. Uma das explicações para esse fato consiste na dificuldade do diagnóstico e no manejo clínico dos pacientes com IRIS (Shelburne et al., 2005). Portanto, torna-se de grande relevância a busca de marcadores genéticos que permitam auxiliar no prognóstico da ocorrência da IRIS e orientar o manejo clínico e terapêutico destes pacientes. Além disso, é de igual importância à caracterização da frequência e distribuição desses alelos na população brasileira no contexto das duas doenças, além do estudo da variabilidade da composição destes alelos na nossa população, onde a miscigenação de raças tem certamente um forte impacto sobre o background genético.*



## **1.9 IMUNOGENÉTICA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E *Mtb***

*Estudos no campo da genética têm fornecido esclarecimentos importantes sobre a resistência, susceptibilidade e progressão de doenças infecciosas, visto que a enorme diversidade de fenótipos associados a essas doenças reflete a composição heterogênea de genótipos do hospedeiro (em nível populacional) (Blackwell, 2001). Isso se deve ao fato de uma gama de patógenos que causam infecções crônicas poderem se estabilizar no hospedeiro durante anos sem causar nenhum sintoma clínico. Por outro lado, em outros indivíduos, o mesmo patógeno pode causar doença grave. Nesse contexto, surge a imunogenética das doenças infecciosas humanas, a qual explora a relação entre o sistema imune e a genética, atuando na busca e caracterização de genes polimórficos envolvidos na resposta contra um patógeno.*

*Na infecção pelo HIV-1 existe uma considerável heterogeneidade entre os indivíduos expostos ao vírus quanto à susceptibilidade, proteção e diferentes perfis de progressão para a doença (O'Brien & Nelson, 2004). Há indivíduos que, mesmo depois de repetidas exposições, não se infectam pelo vírus; outros indivíduos, denominados não progressores de longo termo (ver item 1.3), mantêm níveis estáveis de células T CD4+ (acima de 500 céls/mm<sup>3</sup>). Por outro lado, os progressores rápidos apresentam níveis elevados de carga viral e progridem para a doença mais rapidamente. Um pequeno grupo de indivíduos infectados pelo HIV, os controladores de elite (0,1 a 1,0%), possui carga viral indetectável persistente por 10 anos ou mais após a infecção (Deeks & Walker 2007; Casado et al., 2010). Essas diferenças no curso da infecção pelo HIV têm sido fortemente associadas a marcadores genéticos do hospedeiro (Carrington et al., 2008; An & Winkler, 2010).*

*Na infecção pelo *Mtb* nem todos os indivíduos expostos progridem para a doença, e dos 10% que desenvolvem tuberculose, o curso pode evoluir para TB ativa ou TB latente. A resposta imune ao bacilo é mediada principalmente via ativação celular e produção de citocinas (Berrington & Hawn, 2007). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade ou proteção a TB ativa e/ou TB latente tem se tornado um importante campo de investigação. A característica heterogênea da infecção pelo *Mtb* evidencia que fatores genéticos do*

*hospedeiro desempenham um papel importante no desenvolvimento da tuberculose (Bellamy. 1998).*

*As variantes genéticas que afetam o curso da infecção tanto na infecção pelo HIV, quanto pelo Mtb incluem genes da imunidade inata e adquirida, fatores intrínsecos de restrição (celulares) e fatores de dependência dos patógenos para replicação/multiplicação (An & Winkler, 2010; Moir et al., 2011), tais como: os receptores de quimiocinas (CCR5), os antígenos leucocitários humanos (HLA), os receptores de células T (TCR), os receptores de imunoglobulinas de células matadoras naturais (KIRs), os receptores Toll-like (TLRs), genes de citocinas e quimiocinas, dentre outros (Revisto por Kaur & Mehra, 2009). Porém, o foco de muitos estudos continua sendo os genes que formam o complexo HLA (e genes relacionados – genes KIR): variações nesses genes mostram-se associadas à susceptibilidade ou resistência não só a TB ou a aids, mas à malária, hanseníase, hepatites virais, além de outras doenças autoimunes e cânceres (Revisto por Hill, 1998; Segal & Hill, 2003; Carrington & O'Brien, 2003)*

*Os estudos dos fatores do hospedeiro e sua contribuição genética no desenvolvimento de doenças infecciosas apontam para questões fundamentais no entendimento das patogêneses citadas anteriormente. Porém, devido à existência de certo grau de variabilidade genética nas diferentes populações, faz-se necessário também o entendimento de bases genéticas da população brasileira, que apresenta características bem distintas das populações relatadas em outras séries de pacientes devido ao variado background genético.*

## **1.10 OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)**

*O Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (do inglês “Major Histocompatibility Complex”) é um conjunto de genes ligados intimamente, que codificam aloantígenos (antígenos que diferem dentro de uma mesma espécie). Essa família gênica inclui vários genes altamente polimórficos, que participam ativamente na defesa dos vertebrados contra parasitas e outros patógenos. O MHC de organismos distintos recebe denominações particulares, dependendo da espécie em questão. Em humanos, ele é denominado antígeno leucocitário humano (do inglês Human Leucocyte Antigen, HLA), uma vez que, inicialmente, esses genes*

foram associados à identificação de anticorpos leucoaglutinadores no soro de pacientes que receberam transfusões múltiplas (Abbas et al., 2012).

Esse complexo está disposto numa região que se estende por  $4 \times 10^6$  nucleotídeos no braço curto do cromossomo 6 (posição 6p21.3) em um segmento de aproximadamente 3500kb (Figura 13) (Sharma et al., 2011). Essa região é a mais polimórfica do genoma humano (Carrington & O'Brien, 2003). Cerca de 40% dos genes dessa região estão envolvidos em algum processo imunológico (The MHC sequencing consortium, 1999). As moléculas HLA apresentam peptídeos antigênicos para o reconhecimento específico pelos receptores de células T, gerando uma resposta imune específica (Abbas et al., 2012). Nessa apresentação, peptídeos dos patógenos associados são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) e reconhecidos pelos linfócitos T através da interação molécula HLA + peptídeo antigênico + TCR (receptor de célula T). Polimorfismos nos genes HLA levam à existência de polimorfismos na região de ligação do peptídeo (fenda de ligação). Dessa forma, diferentes moléculas HLA podem apresentar diferentes peptídeos, o que torna a interação HLA/peptídeo/TCR bastante específica (Abbas et al., 2012). Portanto, a ação efetora das células T na resposta imune está diretamente relacionada ao papel desempenhado pelas moléculas HLA.

O sistema HLA, devido ao seu elevado grau de polimorfismo, constitui-se num dos sistemas genéticos mais estudados e importantes no campo da saúde humana em relação às doenças infecciosas, autoimunes, cânceres, compatibilidade de transplantes de tecidos e abortos espontâneos; com associações documentadas com susceptibilidade ou resistência em mais de cem patologias (Revisto por Trachtenberg & Erlich, 2001; Revisto por Carrington & O'Brien, 2003).

O complexo gênico MHC é dividido em três regiões distintas: Classe I, Classe II e Classe III (Figura 14).

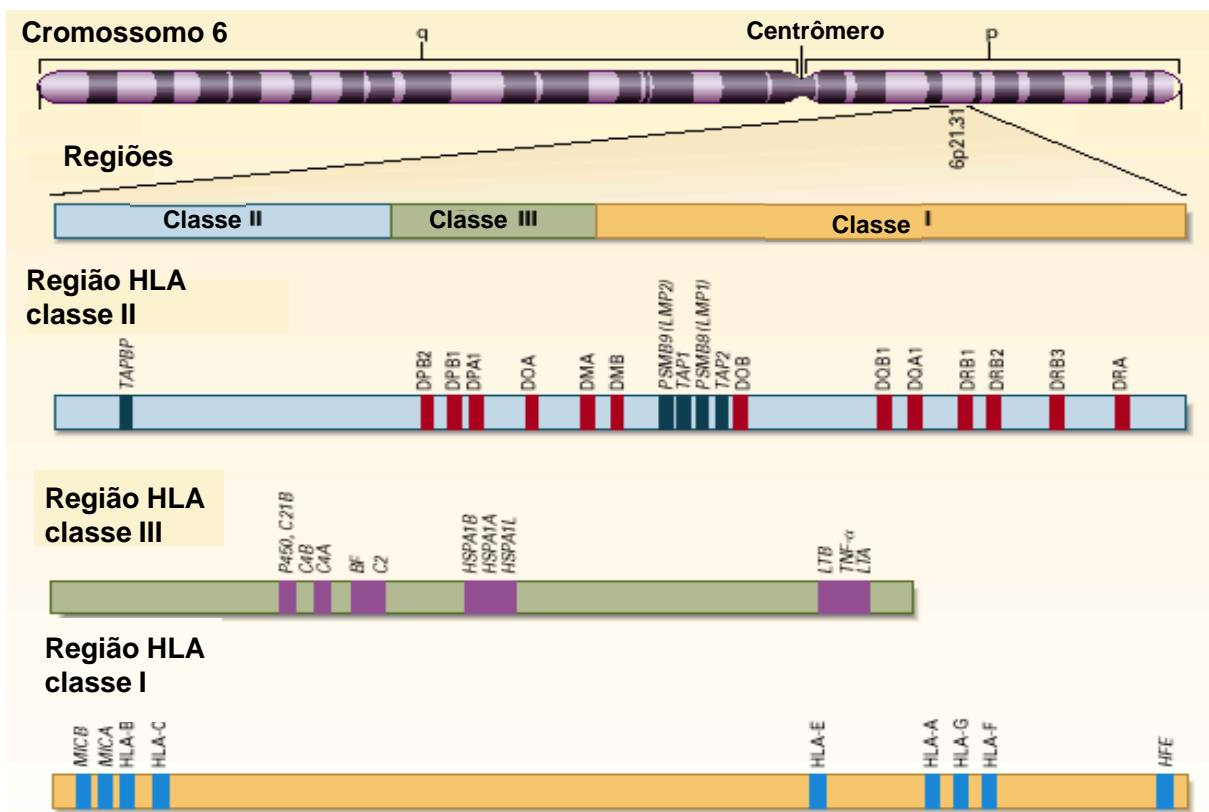


Figura 14: Localização e organização do complexo HLA no cromossomo 6. Este complexo é convencionalmente dividido em três regiões: I, II e III. Retirado de Klein & Sato, 2000.

A região de classe I (aproximadamente 2000 Kb) encontra-se na porção mais telomérica do MHC onde estão localizados os genes HLA clássicos (HLA-A, HLA-B e HLA-C) bem como genes HLA não clássicos (HLA-E, HLA-F, HLA-G e HLA-HFE, MICA e MICB). Nesta região, há também os loci HLA-H, HLA-J, HLA-K e HLA-L, os quais são considerados pseudogenes (Campbell et al., 1993). As moléculas codificadas pelos genes clássicos estão presentes em todas as células nucleadas do hospedeiro, apresentando peptídeos para as células T CD8<sup>+</sup> (Figura 15). Esses peptídeos são endógenos, ou seja, derivados do citosol (de patógenos intracelulares e peptídeos próprios).

A região de classe II situa-se na região mais centromérica do MHC (1000 a 1200 Kb), onde estão os loci denominados clássicos: HLA-DQ, HLA-DP e HLA-DR; e os não clássicos: HLA-DM e HLA-DO (Klein & Sato, 2000). As moléculas clássicas da classe II apresentam peptídeos exógenos (extracelulares - bacterianos e toxinas químicas) para as células T CD4<sup>+</sup> (Figura 15), e são expressas em um subgrupo de células imunes com características de células apresentadoras de antígenos que

*inclui células B, células T, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas (Klein & Sato, 2000; Revisto por Trachtenberg & Erlich, 2001).*

*A região de classe III, localizada entre as regiões de classe I e classe II, não expressa moléculas de histocompatibilidade. Essa região codifica genes do sistema complemento (C2, C4A, C4B) e genes que codificam moléculas de citocinas (TNF, LT $\alpha$  e LT $\beta$ ) (Klein & Sato, 2000; Apostolopoulos et al 2008).*

*Vale ressaltar que os genes não clássicos, supracitados, têm um menor nível de polimorfismo e são pouco expressos ou ausentes na superfície das células do hospedeiro. Além disso, eles não estão classicamente envolvidos com a resposta imunológica (Robinson et al., 2003).*

*As moléculas HLA apresentam uma elevada especificidade no que diz respeito à ligação de peptídeos. Cada molécula possui uma única fenda de ligação que liga um peptídeo por vez para a apresentação aos receptores de células T. O polimorfismo existente nos genes HLA pode levar à substituição de aminoácidos na fenda de ligação dos peptídeos, gerando variabilidade nesta ligação e, conseqüentemente, na apresentação. Dessa forma, a apresentação diferencial dos peptídeos dependerá da localização e da natureza do polimorfismo, portanto, a elevada diversidade nessas moléculas é extremamente relevante no contexto de susceptibilidade e/ou resistência a uma determinada doença e permite que um indivíduo que carrega uma combinação particular de alelos HLA seja mais resistente e/ou susceptível a uma dada doença do que outro que possua uma combinação diferente de alelos (Revisto por Trachtenberg & Erlich, 2001; Ferre et al., 2010).*

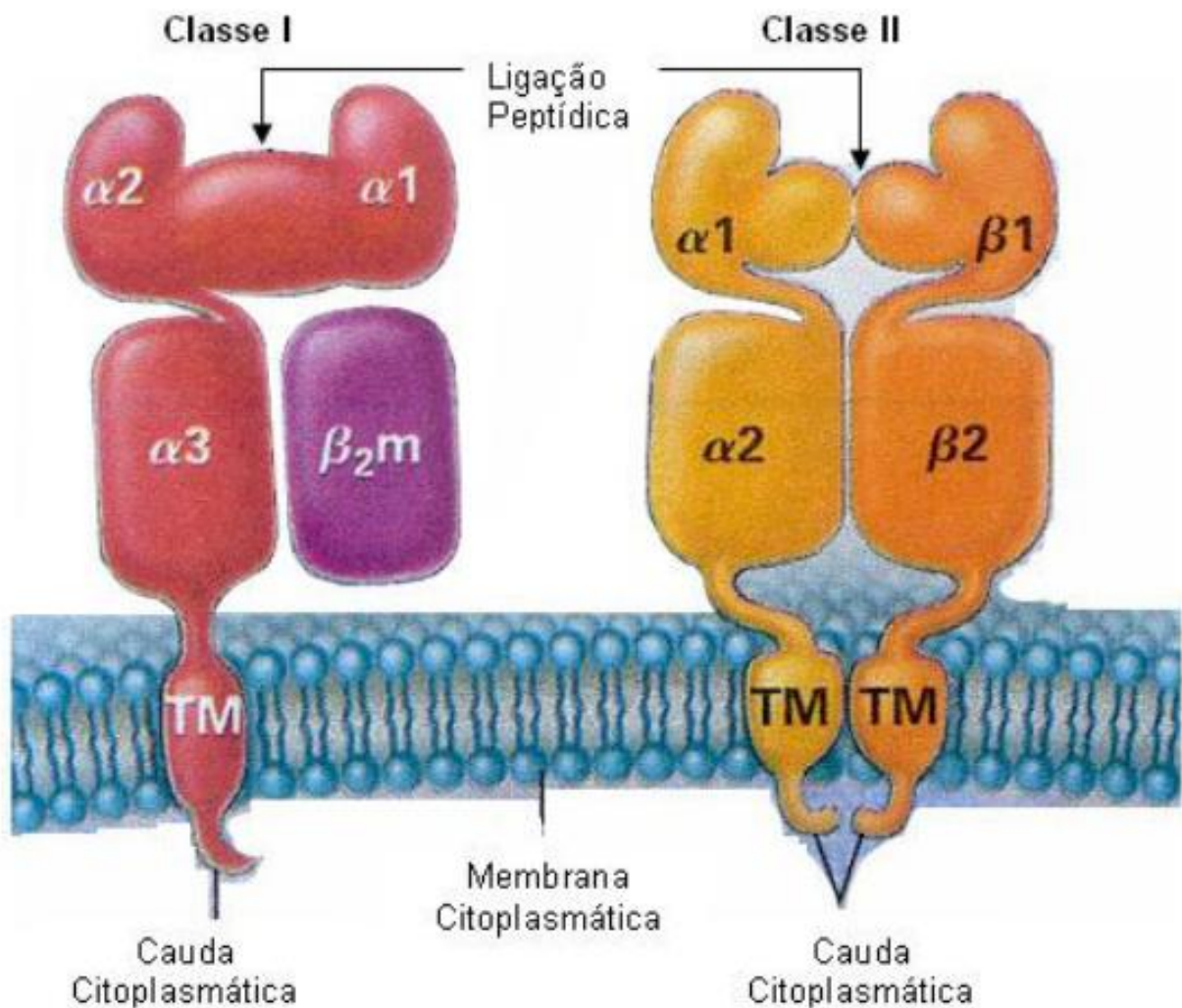


Figura 15: Estrutura das moléculas HLA de classe I e classe II, com representação de seus respectivos domínios  $\alpha$  e  $\beta$  formando as fendas de ligação do peptídeo. A cadeia  $\beta_2$ -microglobulina é a cadeia leve das moléculas de classe I. Retirado de Klein & Sato, 2000.

A alta diversidade, o polimorfismo e a participação dos genes HLA na resposta imune constituem as principais características que tornam esse complexo extremamente atraente sob o ponto de vista dos estudos de doenças. Já foi reportado que essa região do genoma humano está associada com mais doenças do que qualquer outra (Marsh et al., 2000), principalmente devido ao vasto número de alelos presentes em todo os locus dessa região. Até Dezembro de 2014, com referência aos genes de classe I, foram documentados 2946 alelos HLA-A, 3693 alelos HLA-B e 2466 alelos HLA-C; enquanto que, para os genes de classe II,

*havia sido descritos 1691 alelos HLA-DR, 764 alelos HLA-DQ e 510 alelos HLA-DP (IMGT/HLA Database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>).*

## **1.11 AS CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) E OS GENES KIR**

*As células Natural Killer (NK) compõem 5-15% dos linfócitos do sangue periférico e constituem um importante componente do sistema imune inato do hospedeiro, hoje reconhecidas como importantes células com funções efetoras e regulatórias (Trinchieri, 1989; Revisto por Martin & Carrington, 2013). São encontradas principalmente no baço e no sangue periférico e em menor número no pulmão, trato gastrointestinal, tecidos linfóides e útero gravídico (Abbas et al., 2012). Embora tradicionalmente conhecidas por sua habilidade em matar - por citotoxicidade natural - células infectadas por vírus e células de linhagens tumorais, elas também apresentam outros papéis, tais como: regulação imune via interação física com outras células (monócitos/macrófagos, células T e B, células dendríticas) (Nedvetzki et al., 2007; Zhang et al., 2007); regulação da angiogênese via interação com células endoteliais vasculares; mecanismos imunológicos na gravidez (células NK uterinas) e rejeição de aloenxertos de medula óssea (Hiby et al., 2004). As interações das células NK com outras células do sistema imune são importantes para a indução de respostas imunes efetivas. Essas células são capazes de estabelecer uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa através da liberação de grânulos e citocinas pró-inflamatórias, que sinalizam e recrutam outras células do sistema imunológico, tais como as células dendríticas e as células T CD4+ (Hong et al, 2013). Com os avanços no entendimento do funcionamento das células NK, tem sido possível acrescentar conhecimento a respeito do papel dessas células nas diferentes patogêneses.*

*As células NK expressam uma gama de receptores que pertencem a duas famílias, a superfamília das imunoglobulinas e as das lectinas do tipo-C (Marangon et al., 2011). Os receptores KIR (killer immunoglobulin-like receptors) pertencem à família das imunoglobulinas e são moléculas regulatórias que participam do processo de inibição e ativação das respostas das células NK por meio do reconhecimento de moléculas HLA de classe I nas células alvo (Long & Rajagopalan, 2000). Cada célula NK expressam receptores inibitórios e estimulatórios. Essa denominação advém da natureza do sinal que esses receptores*

enviam às células NK após a ligação a seus ligantes específicos. Células normais expressam ligantes (usualmente moléculas MHC de classe I) para receptores inibitórios das células NK e são resistentes à lise mediada por essas últimas. Em infecções virais, a expressão desses ligantes inibitórios nas células infectadas pode ser reduzida ou ausente, tornando-as susceptíveis à lise pelas células NK (Marangon et al., 2011) (Figura 16). Alguns patógenos escapam das respostas citotóxicas dos linfócitos T restritas ao MHC de classe I através da regulação negativa da expressão destas moléculas na superfície da célula infectada (Lorenzo et al., 2001), o que justifica a necessidade de um sistema de defesa que responda à ausência de moléculas MHC de classe I próprias.

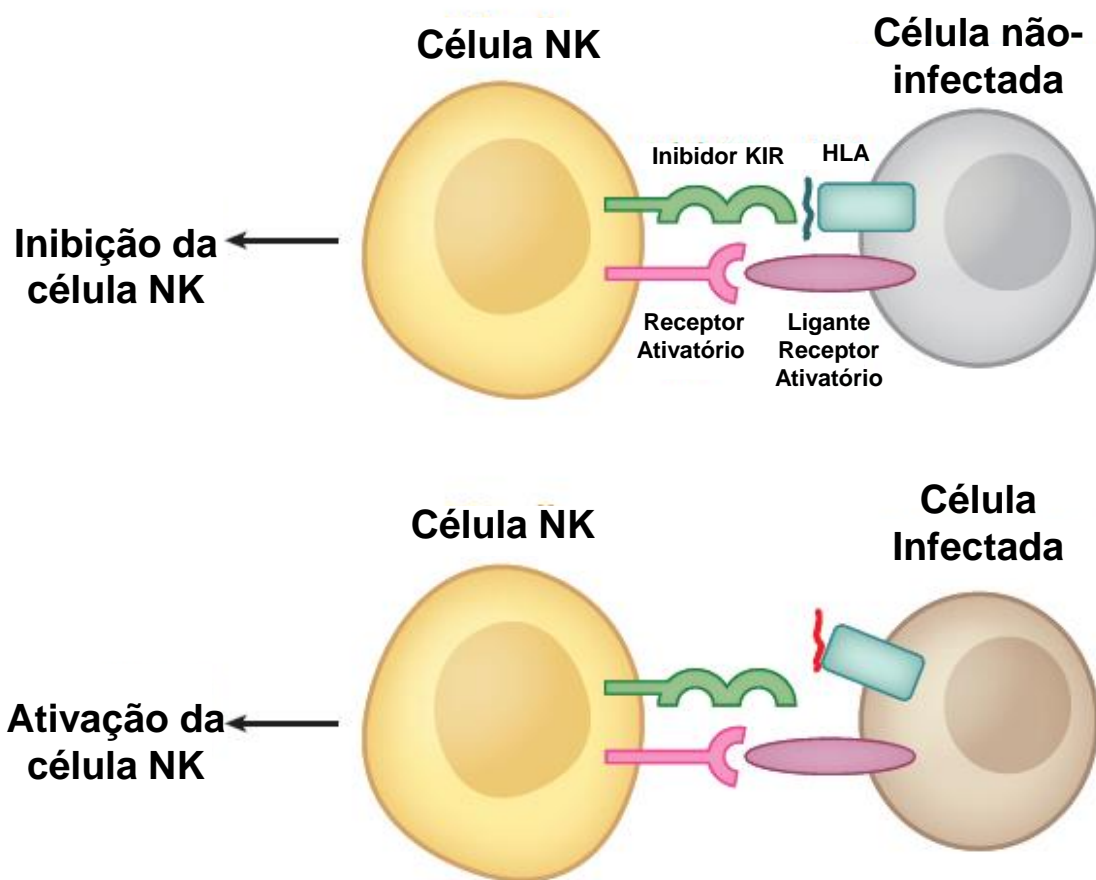


Figura 16: Relação entre a célula NK e a célula alvo, de acordo com a presença ou ausência de ligantes HLA. Fonte: Adaptado de Jost & Altfeld, 2013.

Os genes *KIR* fazem parte do complexo de receptores leucocitários (LRC), localizados na região 19q13.4 do cromossomo 19 (Figura 17). Esse complexo codifica um grupo de receptores que são expressos nas células NK e em um subset de células T, e reconhecem moléculas MHC de classe I (Lanier, 1998), mas não



*estão relacionados ao locus HLA de classe I localizado no cromossomo 6. Esses genes apresentam extenso polimorfismo alélico, sendo considerados os mais polimórficos após o locus MHC. Até o momento, 14 genes KIR distintos (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3) e 2 pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1) – que contam com 678 alelos diferentes – já foram descritos (IPD-KIR Database: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>; Robinson et al., 2003). Para os KIR cujos ligantes já foram definidos, verificou-se que a especificidade é dependente somente de alguns aminoácidos, de modo que um dado KIR pode reconhecer um número considerável de diferentes alótipos HLA.*

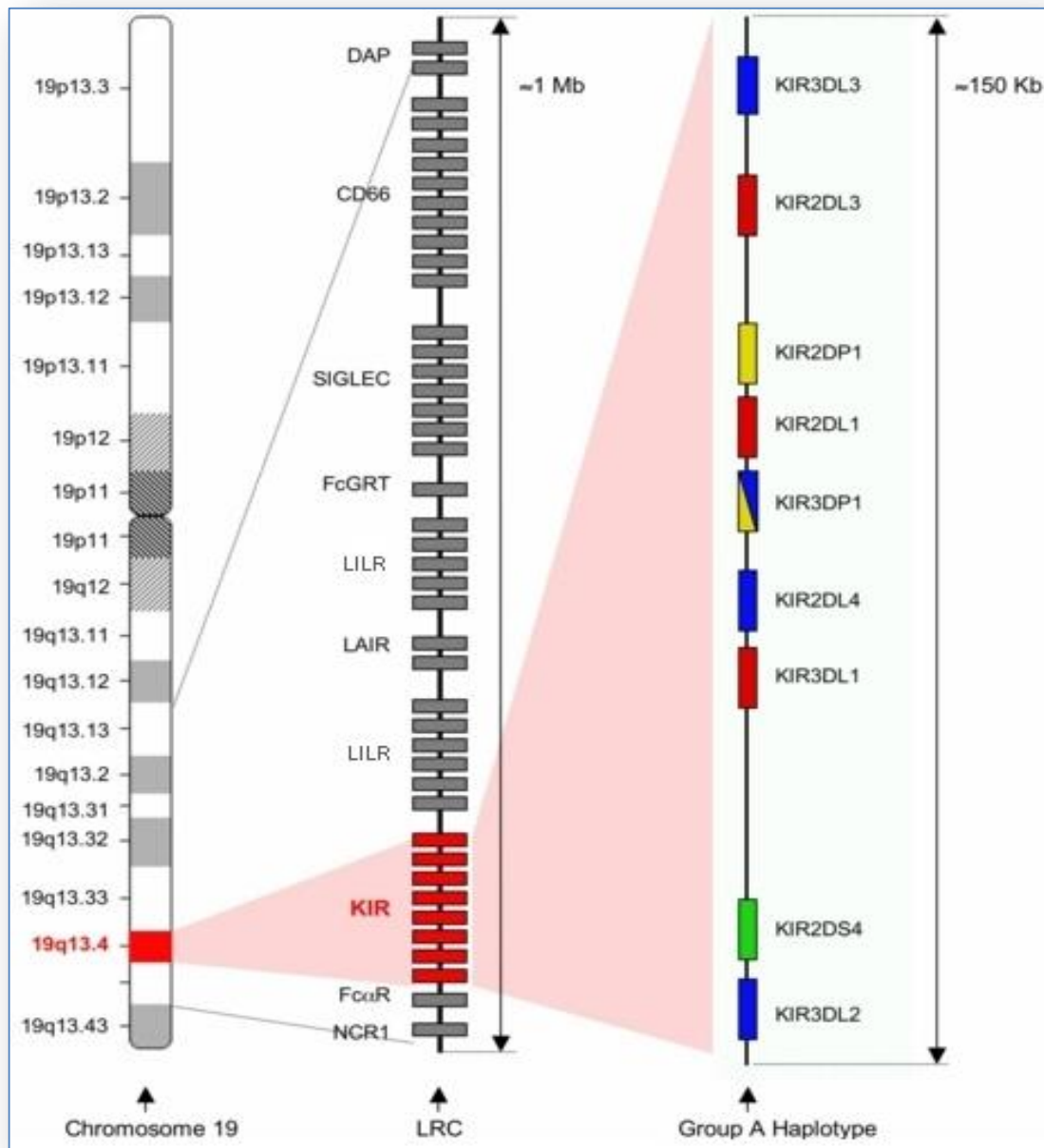


Figura 17: Disposição dos genes no cromossomo 19, indicando o complexo de receptores leucocitários (LRC) e a localização dos genes KIR na posição 19q13.4. Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>.

