

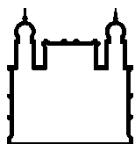
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado *Stricto sensu* em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INATOS HUMANOS NA
ASSOCIAÇÃO HIV/TB: IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGÊNESE DA
TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR EM SUA FORMA GANGLIONAR**

ANDRESSA DA SILVA CAZOTE

Rio de Janeiro
Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Andressa da Silva Cazote

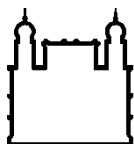
CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INATOS HUMANOS NA ASSOCIAÇÃO HIV/TB: IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGENESE DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR EM SUA FORMA GANGLIONAR

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

Orientadores: Prof. Dr. José Henrique da Silva Pilotto;
Prof. Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp.

RIO DE JANEIRO

Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: Andressa da Silva Cazote

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INATOS HUMANOS NA ASSOCIAÇÃO
HIV/TB: IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE
EXTRAPULMONAR EM SUA FORMA GANGLIONAR**

ORIENTADORES: Prof. Dr. José Henrique da Silva Pilotto
Prof. Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp

Aprovada em: 22/03/2018.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas – Presidente (Laboratório de Imunologia Clínica – IOC/FIOCRUZ-RJ)

Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/Ribeirão Preto)

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues (Laboratório de Imunopatologia - UERJ)

Prof. Dr. Adriano Gomes da Silva (Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacterioses – INI/FIOCRUZ-RJ)

Prof. Dra. Joanna Reis Santos Oliveira (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ-RJ)

Rio de Janeiro, 22 de Março de 2018

Cazote, Andressa da Silva .

Caracterização de linfócitos inatos humanos na associação HIV/TB: implicações na imunopatogênese da tuberculose extrapulmonar em sua forma ganglionar / Andressa da Silva Cazote. - Rio de Janeiro, 2018.
xix, 142f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientador: José Henrique da Silva Pilotto.

Co-orientadora: Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp.

Bibliografia: f. 104-130

1. HIV. 2. Tuberculose. 3. Coinfecções. 4. Células Linfoides Inatas. I.
Título.

Aos meus pais, Edison Antonio Cazote e Aparecida Conceição da Silva Cazote, que tanto apoiaram e incentivaram meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por me conceder o dom da vida e por ter colocado tantos anjos em meus caminhos.

Aos meus orientadores, que tanto me apoiaram durante esses dois anos. À Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp, por todo o carinho, paciência e pela confiança depositada em mim durante esses anos de caminhada científica. Ao Dr. José Henrique Pilotto, pelo apoio e pelas lições. Serei eternamente grata pela oportunidade que me ofereceram. Muito obrigada!

Aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação. Por me darem todas as condições possíveis para que eu estudasse e por embarcarem em todas as minhas “viagens”. Obrigada por tudo, amo muito vocês!

Ao Marcello, pelo amor, amizade, companheirismo, carinho e paciência (muita!), durante todo esse tempo.

À minha família, em especial minhas maravilhosas avós, pelo amor, pelos conselhos e por todo o incentivo.

À equipe do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ, pela força, auxílio, conselhos e momentos de descontração, sobretudo à Bianca, Hury e Karine, que tornaram meus dias mais leves. À Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães, pela oportunidade e confiança.

Aos colaboradores do projeto, no Hospital Geral de Nova Iguaçu - HGNI e no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI/FIOCRUZ, pelo empenho e dedicação que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Dr. Álvaro Bertho e à Thaize Quiroga, da Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (sorting) do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ, por todo o auxílio e disponibilidade durante as aquisições das amostras avaliadas neste estudo.

À Dra. Juliana Matos, pelas sugestões, auxílio e cuidado ao realizar as análises estatísticas deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem nosso convite e pela dedicação do seu tempo à avaliação deste trabalho, em especial ao Dr. Paulo Antas, pelas considerações durante sua revisão.

Aos meus colegas do programa de Medicina Tropical, especialmente à Thamiris, Nathália (e Julinha), Luana, Suellen e Luciana, que me proporcionaram uma caminhada mais alegre e descontraída.

Aos docentes e membros da coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio oferecido aos discentes, em especial à Dra. Martha Suárez-Mutis, pelo cuidado, carinho e incentivo a cada um dos seus alunos.

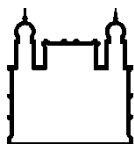
Aos participantes do estudo, especialmente aqueles infectados pelo HIV-1, que, gentilmente, aceitaram doar suas amostras. Sem eles, este trabalho não teria sido possível.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, o qual tive o prazer de fazer parte durante os últimos anos, por toda a infraestrutura disponível para a realização deste estudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro oferecido a mim durante o desenvolvimento deste projeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INATOS HUMANOS NA ASSOCIAÇÃO HIV/TB: IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR EM SUA FORMA GANGLIONAR

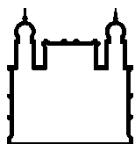
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Andressa da Silva Cazote

A tuberculose (TB) permanece como grave problema de saúde pública mundial, caracterizando-se como a causa principal de óbito entre pessoas com HIV/AIDS. A imunodeficiência característica da infecção pelo HIV-1, com perda de células T CD4⁺ e desestruturação generalizada do sistema imune, impacta significativamente o curso da TB, e predispõem o hospedeiro coinfectado pelo *Mtb* a manifestações extrapulmonares, em especial a ganglionar. Uma vez que as células da imunidade inata possuem papel importante na imunopatogênese da TB e encontram-se alteradas na infecção pelo HIV-1, foi estabelecida a hipótese de participação dessas células na imunopatogênese da TB extrapulmonar, na coinfecção HIV/*Mtb*. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a participação das células NK, iNKT e T $\gamma\delta$, na imunopatogênese da apresentação extrapulmonar de TB em sua forma ganglionar. Como parte de um estudo prospectivo, foram avaliados seis participantes com TB ganglionar coinfectados pelo HIV-1, quinze participantes com TB pulmonar coinfectados pelo HIV-1, e quinze participantes com TB pulmonar mono infectados. A avaliação *ex vivo* do repertório de células NK incluiu moléculas acessórias e receptores inibitórios e de ativação, das famílias KIR, NCR, NKG2, LILR, SLAM, entre outras, por citometria de fluxo multiparamétrica, assim como as células iNKT e T $\gamma\delta$ totais e suas subpopulações. A capacidade funcional das células NK foi investigada *in vitro*, quanto à degranulação citotóxica via CD107a e à produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF. Diferenças de expressão para o repertório de NK foram observadas principalmente entre os participantes coinfectados e aqueles mono infectados pelo *Mtb* ($p \leq 0,05$), independente da manifestação clínica da TB, indicando o impacto da infecção viral na coinfecção. Do mesmo modo, células iNKT ativadas e com perfil Th17 foram mais frequentes entre os participantes TB coinfectados pelo HIV-1, em relação aos *Mtb*-mono infectados ($p \leq 0,01$). As células T $\gamma\delta$ apresentaram uma frequência significativamente menor nos participantes coinfectados com TB ganglionar, em relação àqueles coinfectados com TB pulmonar ($p \leq 0,05$), sugerindo a participação dessas células na patogênese desta manifestação clínica da TB. Por fim, as células NK apresentaram função prejudicada nos três grupos clínicos avaliados, sem qualquer diferença quanto ao potencial de degranulação e expressão de IFN- γ e TNF. O presente trabalho gerou informações importantes quanto ao perfil imune inato na coinfecção HIV/*Mtb*, além de sinalizar uma potencial participação das células T $\gamma\delta$ na imunopatogênese da manifestação extrapulmonar da TB em participantes coinfectados pelo HIV-1.

Palavras-chave: Coinfecção HIV/*Mtb*, células linfóides inatas, imunidade inata, tuberculose extrapulmonar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HUMAN INNATE LYMPHOCYTES CHARACTERIZATION IN HIV/TB ASSOCIATION: IMPLICATIONS ON GANGLIONIC FORM OF EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS IMMUNOPATHOGENESIS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Andressa da Silva Cazote

Tuberculosis (TB) remains a serious worldwide public health problem, and is the leading cause of death among people living with HIV/AIDS. The characteristic HIV-1 immunodeficiency, due to the depletion of CD4⁺ T cells and the generalized immune system disorders, impairs significantly the course of TB, increasing the risk of extrapulmonary TB manifestations among coinfecting HIV/TB patients, especially lymph node TB presentation. Since the cells of innate immunity play an important role in the immunopathogenesis of TB and these cells are impaired in HIV-1 infection, we have hypothesized that innate cells may also participate in the immunopathogenesis of extrapulmonary TB, among HIV/*Mtb* coinfecting patients. In this context, the present work aimed to evaluate the participation of NK, iNKT and $\gamma\delta$ T cells from innate immunity in the immunopathogenesis of the ganglionic form of extrapulmonary TB presentation. Six ganglionic HIV/TB coinfecting patient, fifteen pulmonary HIV/TB coinfecting patients, and fifteen pulmonary *Mtb*-mono-infected subjects were evaluated as part of a prospective study. *Ex vivo* evaluation of the NK cell repertoire included analysis of accessory molecules, and inhibitory and activating receptors belonging to KIR, NCR, NKG2, LILR and SLAM families, by multiparametric flow cytometry. iNKT and $\gamma\delta$ T cells and their subpopulations were also accessed. Cytotoxic degranulation (CD107a) and pro-inflammatory cytokine production (IFN- γ and TNF) were investigated *in vitro* for functional capacities of NK cells. Differences for NK repertoire expression were mainly observed between HIV/TB coinfecting and *Mtb*-mono-infected patients, regardless of TB manifestation, indicating the impact of viral infection. Similarly, activated iNKT cells expressing Th17 profile were significantly more frequent among HIV-1 patients, coinfecting with HIV-1, compared with *Mtb*-mono-infected ($p \leq 0.01$). $\gamma\delta$ T cells was significantly less frequent among HIV/TB coinfecting patients with ganglionic TB presentation than among HIV/TB ones with pulmonary TB ($p \leq 0.05$), suggesting the participation of $\gamma\delta$ T cells in the pathogenesis of extrapulmonary manifestation of TB. Finally, NK cells presented an impaired function and no differences were observed among the three clinical groups evaluated, neither to degranulation potential, nor to expression of IFN- γ and TNF cytokines. The present work generated important information regarding the innate immune profile of HIV/*Mtb* coinfection, signaling the potential participation of $\gamma\delta$ T cells in the immunopathogenesis of extrapulmonary TB manifestation in HIV/TB coinfecting individuals.

Keywords: HIV/*Mtb* coinfection, innate lymphoid cells, innate immunity, extrapulmonary tuberculosis.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia da associação HIV/Tuberculose	1
1.2 Patogenia da Tuberculose	4
1.3 Patogenia da Infecção pelo HIV-1.....	13
1.4 Linfócitos da Imunidade Inata	17
1.4.1 Células “Natural Killer”.....	17
1.4.2 Células “Natural Killer” T Invariantes	29
1.4.3 Células T $\gamma\delta$	32
1.5 Racional	35
2 OBJETIVOSGERAL E ESPECÍFICOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Desenho do estudo	38
3.2 Casuística	38
3.3 Elegibilidade do Estudo.....	39
3.4 Critérios para Definição de Tuberculose Pulmonar e Extrapulmonar.....	40
3.5 Obtenção de Amostras Biológicas para Avaliações <i>Ex Vivo</i> e <i>In Vitro</i>	40
3.6 Caracterização de Parâmetros de Monitoramento da Infecção pelo HIV-1..	41
3.6.1 Contagem dos Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	41
3.6.2 Determinação do Número de Cópias de RNA do HIV-1 no Plasma	41
3.7 Caracterização dos Linfócitos Inatos <i>Ex Vivo</i>	42
3.7.1 Imunofenotipagem das amostras.....	42
3.7.2 Estratégia de Análise dos Linfócitos Inatos <i>Ex Vivo</i>	43
3.8 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico	48

3.9	Ensaio Funcional de Células NK <i>In Vitro</i>	48
3.9.1	Linhagem Celular K562	48
3.9.2	Co-culturas de Células NK com K562	49
3.9.3	Estratégia de Análise das Células NK <i>In Vitro</i>	50
3.10	Análises de Dados	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Análise Inicial da Casuística.....	52
4.2	Caracterização <i>Ex Vivo</i> do Repertório de Células NK.....	55
4.3	Caracterização <i>Ex Vivo</i> das Células iNKT	64
4.4	Caracterização <i>Ex Vivo</i> das Células T $\gamma\delta$	69
4.5	Avaliação Funcional das Células NK <i>In Vitro</i>	77
5	DISCUSSÃO	82
6	PERSPECTIVAS	102
7	CONCLUSÃO	103
8	REFERÊNCIAS	104
9	ANEXOS.....	104
9.1	Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portadores de HIV e Tuberculose	131
9.2	Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portadores de Tuberculose	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro do estabelecimento da infecção pelo <i>Mtb</i> e do desenvolvimento da tuberculose.	5
Figura 2. Estrutura e constituição celular do granuloma tuberculoide.	8
Figura 3. A coinfeção pelo HIV-1 e o <i>Mtb</i> e o risco aumentado de tuberculose ativa e de progressão da infecção pelo HIV-1.	12
Figura 4. Mecanismos propostos para a tolerância e ativação das células NK.	20
Figura 5. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células NK <i>ex vivo</i>	45
Figura 6. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células iNKT <i>ex vivo</i>	46
Figura 7. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células T $\gamma\delta$ <i>ex vivo</i>	47
Figura 8. Protocolo citofluorimétrico para análise funcional das células NK <i>in vitro</i>	50
Figura 9. Distribuição das contagens absolutas dos linfócitos T CD4 ⁺ (céls./mm ³) (A) e da quantificação da carga viral plasmática (Log ₁₀ cópias/mL) (B) dos participantes infectados pelo HIV-1.	55
Figura 10. Distribuição <i>ex vivo</i> de células NK nos três grupos clínicos distintos.	56
Figura 11. Distribuição de expressão <i>ex vivo</i> dos receptores do tipo KIR [CD158a (A), CD158b1,b2,j (B), CD158d (C), CD158e (D), CD158e1,e2 (E), CD158i (F)], receptores do tipo lectina C [CD69 (G), CD161 (H), CD94 (I), NKG2A (J), NKG2C (K), NKG2D (L)], NCRs [NKp30 (M), NKp44 (N), NKp46 (O), NKp80 (P)], entre outros [CD85j (Q), CD160 (R), CD226 (S) e CD244 (T)], em células NK CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺ nos três grupos clínicos distintos.	59
Figura 12. Distribuição <i>ex vivo</i> de coexpressão dos receptores CD226/CD158i (A), CD226/NKG2A (B), CD158i/CD161 (C), CD158i/NKG2A (D), NKp30/NKp46 (E) e CD158d/NKp44 (F) pelas células NK nos três grupos de pacientes clinicamente distintos. .	63
Figura 13. Distribuição <i>ex vivo</i> de células NKT totais nos três grupos clínicos distintos.	64
Figura 14. Distribuição <i>ex vivo</i> de células iNKT nos três grupos clínicos distintos.	65
Figura 15. Distribuição <i>ex vivo</i> das células CD161 ⁺ /CD69 ⁺ nos três grupos clínicos distintos.	66