Os haplótipos dos genes KIR foram divididos em dois grupos, A e B, os quais se distinguem pela variedade e composição dos genes (Figura 18). O haplótipo A tem em sua maioria genes com caráter inibitório, apresentando apenas um gene estimulatório. Já o haplótipo B possui uma combinação de genes inibitórios e estimulatórios. Entretanto, os genes KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 e KIR3DL2 estão presentes em ambos os grupos (Martin & Carrington, 2013).

Haplótipo A	3DL3	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	2DS4	3DL2					
Haplótipo B	3DL3	2DS2	2DL2	2DL5B	2DS3	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DS1	2DL5A	2DS5	2DS1	3DL2

Figura 18: Representação esquemática dos haplótipos A e B dos genes KIRs. Os genes que codificam KIRs ativadores estão em rosa, os KIRs inibitórios estão em azul e os pseudogenes em verde. KIR2DL4, que tem característica tanto ativatória quanto inibitória, está em laranja (Adaptado de Matin & Carrington, 2013).

Os receptores KIR possuem sua nomenclatura baseada na estrutura proteica intracelular e extracelular. Essas moléculas apresentam dois ou três domínios extracelulares sendo dessa forma classificadas em 2D ou 3D, uma porção transmembranar e na parte intracelular, eles apresentam uma cauda intracitoplasmática que pode ser curta e com função de ativação (S, short) ou longa e com função de inibição (L, long), ou ainda “P”, estando relacionado à sua origem - pseudogenes - e à cauda curta (Marangon et al., 2011) (Figura 19). Os receptores com cauda longa (L) apresentam um ou dois motivos moleculares inibitórios (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs – ITIMs) que iniciam a inibição das células NK através do recrutamento de fosfatases da tirosina. Em contraste, os receptores com cauda curta (S) apresentam de um a três motivos moleculares ativadores (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs – ITAMs) que interagem com moléculas acessórias – DAP-10 ou DAP-12 -, produzindo citocinas, como interferons e TNF (fator de necrose tumoral), permitindo a completa ativação e diferenciação das células NK (Jobim et al., 2008).

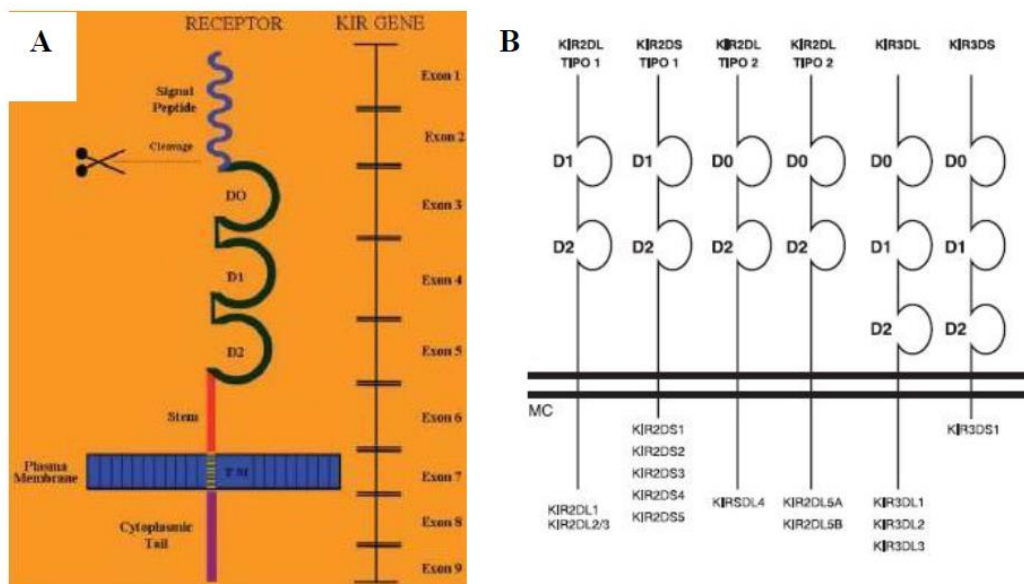


Figura 19: (A) Estrutura de um gene *KIR* típico e do seu receptor codificado. (Iannello et al., 2008). (B) Receptores *KIR* inseridos na membrana celular (MC). (Jobim et al., 2008).

Devido à alta diversidade gênica dos receptores *KIR*, diversos estudos vêm sendo realizados, a fim de entender a participação dessas moléculas na resistência ou susceptibilidade a doenças. Esses genes já foram associados a diversos agravos, incluindo-se aí infecções virais (aids, hepatite C, citomegalovírus, por exemplo), malária, cânceres e doenças autoimunes (Revisto por Boyton & Altmann, 2007).

Os estudos brasileiros que analisaram a diversidade dos genes *KIR* em nosso país já foram realizados em diferentes populações, a maioria na região Sul do Brasil (Rudnick et al., 2008; Jobim et al., 2009). Alguns desses estudos buscavam associar os genes *KIR* a doenças, tais como: hanseníase, hepatite C, doenças reumáticas e lúpus (Carneiro et al., 2010; Franceschi et al., 2011; Marangon et al., 2011; Pedroza et al., 2011; Salim et al., 2011; Perce-da-Silva et al., 2015), mas, até o momento, não existe na literatura publicada nenhum estudo brasileiro com foco na associação entre genes *KIR* e a coinfeção HIV/MTB.

## 1.12 GENES KIR E HLA COMO MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE/PROTEÇÃO À AIDS E À TUBERCULOSE

*Diversos estudos têm mostrado que o desenvolvimento de tuberculose em pacientes com HIV-1 é influenciado principalmente pelos genes HLA e outras variantes genéticas que desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa, destacando-se os genes KIR (Sevaraj 2000; Raghavan et al., 2012; Bozzano et al., 2014). Além disso, é sabido que a susceptibilidade genética à infecção pelo HIV-1 e à progressão para a doença são parcialmente determinadas por fatores genéticos do hospedeiro, e os estudos envolvendo esses fatores têm se concentrado principalmente em duas grandes famílias de genes do hospedeiro: os receptores de quimiocinas e os genes HLA (Revisto por O'Brien & Nelson, 2004).*

*Com relação à infecção pelo HIV-1, devido ao fato de que diferentes alelos HLA especificam moléculas de superfície celular com sítios específicos de reconhecimento para agentes infecciosos, o reconhecimento diferencial dos peptídeos virais pode influenciar tanto o intervalo de tempo da infecção até a aids quanto os mecanismos envolvidos na resistência ou susceptibilidade em um indivíduo infectado (Revisto por O'Brien & Nelson, 2004).*

*Diversos estudos confirmaram a existência de associações genéticas consistentes envolvendo alguns alelos HLA-B na proteção e/ou susceptibilidade à infecção e progressão para a aids (Revisto por Gao et al., 2010). Esse locus em particular desempenha um papel dominante na seleção de respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL), quando comparado com outras moléculas de Classe I (Kiepiela et al., 2004; Kaur & Mehra, 2009). Além do seu importante papel na seleção de respostas citotóxicas contra o vírus, a maior diversidade genética desse locus com relação aos outros genes da mesma classe - HLA-A e HLA-C - é um dos principais fatores dessa evidência (Kaur e Mehra, 2009).*

*Dentre os alelos classicamente associados com uma progressão mais lenta para a aids, podemos citar HLA-B\*27 e B\*57 (Kaslow et al., 1996; Hendel et al., 1999; Altfeld et al., 2003; Kaur & Mehra, 2009) e com a progressão mais rápida, os alelos B\*35 e B\*53 (Klein et al., 1994; Gao et al., 2001; Sharma et al., 2011). Associações mais esporádicas já foram descritas com relação à resistência à infecção (alelo B\*44); e com a susceptibilidade (alelos B\*18 e B\*39) (Trachtenberg EA & Erlich HA, 2001).*

O HLA-B\* 27 ocorre numa frequência de aproximadamente 4% a 6% na população humana (<http://www.allelefreqencies.net>) (Kaur & Mehra, 2009). Acredita-se que esse grupo de alelos reconhece epítomos conservados do HIV-1 na região gag, levando a uma resposta imunodominante (Kelleher et al., 2001). Outro alelo conhecido como protetor, o B\*57, restringe a resposta dos CTL para múltiplos peptídeos do HIV-1, como aqueles derivados de gag e da transcriptase reversa. Esta especificidade compromete o fitness viral, o que conduz à sua natureza protetora para aids (Sharma et al, 2011).

Em contraste, outros grupos de alelos, como o B\*35 e B\*53, têm se mostrado com um prognóstico desfavorável em relação à progressão para a aids. O HLA-B\*35 pode ser agrupado em B\*35 Px e B\*35 Py dependendo da sua capacidade de ligar peptídeos. As moléculas HLA-B\*35 Py se ligam preferencialmente a peptídeos que transportam um resíduo tirosina (Y), já o HLA-B\*35 Px não possuem uma ligação aminoacídica especial. Os relatos da literatura sugerem que indivíduos infectados pelo HIV carregando o alelo B\*35 Px progridem para a aids mais rapidamente em comparação com os portadores dos alelos HLA-B\*35 Py (Gao et al, 2001; Gao et al., 2010).

Além disso, alelos não-B também têm sido descritos - em menor número - como relacionados à resistência e/ou susceptibilidade ao HIV, como por exemplo, o HLA-A\*6802 com a proteção e o HLA-A\*2301 com susceptibilidade (MacDonald et al., 2000). O antígeno HLA-A2 também já foi reportado como fator de risco à infecção pelo HIV-1 (Fabio et al., 1990).

Estudos genéticos de tuberculose pulmonar também têm evidenciado o papel desses genes, porém, a associação desses genes com a tuberculose ainda é limitado. Em um trabalho realizado por Lakshmi e colaboradores, foi investigado o papel das moléculas HLA-B\*51 e HLA-B\*52 na tuberculose pulmonar, e os resultados sugeriram que o HLA-B\*52 tem uma associação de proteção e o HLA-B\*51 foi associado à susceptibilidade à tuberculose pulmonar (Lakshmi et al., 2006).

Alelos HLA de Classe II também têm sido citados com referência à proteção ou susceptibilidade à aids e à tuberculose. Dentre esses alelos, o HLA-DR é alvo da maioria dos estudos (Louie et al., 2004; Raghavan et al., 2009). Uma explicação para esse fato se deve à diversidade alélica desse gene quando comparado a outros genes da mesma classe, da mesma forma que ocorre com o HLA-B (IMGT/HLA Database, 2014). A suscetibilidade à infecção pelo HIV-1 está relacionada aos alelos

HLA-DR\*2, HLA-DRB1\*13 (Selvaraj et al., 2006, Achord et al., 1996) enquanto que a resistência ao alelo HLA-DRB1\*01 (Achord et al., 1996).

Diversos estudos têm relatado uma associação entre os alelos HLA de classe II e a tuberculose, porém estas associações não são consistentes devido à grande diferença de frequências encontrada entre as populações. Um estudo de caso-controle publicado por Dubaniewicz e colaboradores relatou uma forte associação do HLA-DRB1\*16 com a tuberculose na população polonesa (Dubaniewicz et al., 2005). Já na população iraniana, um aumento significativo na frequência do alelo HLA-DRB1\*14 em pacientes com TB foi relatado, sendo associada com a susceptibilidade a doença, (Mahmoudzadeh et al., 2003). Um estudo na mesma população mostrou que o alelo HLA-DRB1\*07 parecia estar também associado com a predisposição à TB (Amirzarga et al., 2004). Essas diferenças se devem muito provavelmente ao background genético de cada população estudada.

Com relação aos genes KIR, diversas associações com doenças já foram descritas na literatura, incluindo-se aí infecções virais (aids, hepatite C, citomegalovírus, por exemplo), malária, cânceres e doenças autoimunes (Revisto por Boyton & Altmann, 2007). A herança desses alelos tem implicações na susceptibilidade individual às doenças infecciosas (Boyton et al., 2007; Altfeld et al., 2006). Dentre os vários genes KIR, os alelos KIR3DL1 e KIR3DS1, que são alelos do mesmo locus, têm sido alvos de estudos de associação com doenças, particularmente a aids (Kulkarni et al., 2008).

O alótipo KIR3DS1 interagem com o motivo Bw4 (Cella et al., 1994), um epitopo presente na fenda de ligação ao peptídeo da molécula HLA-B (polimorfismo na posição 77 e 80). A posição 80 parece afetar a interação com o subtipo KIR3DS1: já foi reportado que, quando a molécula HLA-Bw4 apresenta isoleucina na posição 80 (HLA-Bw4 80Ile) e interage com o alótipo KIR3DS1, está associado com a progressão mais lenta para a aids, indicando que as moléculas HLA-Bw4-80Ile atuam como ligantes para KIR3DS1 e que as células infectadas pelo HIV-1 que expressam Bw4-80Ile podem ser mais propícias à atividade das células NK (Martin et al., 2002; Revisto por Carrington et al., 2008).

Outras variações nos genes KIR que influenciam a infecção pelo HIV-1 e a progressão para a doença envolvem os genótipos 2DS2/2DL2 (Gaudieri et al., 2005). Alter e colaboradores descreveram um mecanismo pelo qual o HIV-1 seleciona polimorfismos em KIR2DL2 que levam a uma melhor ligação deste KIR inibitório às células infectadas, resultando na inibição da função das células NK e,

*portanto, habilitando o HIV-1 a escapar da potencial função protetora deste KIR, ressaltando a contribuição dessas células na evolução viral por meio da pressão imune exercida sobre o HIV-1 (Alter et al., 2011).*

*Além disso, o desequilíbrio entre ativação e inibição dos receptores KIR pode afetar a ativação de células do sistema imunológico, contribuindo para a patogênese da tuberculose. Os genes KIR aparentemente possuem um papel na resistência dessa doença, onde já foi mostrado que os genes KIR2DS1, 2DS3, e 3DS1 podem ser associados com a resistência à tuberculose pulmonar na população chinesa (Lu et al., 2012). Outro alótipo relevante é o KIR2DL3, que foi encontrado significativamente elevado em pacientes com tuberculose, indicando que a inibição das células NK promovidas por esse receptor pode facilitar o desenvolvimento da infecção bacteriana (Méndez et al., 2005).*

*Em indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1, os dados sobre marcadores de susceptibilidade ou resistência são escassos. A maioria deles envolve os alelos HLA, alguns já caracterizados como de proteção ou de susceptibilidade na coinfeção, tais como o HLA-DRB1\*1202 com a proteção e o HLA-DRB1\*10 e HLA-DRB1\*05 com a susceptibilidade (Louie et al., 2004; Figueiredo et al., 2008; Yuliwulandari et al., 2010). Associações entre os genes KIR e a coinfeção ainda não foram descritos na literatura.*

*Diante do exposto, o presente estudo visa caracterizar importantes marcadores genéticos do hospedeiro, a fim de verificar sua influência na dinâmica de duas doenças altamente patogênicas, a aids e tuberculose. Além disso, buscamos contribuir com dados relevantes que corroborem a importância do estudo de marcadores genéticos no contexto desta coinfeção.*



## 1.13 JUSTIFICATIVA

*A tuberculose representa a primeira causa de morte em pacientes com aids no Brasil. Pacientes com esses dois agravos têm maior probabilidade de apresentar um desfecho desfavorável ao tratamento da tuberculose (Boletim Epidemiológico, 2012). Quanto ao aspecto biológico, a combinação das duas doenças é preocupante, pois uma promove o agravamento da outra, acelerando a dupla epidemia (Range et al., 2001). Dessa forma, a compreensão das duas patogêneses e a identificação de biomarcadores é de extrema relevância para a melhoria do tratamento clínico dos indivíduos infectados. Além disso, o uso de tratamento antirretroviral combinado durante o tratamento da tuberculose melhora a sobrevida, notadamente pelo restabelecimento das funções imunológicas (Range et al., 2001). No entanto, no tratamento simultâneo com medicamentos antirretrovirais e medicamentos anti-TB pode ocorrer uma resposta imune excessiva resultando nas manifestações da síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (Muller et al., 2010).*

*Alguns fatores de risco para IRIS já foram identificados em diversos trabalhos, tais como: baixa contagem de T CD4+ antes do início da HAART, presença de tuberculose disseminada e extrapulmonar, e um curto intervalo de tempo entre a terapia anti-TB e a HAART, como já mencionado anteriormente. Entretanto, trabalhos que relacionam a genética do hospedeiro com a patogênese desta síndrome são escassos (Chang et al., 2014; Tan et al., 2015). Até o momento, não há associações descritas entre HLA e KIR no contexto da IRIS.*

*Dada a contextualização do problema, já descrito, além da relação bastante próxima entre os genes HLA e KIR, podemos justificar a condução do estudo proposto - que visa caracterizar o perfil genético dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 na presença e na ausência da IRIS -, com base na busca pelo melhor entendimento da influência desses marcadores do hospedeiro na aids e na tuberculose, além de potencialmente associá-los à ocorrência de IRIS.*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

*Avaliar a distribuição e o impacto dos genótipos HLA-B, HLA-DRB1 e KIR em indivíduos com Tuberculose coinfetados pelo HIV-1, além do papel desses genes na ocorrência da síndrome inflamatória da reconstituição imune (IRIS).*

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Realizar a tipagem genética dos alelos HLA-B, HLA-DRB1 e KIR dos indivíduos incluídos no estudo, a fim de verificar a distribuição e as frequências destes genes nesta coorte;*
- *Verificar a existência de associação entre os genes HLA-B, HLA-DRB1 e KIR e a ocorrência de IRIS, através da análise da distribuição dos genótipos encontrados dentre os pacientes que desenvolveram a referida síndrome versus pacientes que não desenvolveram;*
- *Avaliar a distribuição dos alelos HLA-B, HLA-DRB1 e KIR nos diferentes grupos étnicos da coorte analisada;*
- *Comparar a distribuição e frequências dos genes do hospedeiro aqui estudados frente aos dados disponíveis para a população brasileira.*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA:

*Esse é um estudo de caso/controle retrospectivo em uma coorte de pacientes com Tuberculose infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento antirretroviral.*

*O presente projeto é uma emenda do estudo “Síndrome de reconstituição imune: avaliação da resposta imune em pacientes com tuberculose em uso de HAART” que foi conduzido no Instituto Nacional de Infectologia (INI)/FIOCRUZ sendo aprovado pelo CEP do INI, com o seguinte CAAE: 0002.0.009.000-07.*

*Inicialmente, foram recrutados para o estudo 88 pacientes com tuberculose e infectados pelo HIV-1, acompanhados no INI no período de 2006 a 2012. Destes, 27 foram excluídos por apresentarem baixa adesão aos tratamentos ou por não terem completado o número de visitas estabelecido no projeto (as visitas serão explicadas adiante). Ao final, a casuística contou com 61 pacientes que foram recrutados no âmbito do estudo “Avaliação do perfil de reconstituição imunológica de indivíduos HIV/TB submetidos a tratamento para tuberculose e terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) incluindo Efavirenz”, vinculado ao projeto citado anteriormente e concluído no ano de 2014 no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) aprovado pelo CEP do INI (CAAE: 0052.0.009.000-10). O presente utilizou a mesma casuística de 61 pacientes e também foi submetido ao comitê de ética, como uma emenda do projeto original supracitado, uma vez que foi incluída a genotipagem dos genes KIR, com subsequente aprovação (CAAE 25172513.6.0000.5248) (Figura 20).*

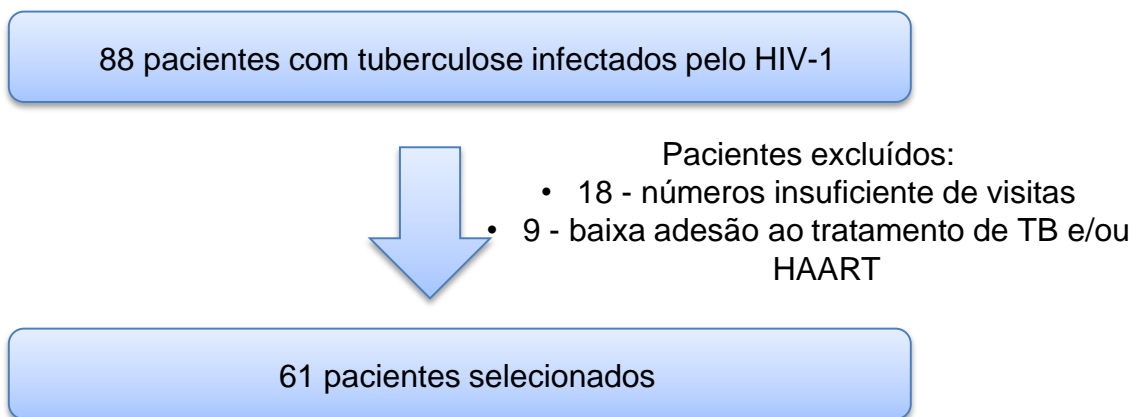


Figura 20: Fluxograma dos pacientes recrutados no estudo. (Adaptato de Silva et al 2013).

### 3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE:

*Foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão do estudo:*

#### a) Inclusão

- *Maior de 18 anos de idade;*
- *Infecção pelo HIV confirmada através de exames laboratoriais;*
- *Virgem de tratamento aos antirretrovirais;*
- *Confirmação de infecção por TB por prova terapêutica ou cultura;*
- *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado antes de qualquer procedimento do estudo;*

#### b) Exclusão

- *Baixa adesão ao tratamento de TB e/ou para HAART;*
- *Gestantes;*

*Para o diagnóstico dos casos de IRIS foram estabelecidos critérios descritos no trabalho de Meintjes e colaboradores em 2008, como por exemplo, quadro clínico temporalmente relacionado com o início da terapia antirretroviral, aumento das contagens de células T CD4+, resposta inflamatória atípica nos tecidos, reação de hipersensibilidade à droga, progressiva disfunção orgânica, dentre outros.*

### 3.3 RECRUTAMENTO:

O recrutamento dos pacientes foi realizado no Ambulatório de Tuberculose do INI. Os participantes inscritos no estudo passaram por uma entrevista para a seleção de casos, onde foi avaliada a suspeita de TB, em seguida feito o diagnóstico e iniciado o tratamento através do Programa de Tuberculose do INI. Em seguida, durante os 15 primeiros dias de tratamento para a tuberculose, houve a seleção de casos obedecendo aos critérios de elegibilidade para iniciar a HAART. Durante o período de tratamento com tuberculostático e HAART foram feitas consultas (Dia 30, dia 60, dia 90, dia 120, dia 150 – final do tratamento da TB e dia 180 – paciente apenas em HAART), denominadas visitas, nas quais eram coletadas amostras de sangue que foram utilizadas para o presente estudo. Consultas adicionais foram realizadas em caso de aparecimento de doenças associadas ao HIV/AIDS ou eventos adversos (incluindo-se a IRIS). Os pacientes desse estudo evoluíram para o quadro de IRIS principalmente nos dias 60 e 90 (Figura 21).

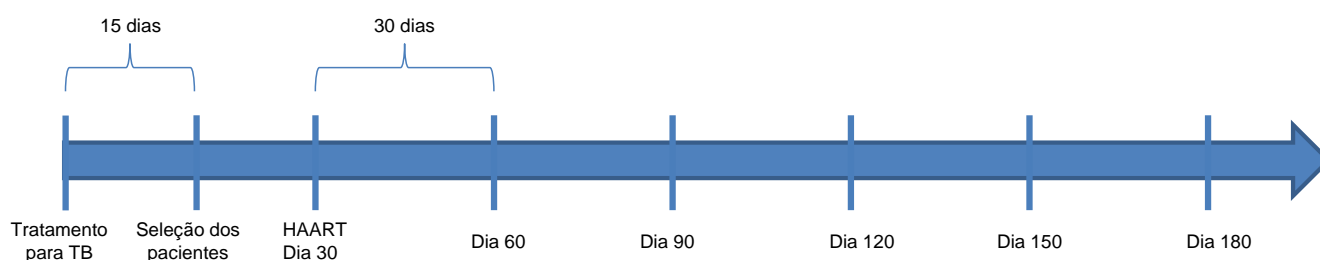


Figura 21: Fluxograma das etapas às quais os pacientes inscritos no estudo foram submetidos

### 3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:

As amostras biológicas foram obtidas no âmbito de um estudo prévio realizado no laboratório (projeto inicial) denominado “Avaliação do perfil de reconstituição imunológica de indivíduos HIV/TB submetidos a tratamento para tuberculose e Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) incluindo Efavirenz”. Desta forma, para a condução do presente projeto, utilizamos as amostras biológicas armazenadas no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular durante o período de

realização do projeto anterior, a partir das quais extraímos o DNA para o estudo dos genes alvo.

### **3.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO:**

*O DNA genômico foi extraído a partir de células do sangue total do paciente, utilizando-se o método de colunas de sílica do kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha), conforme as orientações do fabricante. Este kit é desenhado para extração do DNA total (genômico, viral ou mitocondrial), a partir de 200µL de sangue total humano, com ligação seletiva do DNA a uma matriz de resina de sílica contida em uma coluna de MicroSpin. Após a ligação do DNA a essa matriz o material nucléico sofre várias lavagens com soluções alcoólicas. A eluição se dá pela adição do tampão do próprio kit. Após a extração, o DNA foi identificado e estocado a -20°C.*

### **3.6 QUANTIFICAÇÃO DO DNA:**

*Para cada amostra, foi feita a estimativa da concentração de DNA, para detectarmos o grau de pureza e a quantidade de DNA viável em cada amostra. Foi analisada a leitura de absorbância em 260nm (UV – Concentração do DNA) e em 280nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Scientific 2000). Como requisito para as técnicas de biologia molecular utilizadas após a extração, o DNA extraído deve ter uma concentração de 50 ng/µl (genotipagem KIR) e 15-30 ng/µL (sequenciamento HLA). A pureza (A260nm/A280nm) deve ser  $\geq 1,5$ . Após a quantificação as amostras consideradas viáveis foram estocadas a -20°C. As que não obtiveram concentração adequada foram submetidas à reextração.*

### **3.7 GENOTIPAGEM KIR:**

*Para detectar a presença e ausência de genes KIR a partir das amostras de DNA dos pacientes, foi empregada a metodologia de PCR-SSP (sequence-specific primers), utilizando kits comerciais (KIR Genotyping SSP Kit - Invitrogen, USA). As especificidades gênicas detectadas por esse kit são: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4,*

2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1 e 3DP1. Esta técnica consiste em um ensaio de reação em cadeia da polimerase com jogos de iniciadores locus-específicos, bem como um par de iniciadores que funciona como controle interno da reação de PCR. O protocolo inclui a mistura de um tampão de reação com DNA genômico humano e enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), a qual foi dispensada na placa, selada e submetida à ciclagem em termociclador (1 min a 95°C; 30 ciclos: 94°C por 20", 63°C por 20", 72°C por 90"). Após a etapa de ciclagem, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com gel red (Biotium, USA), que foi foto documentado e interpretado utilizando uma worksheet disponibilizada junto com o kit (Figura 22). A determinação dos alelos consistiu na verificação da ocorrência ou não da amplificação. Este método apresenta-se sensível, específico e reprodutível.

**invitrogen** KIR Genotyping SSP Kit - WORKSHEET  
Code no.: 54410D

Invitrogen Corporation  
Tel: 1-800-955-6286  
Fax: 1-800-331-2286  
www.invitrogen.com

Institution _____	Purpose of Test _____	Taq Lot# _____
Sample I.D. _____	DNA Extraction Method _____	Lot# 004 Batch# _____
Name _____	DNA Conc. (ng/μl) _____	Expiration Date _____
Ethnic Origin _____	Tested by _____	Test Date _____
Donor/Patient _____	Reviewed by _____	Review Date _____

Typing Result (Check genes present)

2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4*FUL	2DS4*DEL	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	2DP1	3DP1*FUL	3DP1*DEL
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Typing Result #/.	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2DL1*001-025		1																					
2DL2*0010101-010			2																				
2DL3*0010101-006/008N-009/011/013-017				3	4																		
2DL3*007/01291					5																		
2DL3*010						4																	
2DL4*00101-017							5																
2DL5A*0010101-01202								6	7														
2DL5B*0020101-00202/004-00601/00603-01303									8	9													
2DL5B*003/00602										8	9												
2DS1*001-008											10												
2DS2*0010101-006												11											
2DS3*00101-004													12										
2DS4*0010101-00104/01101-02/014-015 (FUL)														13									
2DS4*0020101-010/012-013 (DEL)															14								
2DS5*001-010																15							
3DL1*0010101-072																	16						
3DL2*0010101-056																		17					
3DL3*00101-048																			18				
3DS1*010-058																				19			
2DP1*00101-010																					20		
3DP1*001/002/004/007/009/010-009/02 (FUL) (975bp)																						21	22
3DP1*0030101-00304/02/005-006/008/010 (DEL) (344bp)																							21
Product Size (bp)		140	140	515/510	500/510	230	207	1753	1893	1751	100	207	160/155	215	200	155	130/125/95	150	203	95	171	344/975	975
Lane Number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Failed Controls																							
False Positive																							
False Negative																							

Figura 22: Worksheet utilizada para determinar os alelos presentes em cada amostra.

### 3.8 TIPAGEM DOS ALELOS HLA DE CLASSE I B E II DRB1:

A tipagem molecular dos alelos HLA-B e HLA-DRB1 foi determinada pela metodologia sequenciamento automático de nucleotídeos (sequencing-based typing – SBT) em plataforma ABI, utilizando-se um kit comercial (SeCore Sequencing Kit – Life Technologies, EUA). Este kit destina-se a identificar diretamente a sequência de DNA a partir de genes HLA alvo.

Para realização da tipagem as amostras foram submetidas a etapas de amplificação, purificação e sequenciamento. Cada reação de PCR é composta por 19,8 µl da mistura do tampão de amplificação + 0,2 µl de FastStart Taq, no caso da tipagem do HLA-B; e 22,8 µl da mistura do tampão de amplificação + 0,2 µl de FastStart Taq, no caso da tipagem do HLA-DRB1. São necessários 5 ul de DNA para o protocolo HLA-B e 2 ul para o protocolo HLA-DRB1. Após a mistura dos reagentes, as amostras foram colocadas em termociclador para a amplificação dos fragmentos (1 ciclo: 95°C por 4 min.; 35 ciclos: 95°C por 20 s, 63°C por 20s, 72°C por 40s; 1 ciclo: 72°C por 5 min.).

Logo após a reação de PCR, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com gel red (Biotium, USA). Foram incluídos no último poço de cada gel 2 µl do marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder), como parâmetro de verificação do tamanho do fragmento amplificado. Após o término de cada corrida (100 V por 40 min), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador com luz ultravioleta. Para o HLA-B são esperadas duas bandas: ~1250pb (exons – checar se tem acento 2 e 3) e ~720 pb (exon 4 = banda de controle interno) e para o HLA-DRB1 ~ 500 a 850 (exon 2) e ~450 (exon 3). Foi feita a documentação fotográfica dos géis juntamente com a captura das imagens. Após essa etapa os produtos de PCR foram submetidos à purificação, de acordo com as instruções do fabricante. Nessa etapa, somente as amostras com produtos com a banda de ~1250pb (HLA-B) e com ~300pb (HLA-DRB1) foram incluídas.

Após a purificação, os produtos foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o mesmo kit comercial. Os produtos de purificação (2 µl) foram misturados aos mixes de sequenciamento locus-específico (8 µl) e submetidos à ciclagem em termociclador (25 ciclos: 95°C por 20s, 50°C por 15s, 60°C por 60s). Os produtos sequenciados foram precipitados com etanol a 70% e 100% e em seguida, analisados em sequenciador automático ABI 3730XL. Os cromatogramas gerados



*após o sequenciamento foram visualizados e interpretados com o auxílio do software SBT HLA uType 6.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), fornecido pelo fabricante do kit.*

### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

*As frequências dos alelos e genótipos foram estimadas por meio do programa PyPop – Python for Population Genetics 0.6.0 (Lancaster et al., 2003), voltado para o estudo de genética populacional e comparadas entres os grupos com IRIS e sem IRIS e o perfil genômico do Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME), divulgado em março de 2013. Esse banco de dados possui frequências dos alelos HLA representativo da população Brasileira com mais de 5 milhões de doadores registrados ([www.imunogenetica.org](http://www.imunogenetica.org)).*

*A aplicação do teste chi quadrado ou teste exato de Fisher para detectar diferenças significativas das frequências de alelos entre os diferentes grupos de pacientes foi realizada pelo pacote estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism versão 7.0 para Windows, GraphPad Software, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

*Dos 61 pacientes incluídos no estudo (Figura 20), 7 (12%) evoluíram para o quadro de IRIS, que desenvolveu-se em um tempo mediano de 59 dias (IQR 27-89) após a introdução da HAART, e 54 (88%) não apresentaram IRIS. A mediana de células T CD4<sup>+</sup> antes da introdução da HAART foi de 98 céls/mm<sup>3</sup> e a mediana de carga viral foi de 5,14 log<sub>10</sub> cópias/mL. Foi observado que (67%) dos pacientes encontravam-se imunossuprimidos (CD4<200 céls/mm<sup>3</sup>) antes da introdução da HAART. A faixa etária variou entre 20 e 60 anos, com mediana de 37 anos. Quanto ao sexo, 49 (80%) eram do sexo masculino e 12 (20%) do sexo feminino. Quanto a etnia, 46% são brancos, 29% pardos e 25% negros. A proporção de pacientes com tuberculose pulmonar ou disseminada foi semelhante, 44 e 48% respectivamente. Todos os pacientes foram tratados com duas doses distintas de efavirenz (600 ou 800 mg/dia) e dois análogos do nucleosídeo/nucleotídeo durante todo o estudo. As características da população estudada estão representadas na Tabela 1.*

*Tabela 1: Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos 61 pacientes com diagnóstico de tuberculose infectados pelo HIV-1 do INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.*

<b>Características</b>	<b>Pacientes total n=61</b>	<b>Pacientes com IRIS n=7</b>	<b>Pacientes sem IRIS n=54</b>	<b>P valor</b>
Idade (anos), mediana	37 (20 - 60)	34 (22- 44)	38 (20- 60)	0,173
Sexo, n (%)				
Feminino	12 (20%)	0 (0%)	12 (22%)	0,327
Masculino	49 (80%)	7 (100%)	42 (78%)	0,050
Forma clínica, n(%)				
Pulmonar	27 (44%)	2 (29%)	25 (46%)	0,448
Disseminada	29 (48%)	5 (71%)	24 (44%)	0,241
Extrapulmonar	5 (8%)	0 (0.0%)	5 (10%)	1,000
IRIS, n (%)				
Sim	7 (11%)	-	-	
Não	54 (89%)	-	-	
Etnia, n(%)				
Negro	15 (25%)	2 (29%)	13 (24%)	1,000
Pardo	18 (29%)	1 (14%)	17 (32%)	0,662
Branco	28 (46%)	4 (57%)	24 (44%)	0,693
CD4 céls/mm <sup>3</sup> , mediana	98 (35 - 235)	60 (34-196)	104 (36-236)	0,386
< 200	51 (30- 100.5)	6 (86)	35 (65)	
≥ 200	275.5 (234.2 – 361.7)	1 (14)	19 (35)	
Carga Viral (log <sub>10</sub> cópias/ml), mediana	5.14 (4.48 – 5.51)	5,05 (4,77- 5,35)	5,1 (4,47-5,55)	0,910

*n= número de pacientes; IRIS = Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune. Adaptado de Silva et al., 2013.*

## 4.2 FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA-B

Os resultados das frequências alélicas do locus HLA-B e HLA-DRB-1 dos pacientes incluídos no estudo estão apresentados na Tabela 2. Todas as 61 amostras foram submetidas à extração de DNA, quantificação e tipagem molecular dos alelos HLA-B por sequenciamento automático de nucleotídeos.

Tabela 2: Genótipos HLA-B e HLA-DRB1 dos pacientes incluídos no estudo.

Amostras	Ocorrência de IRIS	Tipagem HLA-B		Tipagem HLA-DRB-1	
Tb 001	Não	B*14:01:01	B*45:01	DRB1*07:01:01:01	DRB1*07:01:01:01
Tb 002	Não	B*49:01:01	B*58:01:01	DRB1*01:02:01	DRB1*11:02:01
<b>Tb 003</b>	Sim	<b>B*07:02:10</b>	<b>B*39:10</b>	<b>DRB1*10:01:01</b>	<b>DRB1*15:01:01:01</b>
Tb 004	Não	B*08:01	B*51:01	-	-
Tb 005	Não	B*07:02:01	B*07:02:08	DRB1*15:01:01:01	DRB1*15:01:01:01
<b>Tb 006</b>	Sim	<b>B*07:02:01</b>	<b>B*41:01</b>	<b>DRB1*11:01:01</b>	<b>DRB1*13:02:01</b>
Tb 009	Não	B* 35:01:06	B* 49:01:01	DRB1*03:02:01	DRB1*04:06:02
Tb 011	Não	B*14:01:01	B*51:01:18	DRB1*04:03:01	DRB1*07:01:01:01
<b>Tb 012</b>	Sim	<b>B*14:19</b>	<b>B*38:01:01</b>	<b>DRB1*04:04:01</b>	<b>DRB1*04:04:01</b>
Tb 013	Não	B*15:10:01	B*44:03:09	DRB1*03:01:01:01	DRB1*12:01:01
Tb 014	Não	B*15:01:01	B*44:03:01	DRB1*07:01:01:01	DRB1*13:01:01
Tb 015	Não	B*39:13:01	B*52:01:04	DRB1*03:02:01	DRB1*08:07
Tb 016	Não	B* 15:05:01	B* 15:17:01:01	DRB1*03:02:01	DRB1*04:17:02
Tb 017	Não	B*15:01:16	B*35:05:01	DRB1*04:17:01	DRB1*08:06
Tb 018	Não	B* 07:196	B* 51:159	DRB1*03:01:01:01	DRB1*15:01:01:01
Tb 019	Não	B*35:02:03	B*44:03:09	DRB1*01:01:01	DRB1*01:01:02
Tb 020	Não	B*44:02:01:01	B*44:111	DRB1*13:03:01	DRB1*15:01:01:01
Tb 021	Não	B*37:01:02	B*55:01:01	DRB1*03:01:01:01	DRB1*07:01:01:01
Tb 023	Não	B*15:17:01	B*58:01:01	DRB1*14:95	DRB1*14:111
Tb 024	Não	B* 53:01:01	B* 58:01:01	DRB1*07:01:01:01	DRB1*07:01:01:01
Tb 026	Não	B* 44:01:01	B* 81:01	DRB1*04:03:01	DRB1*15:03:01:01
Tb 027	Não	B* 15:01:01:01	B* 15:31	DRB1*11:02:01	DRB1*11:02:01
Tb 028	Não	B* 08:01:01	B* 53:01:02	DRB1*08:02:01	DRB1*13:01:01
Tb 029	Não	B*44:02:01	B*50:01:02	DRB1*04:04:01	DRB1*07:01:01:01
Tb 030	Não	B*49:01:01	B*58:02	DRB1*04:05:01	DRB1*07:01:01:01
Tb 034	Não	B*15:03:01	B*44:03:08	DRB1*07:01:01:01	DRB1*07:01:01:01
<b>Tb 040</b>	Sim	<b>B* 35:01:01:01</b>	<b>B* 57:01:01</b>	<b>DRB1*01:03</b>	<b>DRB1*04:02:01</b>
Tb 041	Não	B*35:01:04	B*44:02:07	DRB1*07:01:02	DRB1*11:01:01
Tb 042	Não	B*07:02:01	B*51:01:08	DRB1*07:01:01:01	DRB1*15:03:01:01
Tb 047	Não	B* 15:03:01	B* 15:03:01	DRB1*11:01:01	DRB1*13:02:08
Tb 048	Não	B*37:01:01	B*81:01	DRB1*04:05:03	DRB1*12:01:01

Tb 049	Não	B*35:01:01	B*57:03:01	DRB1*07:01:01:01	DRB1*08:07
Tb 050	Não	B*15:01:01	B*57:34	DRB1*04:02:01	DRB1*13:02:01
Tb 051	Não	B*07:02:01	B*50:01:01	DRB1*14:08	DRB1*14:39
Tb 052	Não	B* 27:44	B* 45:01:02	DRB1*07:01:01:01	DRB1*15:03:01:01
Tb 053	Não	B*14:02:01	B*35:23	DRB1*08:04:01	DRB1*12:01:01
Tb 058	Não	B* 27:05:02	B* 57:01:01	DRB1*01:01:01	DRB1*07:01:01:01
<b>Tb 060</b>	<b>Sim</b>	<b>B*40:02:01</b>	<b>B*42:02</b>	<b>DRB1*14:02:01</b>	<b>DRB1*15:03:01:01</b>
Tb 062	Não	B* 08:01:01	B* 51:01:08	DRB1*01:02:01	DRB1*13:01:03
Tb 063	Não	B* 15:10:01	B* 53:01:03	DRB1*03:14	DRB1*14:54
Tb 064	Não	B* 15:10:02	B* 35:03:01	DRB1*11:01:01	DRB1*15:03:01:01
Tb 065	Não	B* 42:02	B* 44:04	DRB1*11:01:01	DRB1*12:01:01
Tb 067	Não	B* 08:01:01	B*44:162	DRB1*03:94	DRB1*12:01:01
Tb 069	Não	B* 44:02:01:01	B* 53:01:01	DRB1*11:01:01	DRB1*11:01:01
Tb 071	Não	B* 15:03:01	B* 58:01:01	DRB1*08:02:02	DRB1*11:04:01
Tb 072	Não	B* 08:01:08	B*35:01:15	DRB1*01:01:01	DRB1*03:01:01:01
Tb 075	Não	B* 15:03:01	B*41:30	DRB1*07:01:01:01	DRB1*11:01:02
Tb 076	Não	B*35:27	B*45:01	DRB1*10:01:01	DRB1*13:02:01
Tb 077	Não	B* 07:02:08	B* 48:02:01	DRB1*09:01:02	DRB1*12:02:02
Tb 078	Não	B* 42:05:02	B* 44:03:01	DRB1*03:02:01	DRB1*07:01:01:01
<b>Tb 079</b>	<b>Sim</b>	<b>B* 42:01:01</b>	<b>B* 44:03:01</b>	<b>DRB1*03:02:01</b>	<b>DRB1*07:01:01:01</b>
Tb 080	Não	B* 53:01:01	B*53:01:01	DRB1*08:02:02	DRB1*13:01:01
Tb 081	Não	B* 15:03:01	B*18:01:01	DRB1*07:05	DRB1*11:04:01
Tb 083	Não	B*40:02:01	B* 52:01:01	DRB1*01:01:01	DRB1*11:01:01
Tb 086	Não	B* 07:02:01	B* 14:02:01	DRB1*01:01:01	DRB1*15:01:01:01
Tb 087	Não	B*14:02:01	B*35:08:01	DRB1*10:01:01	DRB1*15:03:01:01
Tb 089	Não	B*51:01:01	B*52:01:04	DRB1*04:07:01	DRB1*04:11:01
Tb 091	Não	B* 18:84	B* 38:01:01	DRB1*11:01:01	DRB1*16:01:01
<b>Tb 092</b>	<b>Sim</b>	<b>B*44:03:09</b>	<b>B*45:01</b>	<b>DRB1*07:01:01:01</b>	<b>DRB1*07:01:01:01</b>
Tb 094	Não	B*35:01:01	B*44:03:05	DRB1*04:02:01	DRB1*08:01:01
Tb 096	Não	B*15:206	B*35:27	DRB1*01:01:01	DRB1*11:02:01

IRIS: Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune.

Os resultados mostram a ocorrência de 25 grupos alélicos HLA-B, onde os mais frequentes foram: B\*15 (14,7%), B\*44 (13,1%), B\*35 (10,7%) e B\*07 (7,4%) (Figura 23). Quando analisamos os resultados da tipagem em alta resolução, consequentemente dividindo os alelos em mais grupos, os alelos específicos mais frequentemente encontrados foram: B\*44:03 (6,2%), B\*15:03:01 (5,4%), B\*35:01 (5,2%) e B\*07:02:01 (5,4%).

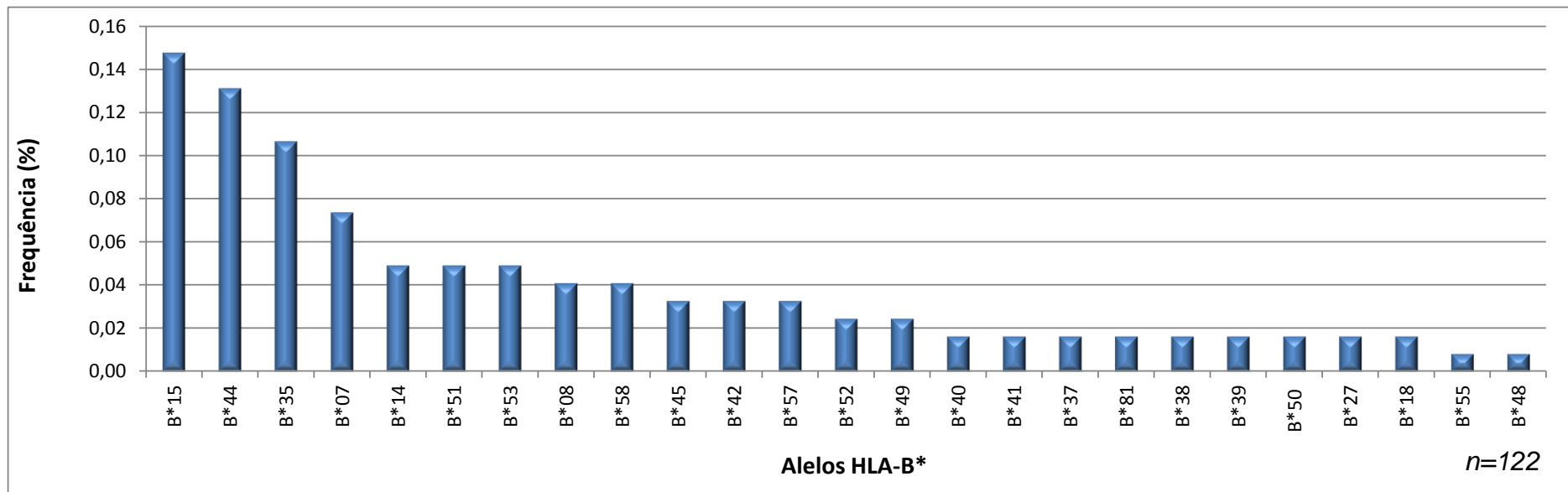


Figura 23: Frequência dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 incluídos no estudo. n=número de alelos.

Uma vez que a determinação dos alelos específicos é de grande importância para os estudos que investigam associações com doenças, verificamos a distribuição dos alelos específicos nos grupos alélicos mais frequentes em nosso estudo (B\*15, B\*44, B\*35 e B\*07) (Figura 24). Os resultados apontam para uma maior diversidade alélica nos grupos B\*15 e B\*35.

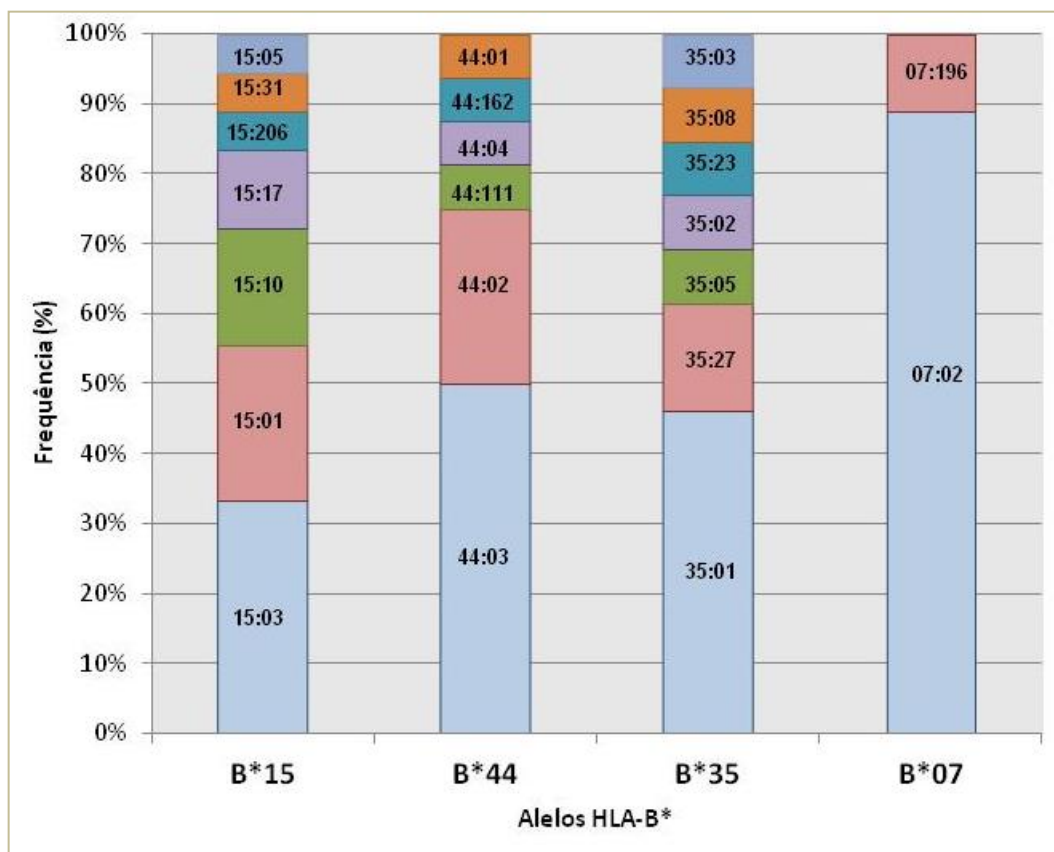


Figura 24: Distribuição dos alelos específicos do gene HLA-B encontrados nos grupos alélicos predominantes em nosso estudo.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do gene HLA-B nos grupos com IRIS e sem IRIS. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) entre as frequências alélicas do HLA-B entre os grupos, porém uma tendência à significância estatística foi observada entre as frequências do alelo HLA-B\*42 nos dois grupos ( $p=0.061$ , OR 10.4), refletindo uma possível associação com a ocorrência de IRIS (14,3% vs. 1,8% respectivamente).

Tabela 3: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B entre os indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1.

Alelos HLA-B	IRIS 2n=14		Não-IRIS 2n=108		IRIS vs. Não-IRIS	
	n	fg	n	fg	p-valor*	OR
<b>B*07</b>	02	0.143	07	0.065	0.275	2.40
<b>B*08</b>	00	0.000	05	0.046	1.000	0.64
<b>B*14</b>	01	0.071	05	0.046	0.526	1.58
<b>B*15</b>	00	0.000	18	0.167	0.127	0.16
<b>B*18</b>	00	0.000	02	0.018	1.000	1.46
<b>B*27</b>	00	0.000	02	0.018	1.000	1.46
<b>B*35</b>	01	0.071	12	0.111	1.000	0.61
<b>B*37</b>	00	0.000	02	0.018	1.000	1.46
<b>B*38</b>	01	0.071	01	0.009	0.217	8.23
<b>B*39</b>	01	0.071	01	0.009	0.217	8.23
<b>B*40</b>	01	0.071	01	0.009	0.217	8.23
<b>B*41</b>	01	0.071	01	0.009	0.217	8.23
<b>B*42</b>	02	0.143	02	0.018	<b>0.064</b>	8.83
<b>B*44</b>	02	0.143	14	0.129	1.000	1.11
<b>B*45</b>	01	0.071	03	0.028	0.389	2.69
<b>B*48</b>	00	0.000	01	0.009	1.000	2.47
<b>B*49</b>	00	0.000	03	0.028	1.000	1.03
<b>B*50</b>	00	0.000	02	0.018	1.000	1.46
<b>B*51</b>	00	0.000	06	0.055	1.000	0.54
<b>B*52</b>	00	0.000	03	0.028	1.000	1.03
<b>B*53</b>	00	0.000	06	0.055	1.000	0.54
<b>B*55</b>	00	0.000	01	0.009	1.000	2.47
<b>B*57</b>	01	0.071	3	0.028	0.389	2.69
<b>B*58</b>	00	0.000	05	0.043	1.000	0.60
<b>B*81</b>	00	0.000	02	0.018	1.000	0.64

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $*p < 0.05$ .

fg: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio;  
IRIS: Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune.



*Dada a elevada diversidade genética da população brasileira, que é caracterizada por um grau elevado de miscigenação, é importante comparar as frequências alélicas entre caucasianos e não caucasianos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.*

Tabela 4: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 entre caucasianos e não-caucasianos.

Alelos HLA-B	Caucasianos 2n=56		Não-caucasianos 2n=66		Cauc vs. Não-caucasianos	
	n	fg	n	fg	p-valor*	OR
<b>B*07</b>	07	0.125	02	0.030	0.078	4.57
<b>B*08</b>	03	0.053	02	0.030	0.660	1.81
<b>B*14</b>	04	0.071	02	0.030	0.411	2.46
<b>B*15</b>	07	0.125	11	0.166	0.612	0.71
<b>B*18</b>	01	0.017	01	0.015	1.000	1.18
<b>B*27</b>	01	0.017	01	0.015	1.000	1.18
<b>B*35</b>	07	0.125	06	0.090	0.540	1.42
<b>B*37</b>	00	0.000	02	0.030	0.499	0.22
<b>B*38</b>	02	0.035	00	0.000	0.208	6.10
<b>B*39</b>	02	0.035	00	0.000	0.208	6.10
<b>B*40</b>	01	0.017	01	0.015	1.000	1.18
<b>B*41</b>	01	0.017	01	0.015	1.000	1.18
<b>B*42</b>	00	0.000	04	0.060	0.123	0.12
<b>B*44</b>	04	0.071	12	0.181	0.105	0.34
<b>B*45</b>	02	0.035	02	0.030	1.000	1.18
<b>B*48</b>	00	0.000	01	0.015	1.000	0.38
<b>B*49</b>	01	0.017	02	0.030	1.000	0.58
<b>B*50</b>	01	0.017	01	0.015	1.000	1.18
<b>B*51</b>	04	0.071	02	0.030	0.411	2.46
<b>B*52</b>	03	0.053	00	0.000	0.093	8.70
<b>B*53</b>	01	0.017	05	0.075	0.216	0.22
<b>B*55</b>	00	0.000	01	0.015	1.000	0.38
<b>B*57</b>	03	0.053	01	0.015	0.332	3.67
<b>B*58</b>	01	0.017	04	0.060	0.373	0.28
<b>B*81</b>	00	0.000	02	0.030	0.499	0.22

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $p < 0.05$ .

fg: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio.

*A fim de verificarmos se a distribuição dos alelos HLA-B encontrados em nosso estudo está de acordo com os dados reportados para a população Brasileira, comparamos as frequências dos alelos dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 aqui estudados com as frequências dos alelos HLA-B disponíveis no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME). Tais resultados são apresentados na Tabela 5.*

Tabela 5: Distribuição das frequências dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e da população Brasileira (dados do REDOME) estratificada em grupos étnicos.