Figura 16. Distribuição <i>ex vivo</i> das subpopulações CD4 ⁺ /CD8 ⁻ (A), CD4 ⁻ /CD8 ⁺ (B), CD4 ⁻ /CD8 ⁻ (C) e CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (D) de células iNKT nos três grupos clínicos distintos.....	67
Figura 17. Distribuição <i>ex vivo</i> de subpopulações CD4 ⁺ (A) e CD8 ⁺ (B) de células iNKT ativadas nos três grupos clínicos distintos.	68
Figura 18. Distribuição das subpopulações CD4 ⁺ (A) e CD8 ⁺ (B) de células iNKT com perfil Th17 nos três grupos clínicos distintos.	69
Figura 19. Distribuição <i>ex vivo</i> das células T $\gamma\delta$ nos três grupos clínicos distintos.....	70
Figura 20. Distribuição <i>ex vivo</i> de coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 (A), CD158a,h/NKG2D (B), CD158b1,b2,j/CD69 (C) e NKp46/CD69 (D) pelas células T $\gamma\delta$ nos três grupos clínicos distintos.	71
Figura 21. Distribuição <i>ex vivo</i> de células T $\gamma\delta$ V δ 2 ⁺ nos três grupos clínicos distintos.....	72
Figura 22. Distribuição <i>ex vivo</i> dos receptores CD69 (A), NKp46 (B), NKG2D (C), CD158a,h (D) e CD158b1,b2,j (E) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2 ⁺ nos três grupos clínicos distintos.....	74
Figura 23. Distribuição <i>ex vivo</i> da expressão dos receptores CD69 (A), NKp46 (B), NKG2D (C), CD158a,h (D) e CD158b1,b2,j (E) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2 ⁻ nos três grupos clínicos distintos.	75
Figura 24. Distribuição <i>ex vivo</i> de coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 (A) e CD158a,h/NKG2D (B) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2 ⁺ nos três grupos clínicos distintos.....	76
Figura 25. Distribuição <i>in vitro</i> de células NK nos três grupos clínicos distintos.....	77
Figura 26. Distribuição <i>in vitro</i> da expressão de CD107a pelas células NK, na presença (K562) ou em ausência (controle) de estímulo.....	79
Figura 27. Distribuição <i>in vitro</i> da expressão de CD107a pelas células NK, frente ao estímulo com K562.	80
Figura 28. Distribuição da expressão de IFN- γ (A) e TNF (B) intracelular em células NK <i>in vitro</i> , frente ao estímulo em PBMC dos participantes incluídos nos três grupos clínicos distintos.	81
Figura 29. Frequência da expressão de CD107a/IFN- γ (A) e CD107a/TNF (B) em células NK <i>in vitro</i> frente ao estímulo com K562.....	81

Figura 30. Heat map representativo da expressão individual de cada receptor pelas células NK, nos três grupos de pacientes clinicamente distintos..... 92

ÌNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Receptores ativadores e inibit3rios expressos em c3lulas NK.	25
Tabela 2. Definiç3o das populaç3es, subpopulaç3es e mol3culas das c3lulas imunes inatas.....	42
Tabela 3. Distribuiç3o das vari3veis sociodemogr3ficas, imunol3gicas e virol3gica dos tr3s grupos cl3nicos avaliados no estudo.	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADCC Do inglês “Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity” (Citotoxicidade celular dependente de anticorpos);
- AIDS Do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida);
- APC Aloficocianina;
- BCG *Bacillus* Calmette-Guérin;
- cART Terapia antirretroviral combinada;
- CD Do inglês “Cluster of Differentiation”;
- CDC Do inglês “Centers for Disease Control and Prevention” (Centro de Controle e Prevenção de Doenças);
- CEP Comitê de Ética em Pesquisa;
- cm Centímetros;
- CO₂ Gás carbônico;
- DCs Células dendríticas;
- DMEM Do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”;
- DNAM Do inglês “DNAX Accessory Molecule” (Molécula acessória DNAX);
- EC Do inglês “Elite Controllers” (Controladores de elite);
- EDTA Do inglês “Ethylenediaminetetraacetic Acid” (Ácido etilendiamino tetraacético);
- FasL Do inglês “Fas ligand” (Ligante de Fas);
- FcγR III Receptor de baixa afinidade para imunoglobulina gama;
- Fig. Figura;
- FITC Isotiocianato de Fluoresceína;
- FSC Do inglês “Forward Scatter” (Parâmetro que avalia o tamanho celular na citometria de fluxo);
- G Força Gravitacional;
- GALT Do inglês “Gut-Associated Lymphoid Tissue” (Tecido Linfoide Associado ao Trato Gastrointestinal);
- GM-CSF Do inglês “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos);
- h Horas;
- HCMV Do inglês “Human Cytomegalovirus” (Citomegalovírus humano);

HGNI	Hospital Geral de Nova Iguaçu;
HIV-1	Do inglês “Human Immunodeficiency Virus type 1” (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1);
HIV-TBEP	Grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 com apresentação extrapulmonar de tuberculose;
HIV-TBP	Grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 com apresentação pulmonar de tuberculose;
HLA	Do inglês “Human Leukocyte Antigen” (Antígeno leucocitário humano);
IFN γ	Interferon-gamma;
Ig	Imunoglobulina;
IGRA	Do inglês “Interferon Gamma Release Assay” (Ensaio de liberação de IFN γ);
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas;
iNKT	Células “Natural Killer” T invariante;
IOC	Instituto Oswaldo Cruz;
IRIS	Do inglês “Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome” (Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune);
ITAM	Do inglês “Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif” (Motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina);
ITIM	Do inglês “Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif” (Motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina);
KIR	Do inglês “Killer Immunoglobulin-like Receptors”;
LAMP	Do inglês “Lysosomal-associated membrane protein” (Proteínas de Membrana Associadas ao Lisossomo);
LILR	Do inglês “Leukocyte Immunoglobulin (Ig)-Like Receptors” (Receptores de leucócitos tipo imunoglobulinas);
LLT1	Transcrito semelhante à lectina 1;
LPS	Lipopolissacarídeo;
LTNP	Do inglês “Long-Term Non Progressor” (Não-progressores de longo termo);
MHC	Do inglês “Major Histocompatibility Complex” (Complexo Principal de Histocompatibilidade);
min	Minutos;
mL	Mililitros;

mm	Milímetros;
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ;
n	Número;
NA	Não aplicável;
NCAM-1	Do inglês “Neural Cell Adhesion Molecule 1” (Molécula de adesão neural);
NCR	Do inglês “Natural Cytotoxicity Receptors” (Receptores de Citotoxicidade Natural);
NK	Células “Natural Killer”;
°C	Graus Celsius;
OMS	Organização Mundial da Saúde;
PBMC	Do inglês “Peripheral Blood Mononuclear Cells” (Células Mononucleares do Sangue Periférico);
PBS	Do inglês “Phosphate Buffered Saline” (Tampão Fosfato Salino);
PE	Ficoeritrina;
PercP	Peridina-clorofila;
PFA	Paraformaldeído;
pH	Potencial de hidrogênio;
PPD	Do inglês “Protein Purified Derivative” (Derivado Proteico Purificado);
RNA	Ácido ribonucleico;
RPMI	Meio de Cultura “Roswell Park Memorial Institute”;
SFB	Soro fetal bovino;
SLAM	Do inglês “Signaling Lymphocytic Activation Molecule”;
SSC	Do inglês “Side Scatter” (Parâmetro que avalia a granularidade celular na citometria de fluxo);
TA	Temperatura Ambiente;
TB	Tuberculose;
TBEP	Tuberculose extrapulmonar;
TBP	Grupo de indivíduos não infectados pelo HIV-1, com Tuberculose Pulmonar;
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
TCR	Do inglês “T-Cell Receptor” (Receptor de células T);
Th	Do inglês “T helper” (Linfócitos T auxiliares);
TLR	Do inglês “Toll-like receptor” (Receptor do tipo Toll);

TNF Do inglês “Tumor Necrosis Factor” (Fator de necrose tumoral);
U Unidades;
UF Unidade da Federação;
ULBP Do inglês “UL16 Binding Protein” (Proteína ligante de UL16);
vs *Versus*;
WHO Do inglês “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde);
YINM Tyr-Ile-Asn-Met;
μL Microlitros.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da associação HIV/Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das doenças infectocontagiosas mais antigas da humanidade, tendo como principal agente causador o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), detectado em múmias egípcias datadas de cerca de 2000 a.C., o que indica que esta doença vem acometendo a humanidade há muitos séculos (Zink et al. 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, aproximadamente, 20 a 40% da população mundial se encontre acometida por esta infecção, com uma estimativa de 10,4 milhões de casos novos em 2016. Dentre esses, cerca de 10% consistem de indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1), 87% deles sob terapia antirretroviral combinada altamente ativa (cART) (WHO 2017), indicando que a cART *per se* não é suficiente para evitar a TB nessa população (Kufa et al. 2014). Soma-se a essa estatística, no mesmo ano, 1,3 milhão de mortes por TB entre indivíduos soronegativos para o HIV-1, além de 374.000 mortes entre aqueles infectados pelo HIV-1. A TB é reconhecida pela OMS como a nona causa principal de morte no mundo e, há cinco anos, tem sido classificada como a doença infecciosa mais letal, à frente do HIV/AIDS (WHO 2017).

No Brasil, a TB permanece como um importante problema de saúde pública, tornando o país parte da lista dos 20 países com os maiores índices de casos de TB no mundo, os quais juntos corresponderam a 84% da incidência global da doença registrada no ano de 2016 (WHO 2017). Além disso, o Brasil responde por 33% de todos os casos de TB nas Américas. Em 2016, o país registrou 69.509 casos novos e 13.213 casos de retratamento de TB, além dos 4.543 óbitos associados à infecção registrados no ano anterior (Boletim Epidemiológico 2017a e 2017b). Entre as Unidades da Federação (UF) observa-se uma variação ampla do risco de adoecimento por TB, com o registro entre 10,5 casos por 100 mil habitantes no Distrito Federal, e de 67,2/100 mil habitantes no Amazonas, frente a uma média nacional de 32,4/100 mil habitantes, observada em 2016. Neste cenário, o estado do Rio de Janeiro apresenta um destaque lamentável, com um coeficiente de incidência de 61,2/100 mil habitantes, registrado no mesmo período para a UF, e de 84,2/100 mil habitantes para a capital, colocando o estado entre as nove UFs acima do registro nacional (Boletim Epidemiológico 2017). Em adição, a cidade do Rio de Janeiro apresentou um coeficiente de mortalidade de 6,5 óbitos a cada 100 mil

habitantes, o segundo maior do país. De fato, a região metropolitana do Rio de Janeiro é considerada endêmica para TB (Rodrigues et al. 2017).

A TB é uma doença relacionada à pobreza, associada com frequência à marginalização social e à privação financeira. No entanto, o principal fator de risco para o desenvolvimento da TB é a infecção concomitante pelo HIV-1, sendo ainda atribuída à TB uma parcela significativa da mortalidade associada ao HIV/AIDS (Ford et al. 2015). A infecção pelo HIV-1 impacta a incidência de TB de modo significativo, pois aumenta em até 20 vezes o risco de desenvolvimento de doença ativa, tanto pela reativação de infecção latente pelo *Mtb*, como pela recidiva da doença e pelo aumento da susceptibilidade à reinfeção (Pawlowski et al. 2012).

Em 2016, um total de 476.774 casos de TB foi notificado entre pessoas vivendo com HIV/AIDS no mundo, o que correspondeu a 46% do número de casos estimados para o mesmo ano (WHO 2017). No Brasil, dos 76,3% dos casos novos de TB submetidos à testagem para HIV-1, 9,4% revelaram a associação HIV/TB, enquanto o percentual de HIV/TB nos casos de retratamento da TB foi de 17,8%, quase duas vezes maior, e correspondendo a 2.345 registros (Boletim Epidemiológico 2017b). No estado do Rio de Janeiro, dentre os casos novos de TB diagnosticados em 2016, a associação HIV/TB foi observada em 8,9% dos casos, enquanto este valor subiu para 10,3% considerando-se os dados da capital (Boletim Epidemiológico 2016).

Pessoas vivendo com HIV/AIDS são mais vulneráveis à TB, sendo esta a causa principal de óbito definida entre as doenças infecciosas nesse grupo. A infecção pelo HIV-1 atinge hoje cerca de 36,7 milhões de indivíduos em todo o mundo, com a contabilização de 1,8 milhão de casos novos em 2016, e de 1,0 milhão de óbitos relacionados à AIDS (UNAIDS 2017). No Brasil, apenas nos seis primeiros meses de 2017, foram notificados 16.371 casos novos de infecção pelo HIV-1, enquanto 12.366 indivíduos vieram a óbito ao longo de 2016 (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2017). O estado do Rio de Janeiro foi responsável por cerca de 10-12% desses números, registrando 1.601 casos novos de infecção no mesmo período de 2017, e 1.721 óbitos em 2016, por AIDS como causa básica (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2017).

A coinfeção HIV/*Mtb* se estabelece como uma entidade patológica distinta das infecções isoladas, permitindo o desenvolvimento de quadros clínicos atípicos

àqueles observados em indivíduos mono infectados. De acordo com os dados da OMS, 15% dos casos notificados de TB no mundo em 2016 referiam-se a casos extrapulmonares de TB (WHO 2017). De fato, embora a TB seja uma doença de disseminação ampla, especialmente em países em desenvolvimento, sua manifestação como doença extrapulmonar ocorre em menor frequência. O Brasil segue a mesma tendência mundial, uma vez que formas clínicas de TB extrapulmonar (TBEP) têm sido observados em cerca de 13% dos pacientes com TB (Gomes et al. 2014).

Porém, estas ocorrências aumentam consideravelmente nos casos de coinfeção pelo HIV-1, incluindo apresentações graves que envolvem o sistema nervoso central (Jaryal et al. 2011; Spalgais et al. 2013). De fato, dados do Ministério da Saúde mostram que 21% (1.403 indivíduos) dos casos novos de TB em indivíduos infectados pelo HIV-1, notificados em 2016, apresentaram formas de TBEP, uma frequência 6% maior que aquela observada em ausência de infecção pelo HIV-1 (Boletim Epidemiológico 2017b). Além disso, em um estudo recente realizado pelo nosso grupo, no qual foram avaliados indivíduos HIV/TB, as apresentações extrapulmonares da TB, incluindo TB disseminada, foram observadas em 56% dos indivíduos avaliados, mostrando como a infecção pelo HIV-1 impacta de modo significativo o curso da TB (da Silva et al. 2017).

Apesar da considerável redução da incidência de TB entre pacientes soropositivos para o HIV em tratamento com cART, estudos realizados, inclusive por nosso grupo colaborador, mostraram ainda uma prevalência do HIV-1 de 19% em pacientes com TB (do Prado et al. 2014) e sugerem que a infecção pelo HIV-1 ainda tenha um impacto substancial na mortalidade por TB, no contexto do amplo acesso à cART e na prevalência da doença (Schmaltz et al. 2009).

Os perfis epidemiológicos da TB e da infecção pelo HIV-1 no Brasil têm propiciado sua sobreposição, em especial nos grandes centros urbanos, envolvendo as capitais federativas (Ministério da Saúde 2017). Nestes locais são observadas condições bastante favoráveis à transmissão de ambos os agentes etiológicos, em função de questões culturais, marginalização, exploração econômica e a expressiva concentração demográfica, em áreas onde o saneamento é inadequado, há falta d'água, e as condições de moradia, alimentação e transporte são precários. As

idades da região metropolitana do Rio de Janeiro, com suas comunidades e periferias carentes, são cenários potenciais para a associação HIV/TB.

1.2 Patogenia da Tuberculose

A transmissão do *Mtb* ocorre, via de regra, por inalação dos bacilos e, portanto, pelas vias aéreas (Förtsch et al. 2000). Logo, o pulmão é o principal órgão acometido pela infecção (Bethlem 2012). Indivíduos com TB pulmonar ativa podem eliminar bacilos de *Mtb* suspensos em aerossóis, através da tosse ou mesmo da fala. Essas partículas com potencial infectante são passíveis de serem inaladas e alcançarem os pulmões de outros indivíduos sadios presentes no mesmo ambiente, caracterizando uma nova infecção, dita primária. Indivíduos com TB cavitária no pulmão são fontes majoritárias de infecção, sendo responsáveis pela transmissão da doença em seu ambiente social (Gadkowsk & Stout 2008).

Frente à inalação dos bacilos, a probabilidade da infecção de fato ocorrer, bem como desta evoluir para TB ativa *per se*, é modulada por fatores ligados às características do bacilo e a fatores imunes do hospedeiro (Narasimhan et al. 2013). Este conceito foi sintetizado por Rich em 1951, através de uma fórmula matemática, a qual estabeleceu que a probabilidade da infecção tuberculosa evoluir para doença ativa é diretamente proporcional ao inóculo, considerando o número de bacilos infectantes, à sua virulência e à reação de hipersensibilidade que ela provoca, e inversamente proporcional às resistências natural e adquirida do organismo infectado (revisto por Coelho Filho et al. 2013). Portanto, a resposta imune é fundamental nesse processo.