Alelos HLA-B	Indivíduos com TB e AIDS (2n=122 alelos)								Brasileiros (REDOME) (2n=5.706.717 alelos)								p valor*			
	Total (2n=122)		Branco (2n=56)		Negro (2n=72)		Pardo (2n=112)		Total** (2n=5.706.717)		Branco (2n=364.014)		Negro (2n=345.703)		Pardo (2n=352.271)		Total	Branco	Negro	Pardo
	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq				
<b>B*07</b>	09	0.073	07	0.125	02	0.666	00	0.000	393.814	0.069	27.961	0.071	26.602	0.068	25.937	0.066	0.838	0.226	0.127	<b>0.018</b>
<b>B*08</b>	05	0.041	03	0.053	01	0.033	01	0.028	291.107	0.051	16.302	0.056	12.422	0.043	12.867	0.044	0.618	0.737	0.353	0.131
<b>B*13</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	90.593	0.016	1.631	0.018	1.132	0.013	1.123	0.012	0.159	0.616	0.627	0.543
<b>B*14</b>	06	0.049	04	0.071	01	0.033	01	0.028	300.037	0.053	15.902	0.053	15.728	0.052	16.151	0.052	0.868	0.369	0.206	0.086
<b>B*15</b>	18	0.147	07	0.121	02	0.066	09	0.250	518.155	0.091	42.489	0.082	58.500	0.113	54.064	0.104	<b>0.032</b>	0.840	0.050	0.057
<b>B*18</b>	02	0.016	01	0.017	01	0.033	00	0.000	270.883	0.048	14.086	0.052	10.648	0.039	11.038	0.041	0.108	0.439	0.408	0.074
<b>B*27</b>	02	0.016	01	0.017	00	0.000	01	0.028	126.605	0.022	3.165	0.025	2.178	0.017	2.371	0.019	0.646	0.460	0.499	0.776
<b>B*35</b>	13	0.106	07	0.125	03	0.100	03	0.083	673.880	0.118	82.887	0.123	72.530	0.107	76.054	0.113	0.696	0.083	0.901	0.456
<b>B*37</b>	02	0.016	00	0.000	01	0.033	01	0.028	60.869	0.011	670	0.011	523	0.009	605	0.010	0.546	0.726	0.942	0.065
<b>B*38</b>	02	0.016	02	0.035	00	0.000	00	0.000	121.887	0.021	2.925	0.024	1.837	0.015	2.070	0.017	0.706	0.296	0.535	0.416
<b>B*39</b>	02	0.016	02	0.035	00	0.000	00	0.000	197.423	0.035	6.515	0.033	6.953	0.035	7.579	0.038	0.275	0.315	0.224	0.117
<b>B*40</b>	02	0.016	01	0.017	01	0.033	00	0.000	273.605	0.048	13.133	0.048	11.820	0.043	13.319	0.049	0.104	0.486	0.355	0.453
<b>B*41</b>	02	0.016	01	0.017	01	0.033	00	0.000	73.500	0.013	956	0.013	936	0.013	892	0.012	0.727	0.357	0.068	0.594

<b>B*42</b>	04	0.032	00	0.000	01	0.033	03	0.083	79.525	0.014	716	0.009	2.343	0.029	1.747	0.022	0.075	0.740	0.462	0.093
<b>B*44</b>	16	0.131	04	0.071	06	0.200	06	0.166	615.800	0.108	69.585	0.113	58.717	0.095	62.608	0.102	0.376	0.056	0.073	0.453
<b>B*45</b>	04	0.032	02	0.035	01	0.033	01	0.028	98.905	0.017	1.385	0.014	2.552	0.026	2.129	0.022	0.200	0.107	0.519	0.694
<b>B*47</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	12.556	0.002	25	0.002	23	0.002	25	0.002	0.615	0.950	0.944	0.929
<b>B*48</b>	01	0.008	00	0.000	01	0.033	00	0.000	41.436	0.007	249	0.006	340	0.008	376	0.009	0.896	0.845	0.107	0.729
<b>B*49</b>	03	0.024	01	0.017	00	0.000	02	0.055	158.232	0.028	4.430	0.028	4.249	0.027	4.264	0.027	0.836	0.698	0.344	0.488
<b>B*50</b>	02	0.016	01	0.017	00	0.000	01	0.028	136.173	0.024	3.268	0.024	3.061	0.022	3.283	0.024	0.593	0.481	0.422	0.958
<b>B*51</b>	06	0.049	04	0.071	01	0.033	00	0.000	475.056	0.083	42.280	0.089	32.380	0.068	36.014	0.076	0.057	0.296	0.423	0.059
<b>B*52</b>	03	0.024	03	0.053	00	0.000	00	0.000	110.700	0.020	1.993	0.018	2.304	0.021	2.397	0.022	0.685	0.238	0.487	0.381
<b>B*53</b>	06	0.049	01	0.017	04	0.133	01	0.028	153.283	0.024	2.759	0.018	6.392	0.042	5.014	0.033	0.133	0.375	0.057	0.636
<b>B*55</b>	01	0.008	00	0.000	00	0.000	01	0.028	62.186	0.011	746	0.012	493	0.008	555	0.009	0.778	0.734	0.748	0.059
<b>B*56</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	20.859	0.004	83	0.004	50	0.002	60	0.003	0.506	0.909	0.918	0.890
<b>B*57</b>	04	0.032	03	0.053	00	0.000	01	0.028	159.435	0.028	4.464	0.028	4.702	0.029	4.456	0.028	0.719	0.053	0.318	0.725
<b>B*58</b>	05	0.041	01	0.017	01	0.033	03	0.083	151.176	0.027	3.326	0.022	6.053	0.040	5.102	0.034	0.325	0.493	0.815	0.276
<b>B*67</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	1.579	0.001	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.854	-	-	-
<b>B*73</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	5.648	0.001	6	0.001	4	0.001	4	0.001	0.728	0.976	0.977	0.972
<b>B*78</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	4.956	0.001	3	0.0007	5	0.001	6	0.001	0.745	0.983	0.974	0.965
<b>B*81</b>	02	0.016	00	0.000	02	0.066	00	0.000	24.196	0.004	73	0.003	224	0.009	159	0.007	0.059	0.915	0.458	0.822
<b>B*82</b>	00	0.000	00	0.000	00	0.000	00	0.000	2.658	0.001	1	0.0003	2	0.001	2	0.001	0.811	0.990	0.984	0.979

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $p < 0.05$ .

freq: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio.

REDOME: Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea.

\*\* A soma do número observado de alelos HLA-B (n) em brancos, negros e mulatos não corresponde ao número total de cada alelo porque os dados REDOME também incluem frequências de alelos de indígenas, orientais e indivíduos cuja etnia não foi notificada.

### 4.3 HOMOZIGOSE E HETEROZIGOSE DOS ALELOS HLA-B

O loci HLA-B apresentou uma alta taxa de heterozigose (90,2%) em relação à homozigose (9,8%), considerando a tipagem com baixo nível de resolução (dois dígitos). Porém, genótipos HLA só podem ser definidos como verdadeiros heterozigotos ou homozigotos através da análise em alto nível de resolução. Deste modo, observa-se que indivíduos caracterizados como homozigotos, em nível alélico (dois dígitos), passam a ser considerados heterozigotos na análise de seus alelos específicos (terceiro e quarto dígitos) (Li et al, 2007). No presente estudo, ao analisar a tipificação em alta resolução, observou-se que apenas 3,3% dos indivíduos que eram considerados homozigotos em nível alélico permaneceram com essa classificação após a análise mais refinada.

Além disso, os alelos HLA-B podem ser divididos em dois grupos com base na expressão dos epítomos moleculares HLA-Bw4 e HLA-Bw6. Encontramos a homozigose do HLA-Bw4 em 8 (13,1%) indivíduos e homozigose do HLA-Bw6 em 19 (31,2%), enquanto que a heterozigose abrangeu o maior número de indivíduos, 34 (55,7%). As análises dos grupos Bw4 e Bw6 do gene HLA-B entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS não apresentou significância estatística, como observado na Tabela 6.

Tabela 6: Frequência dos grupos Bw4, Bw6 e Bw4/Bw6 entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS.

Bw4/Bw6	IRIS 2n=14		Não-IRIS n=108		IRIS vs. Não-IRIS	
	n	fg	n	fg	p-valor*	OR
<b>Bw4</b>	00	0.000	08	0.148	0.594	0.40
<b>Bw6</b>	03	0.429	16	0.315	0.456	1.56
<b>Bw4/Bw6</b>	04	0.571	30	0.537	1.000	1.04

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $p < 0.05$ . fg: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio; IRIS: Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune

#### 4.4 FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA-DRB1

Os resultados das frequências alélicas do locus HLA-DRB1 dos pacientes incluídos no estudo estão apresentados na Tabela 2. A tipagem dos genes HLA-DRB1 pôde ser determinada em 60 dos 61 indivíduos incluídos no estudo. Para uma amostra, não obtivemos resultado mesmo após a realização de repetidas tentativas de tipagem.

Os resultados mostram a ocorrência de 13 grupos alélicos HLA-DRB1, onde os mais frequentes foram: DRB1\*07 (17,92%), DRB1\*11 (14,15%), DRB1\*04 (11,32%) e DRB1\*15 (9,43%) (Figura 25).

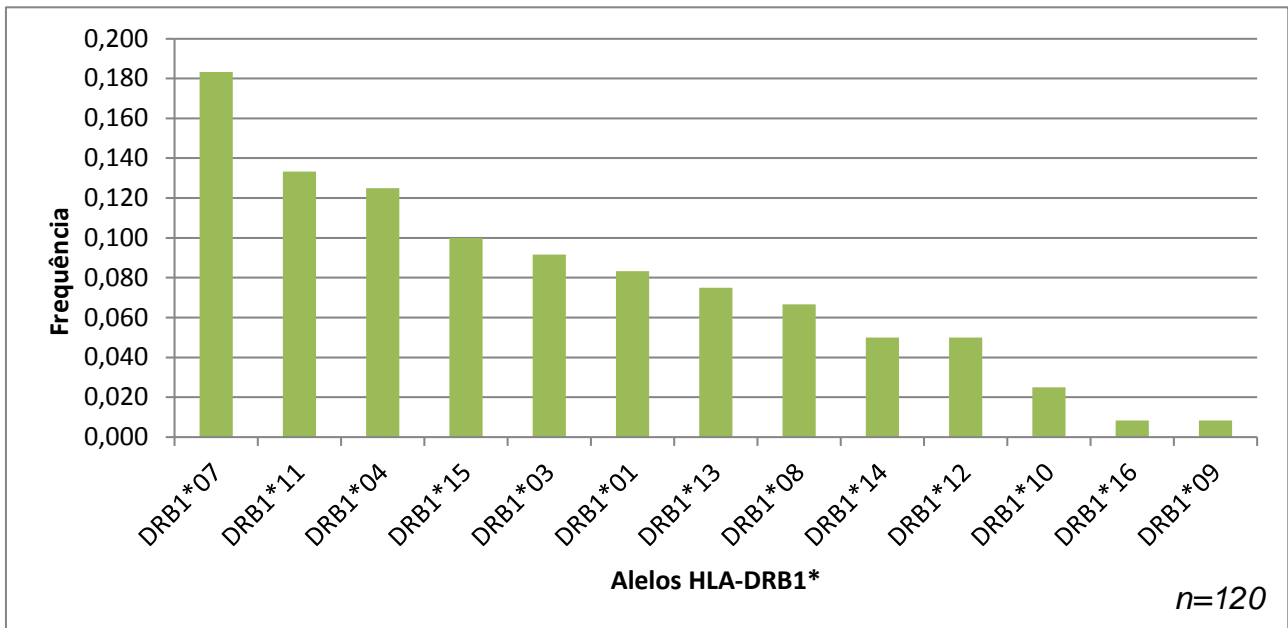


Figura 25: Frequência dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 incluídos no estudo.



Na determinação dos alelos específicos, verificamos a distribuição desses nos grupos alélicos mais frequentes em nosso estudo (DRB1\*07, DRB1\*11, DRB1\*04 e DRB1\*15) (Figura 26). Os resultados apontam para uma maior diversidade alélica no grupo DRB1\*04 seguido do DRB1\*11.

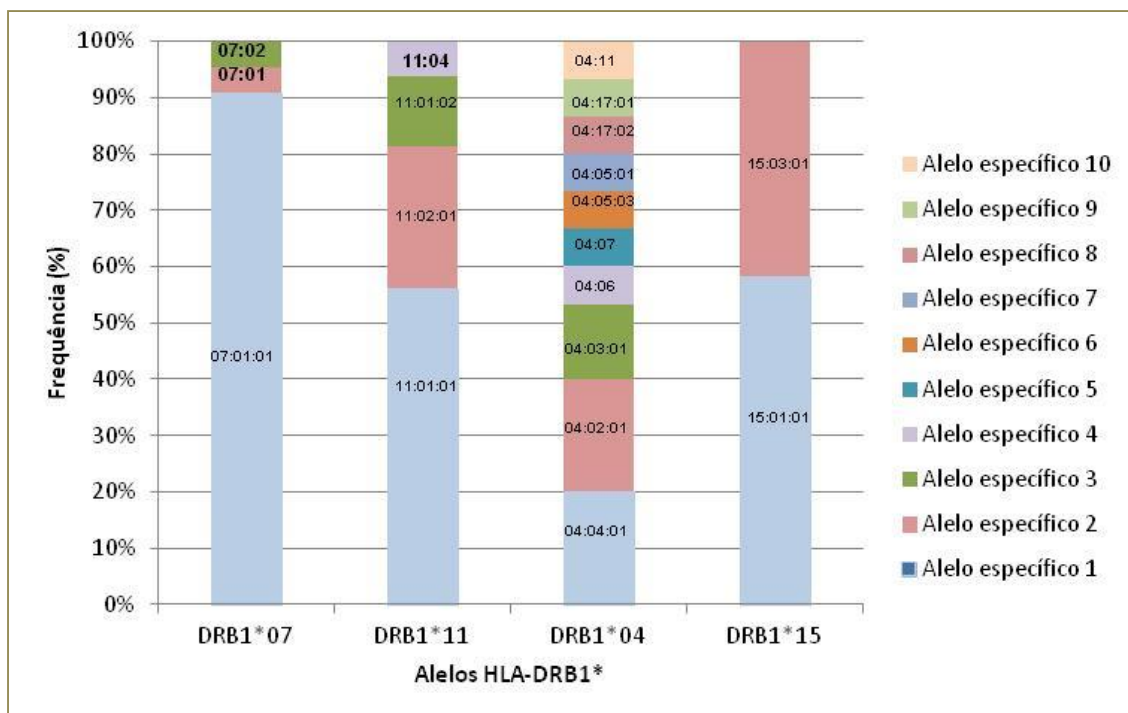


Figura 26: Distribuição dos alelos específicos do gene HLA-DRB1 encontrados nos grupos alélicos predominantes em nosso estudo.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do HLA-DRB1 nos grupos com IRIS e sem IRIS.

Tabela 7: Distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-DRB1 entre os indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1.

Alelos HLA-DRB1	IRIS 2n=14		Não-IRIS 2n=106		IRIS vs. Não-IRIS	
	n	fg	n	fg	p-valor*	OR
<b>DRB1*01</b>	01	0.071	09	0.179	1.000	0.83
<b>DRB1*03</b>	01	0.071	10	0.094	1.000	0.74
<b>DRB1*04</b>	03	0.214	12	0.113	0.381	2.14
<b>DRB1*07</b>	03	0.214	19	0.179	0.720	1.25
<b>DRB1*08</b>	00	0.000	08	0.075	0.594	0.40
<b>DRB1*09</b>	00	0.000	01	0.009	1.000	2.42
<b>DRB1*10</b>	01	0.071	02	0.019	0.313	4.00
<b>DRB1*11</b>	01	0.071	15	0.142	0.690	0.47
<b>DRB1*12</b>	00	0.000	06	0.057	1.000	0.53
<b>DRB1*13</b>	01	0.071	08	0.075	1.000	0.94
<b>DRB1*14</b>	01	0.071	05	0.047	0.533	1.55
<b>DRB1*15</b>	02	0.143	10	0.094	0.630	1.60
<b>DRB1*16</b>	00	0.00	01	0.009	1.000	2.42

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $*p < 0.05$ .

fg: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio; IRIS: Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune.

A comparação das frequências alélicas DRB1\* entre caucasianos e não-caucasianos está representada na Tabela 8. Nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Tabela 8: Distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 entre caucasianos e não-caucasianos.

Alelos HLA-DRB1	Caucasianos 2n=56		Não-caucasianos 2n=64		Cauc vs. Não-cauc	
	n	fg	n	fg	p-valor*	OR
<b>DRB1*01</b>	05	0.089	05	0.078	1.000	1.16
<b>DRB1*03</b>	04	0.071	07	0.109	0.540	0.63
<b>DRB1*04</b>	08	0.143	07	0.109	0.594	1.36
<b>DRB1*07</b>	10	0.179	12	0.188	1.000	0.94
<b>DRB1*08</b>	04	0.071	04	0.063	1.000	1.15
<b>DRB1*09</b>	00	0.000	01	0.016	1.000	0.37
<b>DRB1*10</b>	01	0.018	02	0.031	1.000	0.56
<b>DRB1*11</b>	08	0.143	08	0.125	0.794	1.17
<b>DRB1*12</b>	02	0.036	04	0.063	0.684	0.55
<b>DRB1*13</b>	03	0.054	06	0.094	0.500	0.55
<b>DRB1*14</b>	02	0.036	04	0.063	0.684	0.55
<b>DRB1*15</b>	08	0.143	04	0.063	0.222	2.50
<b>DRB1*16</b>	01	0.018	00	0.000	0.466	3.49

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $*p < 0.05$ .  
fg: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio.

*A comparação dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV aqui estudados e as frequências desses genes na população brasileira (dados depositados no REDOME) está apresentada na Tabela 9.*

Tabela 9: Distribuição das frequências dos alelos HLA-DRB1 dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e da população Brasileira (dados do REDOME) estratificada em grupos étnicos.

Alelos HLA-DRB1	Indivíduos com TB e AIDS (2n=120 alelos)								Brasileiros (REDOME) (2n=5.695.729 alelos)								p valor*			
	Total (2n=120)		Branco (2n=56)		Negro (2n=28)		Pardo (2n=36)		Total** (2n=5.695.729)		Branco (2n=364.014)		Negro (2n=345.703)		Pardo (2n=352.271)		Total	Branco	Negro	Pardo
	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq	n	freq				
<b>DRB1*01</b>	10	0.083	05	0.089	00	0.000	05	0.139	566.297	0.103	52.666	0.093	55.497	0.098	56.063	0.099	0.555	0.239	<b>0.021</b>	0.740
<b>DRB1*03</b>	11	0.092	04	0.071	00	0.000	07	0.194	554.348	0.097	53.771	0.097	48.783	0.088	52.663	0.095	0.834	0.108	<b>0.032</b>	0.449
<b>DRB1*04</b>	15	0.125	08	0.143	03	0.107	04	0.111	714.038	0.125	89.969	0.126	97.823	0.137	92.111	0.129	0.990	0.070	0.063	0.062
<b>DRB1*07</b>	22	0.183	10	0.179	05	0.179	07	0.194	734.549	0.133	91.080	0.124	88.084	0.120	94.757	0.129	0.076	0.216	0.355	0.313
<b>DRB1*08</b>	08	0.067	04	0.071	02	0.071	02	0.056	353.438	0.056	25.447	0.072	23.327	0.066	22.266	0.063	0.834	0.964	0.934	0.850
<b>DRB1*09</b>	01	0.008	00	0.000	01	0.036	00	0.000	98.364	0.014	1.967	0.020	2.557	0.026	1.672	0.017	0.452	0.581	0.080	0.679
<b>DRB1*10</b>	03	0.025	01	0.018	02	0.071	00	0.000	11.919	0.018	262	0.022	226	0.019	226	0.019	0.730	0.068	0.563	0.879
<b>DRB1*11</b>	16	0.133	08	0.143	04	0.143	04	0.111	691.651	0.128	74.698	0.108	77.465	0.112	82.998	0.120	0.689	0.248	0.303	0.078
<b>DRB1*12</b>	06	0.050	02	0.036	02	0.071	02	0.056	93.570	0.019	1.590	0.017	1.778	0.019	1.497	0.016	<b>0.011</b>	<b>0.011</b>	<b>0.003</b>	<b>0.006</b>
<b>DRB1*13</b>	09	0.075	03	0.054	04	0.143	02	0.056	763.148	0.134	99.380	0.135	100.735	0.132	101.499	0.133	0.058	0.059	0.084	<b>0.002</b>
<b>DRB1*14</b>	06	0.050	02	0.036	01	0.036	03	0.083	240.546	0.042	10.343	0.043	10.584	0.044	10.343	0.043	0.672	0.742	0.876	0.055
<b>DRB1*15</b>	12	0.100	08	0.143	04	0.143	00	0.000	554.413	0.093	55.996	0.101	57.659	0.104	53.224	0.096	0.921	0.820	0.734	<b>0.021</b>
<b>DRB1*16</b>	01	0.008	01	0.018	00	0.000	00	0.000	219.448	0.039	8.778	0.040	7.242	0.033	8.339	0.038	0.086	0.760	0.439	0.350

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $p < 0.05$ .

freq: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio.

\*\* A soma do número observado de alelos HLA-B (n) em brancos, negros e mulatos não corresponde ao número total de cada alelo porque os dados REDOME também incluem frequências de alelos de indígenas, orientais e indivíduos cuja etnia não foi notificada.

## 4.5 FREQUÊNCIA DOS GENES KIR

*A tipagem dos genes KIR foi determinada em todos os 61 indivíduos incluídos no estudo. Foram examinados 14 genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1) e 2 pseudogenes (2DP1 e 3DP1) KIR para cada amostra em nosso estudo. As frequências dos indivíduos positivos para cada gene entre toda a população estudada foi calculada e listada na Tabela 10 para os indivíduos sem IRIS e na Tabela 11 para os indivíduos com IRIS. Uma vez que os genes KIR estão funcionalmente relacionados aos epítomos HLA-Bw4 e Bw6 (ver item 1.12 na Introdução), essas tabelas apresentam também esta informação.*

Tabela 10: Genótipos KIR, motivos HLA-B e haplótipos dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 sem IRIS.

Identificação	Genótipos KIR															HLA Bw4/Bw6	Haplótipo	
	2DS3	2DS2	2DS1	2DL5	2DL4	2DL3	2DL2	2DL1	3DP1	2DP1	3DS1	3DL3	3DL2	3DL1	2DS5			2DS4
tb 001																	Bw6	B
tb 002																	Bw4	B
tb 004																	Bw4/Bw6	A
tb 005																	Bw6	B
tb 009																	Bw4/Bw6	A
tb 011																	Bw4/Bw6	A
tb 013																	Bw4/Bw6	B
tb 014																	Bw4/Bw6	A
tb 015																	Bw4/Bw6	B
tb 016																	Bw6	A
tb 017																	Bw6	A
tb 018																	Bw4/Bw6	B
tb 019																	Bw4/Bw6	B
tb 020																	Bw4	B
tb 021																	Bw4/Bw6	A
tb 023																	Bw4/Bw6	B
tb 024																	Bw4	A
tb 026																	Bw4/Bw6	B
tb 027																	Bw6	B
tb 028																	Bw4/Bw6	B
tb 029																	Bw4/Bw6	B
tb 030																	Bw4	A
tb 034																	Bw4/Bw6	B
tb 041																	Bw4/Bw6	A
tb 042																	Bw4/Bw6	B
tb 047																	Bw6	B
tb 048																	Bw4/Bw6	A
tb 049																	Bw4/Bw6	B
tb 050																	Bw4/Bw6	A

Tabela 10. Continuação

Identificação	Genótipos KIR																HLA Bw4/Bw6	Haplótipo
	2DS3	2DS2	2DS1	2DL5	2DL4	2DL3	2DL2	2DL1	3DP1	2DP1	3DS1	3DL3	3DL2	3DL1	2DS5	2DS4		
tb 051																	Bw6	B
tb 052																	Bw4/Bw6	B
tb 053																	Bw6	B
tb 058																	Bw4	B
tb 062																	Bw4/Bw6	A
tb 063																	Bw4/Bw6	B
tb 064																	Bw6	B
tb 065																	Bw4/Bw6	B
tb 067																	Bw4/Bw6	A
tb 069																	Bw4	B
tb 071																	Bw4/Bw6	B
tb 072																	Bw6	B
tb 075																	Bw6	A
tb 076																	Bw6	B
tb 077																	Bw6	B
tb 078																	Bw4/Bw6	B
tb 080																	Bw4	A
tb 081																	Bw6	B
tb 083																	Bw4/Bw6	A
tb 086																	Bw6	B
tb 087																	Bw6	B
tb 089																	Bw4	B
tb 091																	Bw4/Bw6	B
tb 094																	Bw4/Bw6	A
tb 096																	Bw6	B
Total	12	26	20	19	54	51	29	52	53	52	17	54	53	54	19	53		
<sup>1</sup> Frequência genotípica (%)	22,22%	48,15%	37,04%	35,19%	100,00%	94,44%	53,70%	96,30%	98,15%	96,30%	31,48%	100,00%	98,15%	100,00%	35,19%	98,15%		

<sup>1</sup>Frequência genotípica: frequência de indivíduos positivos para cada gene/número total de indivíduos estudados.

Células preenchidas: presença do gene KIR; Células em branco: ausência do gene KIR.



Tabela 11: Genótipos KIR, motivos HLA-B e haplótipos dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 com IRIS.

Identificação	Genótipos KIR																HLA Bw4/Bw6	Haplótipo
	2DS3	2DS2	2DS1	2DL5	2DL4	2DL3	2DL2	2DL1	3DP1	2DP1	3DS1	3DL3	3DL2	3DL1	2DS5	2DS4		
tb 003																	Bw6	B
tb 006																	Bw6	B
tb 012																	Bw4/Bw6	B
tb 040																	Bw4/Bw6	B
tb 060																	Bw6	A
tb 079																	Bw4/Bw6	B
tb 092																	Bw4/Bw6	B

<sup>1</sup> Frequência genotípica: frequência de indivíduos positivos para cada gene/número total de indivíduos estudados.

Células preenchidas: presença do gene KIR; Células em branco: ausência do gene KIR.

O número total de genes *KIR* presentes na composição do repertório *KIR* de cada indivíduo variou entre um mínimo de 8 e um máximo de 16. Houve uma grande variação em relação à presença dos alelos entre as amostras analisadas. Contudo, foi detectada a presença de três alelos presentes em todas as amostras analisadas (2DL4, 3DL1 e 3DL3). Dentre as amostras de indivíduos com *IRIS*, foram detectados nove alelos com 100% de frequência (2DL4, 2DL3, 2DL1, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1 e 2DS4).

Os genes *KIR2DS3* e *KIR3DS1* foram os menos frequentes em pacientes com *IRIS*, estando presentes em 3 dos 7 indivíduos (42,8%). No grupo dos indivíduos sem *IRIS*, os mesmos genes foram os menos frequentes, sendo encontrados em 22 dos 54 indivíduos incluídos nesse grupo (40,7%). A frequência do gene *KIR2DS2* foi a mais discrepante entre pacientes com *IRIS* (85,7%) e sem *IRIS* (48,1%), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,359$ ,  $OR=1,78$ ). Todos os outros genes obtiveram valores de  $p$  próximos de 1,000 (Tabela 12).

Tabela 12: Frequências gênicas KIR entre indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1.

Identificação KIR	IRIS n=7		Não-IRIS n=54		IRIS vs. Não-IRIS	
	n	f (%)	n	f (%)	p-valor	OR
<b>2DL1</b>	07	(100.0)	52	(96.3)	1.000	1.03
<b>2DL2</b>	06	(85.7)	29	(53.7)	0.532	1.59
<b>2DL3</b>	07	(100.0)	51	(94.4)	1.000	1.05
<b>2DL4</b>	07	(100.0)	54	(100.0)	1.000	1.00
<b>2DL5</b>	03	(42.8)	19	(35.2)	0.720	1.21
<b>2DS1</b>	03	(42.8)	20	(37.0)	1.000	1.15
<b>2DS2</b>	06	(85.7)	26	(48.1)	0.359	1.78
<b>2DS3</b>	02	(28.5)	12	(22.2)	0.671	1.28
<b>2DS4</b>	07	(100.0)	53	(98.1)	1.000	1.01
<b>2DS5</b>	03	(42.8)	19	(35.2)	0.720	1.21
<b>2DP1</b>	07	(100.0)	52	(96.3)	1.000	1.03
<b>3DL1</b>	07	(100.0)	54	(100.0)	1.000	1.00
<b>3DL2</b>	07	(100.0)	53	(98.1)	1.000	1.01
<b>3DL3</b>	07	(100.0)	54	(100.0)	1.000	1.00
<b>3DS1</b>	02	(28.5)	14	(25.9)	1.000	1.10
<b>3DP1</b>	07	(100.0)	53	(98.1)	1.000	1.01

\* Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $*p < 0.05$ .  
fg: Frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR: Odds ratio.

A fim de estabelecer comparação entre os padrões genéticos encontrados no presente estudo das frequências dos genes KIR foram incluídos neste trabalho dados referentes à população Brasileira depositados no banco de dados Allele Frequencies Net Database (Tabela 13). A frequência do alelo 2DL5 mostrou-se significativamente diminuída entre os indivíduos incluídos em nosso estudo, com relação à população Brasileira.

Tabela 13: Distribuição das frequências do gene KIR nos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e a população Brasileira (dados do Allele Frequencies Net Database).

Identificação KIR	Indivíduos coinfectados 2n=122		Indivíduos Brasileiros 2n=412		*p valor	OR
	n	fg	n	fg		
2DL1	59	0.967	202	0.980	0.918	0.97
2DL2	35	0.574	105	0.510	0.484	1.18
2DL3	58	0.951	172	0.835	0.298	1.26
2DL4	61	1.000	206	1.000	1.000	1.00
2DL5	22	0.361	123	0.595	<b>0.010</b>	0.52
2DS1	23	0.377	97	0.473	0.323	0.75
2DS2	32	0.525	105	0.510	0.906	1.04
2DS3	14	0.229	70	0.338	0.158	0.63
2DS4	60	0.984	192	0.932	0.680	1.11
2DS5	22	0.361	77	0.374	1.000	0.96
2DP1	59	0.967	203	0.985	0.918	0.96
3DL1	61	1.000	182	0.882	0.300	1.26
3DL2	60	0.984	206	1.000	0.918	0.97
3DL3	61	1.000	206	1.000	1.000	1.00
3DS1	16	0.311	87	0.422	0.050	0.56
3DP1	60	0.984	206	1.000	0.918	0.97

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de \*p<0.05. fg: Frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR: Odds ratio.

#### 4.6 HAPLÓTIPOS KIR

Com relação à composição de Haplótipos A e B dos genes KIR, nenhuma tendência à associação foi observada comparando os grupos com IRIS e sem IRIS, apesar do haplótipo A ter sido encontrado em apenas 1 indivíduo do grupo com IRIS (14.3%). (Tabela 14).