Em indivíduos assintomáticos, a infecção é dita latente e o bacilo permanece contido e sob o controle da resposta imune. A única evidência da transmissão bem sucedida e de infecção efetiva é dada pelo desenvolvimento de resposta imunológica específica, a qual pode ser identificada pela positividade ao teste tuberculínico (PPD - Derivado Proteico Purificado), o que ocorre entre duas a oito semanas após a infecção (CDC 2013).

Cerca de 10% dos indivíduos da população com infecção latente desenvolvem TB ativa logo no primeiro ano pós-infecção, ou em algum momento ao longo da vida, seja pelo não controle da infecção primária ou pela reativação

posterior dos bacilos quiescentes adquiridos naquele momento, ou ainda menos frequentemente, por reinfeção (Maher 2010; WHO 2017).

No entanto, esta divisão clínica simplista da infecção pelo *Mtb*, que classifica a TB em ativa e latente, não contempla a real complexidade da patogenia desta infecção. Designada de modo geral como a contenção do bacilo em sua forma inativa, a TB latente inclui desde casos de depuração completa do *Mtb*, à incubação de bactérias ativamente replicantes em ausência de sintomas clínicos (Young et al. 2009).

Nesse contexto, a infecção pelo *Mtb* pode ser descrita mais adequadamente através de um espectro contínuo envolvendo a resposta imune ao patógeno, o qual se estende de uma imunidade capaz de esterilizar a infecção, ao desenvolvimento da doença ativa subclínica e da doença clinicamente ativa, como apresentado na Figura 1 (Barry 3rd et al. 2009).

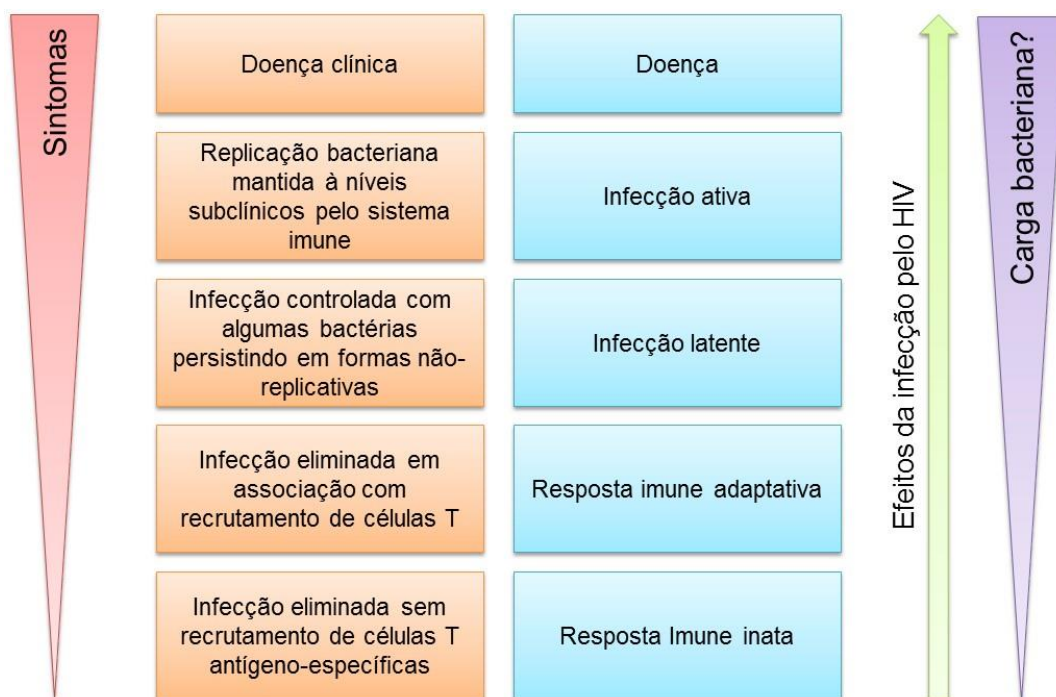


Figura 1. Espectro do estabelecimento da infecção pelo *Mtb* e do desenvolvimento da tuberculose.

A infecção pelo *Mtb* pode ser caracterizada dentro de um amplo espectro de acordo com o envolvimento da resposta imune. Este espectro abrange desde a resposta imune eficaz no controle do patógeno, passando pela apresentação subclínica da doença até a apresentação da doença ativa, incluindo as denominações convencionais de infecção latente ou ativa. Os sintomas da tuberculose manifestam-se de acordo com a progressão da infecção, sendo a infecção pelo HIV um fator de impacto negativo ao curso da tuberculose. Adaptada de Barry 3rd et al. 2009.

Nesse modelo é interessante observar o envolvimento inicial da imunidade inata no bloqueio do estabelecimento do *Mtb* (Förtsch et al. 2000). Frente à inalação dos aerossóis com uma carga bacteriana suficientemente capaz de transpassar as barreiras físicas da mucosa pulmonar, a exposição ao *Mtb* segue com o contato entre os bacilos e os macrófagos alveolares, os quais reconhecem a micobactéria através de um amplo sistema de receptores capazes de identificar diferentes estruturas microbianas, ingerindo o *Mtb* (Förtsch et al. 2000). Essas células possuem toda uma gama de mecanismos antimicrobianos autônomos, mas que podem ser evadidos pelo *Mtb*. O pender da balança para a capacidade microbicida da célula ou para os fatores de virulência da micobactéria será o definidor do curso da infecção. As células dendríticas (DCs), com sua multiplicidade de receptores capazes de reconhecer o *Mtb*, também fazem parte dos primeiros tipos de células residentes dos alvéolos a entrarem em contato com a micobactéria, e no interior das quais essas também são capazes de se replicar (Förtsch et al. 2000). Esse encontro inicial é importante para o posterior desencadeamento da resposta imune adaptativa contra o *Mtb*, caso seja necessário frente à persistência do patógeno.

Os macrófagos alveolares fagocitam a micobactéria, e produzem quimiocinas responsáveis pela atração das células inflamatórias da primeira linha de defesa, como neutrófilos, macrófagos derivados de monócitos, células “natural killer” (NK) e T $\gamma\delta$, que dão início à formação de uma espécie de granuloma inato (revisto por Ehlers & Schaible 2012). A contenção e eliminação do *Mtb* podem ocorrer nessa fase, sem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Förtsch et al. 2000). Este fato pode ser observado em 20-25% dos indivíduos que foram expostos à TB, os quais não desenvolveram nenhum sinal de memória imunológica contra o *Mtb*, apresentando resultados negativos aos testes auxiliares no diagnóstico de TB ativa e latente, como PPD e o ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA), que identificam exclusivamente elementos da resposta imune adaptativa, sugerindo que a eficácia da resposta imune inata desses indivíduos exclua a necessidade da resposta imune adaptativa (Revisto por Verral et al. 2014). Ainda, em modelos experimentais de infecção por *Mtb* através de aerossóis, é possível que ocorra a formação do granuloma em ausência completa de imunidade específica (Smith et al. 1997). Neste contexto, é indiscutível a participação decisiva da resposta imune inata no não estabelecimento eficaz da infecção ou na pré-latência da TB (Bozzano et al. 2014).

Assim, cabe levantar a hipótese de participação da resposta imune inata de memória ou “imunidade treinada” nesse processo, um conceito recente que envolve a participação de macrófagos e células NK, capazes de otimizar a resposta imune de modo inespecífico (Netea et al. 2016).

O conceito de “imunidade treinada” tem ganhado destaque no cenário da pesquisa, especialmente em vegetais, animais invertebrados e mamíferos. A “imunidade treinada” é induzida após infecção primária ou vacinação, e confere proteção contra infecções secundárias e proteção cruzada contra outras infecções, através de mecanismos independentes das respostas de células T e B. O mecanismo celular que medeia a resposta imune inata de memória resulta no reconhecimento de patógenos através de um amplo painel de receptores e no aumento da resposta imune inflamatória protetora (Kleinnijenhuis et al. 2015). Estudos demonstram que a vacina BCG é capaz de conferir imunidade protetora contra infecções secundárias por *Candida albicans* ou *Schistosoma mansoni*. Ainda, células NK de indivíduos imunizados com BCG demonstram maior produção de citocinas próinflamatórias frente à infecções micobacterianas (Revisto por Netea et al. 2016).

Quando a resposta imune inata é insuficiente para a destruição do patógeno e há a manutenção da infecção, um ambiente inflamatório é estabelecido, acompanhado pela remodelação tecidual e pelo desencadeamento da resposta imune adaptativa (revisto por Ehlers & Schaible 2013). Ao longo do tempo, as células se agrupam progressivamente em um agregado compacto e organizado de macrófagos maduros de diferentes fenótipos, cercado por fibroblastos e intercalados por neutrófilos, DCs e células NK, e por células B, células T CD4⁺, as quais correspondem entre 60 e 70% dos linfócitos T (Randhawa 1990), e células T CD8⁺, caracterizando o granuloma tuberculoide clássico (Fig. 2).

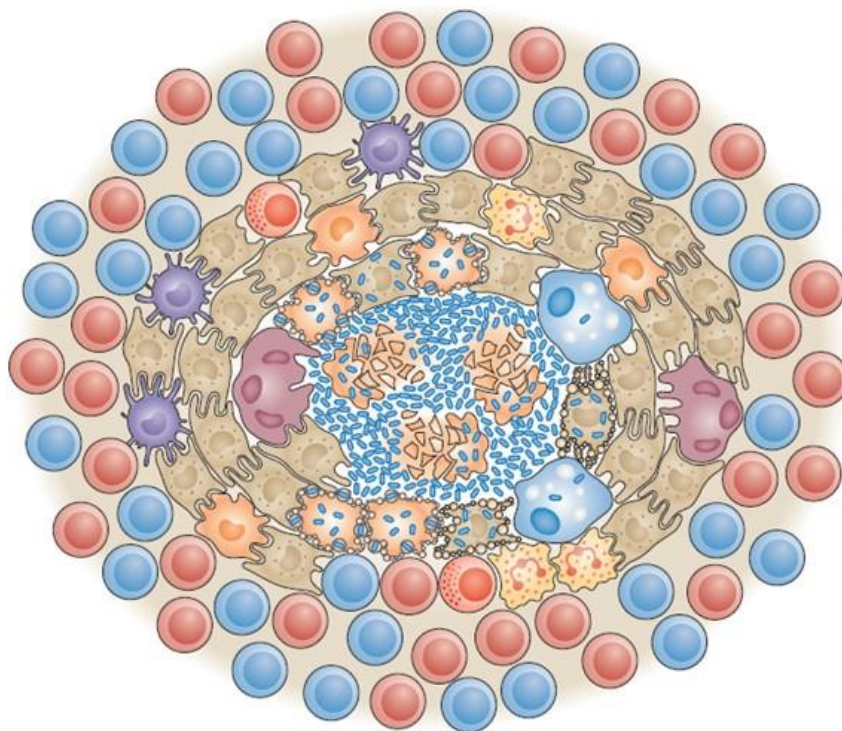
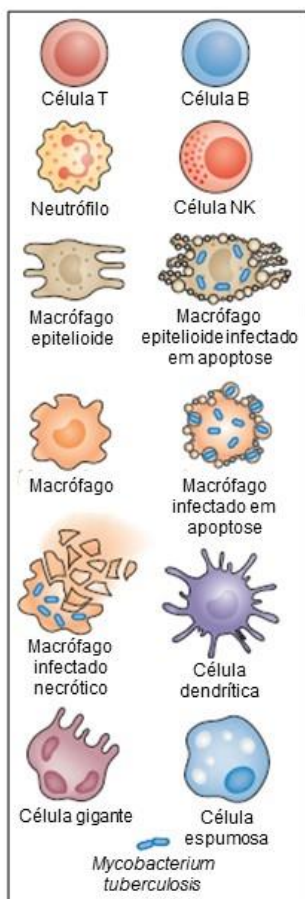


Figura 2. Estrutura e constituição celular do granuloma tuberculoso.

Inicialmente, o granuloma tuberculoso é constituído de macrófagos maduros, que podem fundir-se, formando grandes células multinucleadas ou diferenciar-se em células espumosas. Ainda, podem sofrer transformação, tornando-se células epitelioides. Células como: neutrófilos, células dendríticas, células T e B, células *Natural Killer*, fibroblastos e células que secretam componentes da matriz extracelular, são constituintes da estrutura granulomatosa. Adaptado de Ramakrishnan 2012.

Por volta de seis a oito semanas após a infecção, as DCs que migraram para os nódulos linfáticos e tornaram-se eficientes na apresentação de antígenos, o que não acontece no início da infecção, ativam e recrutam os linfócitos T. Linfócitos T ativados migram, então, para o sítio de infecção, onde o granuloma inato se encontra, ativando os macrófagos, tornando-os capazes de destruir o *Mtb* presente em seu interior (Ulrichs & Kaufmann 2006; Egen et al. 2011). Portanto, é a ativação contínua das células T na manutenção do granuloma que marca o estágio de latência da TB, com a persistência da infecção, na qual o crescimento e a disseminação dos bacilos para outros tecidos são limitados (Ulrichs & Kaufmann 2006). Desse modo, mais de 90% das pessoas infectadas permanecem assintomáticas, embora o *Mtb* sobreviva no interior dos macrófagos.

Estudos em peixe-zebra (*Danio rerio*), um modelo experimental animal cada vez mais utilizado em substituição a camundongos, mostraram que após a administração de *Mycobacterium marinum* em baixas concentrações, a micobactéria replica livremente em macrófagos, e muitos outros macrófagos não infectados são ativamente recrutados para a área em torno das células infectadas (Davis et al. 2002). Esses macrófagos não apenas funcionam como células de sustentação para o granuloma surgente, mas evidências apoiam a ideia de que esta formação inicial beneficia o crescimento e expansão populacional da micobactéria, ao funcionarem como fontes adicionais de infecção. Seguindo-se à replicação inicial das micobactérias no macrófago, estas são liberadas no espaço intracelular através da morte da célula infectada, sendo rapidamente ingeridas pelos macrófagos presentes ao redor (Davis & Ramakrishnan 2009). Além disso, nessa fase de formação do granuloma, uma fração dos macrófagos infectados pode se desprender do granuloma e iniciar infecção em locais distantes. De fato, o monitoramento da infecção em peixe-zebra mostrou que essas células deixam o granuloma primário e participam do estabelecimento de granulomas secundários em outros sítios, por via hematogênica, sendo assim a principal fonte de disseminação durante a infecção (Davis & Ramakrishnan 2009).

Outros fagócitos também podem estar envolvidos na internalização e transporte de micobactérias a partir do sítio primário nos pulmões. As DCs são candidatas importantes nesse processo, dado seu papel no transporte de antígenos da periferia aos órgãos linfoides secundários para o desencadeamento da resposta imune adaptativa (Banchereau et al. 2000). Essas células fagocitam as micobactérias e fornecem um ambiente favorável à sobrevivência e ao crescimento intracelular, em particular por essas células serem menos eficientes em sua destruição que os macrófagos (Krishnan et al. 2010). Portanto, o *Mtb* pode utilizar-se do tráfego das células fagocíticas profissionais como meio de disseminação para gânglios linfáticos regionais e também para outros órgãos, evento chave na patogênese da TB (Krishnan et al. 2010). No entanto, os mecanismos envolvidos na disseminação ou na contenção e controle do *Mtb* no pulmão, bem como no estabelecimento de outros sítios, permanecem sem elucidação (Krishnan et al. 2010).

A TB extrapulmonar é definida, de acordo com critério de classificação da OMS, como a infecção pelo *Mtb* na qual são afetados tecidos e órgãos fora do

parênquima pulmonar, como resultado da disseminação linfática ou hematogênica da micobactéria (WHO 2013). A TB pode ocorrer em qualquer órgão fora dos pulmões, cujas manifestações podem ser mais ou menos graves.

A apresentação mais grave é a chamada TB miliar, a qual se refere a uma forma progressiva e amplamente disseminada da doença, que implica na disseminação hematogênica para vários órgãos, sendo mais afetados fígado, baço, nódulos linfáticos, meninges, medula óssea e glândulas adrenais. No entanto, a apresentação mais frequente de TBEP é a TB ganglionar (63-77%), sendo os gânglios cervicais os mais comumente afetados, embora linfadenopatias supraclavicular, torácica, abdominal e axilar também sejam frequentemente observadas (Salvador et al. 2015). Um terço dos pacientes com a apresentação ganglionar possui histórico familiar de TB (Sánchez et al. 2015).

Os sinais e sintomas clínicos observados nas manifestações extrapulmonares de TB variam de acordo com o órgão acometido. Estes sinais e sintomas podem compreender febre, aumento de fistulização das cadeias ganglionares, dispneia, acúmulo de líquido nos folhetos pleurais, meningite, entre tantos outros (Ministério da Saúde 2011). Habitualmente, os indivíduos que desenvolvem TB ganglionar são assintomáticos, sendo o quadro clínico caracterizado pelo aumento de um ou mais gânglios cervicais, que podem permanecer indolores de semanas a anos, quando começam a apresentar sinais de inflamação (Sánchez et al. 2015).

As apresentações de TB ganglionar geralmente envolvem comprometimento unilateral, sem implicação sistêmica, e as afecções do mediastino associam-se com maior frequência à forma pulmonar da doença (Revisto por Ramirez-Lapausa et al. 2015). Os gânglios afetados desenvolvem-se lenta e progressivamente, adquirindo aspecto de massas multilobuladas, com consistência firme e aderidas a planos mais profundos, podendo ser confundidas com processos malignos (Sánchez et al. 2015). Eventualmente, pode apresentar necrose ou produzir sintomas inflamatórios, como ulceração, formação de fístulas e escrófula. Ainda, o inchaço local pode comprimir estruturas vizinhas, resultando em sua obstrução (Revisto por Ramirez-Lapausa et al. 2015).

No geral, as apresentações de TBEP têm resultado negativo à baciloscopia de escarro e, por isso, seu impacto na transmissão é reduzido (Ministério da Saúde 2011; Bethlem 2012). Por outro lado, seu diagnóstico não é simples, sendo

frequentemente demorado e tardio, o que implica no aumento da morbidade e da mortalidade dos indivíduos acometidos, podendo ainda ser a causa direta de complicações, sequelas e deficiências ao longo da vida. É dependente de forte suspeição clínica, uma vez que sinais e sintomas podem ser relativamente vagos e associados à radiografia torácica normal, além de baciloscopia de escarro negativa. Além disso, envolve exames invasivos, com a sementeira direta do tecido extraído de biópsias ou de outro material biológico (Bethlem 2012).

Testes como PPD e IGRAs também são utilizados na TBEP, embora apenas os segundos permitam diferenciar entre indivíduos infectados pelo *Mtb*, os vacinados com BCG e aqueles infectados por micobactérias atípicas. Além serem incluídos controles, evitando resultados falso-negativos. Embora esses testes deem suporte ao diagnóstico da doença, os resultados negativos não excluem a possibilidade de TBEP, visto que mais de 68% dos casos podem apresentar testes negativos (Mert et al. 2001). Na TBEP, exames de imagem também podem auxiliar no diagnóstico, frente à dificuldade inerente na obtenção de amostras microbiológicas, e na realização de biópsias (González-Martin et al. 2010).

No entanto, o diagnóstico definitivo requer a detecção do *Mtb*, por baciloscopia e/ou cultura microbiológica, o que se faz realmente efetivo com amostras obtidas a partir de biópsias (sensibilidade >70-80%), mas não exatamente de fluidos biológicos (sensibilidade 2-50%). As biópsias são geralmente realizadas por aspiração com agulha fina, ou mesmo requer excisão cirúrgica do tecido, sendo, portanto, um procedimento invasivo, o qual nem sempre é possível de ser realizado pela dificuldade de acesso à lesão suspeita (Ramírez-Lapausa et al. 2015).

Para a TB ganglionar, a biópsia do gânglio sugestivo, aspirativa e/ou cirúrgica, é o procedimento realizado como parte da rotina de investigação da TBEP, o qual apresenta sensibilidade de 80% e menor frequência de resultados inconclusivos. No entanto, a caracterização de biomarcadores circulatórios associados à TB ganglionar, com potencial para identificar os casos de TB ganglionar, seria de grande auxílio no diagnóstico e no manejo menos invasivo dos pacientes acometidos (Ramírez-Lapausa et al. 2015).

Entre os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de TBEP estão a idade, comorbidades, como doença renal crônica, diabetes mellitus, doenças/condições imunossupressivas, e, principalmente, a coinfeção pelo HIV-1.

De fato, a coinfeção pelo HIV-1 é o principal fator de risco conhecido para a progressão da infecção pelo *Mtb* para doença ativa (Fig. 3), aumentando o risco de reativação da TB latente e a ocorrência de TBEP (Jaryal et al. 2011; Pawlowski et al. 2012; Spalgais et al. 2013). Tanto a TB como o HIV-1 têm efeitos profundos no sistema imunológico, pois são capazes de desestruturar as respostas imunes do hospedeiro através de mecanismos que ainda não estão totalmente compreendidos.

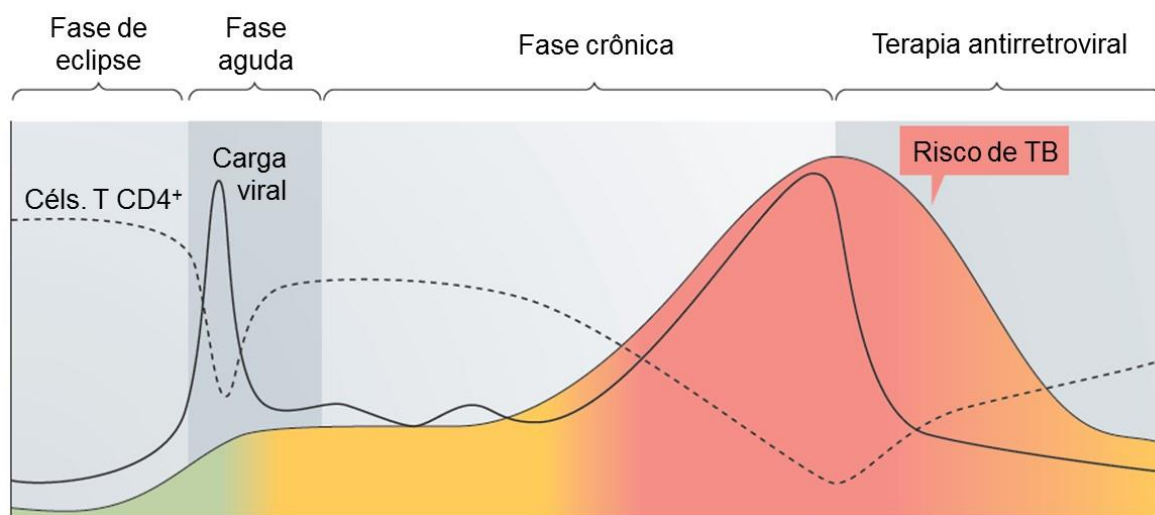


Figura 3. A coinfeção pelo HIV-1 e o *Mtb* e o risco aumentado de tuberculose ativa e de progressão da infecção pelo HIV-1.

Em indivíduos infectados pelo HIV-1, o risco de desenvolvimento da tuberculose aumenta de acordo com a progressão da infecção viral, representado em verde (risco reduzido), amarelo (risco mediano) e vermelho (risco aumentado). O grau de imunodeficiência é um dos principais fatores de impacto para o desenvolvimento das formas ativas de tuberculose. Ainda, o início da terapia antirretroviral pode resultar na rápida reconstituição imune em alguns indivíduos, fator que pode favorecer o surgimento de casos de TB *unmasked*. Adaptado de Bell & Noursadeghi 2018.

O *Mtb* é um patógeno intracelular facultativo de macrófagos, e uma vez no interior dessas células, é capaz de rapidamente se adaptar ao ambiente do fagossomo, como por exemplo, reprogramando sua respiração para anaeróbia (Schnappinger et al. 2003). Macrófagos contendo *Mtb* no interior de seus fagossomos falham em promover o amadurecimento normal e acidificação associados à fusão fagolisossomal. Múltiplos fatores de virulência do *Mtb* parecem contribuir com o estabelecimento desse fenótipo alterado, subvertendo esse mecanismo imune dos macrófagos (Peddireddy et al. 2017). Outro evento relacionado ao mecanismo de virulência do patógeno e ao escape imune é a translocação do *Mtb* do fagossomo para o citosol (Houben et al. 2012; Jamwal et al. 2016).

Além disso, a morte do macrófago é um evento chave na patogenia do granuloma e também no desfecho da TB, sendo a necrose considerada uma estratégia do microrganismo para evitar a defesa inata do hospedeiro. Evidências indicam que a morte dos macrófagos por necrose é mais favorável ao *Mtb* que a apoptose, e que a intervenção da micobactéria neste processo faz parte de sua virulência. Estudos envolvendo macrófagos em cultura revelaram que aqueles em apoptose liberam menos bacilos viáveis que macrófagos necróticos (Molloy 1994). Ainda, macrófagos apoptóticos parecem estar associados a variantes atenuadas de *Mtb*, enquanto aquelas mais virulentas, não somente inibem a apoptose como também promovem necrose e dano tecidual, além de crescerem de modo mais eficiente (Keane et al. 2000). Proteínas do *Mtb* como SecA2 e NuoG são descritas como inibitórias da apoptose em células de linhagem macrofágica (Hinchey 2007; Velmurugan 2007; Miller 2010). Central também nesse processo é a molécula efetora ESAT6, um ativador potente do inflamassoma (Mishra et al. 2010), o que sugere que o *Mtb* pode causar morte celular por piroptose, mediada via Caspase 1 (Davis & Ramakrishnan 2009). Neste contexto, é evidente que a fisiopatologia da TB é altamente dependente da habilidade dos bacilos de subverterem a resposta imune inata de macrófagos.

1.3 Patogenia da Infecção pelo HIV-1

A infecção pelo HIV-1 caracteriza-se pela redução progressiva e contínua dos linfócitos T CD4⁺, principal alvo do vírus, em ausência de cART (Fig. 3). Uma vez que estas células são protagonistas da imunidade adaptativa, sua perda culmina com a desestruturação não apenas quantitativa, mas funcional da imunidade do hospedeiro, expondo-o a infecções e afecções que caracterizam a AIDS (Perreau et al. 2013). Os linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel importante na resposta imune contra o HIV-1 e contribuem para o controle das infecções virais de um modo geral, pela indução e/ou manutenção da resposta dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos B e macrófagos, e/ou ainda pela mediação direta de suas funções efetoras antivirais, como a produção de citocinas e, eventualmente, por atividade citotóxica (Marshall & Swain 2011).

O processo de depleção das células T CD4⁺ está correlacionado tanto com os níveis de viremia (Fig. 3), quanto ao fenômeno de hiperativação crônica dessas

células e do sistema imune em geral. De fato, a infecção pelo HIV-1 cada vez mais tem sido considerada uma doença inflamatória crônica que leva à imunodeficiência. Ao longo de toda a fase crônica assintomática da infecção viral são observadas moléculas inflamatórias em níveis elevados, as quais correlacionam-se diretamente com a progressão da doença (Deeks et al. 2004; Douek et al. 2009). No entanto, em modelo primata não humano de infecção não patogênica pelo vírus da imunodeficiência símia, este perfil inflamatório não é evidenciado (Silvestri et al. 2003).

Vários mecanismos têm sido considerados para a ativação crônica associada à infecção pelo HIV-1. Dentre eles, o principal é a translocação de produtos microbianos do lúmen gastrointestinal, que chegam mesmo a atingir a corrente sanguínea (Brenchley et al. 2006). Este fenômeno tem origem na depleção em massa das células T CD4⁺ do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT), a qual ocorre ainda no início, durante a infecção primária pelo HIV-1 (Brenchley et al. 2004; Mehandru et al. 2004). Esta depleção parece ter causa na infecção lítica de células T “helper” 17 (Th17) do GALT pelo HIV-1, as quais são particularmente permissivas à infecção por retrovírus (Stieh et al. 2016). Em paralelo, a infecção não produtiva de células em repouso pelo HIV-1, por disseminação célula-célula no tecido linfóide, também contribui para a depleção das células T CD4⁺ e a ativação imune, uma vez que moléculas incompletas de DNA geradas na transcrição reversa são percebidas pelo sensor citosólico de DNA IFI16, o que promove a ativação do inflamossomo e resulta na morte celular por piroptose, além da liberação da interleucina próinflamatória (IL-) 1 β (Doitsh et al. 2014; Monroe et al. 2014). Esta sequência de eventos liga claramente a depleção de células T CD4⁺ à inflamação crônica (Galloway et al. 2015; Doitsh & Greene 2016). O processo culmina ainda com uma senescência imunológica precoce e a exaustão clonal dos linfócitos T, impactando a função imune e, conseqüentemente, agravando a imunodeficiência (Kahan et al. 2015; Sokoya et al. 2017).

Na coinfeção HIV/*Mtb* muitos desses mecanismos imunopatogênicos identificados para as infecções isoladamente estão alterados ou mesmo potencializados, acelerando ainda mais a deterioração imunológica, o que resulta em morte prematura do hospedeiro, na ausência de tratamento adequado.

A infecção pelo HIV-1 altera profundamente a resposta imune do hospedeiro ao *Mtb*, a começar pela depleção das células T CD4⁺, funcionalmente importantes na proteção contra a micobactéria. De modo similar à infecção pelo HIV-1, a inflamação crônica também é um evento marcante na TB, e necessário à disseminação dos bacilos para outros hospedeiros. O processo inflamatório estabelecido nas vias respiratórias, induzido e intensificado pela morte dos macrófagos, está diretamente envolvido no mecanismo de transmissão do *Mtb*, através do desenvolvimento de cavitações pulmonares e da tosse característica da doença (Bell & Noursadeghi 2018). Nesse cenário, linfócitos T CD4⁺ próinflamatórios (Th1) ganham também um papel importante na imunopatogênese da TB, uma vez que, em resposta à persistência do *Mtb*, participam na manutenção do ambiente inflamatório. Por outro lado, a importância dessas células na proteção contra o *Mtb* é bem definida, estando envolvidas na contenção e no controle da replicação do *Mtb*. Ao assumir-se que esta participação das células T CD4⁺ na restrição do *Mtb* é dada pelas citocinas que produzem, a coinfeção pelo HIV-1 impacta significativamente esta função (Kalsdorf et al. 2009; Caccamo et al. 2010). Além do HIV-1 infectar e depletar preferencialmente as células T CD4⁺ específicas aos antígenos do *Mtb* (Geldmacher et al. 2010), linfócitos T CD4⁺ multifuncionais, produtores de IFN- γ , IL2 e TNF, possuem uma frequência reduzida em indivíduos coinfectados HIV/*Mtb* (Kalsdorf et al. 2009). Portanto, a coinfeção estabelece um ambiente desestruturado de células T CD4⁺, impactando no controle da replicação do *Mtb* e em sua contenção ao sítio de infecção primária, o que aumenta muito o risco de reativação da TB e da sua disseminação para outros órgãos.

Outras alterações importantes influenciam a formação, manutenção, e composição do granuloma. Em indivíduos coinfectados, o granuloma, quando formado, exibe uma organização celular pobre, com menos linfócitos e macrófagos, e grandes áreas de necrose, comparado a granulomas tuberculoides de indivíduos não infectados pelo HIV-1 (Revisto por Philips & Ernst 2012). De fato, sugere-se que as proteínas do HIV-1 possam reduzir a apoptose de macrófagos associada ao *Mtb*, um papel especialmente conferido à proteína NEF, o que compromete a restrição da micobactéria (Kumawat et al. 2010). Lembrando que a necrose possa ser mais favorável ao *Mtb* que a apoptose, uma aparente permissividade a este último processo se estabelece na coinfeção.

Além disso, a autofagia, importante mecanismo catabólico celular para a degradação e reciclagem de componentes intracelulares, é imunologicamente regulada na infecção por *Mtb* e utilizada pelos macrófagos como alternativa à não formação do fagolisossomo, e à translocação dos bacilos para o citosol, também sofre impacto na coinfeção (Li et al. 2016). Na TB, pacientes com baixo potencial autofágico apresentam uma doença mais severa e desfechos menos favoráveis (Li et al. 2016). O HIV-1 também é capaz de inibir as vias da autofagia, por ação de NEF, através do bloqueio da maturação dos autofagossomos, através da interação com uma proteína reguladora (Kyei et al. 2009). Esta inibição foi observada no processo de montagem do vírion surgente como forma de proteção contra a degradação autofágica. Em consonância com este efeito da infecção pelo HIV-1 na autofagia, a presença do vírus em macrófagos infectados pelo *Mtb* tem sido associada ao aumento do crescimento micobacteriano (Pathak et al. 2010).