Tabela 14: Frequência dos Haplótipos A e B entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS.

Haplótipos	IRIS n=7		Não IRIS n=54		IRIS vs. Não IRIS	
	n	f (%)	n	f (%)	p-valor	OR
<b>A</b>	01	(14.3)	18	(33.3)	0.672	0.42
<b>B</b>	06	(85.7)	36	(66.7)	0.766	1.28

\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $*p < 0.05$ .  
*f*: Frequência gênica; *n*: número de indivíduos; OR: Odds ratio; IRIS: Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune.

## 5 DISCUSSÃO

O crescente interesse na investigação do papel dos fatores genéticos do hospedeiro em diversas patogêneses se dá pela possibilidade de encontrar marcadores que estejam associados com o desfecho de certas doenças. Dessa forma, se é sabido que determinado gene confere susceptibilidade a uma infecção e/ou doença é possível desenvolver estratégias de prevenção, diagnóstico, tratamento e monitoramento visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Diversos relatos na literatura têm associado genes polimórficos com doenças em diferentes populações e grupos étnicos (Carvalho et al., 2013; Wu et al., 2013; Yamakawa et al., 2014; Tan et al., 2015). No caso das infecções pelo HIV e pelo *Mtb*, diversos estudos têm sido realizados envolvendo polimorfismos de genes atuantes nos dois tipos de respostas imunes do hospedeiro: inata e adaptativa (Lakshimi et al., 2006; Figueiredo et al., 2008; Shankarkumar et al., 2012; Wu et al., 2012).

A relevância desse tipo de estudo na população Brasileira se dá devido ao alto grau de miscigenação característico de nossa população, resultando nos diferentes grupos étnicos encontrados no Brasil. Além disso, a frequência de diversos genes com associações com doenças previamente descritas na literatura pode não refletir a real situação desses genes na população Brasileira, visto que eles podem apresentar variações importantes entre diferentes populações e grupos étnicos. Portanto, a obtenção de dados acerca da frequência e distribuição dos genes polimórficos na população Brasileira é de grande valia, podendo servir como marcadores de prognóstico às doenças estudadas.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo determinar a distribuição de genes de resposta imune do hospedeiro (HLA e KIR) e verificar suas possíveis associações com duas importantes doenças – AIDS e Tuberculose -, em uma população de pacientes com tuberculose infectada pelo HIV-1 dividida em dois grupos, com IRIS e sem IRIS.

Os mecanismos imunológicos subjacentes ao desenvolvimento da IRIS ainda não estão claramente compreendidos (Chang et al., 2014; Tan et al., 2015). Sabe-se que a baixa contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o aparecimento de tuberculose disseminada e um curto período de tempo entre o tratamento da TB e do início da HAART são fatores de risco para o desenvolvimento da IRIS (French et al., 2004;

*Shelburne et al., 2005; Laureillard et al., 2013). A IRIS no paciente HIV positivo é consequência da intensa resposta imunológica a um patógeno específico devido ao início da HAART. À medida que a resposta inflamatória do hospedeiro se inicia, infecções subclínicas são desmascaradas ou infecções oportunistas são exacerbadas (Lawn et al., 2005; Goebel et al., 2005).*

*Além disso, não há um algoritmo que sirva como base para o diagnóstico da IRIS. Na maioria das vezes, o diagnóstico é feito através da observação de manifestações clínicas comuns a esses pacientes, como linfadenopatia, fístula linfática e aparecimento de granuloma com necrose caseosa exuberante (Robertson et al., 2006). No projeto anterior, do qual este se desdobra, para fechar o diagnóstico dos pacientes com IRIS foram utilizados como referência diversos critérios citados no estudo de Meintjes e colaboradores em 2008, como mencionado no item 3.2 (Meintjes et al., 2008).*

*A terapia com corticosteroides tem sido efetiva em pacientes que desenvolvem IRIS, entretanto, existem poucas evidências para essa recomendação, o que limita significativamente a sua utilização (Meintjes et al., 2010). Dessa forma, nos diversos estudos sobre a síndrome, o objetivo dos autores é identificar marcadores que caracterizem a doença, potencialmente servindo como preditores do aparecimento da mesma. Tan e colaboradores, estudando a referida síndrome em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1, observaram que o nível de interleucina 18 no plasma de pacientes com IRIS foi maior do que em pacientes sem IRIS, sugerindo que a IL-18 se comporte como um candidato a biomarcador que pode prever o aparecimento da síndrome (Tan et al., 2015). Conesa-botella e colaboradores, analisando uma gama de citocinas em pacientes com IRIS e sem IRIS no sul da África, observaram que o TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-18 foram significativamente maiores no grupo de pacientes com a síndrome (Conesa-botella et al., 2012). Narendran e colaboradores confirmaram que a IL-6 está fortemente associada com a IRIS em pacientes com tuberculose e aids na população da Índia (Narendran et al., 2013). Pean e colaboradores analisaram o nível de degranulação das células NK na ocorrência de IRIS em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV e mostraram que esse marcador teve associação significativa entre pacientes que desenvolveram a síndrome versus pacientes que não desenvolveram (Pean et al., 2012). No entanto, não está completamente elucidado qual desses potenciais biomarcadores podem ter utilidade clínica na predição da IRIS. Além disso, até o momento não há*

*estudos brasileiros que possam auxiliar nessa busca de marcadores para a síndrome, o que ressalta o pioneirismo do presente estudo.*

## **5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

*As características sociodemográficas dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 no presente estudo são semelhantes às características de pacientes descritas em diversos estudos realizados nacionalmente, onde há predomínio no sexo masculino (De Carvalho et al., 2006; Santos et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Barbosa et al., 2012). No entanto, ainda não está claro se existe uma real disparidade na prevalência das infecções entre os sexos ou se são fatores de confusão, como diferenças em relação ao acesso do tratamento, estigmatização, autocuidado com a saúde, estilo de vida ou até o subdiagnóstico em mulheres (Boffo et al., 2004).*

*A faixa etária mediana de 37 anos mostra que os pacientes são adultos, em fase produtiva da vida profissional, trazendo perdas econômicas e desdobramentos sociais para às famílias e a sociedade. Esses dados estão de acordo com os da literatura (De Carvalho et al., 2006; Rodrigues et al., 2010) que confirmam tal faixa etária como alvo das epidemias de tuberculose e aids. A razão de esse grupo etário ser o mais atingido pode estar relacionada ao estilo de vida dessa população, que muitas vezes apresentam comportamentos de alto risco, resultando em maior exposição ao HIV e ao Mtb.*

*Em nossa casuística observou-se uma predominância de pacientes de cor branca (46%), o que contradiz a literatura nacional, visto que na maioria das vezes o observado é que pacientes de cor negra sejam os mais afetados pela aids e pela tuberculose (CDC, 2004; Batista et al., 2005). Porém, se incluirmos os pacientes pardos e negros numa mesma amostragem, a frequência desse grupo seria de 54% contra 46% de pacientes de cor branca, concordando com a literatura nacional. Sobre o fato do grupo de cor negra/parda estar sob maior risco, os estudos mostram que os fatores socioeconômicos provocam grandes impactos na saúde, podendo associar as piores condições de vida e acesso a serviços de saúde de qualidade ao aumento do risco às infecções. Dessa forma, uma vez que a população negra é a que apresenta em nossa sociedade os piores índices de condições de vida, justifica-se a predominância das infecções em estudo nesse grupo (Batista et al., 2005; Silveira et al., 2006).*



*Com relação à localização da micobactéria, a forma pulmonar foi encontrada em 44% dos pacientes e a disseminada foi responsável por 48% dos casos. Essas taxas mostram claramente que, em pacientes com coinfeções, a TB apresenta características diferentes, havendo um decréscimo no percentual de casos pulmonares em relação a outras formas da doença. Nesses pacientes, a forma disseminada torna-se tão frequente quanto a pulmonar devido à dupla infecção, além da maior possibilidade do desenvolvimento de resistência (Garcia et al., 2000; Carvalho et al., 2006; Barbosa et al., 2012).*

## **5.2 GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (HLA-B)**

*Uma grande dificuldade existente em estudo de associação genética é a obtenção de uma casuística de caso e controle que atenda a todos os critérios para o enquadramento nas análises realizadas. A coorte deve ser bem estabelecida para que as análises estatísticas tenham peso adequado e estejam próximos da realidade. Nesse contexto, estudos de investigação imunogenética com pacientes com aids e TB são bastante restritos e escassos na literatura, ainda mais quando se divide esse grupo entre pacientes com IRIS e sem IRIS como feito no presente estudo. Vários estudos reportaram a mesma dificuldade, sendo a maioria deles estudos de casos (Blum et al., 1993; Trindade et al., 2005; Girão et al., 2005; Caruso et al., 2007).*

*Os alelos HLA de classe I B mais encontrados na população brasileira são HLA-B\*44, HLA-B\*35, HLA-B\*15 e HLA-B\*51 (Teixeira et al., 2009; Bardi et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Teixeira et al., 2014; Ayo et al., 2014). Nossos resultados corroboram com esses dados, uma vez que os alelos mais frequentes foram: B\*15 (14,75%), B\*44 (13,11%), B\*35 (10,66%) e B\*07 (7,38%). Recentemente, foram disponibilizadas à comunidade científica informações referentes à distribuição dos genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1 que constam no banco de dados do REDOME (Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea), que conta com 2.847.869 pacientes registrados. Além disso, essas informações podem subsidiar um “mapa” da distribuição nacional dos alelos HLA e de suas respectivas frequências, já que é possível observar a frequência de cada alelo em diferentes estados brasileiros, bem como os alelos raros ou novos que constituem a genética de nossa população. No REDOME, os alelos HLA-B mais frequentes foram: HLA-B\*35, HLA-B\*44, HLA-B\*15 e HLA-B\*51, corroborando com nosso estudo.*

*Nesse trabalho pioneiro com relação ao estudo dos alelos HLA em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 foi possível observar diferenças nas frequências de alguns alelos HLA-B entre os pacientes com IRIS e sem IRIS (Tabela 3). Porém, não foi possível evidenciar nenhuma associação significativa entre as frequências destes alelos e o aparecimento da síndrome da reconstituição imune. Esse fato sugere que nossa avaliação pode ter sido influenciada pelo número relativamente pequeno de indivíduos analisados. Vale ressaltar que, em geral, o número de indivíduos das coortes de pacientes com IRIS é bastante reduzido devido à dificuldade de diagnóstico da síndrome e estudo dessa população (Narendran et al., 2013; Tan et al., 2015).*

*No entanto, é importante salientar que, na comparação entre indivíduos com e sem IRIS, encontramos uma tendência à significância estatística para o alelo HLA-B\*42 ( $p=0.064$ , OR 8.83) (Tabela 3), refletindo uma possível associação com a ocorrência de IRIS (14,3% vs. 1,8%, respectivamente). Esse alelo ainda não teve nenhum papel descrito no contexto da infecção pelo HIV-1, nem da tuberculose. Na literatura, encontramos esse alelo relacionado à doença renal crônica (DRC): um estudo de Yamakawa e colaboradores avaliou o polimorfismo das moléculas HLA em pacientes com e sem DRC no sul do Brasil, observando-se maior frequência do HLA-B\*42 em pacientes com a doença do que no grupo controle (Yamakawa et al., 2014).*

*Dada a elevada diversidade genética da população brasileira, é importante comparar as frequências alélicas entre caucasianos e não-caucasianos. A partir das análises observamos que o alelo HLA-B\*42 teve uma frequência maior em não brancos (6,0% vs. 0% respectivamente;  $p=0.123$ , OR=0.12), apesar da falta de significância estatística. A predominância do HLA-B\*42 em não-caucasianos é consistente com a literatura (Paximadis et al., 2013) e no conjunto de dados do REDOME. Para os outros alelos analisados não houve diferenças significativas (Tabela 4).*

*Uma vez que a determinação dos alelos específicos é de grande importância para os estudos que investigam associações com doenças, em virtude da extensa e crescente diversidade alélica encontrada nos loci HLA, verificamos a distribuição dos alelos específicos nos 25 grupos alélicos encontrados em nosso estudo. Nossos resultados mostram a distribuição dos alelos específicos para os 4 alelos mais frequentes (B\*15, B\*44, B\*35 e B\*07). Os resultados apontam para uma maior diversidade alélica nos grupos B\*15 e B\*35, com sete diferentes especificidades*

cada um. Esses dois grupos alélicos já foram associados à progressão mais rápida para a aids e pior desfecho clínico da aids na literatura (Hendel et al., 1999; Gao et al., 2001; Gao et al., 2005). Vale lembrar que há uma diferença de associação entre os distintos alelos específicos do grupo B\*35 (grupos Px e Py) (Gao et al., 2001). Em nosso estudo, foram encontrados os alelos B\*35:01, B\*35:02, B\*35:27, B\*35:05, B\*35:23, B\*35:08 e B\*35:03, sendo que os alelos B\*35:01 e B\*35:08, pertencentes ao grupo Py – que é associado à progressão mais lenta para a aids, enquanto que os alelos B\*35:02 e B\*35:03 pertencem ao grupo Px – associado à progressão mais rápida (Gao et al., 2001). Nas doenças analisadas, esses grupos alélicos ainda não foram associados a um desfecho favorável ou desfavorável, porém é notável sua grande diversidade alélica.

Além do HLA-B\*35 classicamente associado com a progressão rápida, outros alelos possuem igual importância com relação à associação com diferentes desfechos (susceptibilidade, resistência, progressão). São eles o HLA-B\*27 e o HLA-B\*57 que foram descritos por diversos autores por conferir uma progressão mais lenta para a aids (Revisto por Carrington & O'Brien, 2003). As associações desses alelos (e também de outros) são consideradas consistentes, uma vez que já foram confirmadas por diversos estudos. Esses achados estimulam a busca de novas associações com base na análise das frequências desses alelos em diferentes grupos (casos vs. controles).

Lakshimi e colaboradores em 2006 fizeram um estudo de associação dos genes HLA-B em pacientes com TB e HIV, pacientes apenas com TB e pacientes saudáveis, e mostraram que o número de indivíduos saudáveis portadores do gene HLA-B\*52 foi significativamente maior quando comparado com os demais grupos. Em contraste, o número de pacientes com TB e HIV e só com tuberculose com o alelo HLA-B\*51 foi significativamente maior quando comparado com o grupo sadio. Esses resultados sugerem que o alelo HLA-B\*52 possui uma associação de proteção para a tuberculose e o alelo HLA-B\*51 possui uma associação de suscetibilidade à tuberculose e ao HIV associado a TB (Lakshimi et al., 2006). Na infecção pelo HIV-1 também já foi reportado a associação do alelo HLA-B\*52 com a não progressão para a aids em brasileiros (Teixeira et al., 2014).

No Brasil, Figueiredo e colaboradores avaliaram o perfil dos genes HLA em pacientes com aids e tuberculose versus grupos controles (apenas com aids e saudáveis). Os alelos HLA-A\*31 e HLA-B\*41 foram significativamente mais frequentes no grupo de pacientes com aids e tuberculose em comparação com pacientes só

com aids e pacientes sadios. Os autores sugeriram que esses alelos estariam associados à susceptibilidade à aids e à tuberculose no estado de São Paulo (Figueiredo et al., 2008). Além disso, estudos na Índia relataram que o alelo HLA-A\*11:01 poderia estar associado com a resistência, enquanto que o alelo HLA-B\*40:06 poderia estar associado com a susceptibilidade ao HIV e desenvolvimento de tuberculose (Selvaraj et al., 2006; Raghavan et al., 2009). Em nosso estudo, os alelos HLA-B\*41 e HLA-B\*40, destacados nos estudos supracitados, apresentaram uma baixa frequência nos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 (ambos 1,64%) enquanto que o alelo HLA-B\*51 apresentou uma frequência de 4,92%, o que não nos permitem estabelecer associações entre esses alelos e as doenças analisadas.

Uma vez que nosso grupo possui dados de frequência dos genes HLA-B publicados em outros contextos populacionais (usuários de drogas injetáveis - Teixeira et al., 2009) e desfechos (progressão para a aids - Teixeira et al., 2014), a título de comparação fizemos uma análise das frequências aqui encontradas com as frequências reportadas no estudo mais recente, onde nenhuma associação estatística pôde ser observada (Anexo I).

Com relação à comparação das frequências alélicas dos genes HLA-B encontrados em nosso estudo frente a dados da população Brasileira registrados no REDOME (Tabela 5), com exceção do alelo HLA-B\*15 que se apresentou acima da média no nosso estudo quando comparado com os dados gerais do REDOME (14,7% vs. 9,1%, respectivamente;  $p=0.032$ ) todos os outros alelos foram igualmente distribuídos entre os grupos. A predominância do HLA-B\*15 é consistente na literatura (Carvalho et al., 2013; Teixeira et al., 2014). Vale ressaltar que devido à elevada diversidade genética da população brasileira, que é caracterizada por um elevado grau de miscigenação, é importante comparar as frequências alélicas entre diferentes etnias. Nessa comparação, apenas o alelo HLA-B\*07 apresentou significância entre indivíduos declarados como pardos no nosso estudo com relação aos dados registrados no REDOME (0,0% vs. 6,6% respectivamente;  $p=0,018$ ). Essa diferença se deve principalmente ao baixo número de indivíduos analisados, visto que, apesar do alelo B\*07 ser um dos mais frequentes em nosso estudo (7,4%), quando estratificamos em grupos étnicos sua frequência diminui consideravelmente. Não há relatos na literatura de associação entre o alelo B\*07 e indivíduos pardos.

As moléculas HLA-B codificadas por alelos HLA-B com o epítopo Bw4, mas não o epítopo Bw6, servem como ligantes para os receptores inibitórios das células NK (KIR). Flores-Villanueva e colaboradores associaram significativamente a homozigose para alelos HLA-Bw4 com a resistência a aids e manutenção normal da contagem de células TCD4+ em um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 (Flores-Villanueva et al., 2001). Associações entre os grupos Bw4 e Bw6 na aids e na tuberculose em conjunto ainda não puderam ser observadas na literatura, além disso, em nosso estudo, na avaliação dos diferentes epítomos encontrados nas moléculas HLA-B entre os indivíduos com IRIS e sem IRIS nenhuma associação pôde ser visualizada.

Embora nosso estudo não tenha encontrado associações significativas nas diferenças entre as frequências dos alelos HLA-B nos grupos de pacientes analisados, nossos dados fornecem uma descrição desses alelos em uma coorte de indivíduos infectados por agentes causadores de agravos importantes, que, somados aos dados de outros estudos brasileiros, enriquecem o conhecimento não só acerca das informações genéticas características da nossa população, como também a respeito da imunogenética no contexto de doenças infecciosas.

### **5.3 GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (HLA-DRB1)**

Os alelos HLA de Classe II DRB1 mais encontrados na população brasileira são HLA-DRB1\*11, HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*04, HLA-DRB1\*13 (Bardi et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Yamakawa et al., 2014; Ayo et al., 2014; REDOME). Nossos resultados corroboram com esses dados, uma vez que os alelos mais frequentes foram: DRB1\*07 (17,9%), DRB1\*11 (14,1%), DRB1\*04 (11,3%) e DRB1\*15 (9,4%).

Dado a grande diversidade genética da população brasileira, é importante comparar as frequências alélicas encontradas em nosso estudo frente a dados disponíveis em banco de dados. Para isso utilizamos novamente o REDOME que nos apresentou as frequências dos alelos HLA-DRB1 de 5.695,729 indivíduos. Alguns alelos apresentaram diferenças significativas nas frequências entre os grupos étnicos analisados, como os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*03 que apresentaram diferenças nas frequências entre os indivíduos declarados como negros em nosso estudo quando comparados com os dados do REDOME. (HLA-DRB1\*01: 0,0% vs. 9,8%;  $p=0,021$ ; HLA-DRB1\*03: 0,0% vs. 8,8%;  $p=0,032$ ). O HLA-DRB1\*15 também apresentou diferença significativa entre os indivíduos pardos

(0,0% vs 9,6%;  $p=0,022$ ). Essas diferenças se devem muito provavelmente ao número de amostras analisadas. O alelo HLA-DRB1\*13 teve uma baixa frequência em nosso estudo com relação aos dados do REDOME em todos os grupos étnicos analisados, apresentando diferença significativa entre indivíduos pardos (5,6% vs. 13,3% respectivamente;  $p=0.002$ ). Ao procurar na literatura nacional dados referentes a esse alelo, observamos que sua frequência é considerada elevada em diversos trabalhos: 13,8% ( $n=1,559$ ) (Ayo et al., 2014), 13,7% ( $n=21,943$ ) (Carvalho et al., 2013) e 13,6% ( $n=3,978$ ) (Bardi et al., 2012). Em nosso estudo esse alelo teve uma frequência menor provavelmente devido ao número de indivíduos genotipados ( $n=60$ ).

Com relação ao alelo HLA-DRB1\*12, foi encontrado diferenças significativas entre os dados do nosso estudo e os dados da população do REDOME em todos os grupos étnicos analisados (brancos: 3,6% vs. 1,7%;  $p=0.011$ ; negros: 7,1% vs. 1,9%;  $p= 0.006$ ; pardos: 5,6% vs. 1,6%;  $p= 0,003$ ). Ao procurar dados publicados sobre esse alelo, observamos que sua frequência é baixa, não ultrapassando os 5% em diversos estudos (Carvalho et al., 2013; Yamakawa et al., 2014; Ayo et al., 2014).

Associações entre a aids e a TB e polimorfismos de genes HLA Classe II são escassos na literatura. A grande maioria dos trabalhos envolvendo essas doenças avalia o papel dos genes HLA de Classe I (Kaur & Mehra, 2009). Porém, algumas doenças ligadas aos genes HLA já foram associadas com polimorfismos em genes que codificam a molécula de Classe II (Morran et al., 2015), como a diabetes mellitus e a hanseníase. A capacidade destas moléculas de Classe II em apresentar antígenos é dependente, em parte, da composição de aminoácidos das suas cadeias alfa e beta. Substituições em uma ou duas posições críticas podem aumentar ou diminuir a ligação desses antígenos e, portanto, conferir a suscetibilidade ao diabetes tipo 1 (DM1) (Khalil et al, 1990 e Rowe et al, 1994). Já foi documentado que mais de 90% dos pacientes com diabetes do tipo 1 possuem os alelos HLA-DR3 e HLA-DQB1\*0201. Além disso, o alelo DRB1\*0405 parece conferir susceptibilidade DM1 na maioria dos grupos étnicos, enquanto DRB1\*0403 e DRB1 0406 parecem conferir proteção DM1 (She, 1996).

Diversos estudos de associação apontam para o envolvimento de variantes HLA-DR no controle da resposta imune ao bacilo da hanseníase (Visentainer et al., 1997; Meyer et al., 1998; Hegazy et al., 2002; Mira et al., 2003). Vanderborght e colaboradores encontraram associação entre o HLA-DRB1 e a hanseníase em duas populações: brasileira e vietnamita. Eles verificaram que HLA-DRB1\*04 estava

associado à proteção contra a hanseníase, enquanto o alelo HLA-DRB1\*10 determinava a susceptibilidade (Vanderborght et al., 2007).

Alelos DRB1 já foram associados separadamente à tuberculose e à aids, como se segue: Na China, um estudo conduzido por Wu e colaboradores mostrou que o alelo HLA-DRB1\*04 foi significativamente associado com a ocorrência de tuberculose (Wu et al., 2012). Kim e colaboradores encontraram que os alelos HLA-DRB1\*08:03 e HLA-DRB1\*06:01 estavam envolvidos com a susceptibilidade à tuberculose pulmonar na população Coreana (Kim et al., 2005). Na Índia, dois estudos mostram que o alelo HLA-DRB1\*15:01 aparece numa maior frequência nos indivíduos com TB (Mehra et al., 1995; Rani et al., 1998). No sul da África, uma significativa associação entre o HLA-DRB1\*13:02 e a susceptibilidade a TB foi observada (Lombard et al., 2006). Uma alta frequência dos alelos HLA-DRB1\*05:01 e HLA-DRB1\*15:01 foi encontrada em indivíduos mexicanos com TB (Teran-Escandon et al., 1999). Com relação à infecção pelo HIV-1, na Índia, Shankarkumar e colaboradores associaram o alelo HLA-DRB1\*09:02 com a susceptibilidade a infecção pelo HIV-1 (Shankarkumar et al., 2012). No Quênia, três alelos DRB1 foram associados com a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1: DRB1\*03:02:01, DRB1\*07:01:01 e DRB1\*15:03 (Lacap et al., 2008). Motta e colaboradores associaram o alelo HLA-DRB1\*13 a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 na população Argentina (Motta et al., 2002). Apesar das associações entre os genes HLA-DRB1 e essas doenças serem observadas em diversas populações, os resultados permanecem inconsistentes, pois trata-se de associações pontuais.

Quando se trata da associação entre as duas doenças, apesar dos poucos trabalhos, já existem descrições de associações potenciais dos alelos DRB1 com a coinfeção. Em um estudo realizado na Índia por Raghavan e colaboradores em 2009, foram recrutados 82 pacientes (HIV+ TB+), 151 (HIV+TB-), 162 (HIV- TB+) e 186 controles saudáveis. Nesse estudo os autores avaliavam a frequência de diferentes alelos HLA, dentre eles, o HLA-DRB1. Os resultados indicaram uma associação do alelo HLA-DRB1\*15:02 com a susceptibilidade a tuberculose em pacientes HIV+, visto que sua frequência em pacientes HIV+ TB+ foi maior quando comparado aos controles saudáveis ( $p = 0.019$ , OR 2.33) (Raghavan et al., 2009). Na mesma população indiana, um estudo de Shankarkumar & Shankarkumar com 102 indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV e 200 controles saudáveis, mostrou uma associação significativa dos alelos HLA-DRB1\*04:03:02, HLA-DRB1\*09:01:02 e HLA-DRB1\*14:01:03 com a susceptibilidade à tuberculose em

indivíduos HIV<sup>+</sup> entre os indianos (Shankarkumar & Shankarkumar, 2012). O estudo Brasileiro conduzido por Figueiredo e colaboradores, já citado anteriormente, mostrou que o alelo HLA-DRB1\*10 estava associado com a susceptibilidade a tuberculose em pacientes com aids no Estado de São Paulo (Figueiredo et al., 2012).

Em nosso estudo, o alelo HLA-DRB1\*15 apresentou uma frequência de 10,0%, porém, quando avaliamos os alelos específicos dentro desse grupo, não encontramos o HLA-DRB1\*15:02 e sim o HLA-DRB1\*15:01 e HLA-DRB1\*15:03. Com relação ao HLA-DRB1\*04, este foi um dos mais frequentes em nossa população de estudo (12,5%), além disso, esse alelo foi o que apresentou um maior número de alelos específicos. Com relação ao alelo HLA-DRB1\*04:03, apenas 2 indivíduos possuíam tal gene, não podendo assim ser associado com às doenças analisadas. Apenas um indivíduo apresentou o alelo HLA-DRB1\*09:01:02 e o HLA-DRB1\*14 teve uma frequência de apenas 5,0% em nosso estudo com nenhum sendo HLA-DRB1\*14:01:03. Por fim, o alelo HLA-DRB1\*10 encontrado associado à susceptibilidade a tuberculose em pacientes com aids na população Brasileira (Figueiredo et al., 2012) apresentou-se com uma baixa frequência nos pacientes do nosso estudo (1,9%).

Com relação à diferença nas frequências dos genes HLA-DRB1 nos pacientes com IRIS e sem IRIS nenhuma associação significativa foi evidenciada. A maior diferença entre os pacientes com IRIS e sem IRIS foi encontrada no alelo HLA-DRB1\*11 (7,1% vs. 14,2% respectivamente;  $p=0.690$ ,  $OR=0,47$ ). Da mesma forma, Na comparação entre as frequências alélicas entre caucasianos e não-caucasianos, nenhuma associação significativa foi evidenciada. As frequências dos alelos entre os grupos estavam bem próximas, com exceção do HLA-DRB1\*15 (14,3% vs. 6.3% respectivamente;  $p=0.222$ ,  $OR=2.50$ ).

## **5.4 GENÓTIPOS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO (KIR)**

As células NK expressam uma gama de receptores em sua superfície que pertencem a duas famílias principais, como já mencionado anteriormente. Porém, dentre suas famílias de correceptores, apenas os receptores KIR são genes altamente polimórficos, o que poderia explicar em parte a resposta diferencial dos indivíduos às infecções.