Outras populações celulares que também devem contribuir para as alterações observadas na associação HIV/TB são os linfócitos Th17 e Th22. Um papel funcional para estas subpopulações de células T na proteção imunológica contra a TB tem sido identificado, como o recrutamento de neutrófilos, através da indução de MIP-2 e imunidade protetora durante a fase crônica da infecção por *Mtb* HN878, respectivamente, embora essa observação baseie-se primariamente em estudos desenvolvidos em camundongos (Cruz et al. 2010; Treerat et al. 2017). No entanto, a depleção dessas subpopulações celulares ainda na fase primária da infecção pelo HIV-1 pode também contribuir para as diferenças observadas durante as respostas imunes ao *Mtb* em pacientes coinfectados pelo HIV-1, comparados àqueles não infectados pelo vírus (Brenchley et al. 2008; Kim et al. 2012).

Não há dúvidas de que a perda de células T CD4⁺ está relacionada à reativação da TB e à frequência aumentada dos casos de TBEP observadas na coinfeção HIV/*Mtb*. No entanto, o envolvimento das células da imunidade inata nesse processo deve ser considerado.

A atenção aos eventos inatos associados à imunopatogênese da TB, à infecção por *Mtb* e aos seus desfechos clínicos, em muito se concentra nas células da linhagem mieloide, como monócitos, macrófagos, DCs e neutrófilos (Sia et al. 2015). O envolvimento das células linfoides inatas como as NK, NKT e células T $\gamma\delta$ têm ficado fora do foco, apesar do acúmulo de evidências crescentes a respeito de

sua importante participação na otimização do desenvolvimento e regulação da resposta imune adaptativa dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como na regulação da inflamação. É fato que essas células participam da resposta imune contra o *Mtb* e sofrem alterações importantes na infecção pelo HIV-1 (Espíndola et al. 2016; Morais-Papini et al. 2017). Portanto, conhecer melhor o perfil desses linfócitos inatos em indivíduos HIV/TB e avaliar sua participação na imunopatogênese da coinfeção, em especial dos casos de TB extrapulmonar, se faz relevante.

1.4 Linfócitos da Imunidade Inata

1.4.1 Células “Natural Killer”

As células NK são componentes efetores do sistema imune inato, que se desenvolvem a partir de progenitor linfóide da medula óssea comum aos linfócitos T. Estas células são capazes de reconhecer células tumorais ou infectadas por patógenos intracelulares, especialmente os vírus, através de uma gama de receptores de superfície, e eliminar o alvo arquitetando uma resposta imune eficaz dentro de poucas horas após o início da infecção, sem sensibilização prévia, utilizando múltiplos mecanismos efetores (Hölzemer et al. 2017).

As células NK correspondem à aproximadamente 5-15% dos linfócitos da circulação sanguínea periférica e estão distribuídas por diferentes órgãos e tecidos linfóides, como medula óssea, timo, nódulos linfáticos e baço, e não-linfóides, como intestino, pele, fígado, pulmões e útero gravídico, além de serem rapidamente recrutadas aos tecidos periféricos em processos inflamatórios (Carrega & Ferlazzo 2012). Os nódulos linfáticos apresentam 40% de todos os linfócitos do corpo, dos quais 1 a 7% são células NK.

A definição fenotípica das células NK baseia-se na ausência de expressão da molécula CD3, ou seja, correspondem a linfócitos CD3⁻, e pela expressão relativa na superfície membranar de ambas as moléculas CD56, ou molécula de expressão neural (NCAM-1), e CD16, também identificada como receptor de baixa afinidade para imunoglobulina gama, ou FcγRIII (Robertson & Ritz 1990). A densidade combinada de expressão de CD56 e CD16 resulta em diferentes subpopulações de células NK, e embora não haja um significado funcional direto para níveis altos e baixos de expressão de CD56, uma vez que a função dessa molécula não é conhecida em células NK humanas, de certo modo essa variação de expressão

coincide com as principais características funcionais das células NK. Cerca de 90% das células NK circulantes, apresentam uma menor expressão de CD56, caracterizando o fenótipo CD56^{dim}, o qual é mais naturalmente citotóxico, ineficiente na produção de citocinas e com capacidade proliferativa reduzida. Essas células são também CD16^{bright}, o que lhes dá a capacidade de se ligar a antígenos virais expressos na superfície de células infectadas, através de imunoglobulinas da classe G (IgG), e induzir a lise das células-alvo, um mecanismo de ação conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Os outros 10% restantes das células NK são representados por uma subpopulação com elevada expressão de CD56 (CD56^{bright}), que também é CD16^{dim} ou CD16⁻, e possui baixa citotoxicidade natural, mas alta capacidade proliferativa e de secreção de citocinas (Leal et al. 2017). Cerca de 75% das células NK encontradas nos nódulos linfáticos são CD56^{bright} (Ferlazzo et al. 2004).

Essas células possuem ainda um complexo repertório de receptores de superfície codificados na linhagem germinativa, que não sofrem rearranjo gênico como os receptores antigênicos dos linfócitos T e B, mas que também são capazes reconhecer múltiplos ligantes nas células-alvo, e através dos quais ocorrem as sinalizações de ativação e/ou inibição (Long et al. 2013).

De um modo geral, os receptores ativadores reconhecem moléculas exógenas e endógenas expressas em células alteradas, que indicam a existência de anormalidade, enquanto os receptores inibitórios reconhecem principalmente moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) clássico e não-clássicos, expressos nas células-alvo (Shifrin et al. 2014). A resposta imune efetora das células NK resulta da integração de sinais disparados pelos receptores inibitórios e estimulatórios presentes nas células-alvo. Portanto, o balanço entre os sinais captados pelos diferentes receptores irá definir a atividade das células NK (Long et al. 2013).

É notório que as células NK não necessitam de sensibilização antigênica prévia para realizarem suas funções, o que lhes permite uma ação imediata frente aos estímulos. Embora a densidade das moléculas de MHC-I seja fundamental para sua regulação, os mecanismos envolvidos na modulação desse processo ainda não estão totalmente elucidados. Em condições normais de homeostasia, os dois grupos de receptores promovem um intercâmbio de sinais, que culminam com os sinais

inibidores se sobrepondo aos ativadores, mantendo as células NK tolerantes e em estado de repouso (Fig. 4.B). Duas teorias são propostas para os mecanismos de ativação das células NK: “missing self” e (“stress”-)“induced self” (Watzl 2003).

A teoria “missing self”, que na tradução literal da língua inglesa significa “perda do próprio”, diz respeito à redução ou perda das moléculas de MHC-I, presentes nas células normais de invertebrados, e sugere que as células NK tenham seu limiar de ativação reduzido quando isto acontece (Fig. 4.A). A diminuição da densidade de expressão dessas moléculas torna as células NK citotóxicas frente ao alvo, caso seja transmitido um sinal positivo através dos receptores de ativação (Raulet & Vance 2006; Elliott & Yokoyama 2011).

Por sua vez, a teoria (“stress”-) “induced self”, ou “indução do próprio”, ou ainda, “indução do próprio por estresse”, postula que mesmo não havendo alteração no MHC-I, as células NK tornam-se ativadas pelo aumento de sinais ativadores, disparados pela expressão aumentada de moléculas ligantes dos receptores de ativação, na célula-alvo, de modo a sobrepujar os sinais inibitórios presentes, o que pode ocorrer numa infecção viral, por exemplo (Fig. 4.C) (Pegram et al. 2011). A referência ao estresse baseia-se no fato de que células submetidas a uma injúria, ou a um estresse, também podem expressar moléculas ligantes dos receptores de ativação das células NK (Pegram et al. 2011).

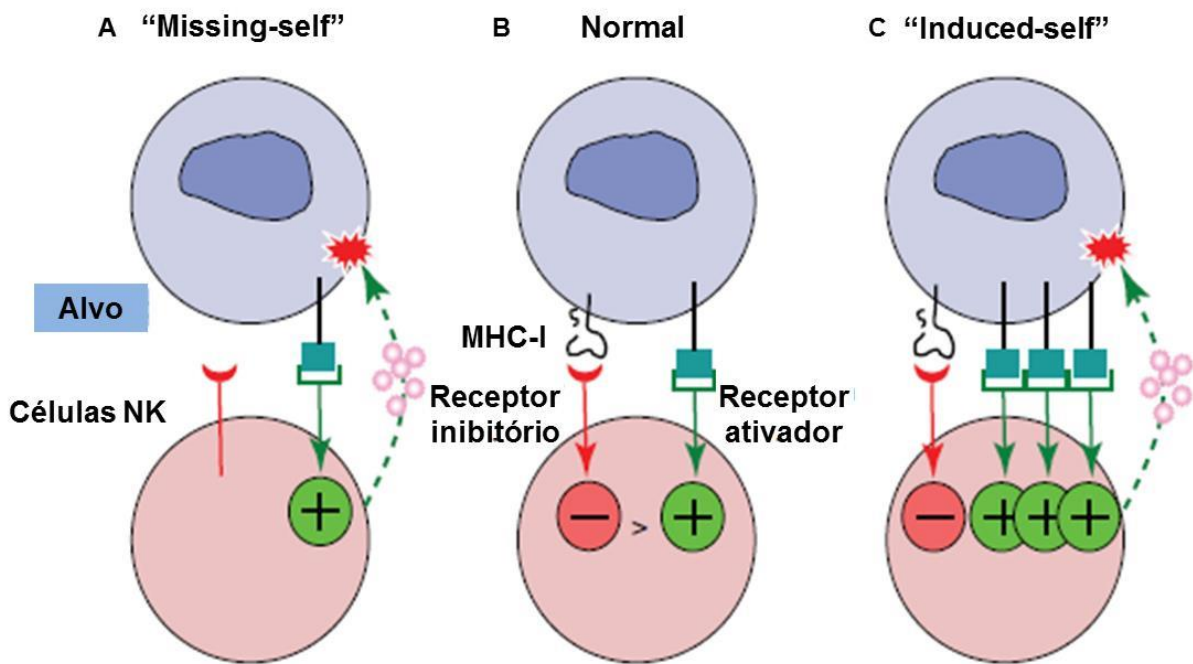


Figura 4. Mecanismos propostos para a tolerância e ativação das células NK.

(A) Ativação através do mecanismo “missing self”; (B) Mecanismo de tolerância; (C) Ativação através do mecanismo “induced self”. Adaptado de Elliott & Yokoyama 2017.

O repertório de receptores das células NK abrange moléculas distintas pertencentes a diferentes famílias, sendo que uma mesma família pode incluir tanto receptores de ativação, quanto de inibição (Middleton et al. 2002; Pegram et al. 2011). O repertório de células NK é moldado por receptores KIR (receptores do tipo imunoglobulina de células “killer”), receptores LILR (receptores semelhantes a imunoglobulinas de leucócitos com domínios extracelulares múltiplos), receptores de lectina tipo C, receptores de citotoxicidade natural (NCRs), e outras moléculas acessórias que participam desse processo (Tabela 1).

Os receptores KIR são reguladores chave do desenvolvimento, tolerância e ativação das células NK e têm como principais ligantes os diversos alelos de MHC-I (HLA-A, HLA-B e HLA-C), os quais são expressos na superfície de todas as células nucleadas do organismo (Caligiuri 2008; Campbell & Purdy 2011). Os receptores KIR possuem ectodomínios semelhantes às imunoglobulinas e, em geral, podem ter 2 (KIR2D) ou 3 domínios (KIR3D). São codificados por 14 genes (2DL1 a 2DL5, 3DL1 a 3DL3, 2DS1 a 2DS5, e 3DS1) altamente polimórficos, e podem transduzir sinais inibitórios ou de ativação, dependendo de sua cauda citoplasmática (Campbell & Purdy 2011). KIR inibitórios (KIR2DL ou KIR3DL) possuem uma longa cauda

citoplasmática que contém dois domínios ITIM (motivo inibitório de receptores imunológicos baseado em tirosina), que inibem a atividade celular. Por sua vez, KIR ativadores (KIR2DS ou KIR3DS) têm cauda citoplasmática curta acoplada à molécula DAP12, a qual possui domínios ITAM (motivo ativador de receptores imunológicos baseado em tirosina) (Campbell & Purdy, 2011; Sivori et al. 2014). Embora os ligantes de KIR inibitórios sejam predominantemente os vários alelos de HLA-A, HLA-B e HLA-C, produtos microbianos como oligonucleotídeos CpG também já foram descritos em associação a essas moléculas (Sivori et al. 2014). Para os KIR ativadores, os ligantes ainda não se encontram totalmente elucidados (Ivarsson et al. 2014).

Dentre os receptores de lectina tipo C, a família NKG é composta por moléculas de grande importância para as células NK, compreendendo sete membros referidos como NKG2A, -B, -C, -D, -E, -F e -H, com A/B e E/H sendo variantes originárias dos mesmos genes (Brostjan et al. 2000). Com exceção de NKG2D, essas moléculas formam heterodímeros com a molécula invariante CD94, também uma lectina tipo C. Os receptores NKG2A e NKG2B são inibitórios e possuem domínios ITIM em suas caudas intracelulares; os receptores NKG2C, NKG2E e NKG2H são moléculas ativadoras e sinalizam via DAP-12, acoplada ao prolongamento citoplasmático de CD94 e que contém motivo ITAM. Apesar das capacidades distintas de sinalização de seus membros, o complexo NKG2-CD94 reconhece o mesmo ligante presente na superfície das células alvo, as moléculas de MHC-I não clássico HLA-E (Brostjan et al. 2000). Embora pertença à família NKG2 e seja um dos receptores mais bem caracterizados, o NKG2D apresenta características bem distintas dos demais componentes. NKG2D é expresso de modo constitutivo em essencialmente todas as células NK humanas em repouso, apresentam-se como homodímeros e associam-se às moléculas DAP-10 ou DAP-12, que além de darem estabilidade ao complexo receptor, são responsáveis pela transdução de sinais, via motivos YINM e ITAM, respectivamente (Lanier 2015). Em humanos, esse receptor é invariante e reconhece moléculas induzidas pelo estresse celular, como proteínas estruturalmente associadas à cadeia do MHC-I, incluindo MIC-A e MIC-B, e os seis membros da família de proteínas ligantes de UL16 (ULBP) (Eagle et al. 2009). Portanto, conceitualmente, o NKG2D funciona como um sensor geral para o reconhecimento do “induced self”, para a detecção e eliminação de

células hiperproliferativas, células transformadas ou células infectadas por agentes patogênicos (Lanier 2015).

A família multigênica LILR corresponde a receptores inibitórios e de ativação, homólogos entre si em suas porções extracelulares, porém diferentes nas regiões intracelulares. Os LILRs possuem dois ou quatro domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas, e uma cauda citoplasmática longa contendo motivos ITIM, quando inibitórios, e enquanto os ativadores, apresentam uma cauda citoplasmática curta, associada à cadeia FcγR, com motivos ITAM (Hirayasu & Arase 2015). Estruturalmente, os LILRs são categorizados como membros do grupo 1 (LILRB1, LILRB2 e LILRA1–3) e membros do grupo 2 (LILRB3–5 e LILRA4–6), com base nos resíduos de LILRB1 que interagem com as moléculas de MHC-I. Embora seja uma família de receptores identificada há quase vinte anos, sua significância clínica e biológica permanece pouco compreendida. No entanto, o receptor LILRB1 ou CD85j, que possui função inibitória para as células NK ao reconhecer um amplo espectro de MHC-I clássicos (HLA-A, B e C) e não clássicos (HLA-E e G), têm importante participação na resposta de NK contra infecções virais (Iannello et al. 2006).

Os NCRs são receptores de ativação e pertencem à superfamília das imunoglobulinas, embora se assemelhem estruturalmente aos KIR e LILR, sendo expressos majoritariamente em células NK (Hudspeth et al. 2013). NKp30, NKp46 e NKp80 são expressos em células NK quiescente, constitutivamente, enquanto NKp44 é expresso apenas em células NK ativadas (Middleton et al. 2002). Os NCRs interagem com uma gama de ligantes que variam de moléculas de origem bacteriana, parasitária e viral, a moléculas originárias das próprias células alvo (Kruse et al. 2014). A densidade superficial dos NCRs correlaciona-se com a magnitude de atividade citolítica das células NK. A transdução de sinais ativadores utiliza os adaptadores DAP-12, CD3ζ e FcγR quando reconhece seus ligantes (Sivori et al. 2014).

Várias outras moléculas com diferentes características estruturais também participam do processo de ativação das células NK, diretamente ou como coestimuladoras, como CD69, CD160, CD161, CD244, CD226, entre outras.

Assim como o receptor NKp44, a molécula CD69 não é expressa na superfície de células NK em repouso (Ziegler et al. 1994; Pisegna et al. 2002). Esse

receptor pertence à família de lectinas tipo C (Ziegler et al. 1994) e sua expressão pelas células NK está condicionada à ativação através de citocinas, como IL-2, IL-7, IL-12 e IFN- α , bem como a partir da ligação ao receptor CD16, sendo prontamente sintetizada (Ziegler et al. 1994). A interação entre o receptor CD69 e seu ligante, desconhecido até o momento (Radulovic & Niess 2015), é capaz de induzir a atividade citotóxica e a produção de citocinas coestimulatórias, não apenas pelas células NK, mas também pelas células T (Pisegna et al. 2002). Essa molécula já foi associada à produção aumentada de IFN- γ em células NK com fenótipo de memória (Romee et al. 2012), além do envolvimento com a resposta imune regulatória em mucosas (Radulovic & Niess 2015).

O receptor CD160, por sua vez, é uma proteína de membrana com um único domínio de Ig, expresso em diversos tipos celulares, especialmente em células citotóxicas, como é o caso das células NK, células T CD8⁺ e células T $\gamma\delta$ (Maeda et al. 2005). De acordo com seu ligante, pode assumir funções ativadora, inibitória (Le Bouteiller et al. 2011) ou coestimulatória (Maeda et al. 2005). Nas células NK, a interação do receptor CD160 com moléculas de MHC-I clássicas e não-clássicas está diretamente ligada à citotoxicidade (Maíza et al., 1993), contudo, essa pode apresentar variações de indivíduo para indivíduo (Le Bouteiller et al. 2011). Ainda, a interação desse receptor com seu ligante promove indução da produção de citocinas, como grandes quantidades de IFN- γ , bem como as citocinas TNF e IL-6 (Barakonyi et al. 2004).

A molécula CD161 também um membro da família de receptores de lectinas tipo C, é expressa por grande parte das células NK (Lanier et al. 1994). Entretanto, sua função e frequência de expressão tendem a ser contraditórias nos diferentes estágios do desenvolvimento dessas células (Montaldo et al. 2013). Em células NK imaturas, o receptor CD161 apresenta-se em frequências reduzidas e detém função ativadora (Montaldo et al. 2012). Em contrapartida, em células NK maduras, essa molécula assume papel inibitório, tendo em vista que a interação com seu ligante, o transcrito semelhante à lectina 1 (LLT1), não resulta em produção de citocinas ou atividade degranulatória por essas células (Montaldo et al. 2013), de outro modo, a perda da interação entre o CD161 e seu ligante resulta na ativação de células NK através do mecanismo “missing-self” (Mesci et al. 2006). Embora a função desse receptor seja principalmente definida como inibitória em células NK, em células T

sua função pode ser descrita como inibitória e coestimulatória (Hassouneh et al. 2017).

O receptor CD244 (2B4), um membro da família das moléculas de sinalização da ativação de linfócitos (SLAM), está presente em todas as células NK humanas, sendo expresso sob uma ou duas isoformas, das quais apenas uma tem demonstrado ativar a citotoxicidade dessas células (Mathew et al. 2009). O ligante identificado para o CD244 é a molécula CD48, presente em todas as células hematopoiéticas. Postula-se que a molécula CD244 possa ter um potencial multifuncional e regulatório, e que o desfecho de sua estimulação possa ser dependente do estágio de maturação da célula NK, mas está frequentemente associada à atividade citotóxica dessa célula (Mathew et al. 2009; Pegram et al. 2011).

O CD226, também conhecido como DNAM-1 (molécula acessória DNAX-1), é expresso em cerca de 50% das células NK, e possui importante função coestimulatória dessas células, estando envolvido no processo de formação da sinapse imunológica citotóxica (Xiong et al. 2015). Os ligantes desse receptor são as moléculas CD112 (Nectina-2) e CD155 (Vimentina), as quais são amplamente distribuídas em células normais neuronais, epiteliais, endoteliais e fibroblastos, e em células transformadas ou infectadas por patógenos, sendo seu aumento de expressão percebido pelas células NK. Elas também são expressas por células imunes como monócitos, DCs e linfócitos T ativados (Pegram et al. 2011; Xiong et al. 2015).

Tabela 1. Receptores ativadores e inibitórios expressos em células NK.

Família	Receptor	Função
ILT	CD85j	Inibitória
KIR	CD158a	Inibitória
	CD158b1	Inibitória
	CD158b2	Inibitória
	CD158d	Inibitória
	CD158e/CD158e1	Inibitória
	CD158e2	Ativadora
	CD158i	Ativadora
Receptor de Lectina tipo C	CD158j	Ativadora
	CD94	Ativadora / Inibitória
	NKG2A	Inibitória
	CD161	Inibitória
	NKG2C	Ativadora
	CD69	Ativadora
NCR	NKG2D	Ativadora
	NKp30	Ativadora
	NKp44	Ativadora
	NKp46	Ativadora
Superfamília das imunoglobulinas	NKp80	Ativadora
	CD160	Ativadora
SLAM	CD226	Ativadora
	CD244	Ativadora

Além da ativação direta pelas células alvo, as células NK podem ser ativadas por mediadores inflamatórios produzidos durante a inflamação, respondendo indiretamente ao estabelecimento da infecção. Em situações de inflamação ou infecção viral, monócitos, macrófagos, neutrófilos, DCs e linfócitos T secretam IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21 em abundância, as quais direcionam a ativação das células NK, aumentando a secreção de citocinas citotóxicas e a habilidade de destruir células alteradas (Wu et al. 2017).

A integração dos sinais ativadores e inibitórios desencadeia a função efetora das NK, caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios solúveis e, principalmente, pela citotoxicidade às células alvo. As células NK possuem um grande número de grânulos secretores os quais estocam e liberam proteínas indutoras de morte celular, como perforina, granzimas e granulisina (Revisto por

Mandal & Viswanathan 2015; Revisto por Elgarhy et al. 2015). Essas proteínas líticas são estocadas em grânulos circundados por uma bicamada lipídica, a qual contem glicoproteínas associadas à membrana lisossomal, incluindo CD107a, CD107b e CD63 (Winchester 2001). Portanto, a ativação das células NK induz a exocitose desses grânulos, cujo conteúdo lítico é liberado na sinapse imunológica, num processo denominado degranulação (Chan et al. 2007). A liberação desses grânulos citolíticos leva à apoptose da célula-alvo, envolvendo o sistema perforina/granzimas ou a expressão das proteínas pró-apoptóticas Fas-ligante (FasL; CD95L) e TRAIL copresentes nos grânulos, na superfície celular (Monleón et al. 2001; Krzewski & Coligan 2012).

A perforina pertence à família de proteínas do complexo de ataque a membrana e insere-se na membrana plasmática da célula-alvo funcionando como um poro de estrutura semelhante ao complexo de ataque a membrana C5-C9 do sistema complemento (Revisto por Voskoboinik et al. 2010). Os poros de perforina são utilizados para facilitar o transporte de granulísina e granzimas para o interior do citoplasma das células-alvo. As granzimas são uma família de serina proteases com diversos membros, sendo a principal constituinte das células NK a granzima B. Esta enzima pode iniciar a apoptose na célula-alvo através da ativação direta das Caspases 3 e 7 (Afonina et al. 2010). A granulísina por sua vez é uma proteína que compartilha semelhanças com a saponina e que possui a habilidade de interagir com lipídeos. A injúria causada nos lipídeos da membrana leva à liberação do citocromo c no interior do citosol, iniciando apoptose junto à geração de espécies reativas de oxigênio (Okada et al. 2003).

Em adição à sua função lítica, as células NK podem secretar quimiocinas e citocinas, como MIP-1 β , TNF e IFN- γ , que recrutam e ativam outras células imunes, promovem resistência celular à infecção e influencia a resposta imune adaptativa (Mandal & Viswanathan 2015).

As células NK estão envolvidas na infecção pelo *Mtb*, sendo capazes de produzir uma resposta imune vigorosa contra a micobactéria, mas seu papel exato durante a TB permanece desconhecido. Essas células são recrutadas para os sítios de infecção bem no início, estando envolvidas no desenvolvimento do granuloma inato, podendo participar mesmo da eliminação do *Mtb* (revisto por Ehlers & Schaible 2013). A resposta de células NK contra o *Mtb* pode ocorrer via

reconhecimento de macrófagos infectados através de receptores como NKp46 e NKG2D que reconhecem UBLP1 e vimentina, respectivamente, aumentadas nessas células após a infecção (Vankayalapati et al. 2005). Além disso, um contato direto entre o ácido micólico e a proteína arabinogalactana da micobactéria com o receptor NKp44 também tem sido considerado, enquanto o receptor do tipo “Toll” 2 (TLR2) reconhece diretamente o *M. bovis* em DCs derivadas de monócitos (Marcenaro et al. 2008; Esin et al. 2013). As células NK podem ainda secretar citocinas que são capazes de expandir a resposta imune das populações de células T CD8⁺ e NKT (Revisto por Vankayalapati & Barnes 2009). A IL-12 é um forte fator estimulador de células NK secretado por macrófagos e que induz aumento da função dessas células e promove a síntese e secreção de IFN- γ . Células NK ativadas por IL-12 são capazes de inibir o crescimento de *Mtb* (Denis 1994).

In vitro, as células NK induzem ainda a resposta imune de células T CD8⁺ através da destruição de macrófagos infectados (Vankayalapati et al. 2004), ou de células T reguladoras (Roy et al. 2008), e pela intensificação do “crosstalk” com DCs na presença de *Mtb* (Vankayalapati et al. 2009), indicando que células NK são importantes para a indução da resposta imune adaptativa na TB.

As células NK parecem ter um papel importante também na infecção pelo HIV-1. No entanto, alterações fenotípicas e funcionais importantes são observadas para essas células, como por exemplo, a redução de expressão de CD16, assim como da circulação das células CD56^{dim}CD16⁺ (Hu et al. 1995; Mavilio et al. 2005). Alterações significativas na expressão do repertório NK após a infecção pelo HIV-1 têm sido descritas, como a redução de NKp30, NKp44 e NKp46 (Mavilio et al. 2003). Alterações funcionais também já foram descritas para as células NK na infecção pelo HIV-1, como a redução de sua capacidade citotóxica, bem como na produção e secreção de IFN- γ e TNF (Mavilio et al. 2003; Mavilio et al. 2005).

Por outro lado, uma atividade mais intensa das células NK e a expressão de NCRs estão associadas com a preservação das funções de células T CD4⁺ e com carga viral mais baixa (Mavilio et al. 2003). De fato, estudos têm demonstrado uma importante participação das células NK no controle da infecção pelo HIV-1. Scott-Algara et al. (2008) caracterizaram um subgrupo de células NK CD85j⁺ capazes de controlar a replicação do HIV-1 em DCs derivadas de monócitos *in vitro*. As associações genéticas entre haplótipos de KIR e a resistência à infecção pelo HIV-1

ou uma progressão mais lenta para AIDS, já foram bem estabelecidas (Martin et al. 2002; Ravet et al. 2007; Carrington et al. 2008). Em particular, os produtos dos genes KIR3DL1 e KIR3DS1 (CD158e1 e CD158e2, respectivamente) têm sido associados ao controle da replicação do HIV-1 por células NK, em indivíduos capazes de controlar naturalmente a infecção pelo HIV-1, na ausência de cART, os chamados não-progressores (LTNP) e controladores de elite (EC) (Long et al. 2008, Kanya et al. 2011). Um estudo desenvolvido por Marras et al. (2013) demonstrou que as células NK desses pacientes, quando estimuladas, não expressam o receptor NKp44, o que parece correlacionar-se à preservação das células T CD4⁺. No entanto, a capacidade citolítica das células NK é preservada, o que pode estar associado ao aumento de expressão de NKG2D observado nesses controladores virêmicos. Esse estudo indica uma resposta imune conservada de células NK, acompanhado por uma restrição seletiva de NKp44, uma via de cunho imunopatogênico para as células T CD4⁺. Em indivíduos expostos ao HIV-1, células NK multifuncionais foram identificadas e relacionadas aos eventos iniciais de controle e ao não estabelecimento da infecção (Lima et al. 2016). Além disso, vários autores demonstraram mutações de escape para linfócitos T citotóxicos no HIV-1, mas que são reconhecidas pelas células NK, reforçando a importância dessas células na infecção (Alter et al. 2011; Fadda et al. 2011).

No entanto, quando considera-se a associação HIV-1 e TB, o papel de células NK e demais células da resposta imune inata pouco está definido. A produção de citocinas pelas células NK, como IL-2, IL-15, IFN- γ e TNF encontra-se acentuadamente reduzida na associação HIV/TB pulmonar (Ramana Rao et al. 2010). Em contrapartida, um estudo realizado no Camboja com pacientes coinfectados HIV/*Mtb* e submetidos à cART, demonstrou o envolvimento das células NK com perfis fenotípicos e citotóxicos diferenciados naqueles indivíduos que se encontravam sob o risco de desenvolver quadros clínicos reacionais associados à síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (Pean et al. 2012). Estes achados apontam para uma participação importante da resposta imune inata no desenvolvimento de processos reacionais observados em coinfeções.

Frente a esta observação, podemos postular a seguinte hipótese: na coinfeção HIV/*Mtb*, as células NK e demais células do sistema imune inato podem também estar envolvidas no processo de contenção do *Mtb* e na imunopatogênese da TBEP. De fato, alterações na atividade de células NK observadas na infecção

pelo HIV-1, como a redução da sua capacidade de responder a macrófagos infectados pelo *Mtb*, pode interferir com o processo de apoptose via Caspases 3 e 7 (Afonina et al. 2010), e deste modo, por exemplo, facilitar que a necrose de macrófagos induzida pelo *Mtb* via Caspase 1 ocorra (Davis & Ramakrishnan 2009). Isto associaria de modo indireto as células NK à patogênese da TB extrapulmonar em pacientes coinfectados pelo HIV-1. Portanto, a caracterização do perfil dessas células circulantes, em pacientes com apresentação TBEP, é bastante relevante.

Além disto, o conceito de memória imune inata para células NK também deve ser considerado para a patogênese da TBEP. O conceito de “imunidade treinada” descrita para monócitos também tem sido aplicado para as células NK. A expressão do receptor heterodimérico de ativação CD94/NKG2C nas células NK circulantes, vem sendo relacionado ao perfil “treinado” ou de memória nestas células (Gumá et al. 2006; Lopez-Verges et al. 2011; Beziat et al. 2013). Esta observação diz respeito à indivíduos assintomáticos soropositivos para citomegalovírus humano (HCMV), que expressaram alta frequência de células NK CD94/NKG2C⁺, em comparação a dadores soronegativos ou soropositivos para outros herpes vírus. Estas células foram associadas ao contato com o vírus (Gumá et al. 2006). Faz-se interessante a observação de que o receptor de ativação NKG2C é geralmente expresso por uma minoria de células NK no sangue periférico, enquanto a maioria das células NK expressa o receptor inibidor CD94/NKG2A. A reativação do HCMV levou a um aumento duradouro das células NK NKG2C⁺, que preferencialmente expressavam CD57, mas não possuíam NKG2A (Foley et al. 2011, Foley et al. 2012; Davis et al. 2015). Células NK de memória podem ser importantes para o processo de restrição do *Mtb* aos sítios de infecção primária.