*Estudos de associação genética mostram que a interação HLA-KIR possui um papel importante na infecção pelo HIV. Geralmente esses estudos indicam a associação entre o HLA-Bw4 e KIR3DL1 e a progressão lenta para aids, além do aumento da funcionalidade das células NK (Martin et al., 2002; Carrington et al., 2008). Em um estudo realizado em pacientes com aids na Zâmbia, a presença do alelo KIR3DL1 em combinação com o HLA-B\*57 mostrou-se protetora (Lopez-Vazquez et al., 2005). Embora a maioria dos estudos relate que o KIR3DL1 seja um alelo que confira proteção contra o HIV, diferentes conclusões sobre a exigência de estar ligado ao Bw4 para que essa função protetora ocorra têm surgido (Carrington et al., 2008).*

*Além disso, o papel da interação HLA-KIR no desenvolvimento da tuberculose em pacientes com HIV ainda não foi bem caracterizado e tais estudos são necessários, uma vez que diferentes genes KIR têm sido associados com a aids (Jennes et al., 2006) e com a tuberculose (Méndez et al., 2006). Recentemente, Pean e colaboradores realizaram um estudo randomizado na população do Camboja com pacientes de um ensaio clínico. Nesse trabalho, os autores examinaram o papel das células NK na ocorrência de IRIS em pacientes com tuberculose infectados pelo HIV e mostraram que pacientes com a síndrome apresentaram uma proporção maior de marcadores de citotoxicidade nas suas células NK, concluindo que os níveis de degranulação dessas células podem servir como um marcador preditivo para o maior risco do aparecimento da IRIS em pacientes infectados pelo HIV com tuberculose (Pean et al., 2012).*

*Na investigação dos polimorfismos genéticos dos genes KIR em nosso estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativas à distribuição das frequências dos diferentes genótipos KIR quando se comparou o grupo de pacientes com IRIS versus o grupo de pacientes sem IRIS. Essa falta de significância estatística pode estar relacionada ao número de pacientes analisados. O alelo que apresentou maior diferença entre os grupos com IRIS e sem IRIS foi o KIR2DS2 (85,7% vs. 48,1%, respectivamente;  $p=0.359$ ,  $OR= 1.72$ ). Esse alelo já foi associado com uma progressão mais rápida para a aids (Gaudieri et al., 2005; Carrington et al., 2008). Gaudieri e colaboradores associaram a presença desse alelo a um acelerado declínio dos níveis de T CD4 e com isso, um menor tempo para a aids (Gaudieri et al., 2005). Em estudos que associam a aids com a tuberculose, ainda não foi descrito o papel desse alelo.*

As frequências dos genes KIR obtidas nos pacientes incluídos no estudo foram semelhantes às descritas para a população brasileira (Ewerton et al., 2007; Rudnick et al., 2008; Jobim et al., 2009). Nesses três trabalhos e no nosso estudo os genes KIR2DL4 e KIR3DL3 estavam presentes em 100% das amostras analisadas.

A fim de estabelecer uma melhor comparação entre os genes KIR encontrados em nosso estudo e dados referentes à população Brasileira, obtivemos as frequências dos genes KIR de um banco de dados denominado Allele Frequencies Net Database (Gonzalez-Galarza et al., 2011). Esse banco fornece uma fonte disponível gratuitamente para o armazenamento e busca de frequências alélicas de diferentes genes em diferentes regiões do mundo. As amostras em comparação foram provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul (n=206) (Tabela 11). Para quinze dos dezesseis genes analisados não observamos diferenças significativas nas análises de frequências, porém, o gene 2DL5 mostrou-se com uma frequência menor em nossa população (36,1%) do que na população de referência (59,5%) (p=0.010; OR=0.52). A fim de observar se esse dado se reproduzia em diferentes populações, analisamos esse gene frente a dados divulgados na literatura por Rudnick e colaboradores que avaliam os 16 genes KIR na população Brasileira e na população de diferentes países (Rudnick et al., 2008). Na população estudada no trabalho proveniente do Paraná, o gene 2DL5 aparece com uma frequência de 52,6% nos 289 indivíduos incluídos no trabalho (Rudnick et al., 2008). Já quando se analisa esse gene em diferentes populações, as frequências encontradas variam consideravelmente: 85,0% no Amazonas, 56,0% na Argentina, 52,8% nos Estados Unidos, 49,0% no México, 39,0% no Japão, 34,6% na China e 33,0% na Itália (Rudnick et al., 2008). Esses dados evidenciam que frequências discrepantes dos genes KIR podem ser encontradas em distintas populações devido ao seu alto grau de polimorfismo. Essas informações reiteram a importância de estudos genéticos que analisam diferentes populações, principalmente a nossa, visto o elevado grau de miscigenação.

Uma vez que nosso grupo também possui dados de frequência dos genes KIR resultante de um trabalho de monografia ainda não publicado (OLIVEIRA, 2014), que avaliou esses genes em indivíduos HIV<sup>+</sup> com diferentes perfis de progressão para aids, comparamos os dados e observamos a similaridade das frequências aqui encontradas com as frequências reportadas neste estudo. Além disso, o alelo menos frequente em nosso estudo, KIR2DS3 foi associado à progressão mais rápida para a aids no estudo de Oliveira. Na literatura científica, a presença desse alelo já foi

*associada com a resposta ao tratamento em indivíduos coinfetados pelo HIV e HCV (Keane et al., 2013).*

*Com relação aos haplótipos A e B, compostos por diferentes combinações de genes KIR, nenhuma tendência de associação com os grupos com IRIS e sem IRIS foi observada, uma vez que as frequências de tais haplótipos mostraram-se similares entre os grupos. De fato, não há relação dos haplótipos KIR com a aids e a tuberculose em conjunto na literatura. O estudo desse gene e seus haplótipos são pioneiros, uma vez que não há na literatura científica relatos de associação entre genes KIR e IRIS.*

*As pesquisas de genes do hospedeiro que buscam explicar diferenças nas respostas imunes dos indivíduos frente a diferentes patogenias representam uma grande área a ser explorada. Diversos grupos de pesquisa no mundo buscam identificar fatores genéticos que possam estar associados a doenças e, dessa forma, compreender melhor a heterogeneidade da resposta imune dos indivíduos frente à invasão de um microorganismo, bem como no contexto de doenças autoimunes e cânceres. Com mencionado, muitos estudos já esclareceram o papel de genes do hospedeiro em diversas infecções, mas muitas perguntas ainda permanecem sem resposta, incluindo as infecções pelo HIV e pelo Mtb. A descrição de marcadores genéticos e sua distribuição no contexto dessas duas infecções podem trazer informações importantes para o desenho de estratégias terapêuticas e vacinais, aumentando a qualidade de vida dos indivíduos infectados e o manejo clínico. A partir desse estudo pioneiro na avaliação da distribuição dos alelos HLA e KIR em indivíduos com tuberculose infectados com HIV com ou sem IRIS conseguimos mostrar a existência de diferenças nas frequências desses genes nos dois grupos analisados, mesmo que sem significância estatística, além de apresentar um panorama atual da distribuição destes genes. Dessa forma, mais estudos nessa população são importantes, e devem incluir maior número de indivíduos, na tentativa de se melhor entender a importância e o papel dos marcadores genéticos do hospedeiro no contexto dessas duas doenças.*

## 6 PERSPECTIVAS

*Um novo projeto já se iniciou no laboratório de AIDS e Imunologia Molecular com a proposta de identificar biomarcadores preditivos da ocorrência da IRIS em uma coorte de pacientes melhor estabelecida, incluindo, além de indivíduos coinfectados, indivíduos mono infectados – (1) soronegativos para a infecção pelo HIV e (2) sem diagnóstico de TB -, e voluntários saudáveis não portadores de HIV e/ou TB. Este projeto, intitulado : “Imunidade inata e adquirida, carga proviral e genética do hospedeiro na coinfeção HIV-tuberculose”, está sendo realizado em colaboração com o Instituto Pasteur (França), e tem como objetivos determinar o envolvimento das respostas imunes inata, especificamente respostas de células NK, e adquirida, das subpopulações de linfócitos T, de marcadores solúveis (citocinas, marcadores inflamatórios e fatores de translocação microbiana), do perfil genético do hospedeiro (principalmente os genes HLA-B, HLA-DRB1 e KIR) e da carga de provirus em pacientes HIV-TB submetidos às terapias antirretroviral e tuberculostática.*

*Desta forma, de modo mais imediato, nossa perspectiva é dar continuidade à caracterização genética de indivíduos acometidos por dois agravos de indiscutível importância em termos de saúde pública, que são a aids e a tuberculose, bem como à busca de biomarcadores que possam estar associados à ocorrência de IRIS, auxiliando o melhor entendimento e caracterização desta síndrome.*

*Outra perspectiva, de longo prazo, é ampliar o repertório dos marcadores genéticos analisados (por exemplo, HLA-C, citocinas e inflamassoma), visto que já encontramos relatos na literatura da associação desses genes e a coinfeção TB/AIDS.*

## 7 CONCLUSÕES

*Com base nos resultados obtidos a partir da análise de marcadores genéticos do hospedeiro na população de pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 do Rio de Janeiro, pode-se concluir que:*

- A realização da tipagem molecular dos alelos HLA de Classe I B, HLA de Classe II DRB1 e KIR dos pacientes com tuberculose infectados pelo HIV-1 nos permitiu conhecer a distribuição desses genes nessa população, além de suas frequências;*
- Os alelos encontrados em maior frequência em nosso estudo concordam, em grande parte, com os alelos dos genes HLA-B e HLA-DRB1 (Bardi et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Teixeira et al., 2009; Teixeira et al., 2014; Ayo et al., 2014) e dos genes KIR (Ewerton et al., 2007; Rudnick et al., 2008; Jobim et al., 2009) descritos para a população Brasileira;*
- A comparação dos dados de distribuição dos genes HLA-B, HLA-DRB1 e KIR entre os indivíduos com e sem IRIS mostrou que existem algumas diferenças nas frequências destes alelos entre os dois grupos. Entretanto, não foi encontrada significância estatística nessa população.*
- Uma tendência de associação do alelo HLA-B\*42 com a ocorrência da IRIS foi observada, reforçando a importância do estudo de marcadores genético do hospedeiro e evidenciando o papel dos genes HLA na resposta imune às doenças infecciosas.*
- Embora nosso estudo não tenha encontrado associações significativas entre os genes HLA-B, HLA-DRB1 e KIR e a ocorrência de IRIS, provavelmente por conta da influência do número restrito de pacientes analisados, nossos dados fornecem uma descrição desses alelos na população estudada, contribuindo*

*para o conhecimento das características genéticas dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 na nossa população.*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K. *Imunodeficiências Congênitas e Adquiridas*. In: Lichtman; Pillai; Abbas. 7. Ed. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012:458-469.

Abebe F, Hansen-Holm C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J of Immun.* 2007;66:176-191.

Achord AP, Lewis RE, Brackin MN, et al. HIV-1 disease association with HLA-DQ antigen in Africans Americans and Caucasians. *Pathobiology*. 1996;64:204–208.

Afiune JB. Tuberculose. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e Tratamento*. Barueri - SP: Editora Manole Ltda. 2006:1301-17.

Ahmad, “New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection,” *Respiratory Research*. 2010:11-169.

Ahmad, “Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *Clinical and Developmental Immunology*. 2011:43- 17.

Alter G, Heckerman D, Schneidewind A, et al. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature*. 2011,476(7358):96-100.

Altfeld M, Kalife ET, Qi Y et al. HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8(+) T cell response against HIV-1. *PLoS Med* 2006. 3:e403.

An P & Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in Genetics*. 2010; 26(3):119-131.

Antonelli LR, Mahnke Y, Hodge JN, Porter BO, Barber DL, et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. *Blood*. 2010; 116: 3818– 3827.

Anzala AO, Nagelkerke NJ, Bwayo JJ, Holton D, Moses S, Ngugi EM, Ndinya-Achola JO, Plummer FA. Rapid progression to disease in African sex workers with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 1995; 171:686-689.

Apostolopoulos V, Lazoura E, Yu M: MHC and MHC-like molecules: structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 640:252-267.

Appay, V. and D. Sauce. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008;214(2): 231-41.

Ayo CM, Camargo AVS, Xavier DH, Batista MF, Carneiro OA, Mattos CCB et al. Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Inter Jour of Immunogen*. 2015;42: 19–25.

- Ayoub A et al. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 2001;7: 466–467.
- Balamurugan, A.; Sharma, S. K.; Mehra, N. K. Human Leukocyte Antigen Class I Supertypes Influence Susceptibility and Severity of Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases.* 2004;(189): 805–11.
- Batista LE. Masculinidade, raça/cor e saúde. Trabalho apresentado no 2o Seminário Internacional/1o Seminário Norte-Nordeste Homens, Sexualidade e Reprodução: Tempos, Práticas e Vozesç 2003 junh 17-20, Recife.
- Barbosa IR, Costa ICC. A emergência da co-infecção tuberculose – HIV no Brasil. *Hygeia.* 2012;8(15):232-44.
- Bardi MS, Jarduli LR, Jorge AJ, Camargo RB, Carneiro FP, Gelinski JR, et al. HLA-A, B and DRB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from the north of Parana State. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(1):25-30.
- Bartlett JG and Moore R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1999;(1):50-55.
- Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J.Clin.Invest.* 2005;115: 3265-3275.
- Bellamy R: Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. *Thorax,* 1998 53:588.
- Berrington W R & Hawn T R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev.* 2007;219:167-186.
- Blackwell JM. Genetics and Genomics in Infectious Disease Susceptibility. *Trends in Molecular Medicine.* 2001;7 (11): 521 – 526.
- Bloom BR, Flynn J, McDonough K, Kress Y, Chan J. Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in M. Tuberculosis infection. *Immunobiology.* 1994;191(4-5):526-36.
- Blum L, Flageul B, Sow S, Launois P, Vignon-Pennamen MD, Coll A, Millan J. Leprosy Reversal Reaction in HIV-Positive Patients. *International journal of leprosy.* 1993; 61:2.
- Boffo MMS, De Mattos IG, Ribeiro MO, Neto ICO. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. *J Bras Pneumol.* 2004; 30(2):140-146.
- Boletim Epidemiológico Especial Tuberculose - Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2012: 43.



*Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da Saúde. [online]. Brasil; 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.*

*Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da Saúde. [online]. Brasil; 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.*

*Bontadini, A., Testi, M., Cuccia, C., Martinetti, M., Carcassi, C., Chiesa, A. et al. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. Journal of Translational Medicine, 2006;4, 44.*

*Bothamley G. H. Differences between HLA-B44 and HLA-B60 in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis and exposed controls. Journal of Infectious Diseases, 1999;(179)1051–2.*

*Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, Lascoux C, Delcey V, Gicquel B, et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. AIDS. 2006;20:1-7.*

*Boulet S, Sharafi S, Simic N, et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. AIDS 2008, 22(5):595-9.*

*Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. Clin Exp Immunol 2007; 149:1–8.*

*Bozzano F, Marras F. and De Maria A. Immunology of Tuberculosis. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014;6(1): 2014-2027.*

*Breen RA, Smith CJ, Bettinson H, et al. Paradoxical reactions during tuberculosis treatment in patients with and without HIV co-infection. Thorax 2004; 59:704–707.*

*Breton G, Duval X, Estellat C, Poaletti X, Bonnet D, Mvondo Mvondo D, et al. Determinants of immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV type 1-infected patients with tuberculosis after initiation of antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2004;39:1709-1712.*

*Cahn P, Perez H, Ben G, Ochoa C. Tuberculosis and HIV: A partnership against the most vulnerable. JIAPAC. 2003;2(3):106-123.*

*Campbell R, Milner C M. MHC genes in autoimmunity. Current Opinion in Immunology. 1993;5:887-893.*

*Carneiro VL, Lemaire DC, Bendicho MT, Souza SL, Cavalcante LN, Angelo AL, Freire SM, Mendes CM, Santana N, Lyra LG, et al. Natural killer cell receptor and HLA-C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: A comparison between sustained virological responders and non-responders. Liver Int. 2010;30:567-573.*

*Carrington & O'Brien. The influence of HLA genotype on AIDS. Annu Rev Med. 2003; 54:535-51.*

*Carrington M., Kulkarni S, Martin MP. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. Semin. Immunol. 2008; 20:343-52.*

Caruso RL, Fernandes RM, Serra MS, Lima RB, Martins CJ. Reação reversa atípica em paciente com hanseníase dimorfa co-infectado pelo HIV. *An Bras Dermatol.* 2007;82(6):553-7.

Carvalho MG, Tsuneto LT, Neto JMM, Sousa LCDM, Filho HLAS, Macêdo MB et al. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 haplotype frequencies in Piauí's volunteer bone marrow donors enrolled at the Brazilian registry. *Human Immunology.* 2013; 73:1598–1602.

Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, Garcia S, et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One.* 2010;11(5):11079.

Cella M, Longo A, Ferrara GB, et al. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med.* 1994, 180(4):1235-42.

Chang CC, Sheikh V, Sereti L, French MA. Immune Reconstitution Disorders in Patients With HIV Infection: From Pathogenesis to Prevention and Treatment. *Curr HIV/AIDS Rep* (2014) 11:223–232.

Choe H; Farzan M; et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 1996;85(7): 1135-48.

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science.* 1986;233(4761):343-46.

Conesa-Botella A, Meintjes G, Coussens AK, et al. Corticosteroid therapy, vitamin D status, and inflammatory cytokine profile in the HIV-tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. *Clin Infect Dis.* 2012;55:1004– 11.

Cunha, LK et al. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the State of Amazonas, Brazil, and subtype C identification. *Braz J Med Biol Res.*,2012; 45(2):104-12.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WRJ et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus - an analysis using restriction-fragment length polymorphisms. *N Engl J Med.* 1992;326:231-5.

De Carvalho LGM, Buani AZ, Zollner MSAC, Scherma AP. Co-infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e vírus da imunodeficiência humana: uma análise epidemiológica em Taubaté (SP). *J Bras Pneumol.* 2006;32(5):424-9.

De Oliveira APC. Caracterização dos genótipos KIR como marcadores de prognóstico em indivíduos infectados pelo HIV-1. [Trabalho de monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. Curso de Biomedicina;2014.

Deeks SG and Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007;27: 406-416.

Delves, P. J.; Roitt, I. M. *The Immune System (First of two parts)*. *The New England Journal of Medicine*, 200(343) 37-49.

Diedrich CR, Flynn JL. HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis? *Infect Immun*. 2011;79: 1407-1417.

Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95-8.

Dubaniewicz A, Moszkowska G, Szczerkowska Z. Frequency of DRB1-DQB1 two-locus haplotypes in tuberculosis: preliminary report. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:259e67.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006;(101)697-714

Edwards D, Kirkpatrick C H. The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1986(134):1062-1071.

Elliott JH, Vohith K, Saramony S, et al. Immunopathogenesis and diagnosis of tuberculosis and tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome during early antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2009; 200:1736–1745.

Ewerton PD, Leite MM, Magalhães M, et al. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics* 2007;59:625–30.

Ferguson, M.R; Rojo, D.R; Von Lindern, J.J. & O'Brien, W.A. HIV-1 replication cycle. *Clin. Lab. Med.*, 2002(22):611-635.

Fernandes C, Maltez F, Lourenco S, Morgado A, Proenca R. Papulonecrotic tuberculid in a human immunodeficiency virus type-1 patient with multidrug-resistant tuberculosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004, 18:369-370.

Ferre, A. L., P. W. Hunt, J. W. Critchfield, D. H. Young, J. C. Garcia, H. F. Yee, Jr., R. B. Pollard, J. N. Martin, S. G. Deeks, and B. L. Shacklett. 2009. HIV controllers with HLA-DR\*13 and HLA-DQ\*6 have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J of Virol*. 2010; 11020-11029.

Fellay, J., Shianna, K.V., Telenti, A., Goldstein, D.B. Host genetics and HIV-1: The final phase?., 2010(13):1001033.

Figueiredo JF, Rodrigues Mde L, Deghaide NH, Donadi EA. HLA profile in patients with AIDS and tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 2008;12:278e80.

Figueiredo TM, Villa TC, Scatena LM, Cardozo Gonzales RI, Ruffino-Netto A, Nogueira Jde A, et al. Performance of primary healthcare services in tuberculosis control. *Revista de Saúde Publica*, 2009(5):825-31.

Fiuza de Melo FA, Afiune JB, Hijjar MA, Gomes M, Rodrigues DSS, Klautau GB. Tuberculose. In: Focaccia R, editor. *Veronesi - Tratado de Infectologia*. 3a ed. Revisada e Atualizada ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005. p. 1139-205.

Franceschi, D S A, Souza, C A, Aranha, F J P, Cardozo, D M, Visentainer, J E L. Importance of killer immunoglobulin-like receptors in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2011;33: 126-130.

Freed EO. HIV-1 replication. *Somat cell mol Genet* 2001;26(1-6):13-33.

French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *Aids*. 2004;18:1615-1627.

Friedland G, Churchyard GJ, Nardell E. Tuberculosis and HIV coinfection: current state of knowledge and research priorities. *J Infect Dis*, 2007(196)1:3.

Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 2001; 344: 1668–1675.

Gao, X.; O'Brien, T. R.; Welzel, T. M. et al. HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS*, 2010(.24):1835-1840.

Garcia GF, Corrêa PCR, Melo MGT, Souza MB. Prevalência da infecção pelo HIV em pacientes internados por tuberculose. *J Pneumol*. 2000; 26(4).

Gaudieri S, De Santis D, McKinnon E, et al. Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun*. 2005;6(8):683-90.

Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Current opinion in infectious diseases*. 2006;19(1):1-7.

Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy J F Meyer L. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology*. 2007:4:65.

Girão RJS, Ura S, Daolio A, Fleury RN, Opromolla DVA. Hanseníase tuberculóide em paciente com Aids\* Tuberculoid leprosy in AIDS patient\*. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):360-363.

Goebel FD. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)-another new disease entity following treatment initiation of HIV infection. *Infection*. 2005;33:43-5.

Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D913–D919.

Goto T, Nakai M, Ikuta K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron* 1998; 29(2-3):123-138.

Grossman, Z.; Meier-Schellersheim, M.; Souza, A. E.; Victorino, R.M.M.; Paul, W.E. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the causes? *Nature medicine*, 2002(8)319-323.

Gutierrez-Rodriguez, M.E., Sandoval-Ramirez, L., Diaz-Flores, M., Marsh, S.G., Valladares-Salgado, A., Madrigal, J.A. et al. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. *Human Immunology*, 2006: 67-85.

Hauptmann, G.; Bahram, S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion on Immunology*, London,2004(16) 668-672.

Hay CM, Ruhl DJ, Basgoz NO, Wilson CC, Bilingsley JM, DePasquale MP, et al. Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type-1 specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J Virol*. 1999;73:5509–19.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS*. 2011;13;25(5):679-89.

Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999; 162: 6942–6946.

Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM, Procópio MJ. Retrospect of tuberculosis control in Brazil [Article in Portuguese]. *Revista de Saúde Publica*, 2007(41) Suppl 1:50-8.

Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:593-617.

Hirsch, H. H; Kaufmann, G.; Sendi, P.; Battegay, M. Immune reconstitution in HIV-1 infected patients. *Clinical infectious disease*, 2004(38):1159-1166.

HLA Class I alleles associated with susceptibility or resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection among a population in Chaco Province, Argentina. *J. Infect. Dis.* 182, 1523–1526.

Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies W, Jong G, Reiner N E. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature Class II heterodimers. *J. Immunol*.1998(162) 4882-4893.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*. 2001. (10):978-96.

Hong HA, Paximadis M, Gray GE, Kuhn L, Tiemessen CT. KIR2DS4 allelic variants: Differential effects on in utero and intrapartum HIV-1 mother-to-child transmission. *Clin Immunol*. 2013;149(3):498-508.

Houben EN, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:76–85.

Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, et al. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA*. 1996;275(3):210-6.

Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 1995; 69(11):6810-6818.

IMGT/HLA “Database”; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>. Acessado em 15/01/2015. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SGE. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):311–4.

Jacob JT, Mehta AK, Leonard MK. Acute forms of tuberculosis in adults., *Am J med*. 2009;122(1):12-7.

Jamal LF, Moherdau F. Tuberculosis and HIV infection in Brazil: magnitude of the problem and strategies for control. *Rev Saude Publica*. 2007;41 Suppl 1:104-10.

Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adjé-Touré CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN, et al. Resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol* 2006;177:6588e92.

Jobim, M., Jobim, L. Células natural killer e vigilância imunológica. *Jornal de Pediatria*. 2008; 84(4).

Jobim M, Salim P H, Portela P, Wilson T J, Fraportti J, Baronio D et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of Southern Brazil. *International Journal of Immunogenetics*. 2009; 37: 83–89.

Jost S, Altfeld M. Control of human viral infection by natural killer cells. *Annual review of immunology*. 2013;31: 163-194.

Kahn, J. O. and B. D Walker. "Acute human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med*, 1998;339(1): 33-9.

Kantor, R., Katzenstein, D. Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol*. 2004;( 29):152-159.

Kaufmann S, Winau. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nature Immunology*. 2005;11: 1063-1066.

Kaur G. & Mehra N. Genetic Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue Antigens*. 2009(74): 373-385.

Kelleher A. D., Long C., Holmes E. C., Allen R. L., Wilson J., Conlon C., et al. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 2001;193:375–386.

Khalil, I., D'Auriol, L., Gobet, M., et al.,. A combination of HLA-DQ beta Asp 57-negative and HLA-DQ Arg 52 confers susceptibility to insulindependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1990(85):1315–1319.

Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature.* 2004( 432) 769-75.

Klein MR, Keet IP, D'Amaro J, Bende RJ, Hekman A, Mesman B, et al. Associations between HLA frequencies and pathogenic features of human immunodeficiency virus type 1 infection in seroconverters from the Amsterdam cohort of homosexual men. *J Infect Dis.* 1994;169(6):1244-9.

Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702-9.

Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994; 68(7):4650-5.

Kulkarni, P.S., Butera, S.T., Duerr, A.C. Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *AIDS Rev.*, 2008(5) 87–103.

Lakshimi, V.V; Rakh, S.S.; Radha, A.; Priya, V. H. S.; Pantula, V.; Jasti, S.; Latha, S; Murthy, K. J. R. Role of HLA-B51 and HLA-B52 in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006(6) 436–439.

Lancaster, A., Nelson, M.P., Single, R.M., Meyer, D. and Thomson, G. “PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data”. *Pacific Symposium on Biocomputing.* R B Altman. et al. 2003(8) 514-525.

Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:359-93.

Lawn SD, Bekker L-G, Miller RF. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIVinfected individual receiving antiretrovirals. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:361-73.

Lawn SD, Myer L, Bekker LG, Wood R. Tuberculosis-associated immune reconstitution disease: incidence, risk factors and impact in an antiretroviral treatment service in South Africa. *AIDS.* 2007; 21:335– 341.

Laureillard D, Marcy O, Madec Y, Chea S, Chan S, Borand L, et al. Paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome after early initiation of antiretroviral therapy in a randomized clinical trial. *AIDS.* 2013;27(16):2577-86.

Lemos ACM. Coinfecção tuberculose/hiv. *J Bras. Pneumol.* 2008;34;10.

Leslie G. Louie, Wendy E. Hartogensis, Rachael P. Jackman, Kathleen A. Schultz, Lynn S. Zijenah, Carina H.-Y. Yiu, Viet D. Nguyen, Marie Y. Sohsman, David K. Katzenstein, and Peter R. Mason. *Mycobacterium tuberculosis/HIV-1 Coinfection and Disease: Role of Human Leukocyte Antigen Variation. The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189:1084–90.

Lima, A. L. M., Kiffer, C. R.; Uip, D.; Oliveira, M. S.; Leite, O.M.- HIV/AIDS: Perguntas e Respostas. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. Caps. 1, 2, 5, 6.) Louie LG, Hartogensis WE, Jackman RP, Schultz KA, Zijenah LS, Yiu CH, et al. *Mycobacterium tuberculosis/HIV-1 coinfection and disease: role of human leukocyte antigen variation. J Infect Dis* 2004;189:1084e90.

Lombard, Z. D. Dalton, P. A. Venter, R. C. Williams, and L. Bornman, “Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa,” *Human Immunology*, 2006: 67(8) 643– 654.

Long EO & Rajagopalan S. HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin Immunol.* 2000;12:1018.

Lopez-Vazquez A, Mina-Blanco A, Martinez-Borra J, Njobvu PD, Suarez- Alvarez B, Blanco-Gelaz MA, et al. Interaction between KIR3DL1 and HLA-B\*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Hum Immunol* 2005;66:285-289.

Lorenzo ME, Ploegh HL, Tirabassi RS. Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology. *Semin Immunol.* 2001;13:1-9.