1.4.2 Células “Natural Killer” T Invariantes

As células “natural killer” T ou NKT estão entre os primeiros componentes do sistema imune a responderem contra diversos agentes infecciosos e a produzirem resposta inflamatória, atuando como uma conexão entre o sistemas imunes inatos e adaptativo. São capazes de direcionar a natureza e a qualidade da resposta das células T, devido à sua pronta capacidade de produção de citocinas frente à infecção, e desempenham importante papel na regulação da tolerância a transplantes, doenças autoimunes, alergias, inflamação e doenças infecciosas

(Terabe & Berzofsky 2008). Estas células representam uma subpopulação de linfócitos inatos que compartilham semelhanças com as células NK e com os linfócitos T da imunidade adaptativa, como seu próprio nome indica.

As células NKT expressam moléculas de superfície definidoras de células NK, como CD56 e CD161, e dos linfócitos T convencionais, como CD3 e os receptores de antígeno de células T (TCR), que resultam de rearranjo gênico e que reconhecem lipídeos e glicolipídeos no contexto de moléculas não polimórficas que se assemelham àquelas do MHC-I, conhecidas como CD1d (Waldowska et al. 2017). As moléculas CD1d são constitutivamente expressas em todos os linfócitos, mas predominante em células apresentadoras de antígenos, como DCs, linfócitos B e macrófagos (Tessmer et al. 2009).

Raras no sangue periférico, representam cerca de 0,001 a 1% dos linfócitos circulantes em humanos, podendo chegar a 3% em alguns indivíduos (Berzins et al. 2011). As células NKT são encontradas em vários tecidos e órgãos, como fígado, baço, pulmões, timo, medula óssea, nódulos linfáticos, pele e peritônio (Slauenwhite & Johnston 2015), com sua frequência variando de 0,0001-0,001 no timo, a 1% no fígado e 10% no peritônio (Berzins et al. 2011).

Com base nas diferenças das características dos TCRs, as células NKT restritas ao CD1d são divididas em dois subgrupos principais: NKT tipo I e NKT tipo II (Juno et al. 2012; Kumar & Delovitch 2014). Embora haja divergência na literatura, a maioria das células NKT em humanos são do tipo I (Bendelac et al. 2007; Liao et al. 2013, Kumar & Delovitch 2014, Waldowska et al. 2017). Essas células expressam um TCR formado por uma cadeia α única, resultante do rearranjo dos segmentos $V\alpha 24$ e $J\alpha 18$, e por uma cadeia β de variedade restrita, geralmente $V\beta 11$, sendo, portanto, também conhecidas como NKT invariante ou iNKT (Juno et al. 2012). As NKT tipo II, por sua vez, exibem TCRs com muito mais variedade de sequências, assemelhando-se mais às células T convencionais. No geral, as células NKT são fenotipicamente definidas como $CD3^{dim}/CD56^+$ (Schmidt-Wolf et al. 1993; Almehmadi et al. 2014) e as iNKT identificadas no contexto destas células como $V\alpha 24J\alpha 18^+$ (Montoya et al. 2007), sendo estas as células NKT mais bem estudadas e caracterizadas.

As iNKTs podem ser classificadas em subpopulações, de acordo com a expressão de CD4 e CD8, como $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$ e duplo-negativas (DN) $CD4^-$

CD8⁻ (Lee et al. 2002; Gumperz et al. 2002). No entanto, iNKTs CD4⁺CD8⁺ duplo-positivas também já foram descritas, embora numa frequência bastante reduzida (Montoya et al. 2008). Além disso, estudos diversos demonstraram a existência de subpopulações de células iNKT que diferem em termos da produção particular de citocinas e a expressão específica de fatores de transcrição. Essa classificação possui concomitância com a classificação das células T “helper” convencionais, e agrupa as células iNKT, predominantemente, como NKT-1, NKT-2 e NKT-17. Essas células expressam os fatores de transcrição T-bet, GATA3 e ROR γ t, que regulam, respectivamente, as células Th1, Th2 e Th17 (Kim et al. 2006; Michel et al. 2007; Lee et al. 2013). As células NKT-1 liberam grandes quantidades de IFN- γ , enquanto aquelas NKT-2 participam efetivamente como Th2, com a secreção de IL-4, IL-9, IL-10 ou IL-13 (Watarai et al. 2012). As células NKT-17 liberam IL-17, uma vez ativadas, e promovem um estado de inflamação (Michel et al. 2007). Estas células estão associadas à expressão da molécula CD161, marcador natural de células NKT e caracteristicamente expresso na superfície das células Th17 (Annunziato et al. 2007; Kleinschek et al. 2009; Ito & Seishima 2010; Moreira-Teixeira et al. 2011). Um estudo mais recente realizado por Sag et al. (2014) demonstrou ainda a existência das células NKT-10, com perfil secretor de IL-10.

Múltiplos mecanismos de ativação já foram descritos para as células iNKT. A ativação direta dessas células possui analogia à ativação dos linfócitos T clássicos, envolvendo o reconhecimento pelo TCR da iNKT, do antígeno lipídico microbiano apresentado no contexto de CD1d (Reilly et al. 2010). Estas células também podem ser alertadas sobre a presença de patógenos quando antígenos lipídicos endógenos, associados ao CD1d, são apresentados por APCs, as quais foram previamente ativadas via TLR (Kronenberg et al. 2009). O estímulo de DCs com lipopolissacarídeo (LPS) ligante de TLR4, resulta na produção de IL-12 e no reconhecimento endógeno do complexo CD1d-ligante, que em conjunto com a sinalização de IL-12, induz a função efetora de células iNKT (Nagarajan et al. 2007). Além disso, a combinação das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-18 é suficiente para ativar as iNKT, de modo independente à apresentação de antígeno via CD1d (Reilly et al. 2010). Uma vez ativadas, as células iNKT produzem um coquetel de moléculas efetoras solúveis e associadas à membrana. Além das citocinas, estas células produzem proteínas citolíticas que incluem perforina, granzimas e granulicina, como as células NK, assim como moléculas de superfície envolvidas na

citotoxicidade, como FasL, culminando com a apoptose da célula-alvo (Gansert et al. 2003; Matsuda et al. 2008).

As células iNKT participam da imunidade de indivíduos com TB ativa, uma vez que estas encontram-se ativadas nesses pacientes (Montoya et al. 2008). Isto sugere que o *Mtb* possa produzir lipídeo antigênico capaz de ser reconhecido pelas células iNKT, ou que a TB induza a expressão ou exposição de antígeno lipídico endógeno. De fato, TCR de alta afinidade para o complexo formado por ácido micólico derivado de *Mtb* e CD1d, foi identificado para NKT (Van Rhijn et al. 2013). Além disso, deficiência de células iNKT já foi associada ao desenvolvimento de TB ativa, uma vez que a comparação de biomarcadores imunológicos entre pacientes com TB latente e ativa demonstrou que essa deficiência é preditiva de ativação da doença em indivíduos infectados pelo *Mtb* (Sutherland et al. 2009). Em adição, a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófago (GM-CSF) pelas células iNKT também está associado à resistência ao *Mtb* (Rothchild et al. 2017).

As células iNKT são susceptíveis à infecção pelo HIV-1, em particular as subpopulações CD4⁺, uma vez que também expressam CCR5, correceptor de entrada para o HIV-1 (Sandberg et al. 2002; Vasan et al. 2010). Estas células são rapidamente depletadas durante a infecção aguda, colaborando com a cronificação da infecção pelo HIV-1 (Fernandez et al. 2014). Estas células são preservadas em alguns indivíduos, sendo, porém, funcionalmente comprometidas (Moll et al. 2009; Snyder-Cappione et al. 2009). Considerando a participação das células NKT na formação inicial do granuloma na TB e na contenção da micobactéria, é relevante a investigação dessas células nas manifestações extrapulmonares da TB em indivíduos HIV/*Mtb* coinfectados.

1.4.3 Células T $\gamma\delta$

As células T $\gamma\delta$ correspondem a um importante subgrupo de linfócitos T, referidos como não convencionais, que possuem a habilidade de reconhecer uma gama de antígenos através do TCR, independente de sua apresentação no contexto das moléculas de MHC (Bonneville et al. 2010). Como o próprio nome revela, essas células também diferem das células T $\alpha\beta$ convencionais pela composição do TCR, o qual consiste de heterodímeros formados pelas cadeias γ e δ (Wu et al. 2014). Em

humanos, as células T $\gamma\delta$ são identificadas primariamente pelo segmento variável da cadeia δ utilizada (V δ), definindo ao menos duas subpopulações: aquelas que expressam o segmento variável 1 (V δ 1⁺), encontradas no timo e nos tecidos periféricos, e aquelas que expressam essencialmente a cadeia δ com a região variável 2 (V δ 2⁺) (Vantourout & Hayday 2013). Estas V δ 2⁺ geralmente têm associada a cadeia γ constituída pela região variável 9 (V γ 9⁺) e, por isso, são conhecidas como T V γ 9⁺V δ 2 semi-invariáveis, e constituem as células T $\gamma\delta$ do sangue periférico (Vantourout & Hayday 2013; Ribeiro et al. 2015).

Estes linfócitos T possuem uma capacidade inerente de reconhecer antígenos rapidamente após infecção ou outras formas de estresse, e por responder amplamente, sem a necessidade de expansão clonal extensa ou diferenciação, o que permite às células T $\gamma\delta$ participarem dos estágios iniciais da resposta imune conhecidos como fase aferente (Hayday 2009). Portanto, essas células são descritas como linfócitos efetores potentes contra patógenos (Lawand et al. 2017).

As especificidades das células T $\gamma\delta$ ainda são pouco conhecidas, mas não se restringem ao reconhecimento de peptídeo associado ao MHC, sendo sugerido que ocorra com amplitude semelhante ao reconhecimento antigênico das imunoglobulinas (Vantourout & Hayday 2013). A hipótese fundamentada há trinta anos continua sendo considerada (Janeway et al. 1988), na qual essas células sejam capazes de reconhecer e reagir às moléculas de MHC, independente do conteúdo associado à fenda, ou a moléculas de MHC não clássicas, como CD1, quanto a moléculas relacionadas ao MHC, como MIC-A, MIC-B e ULBPs (Adams et al. 2005; Chien & Konigshofer 2007; Willcox et al. 2012; Uldrich et al. 2013). As células V γ 9V δ 2 reconhecem fosfoantígenos que são expressos pela via bioquímica do fosfato de metil-eritritol, muito utilizada no metabolismo de bactérias, fungos e parasitas, entre os quais o *Mtb* (Champagne 2011; Tyler et al. 2015).

Além dos TCR com especificidades de reconhecimento variadas, definidas por rearranjo gênico, moléculas coestimulatórias e receptores de células NK, como NKG2D e CD158b, também são expressos pelas células T $\gamma\delta$, e possuem papel chave na ativação e na regulação da resposta imune mediada por estas células (Airò et al. 2000; Rincon-Orozco et al. 2005; Ribeiro et al. 2015). Assim como as células NK e os linfócitos T CD8⁺, as células T $\gamma\delta$ também exibem potencial citotóxico, o qual é induzido através desses receptores de superfície, e mediado pela liberação de perforina e granzimas (Wrobel et al. 2007; Todaro et al. 2009). Além disso, as

células T $\gamma\delta$ possuem uma propensão elevada à secreção de IFN- γ e TNF e em quantidades significativas, além de IL-17, cuja secreção é dependente da sua localização, como na derme e na lâmina própria do intestino, e do ambiente inflamatório (Wen et al. 1998; Caccamo et al. 2011). Em conjunto, essas funções efetoras permitem às células T $\gamma\delta$ participarem da fase eferente mais tardia da resposta imune (Vantourout & Hayday 2013).

As células T $\gamma\delta$ possuem papel importante na defesa contra patógenos. Ainda que correspondam uma pequena parte dos linfócitos T CD3⁺ circulantes na periferia, entre 3 e 10% (Zheng et al. 2013; Latha et al. 2014), representam a subpopulação de células T de maior abundância nas mucosas e na pele (Zheng et al. 2013). Através de seus mecanismos efetores, bem como pela ativação de outras células do sistema imune, as células T $\gamma\delta$ podem atuar na defesa contra uma gama de agentes infecciosos, câncer e doenças autoimunes (Zheng et al. 2013; Latha et al. 2014). Na TB, estas células possuem capacidade de modular o perfil de resposta imune inata e adaptativa, através da produção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 (Latha et al. 2014). Já foi descrito que as células T $\gamma\delta$ tendem a expandir-se após cultura frente ao *Mtb* (Kabelitz et al. 1990; Kabelitz et al. 1991).

A atividade antiviral de células T $\gamma\delta$ provenientes de indivíduos infectados pelo HIV-1 já foi demonstrada através da sua capacidade em lisar células infectadas pelo vírus e pela habilidade na produção de citocinas (Zheng et al. 2013). No entanto, com a progressão da infecção, reduções qualitativa e quantitativa são observadas para essas células, as quais se tornam anérgicas (Zheng et al. 2013). Essa observação pode ser em parte associada ao fato de que as células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ possuem o receptor CCR5 em sua superfície, o que permite a ligação da proteína viral gp120, promovendo a lise dessas células (Latha et al. 2014). Além disso, a redução das células T $\gamma\delta$ promovida pela infecção pelo HIV-1 permanece mesmo após a restauração imunológica que se estabelece após a submissão à cART (Kabelitz & Déchanet-Merville, 2015).

Neste contexto, é grande a possibilidade de participação das células T $\gamma\delta$ na patogênese da TB extrapulmonar em pacientes coinfectados pelo HIV-1, e sua avaliação deve ser considerada.

1.5 Racional

A TB é, sem dúvida, uma doença de proporções mundiais, para a qual estão voltados esforços governamentais e de grande parte da comunidade científica. Sua associação à infecção pelo HIV-1 representa um desafio adicional, pois esta é a infecção oportunista mais comum e uma das mais importantes causas definidas de óbito entre as doenças infecciosas, nesse grupo de indivíduos. A infecção por *Mtb* interfere na patogenicidade e na progressão da infecção pelo HIV-1 e vice-versa, com o HIV-1 influenciando no curso da TB, tornando a coinfeção uma entidade patológica distinta.

A forma mais frequente de apresentação da TB é a pulmonar. No entanto, esse cenário pode apresentar-se de modo diferenciado no âmbito da coinfeção pelo HIV, quando a manifestação clínica da TB pode ser influenciada pelo grau de imunossupressão dos pacientes. Nestes casos, pode ocorrer a disseminação do bacilo para outros órgãos, resultando na TB extrapulmonar. Estas manifestações costumam apresentar resultado negativo à baciloscopia, e por isso, seu impacto na transmissão é reduzido, mas seu diagnóstico é mais complexo, dependente de exames invasivos, envolvendo o cultivo direto da micobactéria por semeadura do tecido de biópsias ou de outro material biológico.

A forma de manifestação mais comum de TB extrapulmonar entre pacientes HIV/TB é a ganglionar, mas outras apresentações da enfermidade são evidenciadas nesse grupo, como as formas pleural, miliar, osteoarticular, meningoencefálica, cutânea, entre outras.

Nossa experiência em estudos prévios (da Silva et al. 2013) e atualmente em desenvolvimento, envolvendo pacientes HIV/TB, nos quais foram demonstradas características particulares e prognóstico negativo para indivíduos coinfectados HIV/*Mtb*, reforçam a importância de se conhecer os processos imunopatogênicos envolvidos nesta coinfeção. A dificuldade em se identificar as lesões, aliada à limitação de testes diagnósticos que nem sempre são capazes de identificar o agente etiológico, fazem da TB extrapulmonar um importante e necessário alvo de estudo. Deste modo, o conhecimento dos processos imunopatológicos envolvidos no estabelecimento ou não de sítios extrapulmonares em pacientes vulneráveis, como aqueles HIV/TB, é bastante relevante.