Louie, L.G; Wendy E. Hartogensis, Rachael P. Jackman,, Kathleen A. Schultz, Lynn S. Zijenah, Carina H.-Y. Yiu, Viet D. Nguyen, Marie Y. Sohsman, David K. Katzenstein, and Peter R. Mason. *Mycobacterium tuberculosis/HIV-1 Coinfection and Disease: Role of Human Leukocyte Antigen Variation. The Journal of Infectious Diseases.* 2004; 189:1084–90

Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B, Letourneur F, Gomas E, Allen E, et al. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* 1995; 69:5640-9.

Lu, C.; Shen, Y. J.; Deng, Y. F.; Wang, C. Y.; Fan, G.; Liu, Y. Q.; Zhao, S. M.; Zhang, B. C.; Zhao, Y. R.; Wang, Z. E.; Zhang, C. G.; Lu, Z. M. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with pulmonary tuberculosis in Chinese Han. *Genetics and Molecular Research*, 2012 (11):2:1370-1378.

Lucca ME. Análise epidemiológica da tuberculose e co-infecção TB/HIV, em Ribeirão Preto-SP, de 1998 a 2006 [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2008.



Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, Storkus WJ, Kalinski P. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: twosignal requirement for the induction of NK cell helper function. *J.Immunol.* 2003;171: 2366-2373.

Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J.Clin.Invest.* 2008;118:3431- 3439.

Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Phoorisri T, Sungkanuparph S. Immune reconstitution inflammatory syndrome of tuberculosis among HIV-infected patients receiving antituberculous and antiretroviral therapy. *J Infec.* 2006; 53:357–363.

Marangon AV, Silva GF, de Moraes CF, Grotto RM, Pardini MI, de Pauli DS, Sell AM, Visentainer JE, Moliterno RA. KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hum Immunol.* 2011;72(11):1074-8.

Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, et al. Reduced Rate of Disease Development after HIV-2 infection as Compared to HIV-1. *Science.* 1994;265(5178):1587-90.

Marsh S G E, Parham P and Barber L D. *The HLA Facts Book.* Elsevier. 2000.

Martin MP & Carrington, M. Immunogenetics of HIV disease. *Immunological Reviews.* 2003; 254:245-264.

Marquez, J. – *O essencial da Saúde – Tuberculose.* 2007. Lisboa: QuidNovi.

Marx Pa, Munn Rj, Joy Ki. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab Invest* 1988; 58(1):112-118.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.

Mehra NK, Rajalingam R, Mitra DK, et al. Variants of HLADR2/DR51 group haplotypes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis in Asian Indians. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1995;63:241–8.

Meintjes G, Lawn SD, Scano F, Maartens G, French MA, et al. International Network for the Study of HIV-associated IRIS. Tuberculosis associated immune reconstitution inflammatory syndrome: case definitions for use in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8(8): 516–23.

Meintjes G, Wilkinson RJ, Morroni C, Pepper DJ, Rebe K, Rangaka MX, et al. Randomized placebo-controlled trial of prednisone for paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS.* 2010; 24: 2381–2390.

Méndez A, Granda H, Meenagh A, Contreras S, Zavaleta R, Mendoza MF, et al. Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 2006;68: 386e9.

Migueles, S. A., C. M. Osborne, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008; 29(6): 1009-21.

Michailidis C, Pozniak AL, Mandalia S, Basnayake S, Nelson MR, Gazzard BG. Clinical characteristics of IRIS syndrome in patients with HIV and tuberculosis. *Antivir Ther*. 2005; 10:417–422.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose, Brasília, 2014.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2010, Brasília.

Moir S, Chun T W, Fauci A S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology*. 2011; 28(6):223-248.

Morrow CD, Park J, Wakefield JK. Viral gene products and replication of the Human Immunodeficiency Type 1 Virus. *Am J Physiol*. 1994;266(5 pt1):C1135-56.

Motta P, Marinic K, Sorrentino A, López R, Iliovich E, Habegger de Sorrentino A. Association of HLA-DQ and HLA-DR alleles with susceptibility or resistance to HIV-1 infection among the population of Chaco Province, Argentina. *Medicina (B Aires)* 2002;62(3):245-248

Muller M, Wandel S, Colebunders R, Attia S, Furrer H, Egger M. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:251-261.

Nakai M, Goto T. Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency virus. *Journal of electron microscopy*. 1996: 45(4):247-257.

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*. 2011;85(4):776-781.

Narendran G, Andrade BB, Porter BO, et al. Paradoxical tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome (TB-IRIS) in HIV patients with culture confirmed pulmonary tuberculosis in India and the potential role of IL-6 in prediction. *PLoS ONE*. 2013;(8)635-41.

Narita M, Ashkin D, Hollender ES, Pitchenik AE. Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:157-161.

Norman, P.J., Stephens, H.A., Verity, D.H., Chandanayingyong, D. & Vaughan, R.W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*, 2001: 52, 195.

O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet* 2004;36:565e74.

Oliver BG, Elliott JH, Price P, et al. Mediators of innate and adaptive immune responses differentially affect immune restoration disease associated with *Mycobacterium tuberculosis* in HIV patients beginning antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2010;202:1728–37.

PAHO. Organização Pan Americana da Saúde. Co-epidemia TB/HIV nas Américas. 2012. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org).

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1998; 338: 853–60.

Palomino JC, Leão SC 2007. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. [www.tuberculosisTextbook.com](http://www.tuberculosisTextbook.com), 687 p.

Pantaleo, G.; Graziosi, C.; Demarest, J. F.; Butini, L.; Montroni, M.; Fox, C. H.; Orenstein, J. M.; Kotler, D. P.; Fauci, A. S. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature Immunology*, New York, 1993 (362):6418:355-358.

Paximadis M, Mathebula TY, Gentle NL, Vardas E, Colvin M, Gray CM et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum Immunol* 2012; 73:80–92.

Pean P, Nerrienet E, Madec Y, Borand L, Laureillard D, Fernandez M, Marcy O, Sarin C, Phon K, Taylor S, Pancino G, Barré-Sinoussi F, Scott-Algara D; Cambodian Early versus Late Introduction of Antiretroviral Drugs (CAMELIA) study team. Natural killer cell degranulation capacity predicts early onset of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV-infected patients with tuberculosis. *Blood.* 2012;119(14):3315-3320.

Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, et al. Systemic lupus erythematosus: Association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus.* 2011;20:265-273.

Perce-da-Silva D S, Silva L A, Lima-Junior J C, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro-Alves M, Santos F, Porto L C M S, Oliveira-Ferreira J and Banic D M. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity in a population naturally exposed to malaria in Porto Velho, Northern Brazil. *Tissue Antigens.* 2015; 20:265-273.

Peterlin Bm, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):97-107.

Phair J, Jacobson L, Detels R, Rinaldo C, Saah A, Schragger L, Munoz A. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Sybdr.* 1992; 5:490-6.

Piatak, M., Jr., M. S. Saag, et al. "High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR." *Science.* 1993;259(5102):1749-1754.

Pitabut, N. Shinsaku Sakurada, Takahiro Tanaka, Chutharut Ridruechai, Junko Tanuma, Takahiro Aoki, Pacharee Kantipong, Surachai Piyaworawong, Nobuyuki Kobayashi, Panadda Dhepakson, Hideki Yanai, Norio Yamada, Shinichi Oka, Masaji Okada, Srisin Khusmith, Naoto Keicho. Potential Function of Granulysin, Other Related Effector Molecules and Lymphocyte Subsets in Patients with TB and HIV/TB Coinfection. *International Journal of Medical Sciences.* 2013; 10(8):1003-1014.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):871-2.

Price P, Keane NM, Stone SF, Cheong KY, French MA. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Hum Immunol.* 2001;62(2):157-64.

Raghavan, S., Alagarasu, K., Selvaraj, P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 92, p. 18 e 30, 2012.

Raghavan, S.; Selvaraj, P.; Swaminathan, S. and Narendran, G. Short Communication: Association of HLA-A\*1101 with Resistance and B\*4006 with Susceptibility to HIV and HIV-TB: An in Silico Analysis of Promiscuous T Cell Epitopes. *AIDS research and human retroviruses*, v. 25, n. 10, 2009.

Raghavan S, Selvaraj P, Swaminathan S, Alagarasu K, Narendran G, Narayanan PR. Haplotype analysis of HLA-A, -B antigens and -DRB1 alleles in south Indian HIV-1-infected patients with and without pulmonary tuberculosis. *Int J Immunogenet* 2009;36:129e33.

Range N, Ipuge Y, Obrien RJ, Egwaga SM, Mfinanga SG, Chonde TM, et al. Trend in HIV prevalence among tuberculosis patients in Tanzania, 1991-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5:405-412.

Rani RR, Mukherjee R, Stastny P. Diversity of HLA-DR2 in North Indians: the changed scenario after the discovery of DRB1\*1506. *Tissue Antigens* 1998;52:147-52.

Rinaldo CR Jr, Liebmann JM, Huang XL, et al. Prolonged suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia in persons with advanced disease results in enhancement of CD4 T cell reactivity to microbial antigens but not to HIV-1 antigens. *J Infect Dis.* 1999; 179:329-36.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK et al. HIV 1 Nomenclature proposal. *Science* 2000; 288:55-56.

Robertson J, Meier M, Wall J, et al. Immune reconstitution syndrome in HIV: validating a case definition and identifying clinical predictors in persons initiating antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1639–1646.

Rodrigues JLC, Fiegenbaum M, Martins AF. Prevalência de coinfeção tuberculose/HIV em pacientes do Centro de Saúde Modelo de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Scientia Med.* 2010; 20(3) 212-217.

Roques P et al. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS* 2004. 18, 1371–1381.

Rowe, R.E., Leech, N.J., Nepom, G.T., McCulloch, D.K., 1994. High genetic risk for IDDM in the Pacific Northwest: first report from the Washington State diabetes prediction study. *Diabetes* 43, 87–94.

Rubbert A, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 infection. 2005; 59-82.

Rudnick et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Human Immunology.* 2008;69:872-876.

Sabatte J, Ceballos A, Raiden S, Vermeulen M, Nahmod K, Maggini J, Salamone G, Salomon H, Amigorena S, Geffner J. Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *J.Virol.* 2007;81:13723-13734.

Sailaja, G., I. Skountzou, et al. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology.* 2007; 362(2): 331-41.

Saita NM, Oliveira HB. Tuberculose, AIDS e coinfeção tuberculose-AIDS em cidade de grande porte. *Rev. Latino-Am. Enfermagem,* 2012: 20(4).

Salim P H, Mariana J, Jobim L F , Xavier R M. Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51(4):351-64.

Sanches, M., Krauchenco, S., Martins, N.H. et al. Structural Characterization of B and non-B Subtypes of HIV-Protease: Insights into the Natural susceptibility to drug resistance. *J. Mol. Biol.* v. 369, pp.1029–1040, 2007.

Santos MLSG, Ponce MAZ, Vendramini SHF, Villa TCS, Santos NSGM, Wysocki AD, Kuyumijian FG, Gazetta CE. a dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. *Rev Latino-am Enfermagem.* 2009;17(5).

Sattentau Q, Moore J, Vignaux F, Traincard F, Poignard P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol.* 1993;67(12):7383-93.

Saunders B M, Cooper A M 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell. Biol.* 78: 334-341.

Segal S, Hill AVS. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol.* 2003;11(9):445-8.

Selvaraj P. Role of human leucocyte antigen (HLA) and non-HLA genes in susceptibility or resistance to pulmonary tuberculosis. *Ind J. Tub.* 2000; 47:133.

Selvaraj P, Swaminathan S, Alagarasu K, Raghavan S, Narendran G, Narayanan P: Association of human leucocyte antigen-A11 with resistance and B40 and DR2 with susceptibility to HIV-1 infection in south India. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, 43:497-498.

Serra FC, Hadad D, Orofino RL, Marinho F, Lourenco C, Morgado M, et al. Immune reconstitution syndrome in patients treated for HIV and tuberculosis in Rio de Janeiro. *Braz J Infect Dis* 2007,11:462-465.

Sester M, Giehl C, McNerney R, Kampmann B, Walzl G, Cuchi P, et al. Challenges and perspectives for improved management of HIV/Myco**acterium tuberculosis** co-infection. *Eur Respir J.* 2010;36:1242-1247.

Silva TP, Giacoia-Gripp CBW, Schmaltz CA, Sant` Anna FM, Rolla V, Morgado MG. T Cell Activation and Cytokine Profile of Tuberculosis and HIV-Positive Individuals during Antituberculous Treatment and Efavirenz-Based Regimens. *PLoS ONE.* 2013;8(6).

Silveira JM, Sassi RAM, Oliveira Netto IC, Hetzel JL. Prevalência e fatores associados à tuberculose em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana em centro de referência para tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida na região sul do Rio Grande do Sul. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(1):48-55.

Shankarkumar A & Shankarkumar U. Role of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 alleles in HIV-1 patients with pulmonary tuberculosis co-infection from India. *Int J Hum Genet* 2012: 12(1): 11-13.

She, JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol. Today.* 1996;17:323–329.

Simon F et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1998. 1032–1037.

Staprans SI and Feinberg MB 2004. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2004;3(4):5-32.

Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell.* 1987;49(5):659-68.

Sharma S, Kaur G, Mehra N. Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res.*2011;134:749–68.

Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non progressors: Long term HIV-1 infection with stable CD4 T cell levels. *AIDS*. 1993;7:1159–66.

Shelburne SA, Visnegarwala F, Darcourt J, Graviss EA, Giordano TP, White AC, Jr., et al. Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2005;19:399-406.

Singh P, Kaur G, Sharma G, Mehra NK. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. *Vaccine* 2008; 29:66-80.

Tan H Y, Yong YK, Andrade B B, Shankar E M, Ponnampalavanar S, Omar S F S. Plasma interleukin-18 levels are a biomarker of innate immune responses that predict and characterize tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS*. 2015;29:000-000.

Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Morgado MG. Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 638–642.

Teixeira SL, De Sá NBR, Campos DP, Coelho AB, Guimarães ML, Leite TCNF, Veloso VG, Morgado MG. Association of the HLA-B\*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes and Immunity*. 2014:1–7.

Telenti A, Goldstein DB. Genomics meets HIV. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4 9–18.

Teran-Escandon D, Teran-Ortiz L, Camarena-Olvera A, et al. Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest* 1999;115:428–33.

Together we will end AIDS. “UNAIDS / JC2296E”. UNAIDS 2012. ISBN 978-92-9173-978-3 (digital). Disponível em: <http://www.unaids.org>.

Tomescu, C., Abdulhaqq, S. and Montaner, L.J. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011;164: 158–169.

Trachtenberg E A, Erlich H A. A Review of the Role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) System as a Host Immunogenetic Factor Influencing HIV Transmission and Progression to AIDS. *HIV Molecular Immunology*. 2001:43-60.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989; 47:187–376.

Trindade MAB, Manini MIP, Masetti JH, Leite MA, Takahashi MD, et al. Leprosy and HIV co-infection in five patients. *Lepr Rev*. 2005; 76: 162–6.

Trunz, B. B.; Fine, P.; Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of costeffectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-80.

Ulrichs T, Kaufmann S H. *New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. J. Pathol.* 2006;208: 261-269.

Vidal N, Bazepeo SE, Mulanga C, Delaporte E, Peeters M. *Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26\_A5U. AIDS Res Hum Retroviruses.*2009;25(8):823-832.

Wendel KA, Alwood KS, Gachuhi R, Chaisson RE, Bishai WR, Sterling TR. *Paradoxical worsening of tuberculosis in HIV-infected persons. Chest* 2001; 120:193–197.

Wigg, M.D. *Vírus da Imunodeficiência Humana. In: Santos; Romanos; Wigg. 2. Ed. Introdução à Virologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008;410-447.*

Witt, C.S., Dewing, C., Sayer, D.C., Uhrberg, M., Parham, P. & Christiansen, F.T. *Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. Transplantation.*1999;68:1784.

WHO, World Health Organization. *Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08*

Wu F, Zhang W, Zhang L, Wu J, Li C, Meng X, et al. *NRAMP1, VDR, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 Gene Polymorphisms in Susceptibility to Tuberculosis among the Chinese Kazakh Population: A Case-Control Study. BioMed Research International.* 2013; 20: 484-535.

Yamakawa RH, Saito PK, da Silva Junior WV, de Mattos LC, Borelli SD. *Polymorphism of Leukocyte and Erythrocyte Antigens in Chronic Kidney Disease Patients in Southern Brazil. PLoS ONE.* 2014; 9(1): 844-856.

Yuliwulandari R, Sachrowardi Q, Nakajima H, Kashiwase K, Hirayasu K, Mabuchi A, Sofro AS, Tokunaga K. *Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia. Hum Immunol.* 2010;71(7):697-701.



## 9 ANEXOS

*Anexo 1- Tabela da distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes padrões de progressão para a aids (Teixeira et al., 2014).*

*Anexo 2 – Trabalho científico realizado no nosso grupo, que contém dados referentes à distribuição aos alelos HLA-B em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes perfis de progressão para aids. Esta publicação originou-se a partir dos resultados obtidos durante a Iniciação Científica e publicados durante o Mestrado. O artigo intitula-se: “Association of the HLA-B\*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals”.*

## ANEXO 1

*Tabela: Distribuição das frequências gênicas dos alelos HLA-B dos indivíduos com tuberculose infectados pelo HIV-1 e indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes padrões de progressão para a aids (Teixeira et al., 2014).*

Alelos	AIDS/TB		HIV-1		AIDS/TB vs. HIV-1	
	2n=122		2n= 436		p-valor*	OR
	n	f	n	f		
<b>B*07</b>	09	0.073	28	0.064	0.683	1.16
<b>B*08</b>	05	0.041	23	0.053	0.814	0.76
<b>B*14</b>	06	0.049	31	0.071	0.536	0.67
<b>B*15</b>	18	0.147	49	0.112	0.343	1.36
<b>B*18</b>	02	0.016	12	0.028	0.744	0.58
<b>B*27</b>	02	0.016	06	0.011	0.688	1.19
<b>B*35</b>	13	0.106	48	0.110	1.000	0.96
<b>B*37</b>	02	0.016	03	0.007	0.301	2.40
<b>B*38</b>	02	0.016	07	0.016	1.000	1.02
<b>B*39</b>	02	0.016	12	0.027	0.744	0.58
<b>B*40</b>	02	0.016	14	0.028	0.541	0.50
<b>B*41</b>	02	0.016	05	0.011	0.619	1.77
<b>B*42</b>	04	0.032	08	0.018	0.305	1.81
<b>B*44</b>	16	0.131	43	0.099	0.318	1.38
<b>B*45</b>	04	0.032	13	0.030	0.772	1.10
<b>B*48</b>	01	0.008	06	0.011	1.000	0.59
<b>B*49</b>	03	0.024	11	0.025	1.000	0.97
<b>B*50</b>	02	0.016	08	0.018	1.000	0.89
<b>B*51</b>	06	0.049	28	0.067	0.670	0.75
<b>B*52</b>	03	0.024	15	0.034	0.775	0.70
<b>B*53</b>	06	0.049	17	0.039	0.609	1.27
<b>B*55</b>	01	0.008	00	0.000	0.218	10.7
<b>B*57</b>	04	0.032	17	0.039	1.000	0.83
<b>B*58</b>	05	0.041	15	0.037	0.782	1.19
<b>B*81</b>	02	0.016	02	0.002	0.209	3.61

*\*Teste exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas com valor de  $p < 0.05$ .  
f: frequência gênica; n: número de indivíduos; 2n= número total de alelos; OR= Odds ratio;*



## ORIGINAL ARTICLE

## Association of the HLA-B\*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals

SLM Teixeira<sup>1</sup>, NBR de Sá<sup>1</sup>, DP Campos<sup>2</sup>, AB Coelho<sup>2</sup>, ML Guimarães<sup>1</sup>, TCNF Leite<sup>1</sup>, VG Veloso<sup>2</sup> and MG Morgado<sup>1</sup>

Several human leukocyte antigen (HLA) class I alleles are associated with the susceptibility to human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection and/or AIDS progression. Of these, the HLA-B alleles are considered the strongest genetic determinant of disease outcome. We evaluated the influence of the HLA-B alleles on AIDS progression among HIV-1-positive individuals from Rio de Janeiro, Brazil, who were categorized as rapid progressors (RPs), typical progressors (TPs) or long-term non-progressors (LTNPs). In this study, significant differences in HLA-B allele frequencies were observed among the three progression groups for the B\*48, B\*49 and B\*52 alleles. After controlling for other factors associated with AIDS progression, the presence of the B\*52 allele was shown to be a significant protective factor (hazard ratio (HR) 0.49 (95% confidence interval (CI) 0.27–0.90)  $P < 0.03$ ). Although no direct association was observed between the presence of the B\*27 or B\*57 allele and the LTNP profile compared with the TP or RP groups, the adjusted model confirmed that these alleles are protective factors against AIDS progression (HR 0.62 (95% CI 0.38–0.99)  $P < 0.05$ ), as previously described. These data corroborate the existence of significant differences in HLA-B allele frequencies among the distinct AIDS progression profiles and further elucidate the role of HLA alleles in the outcome of HIV infections in diverse populations.

*Genes and Immunity* advance online publication, 10 April 2014; doi:10.1038/gene.2014.14

## INTRODUCTION

The natural clinical course of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection is extremely variable, ranging from the development of AIDS in less than a year to no evidence of progression in >10 years.<sup>1</sup> The majority of HIV-infected individuals (70–80%) present with a typical course of infection that progresses to disease within 10 years. Approximately 10–15% of HIV-1-infected individuals progress to AIDS within 3 years of seroconversion, and these individuals are known as rapid progressors (RPs). A smaller proportion of individuals (5–10%) remains asymptomatic and presents CD4<sup>+</sup> T-cell counts >500 cells mm<sup>-3</sup> for >10 years; these patients are termed long-term non-progressors (LTNPs). To help explain the high variability among AIDS progression profiles, several studies have examined the roles of viral factors,<sup>2–6</sup> the innate and adaptive immune responses<sup>7–10</sup> and host genetic factors<sup>20–26</sup> in disease progression.

Host genetic variation is presently estimated to account for about one-fourth of the observed variation in HIV control.<sup>27</sup> Among the genetic factors involved in the immune response to HIV, the human leukocyte antigens (HLAs) exert the strongest influence on viral control, immune escape and disease progression.<sup>28–31</sup> Several HLA class I alleles are associated with the susceptibility to HIV-1 infection and/or AIDS progression. The HLA-B alleles in particular impose substantially greater selection pressure on HIV-1 and are considered the strongest genetic determinant of disease outcome.<sup>21,32,33</sup> Some associations are well characterized; for example, the impact of HLA-B\*27 and B\*57 alleles in slower progression to AIDS and long-term control of HIV-1 replication,<sup>24,34–36</sup> whereas the B\*35 and B\*53 alleles lead to faster progression.<sup>33,39,40</sup>

Based on this background, this study aimed to evaluate the impact of host genetics on AIDS progression based on the

distribution of HLA-B class I alleles among HIV-1-infected individuals classified as RPs, typical progressors (TPs) or LTNPs.

## RESULTS

## Clinical epidemiological characteristics

Of the 3809 HIV-1-seropositive individuals included in this cohort, 496 fulfilled the criteria for the disease progression classification (see Materials and methods section) and were categorized as 182 RPs (36.7%); 289 TPs (58.3%) and 25 LTNPs (5.0%). From this group, a subset of 218 individuals (86 RPs, 39.4%; 115 TPs, 52.8% and 17 LTNPs, 7.8%) had their HLA-B alleles genotyped.

In order to check the representativeness of this subset of 218 individuals, we compared the sociodemographic data of the 3313 unclassified individuals with data from individuals who had their HLA-B alleles genotyped ( $n = 218$ ) and those whose alleles could not be determined ( $n = 278$ ; Table 1). No difference regarding ethnicity, which could have influence on the HLA-B allele distribution, was observed from these comparisons, indicating that the subgroup of 218 individuals matches the 3313 group in this aspect. Similar results were observed when the sociodemographic data were compared considering the different groups of AIDS progression (Supplementary Table S1, Supplementary Material).

## HLA-B alleles

Of the 218 HIV-positive individuals genotyped for their HLA-B alleles, roughly 29 HLA-B allelic groups were identified. The most frequent HLA-B alleles were B\*15, B\*35, B\*44 and B\*14 at 11.2%, 11.0%, 9.9% and 7.1% prevalence, respectively. These four common alleles accounted for 39.2% of the overall HLA-B allele

<sup>1</sup>Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and <sup>2</sup>Evandro Chagas Clinical Research Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence: Dr SLM Teixeira, Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Leonidas Deane Building, Room 401, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil.  
E-mail: sylvia@ioc.fiocruz.br

Received 8 November 2013; revised 26 February 2014; accepted 28 February 2014

**Table 1.** Sociodemographic data from HIV-1-positive individuals from Rio de Janeiro, Brazil, included in the study

	Unclassified individuals (n = 3313) %	Classified individuals		P-value <sup>a</sup>	P-value <sup>b</sup>
		HLA-B not typed (n = 278) %	HLA-B typed (n = 218) %		
<b>Gender</b>				0.85	0.25
Male	67.3	64.4	69.7		
Female	32.7	35.6	30.3		
<b>Ethnicity</b>				0.69	0.46
White	54.8	55.4	57.8		
Mulattoes	29.8	28.8	25.7		
Black	15.0	15.1	16.5		
Other <sup>c</sup>	0.1	0.4	0.0		
NR	0.3	0.4	0.0		
<b>Age (years)</b>				0.18	<0.001
<30	33.9	47.5	39.4		
30–39	37.8	32.0	38.5		
≥40	28.2	20.5	22.0		
NR	0.2	0.0	0.0		
Mean age (s.d.)	34.7 (9.2)	32.0 (9.5)	33.4 (8.8)	<0.001	<0.001
<b>Schooling</b>				0.38	<0.001
Fundamental <sup>d</sup>	51.9	40.6	44.5		
Middle	32.3	36.3	38.1		
Graduation	13.6	22.3	17.4		
NR	2.2	0.7	0.0		
<b>Exposure category</b>				0.49	0.02
MSM/bisexual	35.2	40.6	49.1		
Heterosexual	45.7	54.6	40.8		
IDU	2.5	3.2	1.4		
Other <sup>e</sup>	3.6	4.1	3.2		
NR	12.9	13.8	5.5		

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leukocyte antigen; IDU, injecting drug users; MSM, men who have sex with men; NR, not reported. Bold numbers indicate P-value <0.05. <sup>a</sup>Chi-square test, Fisher's exact test or Mann-Whitney test between HLA-B not typed (n = 278) and HLA-B typed (n = 218). <sup>b</sup>Chi-square test, Fisher's exact test or Mann-Whitney test between unclassified individuals (n = 3313) and all classified individuals, including HLA-B typed and not typed. <sup>c</sup>Other = indigenous (n = 1), oriental (n = 3). <sup>d</sup>Includes illiterate (n = 94). <sup>e</sup>Other = blood transfusion (n = 124), hemophilic (n = 1), vertical transmission (n = 4) and percutaneous exposure (n = 6).

frequency. Another 12 alleles presented moderate frequencies ranging from 2 to 7% and accounted for 48.3% of the overall allele frequency. The remaining 12 alleles had frequencies <2% and accounted for 12.5% of the overall allele frequency. Overall, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was not observed in the distribution of HLA-B genotypes in this population ( $P > 0.05$ ).

Given the miscegenation of the Brazilian population, we first analyzed the difference in frequencies of each HLA-B allele between Caucasian and non-Caucasian (Mulattoes and Black) individuals (Supplementary Table S2, Supplementary Material). Except for HLA-B\*42 (0.4% vs 3.8%, respectively,  $P < 0.02$ ), no statistically significant differences were evident. Therefore, the following analysis of the HLA-B allele frequencies across the three AIDS progression groups were performed without accounting for the ethnic background of the individuals studied (Table 2). In our study, the frequency of the B\*49 allele was higher in the TP group (4.0%) than in the RP group (0.6%,  $P < 0.05$ , odds ratio (OR) = 0.14). On the other hand, the frequency of the B\*48 allele was higher in the LTNP group (5.9%) compared with the RP group (0%,  $P < 0.03$ , OR = 0.00). Notably, the B\*52 allele frequency was higher in the LTNP group (11.8%) than in either the RP group (2.9%,  $P < 0.05$ , OR = 0.22) or the TP group (2.6%,  $P < 0.05$ , OR = 0.27; Table 2). The HIV-1-positive individuals in our study had quite diverse HLA-B genotypes, resulting from the combination of the four more common alleles cited above: B\*15, B\*35, B\*44 and B\*14. Each one

of genotypes B\*15:B\*44 and B\*14:B\*15 were found in five individuals; followed by B\*35:B\*44 and B\*14:B\*44, with four occurrences each one and B\*14:B\*35, presented by three individuals. Only 13 individuals (6.0%) presented with a homozygous genotype (data not shown).

The comparison of the three HLA-B alleles significantly associated to disease progression profiles (Table 2) with their respective frequencies reported for the Brazilian general population (REDOME data set) is presented in Table 3. From this analysis, no statistically significant difference was verified in the overall comparison or stratified by ethnicity (white, black and mulattoes) showing that our studied population matched the HLA-B allelic distribution of the Brazilian population.

#### Survival analysis

In general, the median time between the diagnosis of HIV-1 infection and AIDS development for the 218 evaluated patients was 1816 days (95% confidence interval (CI): 1624–2004 days). The sociodemographic variables identified as having significant differences in the time to AIDS progression were gender ( $P < 0.02$ ), age at date of positive serology ( $P < 0.05$ ) and exposure category ( $P < 0.02$ ). The time until progression to AIDS was significantly different for the clinical variables presence of the B\*48 allele ( $P < 0.05$ , median 4470 vs 1792 days) and presence of the B\*52

**Table 2.** Distribution of HLA-B alleles and statistical comparison of the allele frequencies among the three clinical progression groups from Rio de Janeiro, Brazil (n = 218)

Allele	RPs (2n = 172)		TPs (2n = 230)		LTNPs (2n = 34)		RP vs TP		RP vs LTNP		TP vs LTNP	
	n	af	n	af	n	af	P-value <sup>a</sup>	OR	P-value <sup>a</sup>	OR	P-value <sup>a</sup>	OR
B*07	13	0.075	15	0.065	00	0.000	0.69	1.17	0.13	—	0.23	—
B*08	13	0.075	08	0.035	02	0.059	0.07	2.27	1.00	1.31	0.62	0.58
B*13	01	0.006	05	0.022	00	0.000	0.24	0.26	1.00	—	1.00	—
B*14	08	0.046	21	0.091	02	0.059	0.09	0.49	0.67	0.78	0.75	1.61
B*15	19	0.110	24	0.104	06	0.177	0.84	1.07	0.26	0.58	0.24	0.54
B*18	06	0.035	06	0.026	00	0.000	0.61	1.35	0.59	—	1.00	—
B*27	00	0.000	04	0.017	01	0.029	0.14	0.00	0.17	0.00	0.50	0.58
B*35	23	0.134	23	0.100	02	0.059	0.29	1.39	0.39	2.47	0.75	1.78
B*37	01	0.006	02	0.009	00	0.000	1.00	0.67	1.00	—	1.00	—
B*38	02	0.012	04	0.017	01	0.029	1.00	0.66	0.42	0.39	0.50	0.58
B*39	02	0.012	10	0.044	00	0.000	0.06	0.26	1.00	—	0.37	—
B*40	09	0.052	08	0.035	00	0.000	0.39	1.53	0.36	—	0.60	—
B*41	02	0.012	03	0.013	00	0.000	1.00	0.89	1.00	—	1.00	—
B*42	03	0.017	04	0.017	01	0.029	1.00	1.00	0.52	0.59	0.50	0.58
B*44	18	0.105	23	0.100	02	0.059	0.88	1.05	0.54	1.87	0.75	1.78
B*45	05	0.029	07	0.030	01	0.029	0.94	0.95	1.00	0.99	1.00	1.04
B*47	02	0.012	00	0.000	00	0.000	0.18	—	1.00	—	—	0.00
B*48	00	0.000	03	0.013	02	0.059	0.26	0.00	<b>0.02</b>	0.00	0.13	0.21
B*49	01	0.006	09	0.040	01	0.029	<b>0.04</b>	0.14	0.30	0.19	1.00	1.34
B*50	05	0.029	03	0.013	00	0.000	0.30	2.27	0.59	—	1.00	—
B*51	15	0.087	11	0.048	03	0.089	0.11	1.90	1.00	0.99	0.40	0.52
B*52	05	0.029	06	0.026	04	0.118	1.00	1.12	<b>0.04</b>	0.22	<b>0.04</b>	0.27
B*53	05	0.029	11	0.048	01	0.029	0.34	0.60	1.00	0.99	1.00	1.66
B*56	00	0.000	01	0.004	01	0.029	1.00	0.00	0.17	0.00	0.24	0.14
B*57	06	0.035	08	0.035	03	0.089	0.99	1.00	0.17	0.37	0.16	0.37
B*58	05	0.029	10	0.044	01	0.029	0.45	0.66	1.00	0.99	1.00	1.50
B*67	00	0.000	01	0.004	00	0.000	1.00	0.00	—	0.00	1.00	—
B*81	02	0.012	00	0.000	00	0.000	0.18	—	1.00	—	—	0.00
B*82	01	0.006	00	0.000	00	0.000	0.43	—	1.00	—	—	0.00

Abbreviations: af, allele frequency; HLA, human leukocyte antigen; LTNP, long-term non-progressor; n, observed number of a HLA-B allele; 2n, total number of alleles (allele count); OR, odds ratio; RP, rapid progressor; TP, typical progressor. Bold numbers indicate P-value < 0.05. —, undefined P-value or OR value.  
<sup>a</sup>Chi-square test or Fisher's exact test.

**Table 3.** Allelic frequencies of the three HLA-B alleles significantly associated with disease progression, comparing HIV-1-positive individuals from Rio de Janeiro, Brazil, and Brazilian general population (data from Brazilian Registry of Bone Marrow Donors-REDOME), stratified according to ethnic background

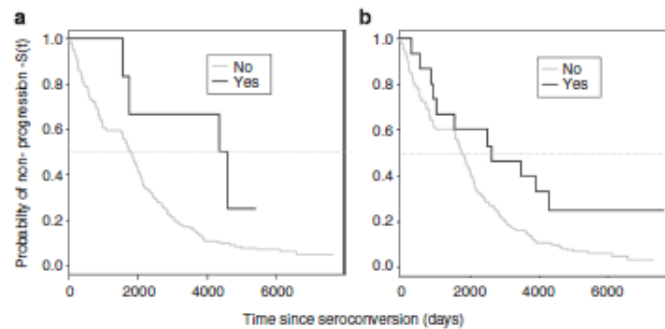
Allele	HIV-1+ individuals (2n = 436 alleles)				Brazilian (REDOME) (2n = 5706717 alleles)				P-value <sup>a</sup>			
	Total (2n = 436)	White (2n = 252)	Black (2n = 72)	Mulattoes (2n = 112)	Total <sup>b</sup> (2n = 5706717)	White (2n = 364014)	Black (2n = 345703)	Mulattoes (2n = 352271)	Total	White	Black	Mulattoes
B*48	0.011	0.012	0.014	0.018	0.007	0.006	0.008	0.009	0.46	0.46	0.48	0.46
B*49	0.025	0.032	0.000	0.027	0.028	0.028	0.027	0.027	0.48	0.48	—	0.50
B*52	0.034	0.036	0.042	0.027	0.020	0.018	0.021	0.022	0.38	0.39	0.43	0.48

Abbreviations: af, allele frequency; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leukocyte antigen; n, observed number of a HLA-B allele; 2n, total number of alleles (allele count); OR, odds ratio. —, undefined P-value. <sup>a</sup>Fisher's exact test. <sup>b</sup>The sum of the observed number of HLA-B alleles (n) in white, black and mulattoes does not correspond to the total number because REDOME data also includes frequencies of alleles in indigenous, oriental and individuals whose ethnicity was not reported. For purposes of comparison with our data broken down by ethnicity, we included only allele frequencies from white, black and mulattoes' individuals.

allele (P < 0.02, median 2618 vs 1775 days), indicating a possible association of these factors with non-progression to AIDS (Figures 1a and b).

In the multivariate analysis, in addition to the variables significantly associated with the risk of progression to AIDS, described above, we also evaluated the variables schooling, presence of the rapid progression allele (B\*35) and presence of the slow progression allele (B\*27/B\*57; Table 4). From this analysis, the variables independently associated with AIDS progression

were gender, age at date of positive serology, presence of the slow progression allele (B\*27/B\*57) and presence of the allele B\*52. Although the variable presence of the B\*48 allele was not significantly associated with AIDS progression (P < 0.08) in the multivariate model, this variable was included in the analysis because it added explanatory power. Controlling for these factors, the risk of developing AIDS was significantly higher among the male patients (hazard ratio (HR) 1.45 (95% CI 1.06–1.97) P < 0.03) who were diagnosed with HIV-1 at a later age (HR 1.02 (95% CI



**Figure 1.** Analysis of disease progression. Kaplan–Meier survival curves for the progression to AIDS from the estimated time of seroconversion stratified by (a) the presence of the B\*48 allele and (b) the presence of the B\*52 allele.

**Table 4.** Bivariate and multivariate analyses of the factors associated with AIDS (n = 218)

Factor	Bivariate		Adjusted model	
	HR	P Wald	HR	P Wald
<b>Sociodemographic characteristics</b>				
<b>Gender</b>				
Female	1 (Ref)		1 (Ref)	
Male	1.47 (1.08; 2.00)	<b>0.01</b>	1.45 (1.06; 1.97)	<b>0.02</b>
<b>Ethnicity</b>				
White	1 (Ref)		1 (Ref)	
Black	0.92 (0.62; 1.36)	0.67		
Mulattoes	0.94 (0.68; 1.31)	0.72		
Age (years)	0.99 (0.99; 1.03)	0.06	1.02 (1.00; 1.03)	<b>0.03</b>
<b>Schooling</b>				
Graduation	1 (Ref)			
Fundamental	0.74 (0.50; 1.10)	0.14		
Middle	0.98 (0.66; 1.46)	0.93		
<b>Exposure category<sup>a</sup></b>				
Heterosexual	1 (Ref)			
MSM/bisexual	1.52 (1.13; 2.04)	<b>0.05</b>		
Other	1.56 (0.80; 3.04)	0.19		
<b>Clinical characteristics</b>				
<b>Presence of the rapid progression allele (B*35)</b>				
No	1 (Ref)			
Yes	1.22 (0.87; 1.70)	0.26		
<b>Presence of the slow progression allele (B*27/B*57)</b>				
No	1 (Ref)		1 (Ref)	
Yes	0.64 (0.40; 1.03)	0.07	0.62 (0.38; 0.99)	<b>0.04</b>
<b>Presence of the B*48 allele</b>				
No	1 (Ref)		1 (Ref)	
Yes	0.37 (0.14; 0.99)	<b>0.04</b>	0.41 (0.15; 1.11)	0.08
<b>Presence of the B*49 allele</b>				
No	1 (Ref)			
Yes	0.81 (0.43; 1.54)	0.53		
<b>Presence of the B*52 allele</b>				
No	1 (Ref)		1 (Ref)	
Yes	0.49 (0.27; 0.90)	<b>0.02</b>	0.48 (0.26; 0.89)	<b>0.02</b>

Abbreviations: HR, hazard ratio; MSM, men who have sex with men; n, number of individuals; ref, reference. Bold numbers indicate P-value ≤ 0.05. <sup>a</sup>12 missing (n = 206).

1.00–1.03)  $P < 0.04$ ). Although no direct association was observed between the B\*27 or B\*57 alleles and the LTNP profile (Table 2), in the adjusted model these alleles were confirmed as protective factors against AIDS progression (HR 0.62 (95% CI 0.38–0.99)  $P < 0.05$ ). The B\*52 allele was found to be a protective factor against AIDS in both the bivariate (HR 0.49 (95% CI 0.27–0.90)  $P < 0.03$ ) and multivariate models (HR 0.48 (95% CI 0.26–0.89)  $P < 0.03$ ).

When selecting the variables to be evaluated in the multivariate model, the variable presence of the rapid progression allele (B\*35) was included although the  $P$ -value (0.26) was  $> 0.20$  in the bivariate analysis. However, no association between this allele and the time to AIDS progression was found using the multivariate model (Table 4). By contrast, the variable exposure category, which was considered significant using the bivariate model, was not evaluated in the adjusted model because it would exclude 12 patients, including 2 from the LTNP group. The final model fit the data properly and was in accordance with the assumptions of Cox model.

**DISCUSSION**

Host genetic factors have been consistently linked to variations in both susceptibility and resistance to HIV-1 infection and disease progression.<sup>1,41–43</sup> In a previous study, we tried to assess the possible association of CCR5 genotypes and HLA-B alleles with the susceptibility or resistance to HIV-1 infection in injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil, but no association was evident.<sup>44</sup> Here we focused on AIDS progression, evaluating the influence of the HLA-B alleles on disease outcome.

The classification of HIV-1-positive individuals based on their AIDS progression profile is not consistent across the studies, mainly because of the different clinical criteria used to distinguish the RP, TP and LTNP groups. Here we defined these three groups of AIDS progressors based on the time from the estimated date of infection to the occurrence of the first AIDS-defining event. AIDS-defining events included a CD4+ T-lymphocyte count below 350 cells mm<sup>-3</sup>, AIDS-defining illness, the initiation of antiretroviral therapy or AIDS-related death. The need to apply a standardized and accepted set of clinical definitions for the purpose of disease stratification has already been emphasized.<sup>45</sup> As a result of the strict inclusion criteria adopted in this study to classify the HIV-positive patients across the three AIDS progression profiles, a high proportion of the individuals included in our databank could not be classified. The major obstacle to classification was the late HIV diagnosis, which is common in our country, as in many other regions.<sup>46–49</sup> This factor impeded the classification of a large number of individuals with a potential TP profile. Similarly, the lack of information about the last negative HIV serology limited the classification of possible RPs in our databank.

The HLA class I locus has been characterized as the main factor influencing the outcome of HIV infection.<sup>21,29</sup> This study presents the first evidence of a significant association between HLA-B\*52 and slower progression to AIDS. This observation contradicts a previous study in which this allele was not associated with either slower or faster AIDS progression.<sup>30</sup> The association of the B52

antigen with resistance to HIV was first described in 1992 by Fabio et al.<sup>51</sup> but since then there has been no other study corroborating this finding. Recently, HLA-B\*52 was linked to a strong effect on viral load during early time points but had no significant effect on the long-term control of HIV-1.<sup>38</sup> This allele has also been described as a protective factor for pulmonary tuberculosis.<sup>52</sup>

We also detected other HLA-B alleles associated with slower progression or non-progression to AIDS that were less striking than that observed for the B\*52 allele. In fact, a possible association between the B\*48 allele and non-progression to AIDS was initially observed in this study but was not confirmed by the multivariate model results. For the HLA-B\*27 and B\*57 alleles, we did not find a direct association with non-progression to AIDS, but a correlation was observed based on the higher frequencies of these alleles in the LTNP group (Table 2) and the confirmation of the protective role of these alleles by the multivariate analysis (Table 4). Thus, we may have lacked the statistical power to detect this association because of the low number of individuals with an LTNP profile in our databank. The protective effect of these alleles on the different aspects of HIV-1 infection has been extensively documented in the literature,<sup>21,24,27,36,37,50</sup> including the potent antiviral immunity conferred by the B\*27 and B\*57 alleles through limiting central memory T-cell infection in LTNP individuals.<sup>53</sup> On the other hand, the previously reported deleterious effect of the HLA-B\*35 allele on disease progression<sup>33,40</sup> was not observed in this study despite the higher frequency of this allele in the RP group (13.4% vs 10.0% in the TP group vs 5.9% in the LTNP group). Unlike our findings for the B\*27 and B\*57 alleles, the multivariate analysis did not confirm the B\*35 allele as a risk factor for AIDS in our study group.

Given the high genetic diversity of the Brazilian population, which is characterized by an elevated degree of miscegenation, it is important to compare the allelic frequencies between Caucasians and non-Caucasians. With the exception of the HLA-B\*42 allele, which was overrepresented in non-Caucasian individuals ( $P < 0.02$ ), all other HLA-B alleles were equally distributed across different ethnicities within the study group. The predominance of HLA-B\*42 in non-Caucasians is consistent with the literature<sup>54</sup> and ethnicity information in the REDOME data set and in the Allele Frequency Net Database.<sup>55</sup>

In conclusion, despite the limitations in the classification of the HIV-1-positive individuals because of unavailable data, this study corroborates the importance of the HLA-B alleles in determining the outcome of HIV-1 infection. Here we have described for the first time the protective role of the B\*52 allele in disease progression and confirmed the association of the B\*27 and B\*57 alleles with the LTNP profile. These results reinforce the hypothesis that HLA class I alleles are key determinants of the host immune response against HIV-1 infection and expand our knowledge of the distribution and effects of these alleles in the Brazilian population, where additional studies examining host genetic characterization in the context of infectious diseases are still needed.

## MATERIALS AND METHODS

### Study group

This retrospective study included HIV-1-seropositive individuals who were undergoing clinical follow-up at Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, from 1986 to 2011 ( $n = 4015$ ) and were registered in the IPEC database. The inclusion criteria for further classification according to the progression profiles were as follows: (1) the patient had been clinically followed up for at least 60 days, (2) HIV-1 infection was diagnosed before 2010 and (3) the patient was >13 years old. Clinical and laboratory data from a total of 3809 individuals that fulfilled these criteria were considered for the stratification of the HIV-1-infected individuals into the three clinical progression profiles: RP (AIDS progression within 3 years of seroconversion;  $\geq 1$  CD4 T-cell measurement

available; time between the negative serological test and the positive serological test <3 years), TP (AIDS progression >4 years after seroconversion;  $\geq 2$  CD4 T-cell measurements  $> 350$  cells  $\text{mm}^{-3}$  before AIDS event) and LTNP (asymptomatic HIV-1 infection for >10 year after seroconversion; all CD4 T-cell measurements  $> 500$  cells  $\text{mm}^{-3}$ ). Biological material was available in the laboratory biorepository for 218 individuals. These samples were used for genetic characterization and subsequent statistical analyses.

For the RP group, the dates of the last seronegative test and the first seropositive test were used to calculate the estimated date of infection (defined as the midpoint of these two dates with a maximum interval of 36 months). For the other groups, when the date of the last seronegative test was not available, the estimated date of infection was calculated as 6 months before the date of the first seropositive test. Time to disease progression was defined as the time elapsed (in days, after conversion to years) between the estimated date of infection and the first AIDS-defining event. An AIDS-defining event included any one of the following: CD4 + T-lymphocyte count below 350 cells  $\text{mm}^{-3}$ , AIDS-defining illness (according to the Brazilian Ministry of Health Guidelines),<sup>56</sup> initiation of antiretroviral therapy or AIDS-related death.

Based on the criteria used to estimate the seroconversion date, we were not able to precisely classify individuals who progressed to AIDS within 3 to 4 years of infection because these individuals were in the threshold between the RP and TP groups after applying the estimated seroconversion criteria. The present work was approved by the FIOCRUZ Ethical Research Committee as an anonymous unlinked study (Ethics Committee CAE: 0002.0.009.000-08).

### DNA extraction

DNA was extracted from whole blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. All DNA samples were stored at  $-20$  °C until the genomic analyses.

### HLA-B typing

The HLA-B typing was performed using a combination of two commercial kits: the INNO LiPA HLA-B Multiplex Plus kit and the INNO LiPA HLA-B Update Plus kit (INNOGENETICS, Ghent, Belgium). The first kit was used to PCR amplify a fragment between the second and fourth exons of the HLA-B locus according to the manufacturer's protocol. After this step, the PCR products were submitted to a hybridization assay using the second kit, which is based on the line probe assay methodology. The identification of the HLA-B alleles was performed using the LIRAS interpretation software, LiPA HLA v6.00 (INNOGENETICS).

### Statistical analyses

Sociodemographic characteristics of the subgroups of individuals were tested by the  $\chi^2$  test, Fisher's exact test or Mann-Whitney test (the most appropriated in each situation). The HLA-B allele frequencies and genotypes were estimated using the PyPop package.<sup>57</sup> Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using the method of Guo and Thompson,<sup>58</sup> which was also performed using PyPop. The frequencies of each HLA-B allele were compared (1) among the three clinical progression groups and (2) between HIV-1-positive individuals and the genomic profile from the Brazilian National Registry of Bone Marrow Donors (REDOME) released in March 2013, which represents a reliable and representative sample of the Brazilian population, with almost 3 million registered donors ([www.imunogenetica.org](http://www.imunogenetica.org)). For all comparisons, a  $\chi^2$  test or Fisher's exact test was performed using the statistics program Epi Info Version 6.<sup>59</sup>

The Kaplan-Meier method and Cox proportional hazards models were used to evaluate the elapsed time from the first HIV-1-positive serology to the progression to AIDS for individuals who could be categorized into one of the three progression groups and for whom HLA-B data were available. Survival curves were described by the Kaplan-Meier estimator, and the categories of each analyzed variable were compared through a log-rank test. For the evaluation of the factors associated with AIDS progression, variables with a significant effect on the HR and an occurrence of the event <20% (based on the Wald test) were evaluated in the model. The models were compared using the likelihood ratio test (analysis of variance). The assumptions of the Cox models and the quality of the adjustment were made, respectively, based on the residuals and coefficient of determination, as well as the likelihood of agreement, to evaluate the discriminatory power and predictive accuracy of the model. All tests were considered

significant if the *P*-value was <0.05. R software version 2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with the Survival library was used to run these analyses.<sup>60</sup>

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (grant number 305592/2010-6) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ (grant number E26/110517/2012).

#### REFERENCES

- Sharma G, Kaur G, Mehra N. Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* 2011; **134**: 749–768.
- Alexander L, Witkop F, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 2000; **74**: 4361–4376.
- Maitani R, Kirchhoff F, Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC, Skowronski J. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1996; **70**: 7752–7764.
- Michaël NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Maitani R, Busch MP et al. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* 1995; **69**: 4228–4236.
- Brumme ZL, Li C, Mium T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ et al. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **56**: 100–108.
- Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooper DJ et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995; **270**: 988–991.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2005; **107**: 4781–4789.
- Ferre AL, Hunt PW, Catchfield JW, Young DH, Morris MM, Garza JC et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 2009; **113**: 3978–3989.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002; **3**: 1061–1068.
- Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Jishi RP, Waeks KA et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008; **29**: 1009–1021.
- Ndhlovu ZM, Proudfoot J, Cesa K, Avino DM, McMullen A, Vine S et al. Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses. *J Virol* 2012; **86**: 6959–6969.
- Saez-Cirion A, Lacabanne C, Lambotte O, Vermisse P, Urrutia A, Boufassa F et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 6776–6781.
- Saez-Cirion A, Siret M, Shin SY, Urrutia A, Vermisse P, Lacabanne C et al. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 2009; **182**: 7828–7837.
- Chevallier MF, Julg B, Pyo A, Randes M, Ransinghe S, Soghoian DZ et al. HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *J Virol* 2011; **85**: 733–741.
- Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao HX, Parks RJ et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 2009; **23**: 897–906.
- Baiblu L, Machmach K, Gas C, Delraissy JF, Boufassa F, Leal M et al. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-alpha and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J Infect Dis* 2012; **206**: 790–801.
- Machmach K, Leal M, Gas C, Viciana P, Genebat M, Franco E et al. Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol* 2012; **86**: 4245–4252.
- Saez-Cirion A, Hamimi C, Bergamaschi A, David A, Vermisse P, Melard A et al. Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers. *Blood* 2011; **118**: 955–964.

- Veillard V, Faucher-Bovendo H, Sami A, Debre P. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**: 564–573.
- Pereyra F, Ja X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, Walker BD et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 2010; **330**: 1551–1557.
- Felby J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007; **317**: 944–947.
- Bailey JR, Williams TM, Silidano RF, Blankson JN. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* 2006; **203**: 1357–1369.
- Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1053–1056.
- Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2709–2714.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Hutley GA, Smith MW, Allamets R et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CXCR3 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996; **273**: 1856–1862.
- Limou S, Le Clerc S, Coulonges C, Carpenter W, Dina C, Delaneau O et al. Genome-wide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genome-wide Association Study 02). *J Infect Dis* 2009; **199**: 419–426.
- Carrington M, Walker BD. Immunogenetics of spontaneous control of HIV. *Annu Rev Med* 2012; **63**: 131–145.
- Trachtenberg E, Korber B, Solars C, Kepler TB, Hraber PT, Hayes E et al. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med* 2003; **9**: 928–935.
- O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet* 2004; **36**: 565–574.
- Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, Johnston MN et al. HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* 2006; **3**: e403.
- Huang X, Ling H, Mao W, Ding X, Zhou Q, Han M et al. Association of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes with HIV-1 infection in Chongqing, China. *BMC Infect Dis* 2009; **9**: 201.
- Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004; **432**: 769–775.
- Gao X, O'Brien TR, Welzel TM, Marti D, Qi Y, Goedert JJ et al. HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS* 2010; **24**: 1835–1840.
- Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; **2**: 405–411.
- Hendel H, Callat-Zucman S, Lebuaneh H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999; **162**: 6942–6946.
- Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, Hecht FM, Lee PK, Vogel M et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2003; **17**: 2581–2591.
- Catano G, Kulkarni H, He W, Marconi V, Agan BK, Landrum M et al. HIV-1 disease-influencing effects associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C alleles are attributable mainly to either HLA-A10 or HLA-B\*57 alleles. *PLoS ONE* 2008; **3**: e3636.
- Antoni G, Guenon J, Maudre C, Sami A, Boufassa F, Goujard C et al. MHC-driven HIV-1 control on the long run is not systematically determined at early times post-HIV-1 infection. *AIDS* 2013; **27**: 1707–1716.
- Klein MR, Keat P, D'Amato J, Bende RJ, Helman A, Mesman B et al. Associations between HLA frequencies and pathogenic features of human immunodeficiency virus type 1 infection in seroconverters from the Amsterdam cohort of homosexual men. *J Infect Dis* 1994; **169**: 1244–1249.
- Gao X, Nelson GW, Kamali P, Martin MP, Phair J, Kaslow R et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1668–1675.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance to some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; **86**: 367–377.
- Samson M, Libert F, Dornaz BJ, Rueler J, Liesnard C, Faber CM et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; **382**: 722–725.



- 43 Matthews PC, Litzgarten J, Carlson JM, Payne R, Huang KH, Fater J et al. Co-operative additive effects between HLA alleles in control of HIV-1. *PLoS ONE* 2012; **7**: e47799.
- 44 Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Morgado MG. Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol* 2009; **9**: 638–642.
- 45 Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, García S et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11079.
- 46 Girardi E, Aloisi MS, Arici C, Pezzotti P, Serraino D, Balzano R et al. Delayed presentation and late testing for HIV: demographic and behavioral risk factors in a multicenter study in Italy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; **36**: 951–959.
- 47 Grangeiro A, Escuder MM, Menezes PR, Alencar R, Ayres de Castilho E. Late entry into HIV care: estimated impact on AIDS mortality rates in Brazil, 2003–2006. *PLoS ONE* 2011; **6**: e14585.
- 48 Kerr LRP, Mota RS, Kendall C, Douado L. HIV infection and late diagnosis among MSM in Brazil. In: *XIX International AIDS Conference 2012 Washington DC, USA, 2012* (abstract MOPE280).
- 49 Ramos Jr NA, Mattia LH, Alencar CH, Hearst N, Heukelbach J. Late-stage diagnosis of HIV infection in Brazilian children: evidence from two national cohort studies. *Cadernos de Saúde Pública* 2013; **29**: 10.
- 50 Kaur G, Mehra N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue Antigens* 2009; **74**: 373–385.
- 51 Fabio G, Souza R, Lazzarin A, Marchini M, Zamantonello M, D'Aminio A et al. HLA-associated susceptibility to HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1992; **87**: 20–23.
- 52 Vijaya LV, Ragh SS, Anu RB, Hari SPV, Pantula V, Jasti S et al. Role of HLA-B51 and HLA-B52 in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol* 2006; **6**: 436–439.
- 53 Descours B, Avettand-Fenoel V, Blanc C, Samri A, Méard A, Supervie V et al. Immune responses driven by protective human leukocyte antigen alleles from long-term nonprogressors are associated with low HIV reservoir in central memory CD4 T cells. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1495–1503.
- 54 Paximada M, Mathebula TY, Gende NL, Vardas E, Colvin M, Gray CM et al. Human leukocyte antigen class I (A, B, C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum Immunol* 2012; **73**: 80–92.
- 55 Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: D913–D919.
- 56 Brazilian Ministry of Health. Criteria for definition of AIDS cases in adults and children (Portuguese). *DST and AIDS National Program Brasília, Brazil, 2004*.
- 57 Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Thomson G, Single RM. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput* 2003: 514–525. Available at: <http://psb.stanford.edu/psb-online/proceedings/psb03/lancaster.pdf>.
- 58 Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; **48**: 361–372.
- 59 Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH et al. *Epi-Info Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers*. 6 edn. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA, 1995.
- 60 Carvalho MS, Andreozzi VL, Codeço CT, Campos DP, Barbosa MTS, Shimakura SE. *Análise de Sobrevida: Teoria e Aplicações em Saúde*. 2a edn, vol. 1. Editora FIOCRUZ: Rio de Janeiro, Brazil, 2011.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Genes and Immunity website (<http://www.nature.com/gene>)