Evidências quanto a participação de células da imunidade inata em processos patogênicos, como aquele observado em pacientes HIV/TB que desenvolvem IRIS, com acometimento de outros tecidos, além do pulmonar, já foi descrita. Inclusive, a definição de biomarcadores capazes de identificar indivíduos sob o risco potencial de desenvolver reações inflamatórias adversas já foi discutida (Pean et al. 2012). Num estudo em desenvolvimento pelo nosso grupo, um perfil específico de células NK, envolvendo a coexpressão das moléculas CD94/CD160, tem sido avaliado pela potencial associação aos casos de óbito ocorridos entre os pacientes HIV/TB estudados. Portanto, a mesma resposta imune inata pode ter importante participação na imunopatogênese da apresentação clínica da TB em indivíduos infectados pelo HIV-1, bem como fornecer marcadores biológicos que auxiliem, não apenas no diagnóstico de manifestações extrapulmonares, mas também no manejo clínico dos pacientes acometidos.

2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a participação das células NK, iNKT e T $\gamma\delta$ na imunopatogênese da apresentação extrapulmonar de TB em sua forma ganglionar, na coinfeção pelo HIV-1.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a frequência *ex vivo* de células NK, iNKT e T $\gamma\delta$, e de suas subpopulações, de participantes coinfectados com TB extrapulmonar (HIV-TBEP), coinfectados com TB pulmonar (HIV-TBP) e pacientes *Mtb*-monoinfectados com TB pulmonar (TBP);
- Avaliar o perfil fenotípico *ex vivo* das células NK quanto à expressão de receptores de ativação e de inibição, de participantes HIV/TBEP, frente àqueles HIV/TBP e TBP;
- Avaliar as características fenotípicas *ex vivo* das células iNKT e de suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ de participantes HIV/TBEP, frente àqueles HIV/TBP e TBP;
- Caracterizar o perfil fenotípico *ex vivo* das células T $\gamma\delta$ e suas subpopulações V δ 2⁺ e V δ 2⁻ de participantes HIV/TBEP, em relação àqueles HIV/TBP e TBP;
- Avaliar o potencial citotóxico de degranulação e de produção de citocinas pró-inflamatórias das células NK *in vitro*, de participantes HIV/TBEP, em relação àqueles HIV/TBP e TBP;
- Identificar potenciais perfis celulares e/ou moleculares associados à apresentação extrapulmonar da TB em sua forma ganglionar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo e exploratório, transversal, com uma amostra de conveniência, cuja meta foi avaliar participantes coinfectados pelo HIV-1 e com apresentação da forma extrapulmonar da tuberculose (HIV-TBEP), frente aos casos de tuberculose pulmonar, em pacientes coinfectados (HIV-TBP) e monoinfectados por *Mtb* (TBP).

3.2 Casuística

O presente estudo é subprojeto de um estudo principal, prospectivo longitudinal, desenvolvido com uma coorte de pacientes com tuberculose e coinfectados pelo HIV-1, intitulado “Caracterização da imunidade inata e de biomarcadores em pacientes TB/HIV”. O estudo, cujo objetivo consistiu em determinar a participação da resposta imune inata, especificamente da resposta de células NK, e de biomarcadores associados, na evolução da infecção pelo HIV em pacientes com tuberculose, foi realizado em cooperação com o Instituto Pasteur de Paris. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP-IOC) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, sob o CAAE 04514012.1.1001.5248, participantes TB/HIV, virgens de tratamento para a tuberculose e para o uso de cART, foram recrutados em paralelo a participantes monoinfectados pelo HIV-1, participantes com tuberculose, não infectados pelo HIV-1 e voluntários sadios para ambas afecções.

Os participantes do estudo foram recrutados no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) e no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da FIOCRUZ (INI/FIOCRUZ). O primeiro está situado na região metropolitana-periférica do Rio de Janeiro e é um centro de referência para o cuidado e acompanhamento de pacientes infectados pelo HIV-1, tuberculose e doenças sexualmente transmissíveis. O segundo está localizado no município do Rio de Janeiro e é uma unidade da FIOCRUZ voltada para pesquisa clínica, ensino, serviços de referência e assistência em doenças infecciosas, integrando a Rede de Pesquisa Clínica da Fundação Oswaldo Cruz.

Para o presente estudo, entre os participantes HIV-TBEP, foram selecionados apenas aqueles que apresentaram a forma ganglionar da tuberculose, mais comumente observada, e diagnosticada em seis participantes. Por sua vez, entre os participantes que desenvolveram TB pulmonar, coinfectados (HIV-TBP; n=15) e monoinfectados por *Mtb* (TBP; n=15), a seleção foi realizada de modo aleatório no contexto dos grupos do estudo principal, considerando os critérios de elegibilidade. Em paralelo ao estudo principal e com a finalidade de incluir participantes com apresentação ganglionar da TB, bem como de ter acesso a biópsias dos gânglios linfáticos desses participantes, quando da indicação médica para esse procedimento, este subprojeto também foi submetido ao CEP-IOC, sendo aprovado sob o CAAE 64327117.8.0000.5248. No entanto, não houve indicação/obtenção de biópsias de gânglios linfáticos durante o desenvolvimento do estudo.

Todos os participantes incluídos neste estudo foram informados dos procedimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), redigido de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, MS (Anexos I e II).

3.3 Elegibilidade do Estudo

Foram considerados elegíveis os participantes com as seguintes características:

- Aqueles que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE;
- Maiores de 18 anos;
- Não-gestantes;
- Não-fumantes;
- Não-oncológicos;
- Ausência de tratamento com tuberculostáticos;
- Ausência de cART, abrangendo participantes virgens de tratamento ou aqueles expostos ao tratamento, mas sem exposição há mais de seis meses, a fim de excluir possíveis casos de IRIS;
- Contagens de células T CD4⁺ iguais ou inferiores a 350 células/mm³ para todos participantes infectados pelo HIV-1, a fim de homogeneizar o grau de imunodeficiência.

- Ausência de diabetes mellitus, um fator de risco para o desenvolvimento de TB ativa, podendo constituir um viés às análises propostas.

3.4 Critérios para Definição de Tuberculose Pulmonar e Extrapulmonar

A infecção ativa por *Mtb* foi definida a partir da combinação dos resultados dos exames de baciloscopia e cultura do escarro, além do exame de imagem do pulmão e da avaliação clínica, no caso da TB pulmonar. O diagnóstico dos casos extrapulmonares teve por base a avaliação clínica do paciente, bem como avaliação micobacteriológica (cultura e Genexpert) ou histopatológica (coloração de Wade), tendo sido considerados aqueles que apresentaram um ou mais resultados positivos para os exames citados.

3.5 Obtenção de Amostras Biológicas para Avaliações *Ex Vivo* e *In Vitro*

Os participantes recrutados foram submetidos à coleta de 10 mL de sangue venoso periférico em anticoagulante EDTA, destinados às avaliações *ex vivo* do repertório de células NK, às contagens dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e à quantificação da carga viral plasmática do HIV-1. Além disto, cerca de 40 mL de sangue coletados em anticoagulante heparina destinaram-se à avaliação do potencial citotóxico e funcional das células NK, *in vitro*. As análises foram conduzidas utilizando-se as amostras biológicas obtidas no momento de inclusão dos participantes no estudo ou dia 0 (D0), e portanto, em ausência de cART e tuberculostático. Para a contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, as amostras poderiam ser mantidas até seu processamento, em temperatura ambiente (TA) por até 48h após a coleta. Já para a quantificação da carga viral plasmática, as amostras poderiam ser armazenadas em freezer a -70°C tempo indeterminado, até seu processamento. Para as análises *ex vivo* e *in vitro*, o processamento das amostras foi realizado em até seis horas após a coleta.

3.6 Caracterização de Parâmetros de Monitoramento da Infecção pelo HIV-1

3.6.1 Contagem dos Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

O monitoramento laboratorial das contagens de células T CD3⁺/CD4⁺ e T CD3⁺/CD8⁺ foi realizado para todos os participantes, a partir de amostras de sangue venoso, através do sistema BD TruCount[®] (BD Biosciences, Becton & Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) o qual baseia-se na utilização de “beads” ou bilhas de referência para a quantificação absoluta destas subpopulações, e de um painel de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de CD3, CD8, CD45 e CD4, marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridina-clorofila (PercP) e alofocianina (APC), respectivamente (BD Multitest[®], BD Biosciences), seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram submetidas à hemólise e fixação (BD FACS LysingSolution[®], BD Biosciences), e avaliadas por citometria de fluxo em até 24h após seu processamento, utilizando-se o equipamento FACS Calibur[®] (BD Biosciences) e um “software” apropriado para esta análise (Multiset[®], BD Biosciences). Esta metodologia é realizada no contexto da rotina laboratorial do Serviço de CD4/CD8 do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do IOC - FIOCRUZ.

3.6.2 Determinação do Número de Cópias de RNA do HIV-1 no Plasma

A quantificação do número de cópias de RNA viral foi realizada a partir do plasma, através da tecnologia de PCR em tempo real. A técnica foi realizada utilizando o Kit Reagente de Amplificação “Real Time” HIV-1 (Abbott Laboratories, Illinois, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, sendo o intervalo de detecção deste sistema de 40 a 10.000.000 cópias de RNA/mL de plasma. Esta metodologia é realizada no contexto da rotina laboratorial do Serviço de Carga Viral do HIV-1 do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do IOC - FIOCRUZ.

3.7 Caracterização dos Linfócitos Inatos *Ex Vivo*

3.7.1 Imunofenotipagem das amostras

A caracterização do repertório de células NK circulantes *ex vivo*, bem como do perfil das células iNKT e dos linfócitos T $\gamma\delta$, foi realizada por citometria de fluxo, seguindo-se os protocolos de preparo de amostras, de aquisição em citômetro de fluxo e de análise padronizados no Instituto Pasteur de Paris para o estudo principal, e estabelecidos no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do IOC - FIOCRUZ. As populações e subpopulações celulares avaliadas foram definidas pela presença ou ausência de diferentes moléculas de superfície, incluindo receptores de ativação e inibição celular, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos, os quais podem ser observados na Tabela 2. Para as células NK, foi investigada a expressão de moléculas pertencentes às diferentes famílias de receptores envolvidos nos processos de ativação, inibição e coestimulação dessas células, alguns dos quais também avaliados para as células T $\gamma\delta$. Como controles negativos para marcação/fluorescência foram utilizadas células de cada participante sem adição de anticorpos monoclonais (células puras).

Tabela 2. Definição das populações, subpopulações e moléculas das células imunes inatas.

Populações celulares	Identificação	Subpopulações celulares	Receptores avaliados
NK	CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺		CD85j, CD158a, CD158b1/b2,j, CD158d, CD158e1/e2, CD158i, CD94, CD161, NKG2A, NKG2C, CD69, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, CD160, CD226, CD244
iNKT	CD3 ⁺ CD56 ⁺ V α 24J α 18 ⁺	CD4	CD161, CD69
		CD8	
		Th17	
TCR $\gamma\delta$	Pan $\gamma\delta$	V δ 2 ⁻	CD158a,h, CD158b1/b2,j, CD69, NKG2D, NKp46.
		V δ 2 ⁺	

Cerca de 100µL de amostra foram adicionados a 2µL de cada um os anticorpos monoclonais utilizados, com exceção do anticorpo CD69, para o qual utilizou-se 1µL, e incubados por 20 minutos, em TA de 20 à 25°C, e protegidos da luz. Após esse período, as amostras foram submetidas à hemólise e fixação, pela adição de 1mL de solução de lise e fixação (BD FACS LysingSolution®, BD Biosciences), e incubadas por mais 15 minutos (TA; escuro). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato salino (PBS), a 755 G, 5 minutos, sendo as células ressuspensas em 100µL de PBS contendo 1% paraformaldeído (PFA) e submetidas à avaliação em citômetro de fluxo (Gallios ou MoFloAtrios, Beckman-Coulter Inc, Carlsbad, EUA) em até 24 h.

O número de eventos adquiridos foi condicionado à população alvo: para as células NK, foram adquiridos 10.000 eventos na região definidora da população de células CD3⁻; e até 2.000 eventos nas regiões definidoras das populações de células positivas para Vα24Jα18e TCR Vδ2, para as iNKT e para os linfócitos T γδ, respectivamente.

3.7.2 Estratégia de Análise dos Linfócitos Inatos Ex Vivo

As análises dos dados obtidos através da citometria de fluxo foram realizadas utilizando-se o “software” Kaluza (Beckman-Coulter), versão 1.5. Os protocolos citofluorimétricos de análise padronizados para determinar as populações-alvo e avaliar os receptores de interesse serão discutidos a seguir. Todas as aquisições tiveram, inicialmente, um ajuste das compensações, seguidas pelas análises finais.

A Figura 5 traz a estratégia utilizada para a análise das células NK. A avaliação teve como ponto de partida a definição de uma região de células com intensidade de fluorescência “dim” ou fraca, para a expressão da molécula CD16, com a criação de um gráfico do tipo “dot-plot” morfológico de “forward scatter” (FSC) *versus* CD16, a fim de eliminar a inclusão indesejada de neutrófilos (Fig.5.A) (Pillay et al. 2013). Esta região foi identificada como “CD16DIM” e a ela foi associado o “dot-plot” seguinte FSC vs. CD3, no qual a região de células CD3 negativas foi estabelecida (CD3NEG), uma vez que as células NK clássicas não expressam este receptor (Fig. 5.B) (Robertson & Ritz 1990). O próximo passo foi definir, em

associação a estas células, a população de linfócitos CD3⁻ (LYMPHOS CD3⁻), através de um “dot-plot” FSC vs. “side scatter” (SSC) (Fig. 5.C). Em seguida, a população de células NK pôde, então, ser determinada, pela criação de um “dot-plot” CD56 vs. CD16, moléculas definidoras clássicas destas células (Robertson & Ritz 1990), em função da região LYMPHOS CD3⁻ (Fig. 5.D). Às células NK foram associados “dot-plots” para todas as moléculas investigadas, a fim de avaliar a frequência de suas coexpressões. A Figura 5 exemplifica as coexpressões de CD94 frente a CD161 (Fig. 5.E), CD244 (Fig. 5.F) e CD158b1/b2,j (Fig. 5.G), observadas para um dos participantes TBEP do estudo. Todas as moléculas foram avaliadas umas frente às outras. Por fim, histogramas definiram as frequências individuais de cada receptor, como mostrado para CD94 (Fig. 5.H).

A análise das células iNKT teve os linfócitos demarcados como região estratégica inicial (LYMPHOS), definida no contexto de um “dot-plot” FSC vs. SSC (Fig. 6.A). A partir desta região um “dot-plot” CD56 vs. CD3 foi criado para a predefinição das células iNKT, através da criação da região NKT (Fig. 6.B), a qual abrange as células NKT totais CD3⁺/CD56⁺. Nesta etapa foi realizada a exclusão criteriosa dos eventos CD56⁺/CD3^{bright}, que caracterizam os linfócitos T $\gamma\delta$ CD3⁺, a fim de evitar a contabilização indevida destas células entre as NKT (Lambert & Genin 2004). Seguiu-se, então, em função da região NKT, com o histograma de expressão das cadeias α do TCR, mais especificamente daquelas formadas pelos seguimentos V α 24J α 18, para a identificação das iNKT (Fig. 6.C). À região iNKT foram associados “dot-plots” para a identificação de células ativadas (CD161/CD69) (Fig. 6.D), das subpopulações iNKT CD4⁺ e CD8⁺ (Fig. 6.E), bem como das subpopulações iNKT com perfil Th17 (Fig. 6.F e 6.G).

Por fim, para a avaliação dos linfócitos T $\gamma\delta$, o protocolo também teve início com a definição dos linfócitos (LYMPHOS) em “dot-plot” FSC vs. SSC (Fig. 7.A) e, em seguida, das células CD3⁺ (CD3POS), em histograma (Fig. 7.B). A identificação das células T $\gamma\delta$ propriamente, começa com a definição das células pan $\gamma\delta$ (GD), no contexto da região CD3POS (Fig. 7.C). Dentre essas células, foram identificadas aquelas que carregam a cadeia δ constituída pelo segmento variável 2 (V2), delimitadas pela região VD2POS, e aquelas constituídas por outras cadeias δ (VD2NEG) (Fig. 7.D). Uma vez definidas essas duas subpopulações, através de histogramas associados às regiões VD2POS e VD2NEG, a expressão simples ou a coexpressão dos receptores investigados foram avaliadas, como exemplificado na

Figura 7 para CD69 (E e F), NKp46 e CD158b1/b2,j (H e I). A expressão também foi investigada para a população total de linfócitos T $\gamma\delta$ (Fig 7.G).

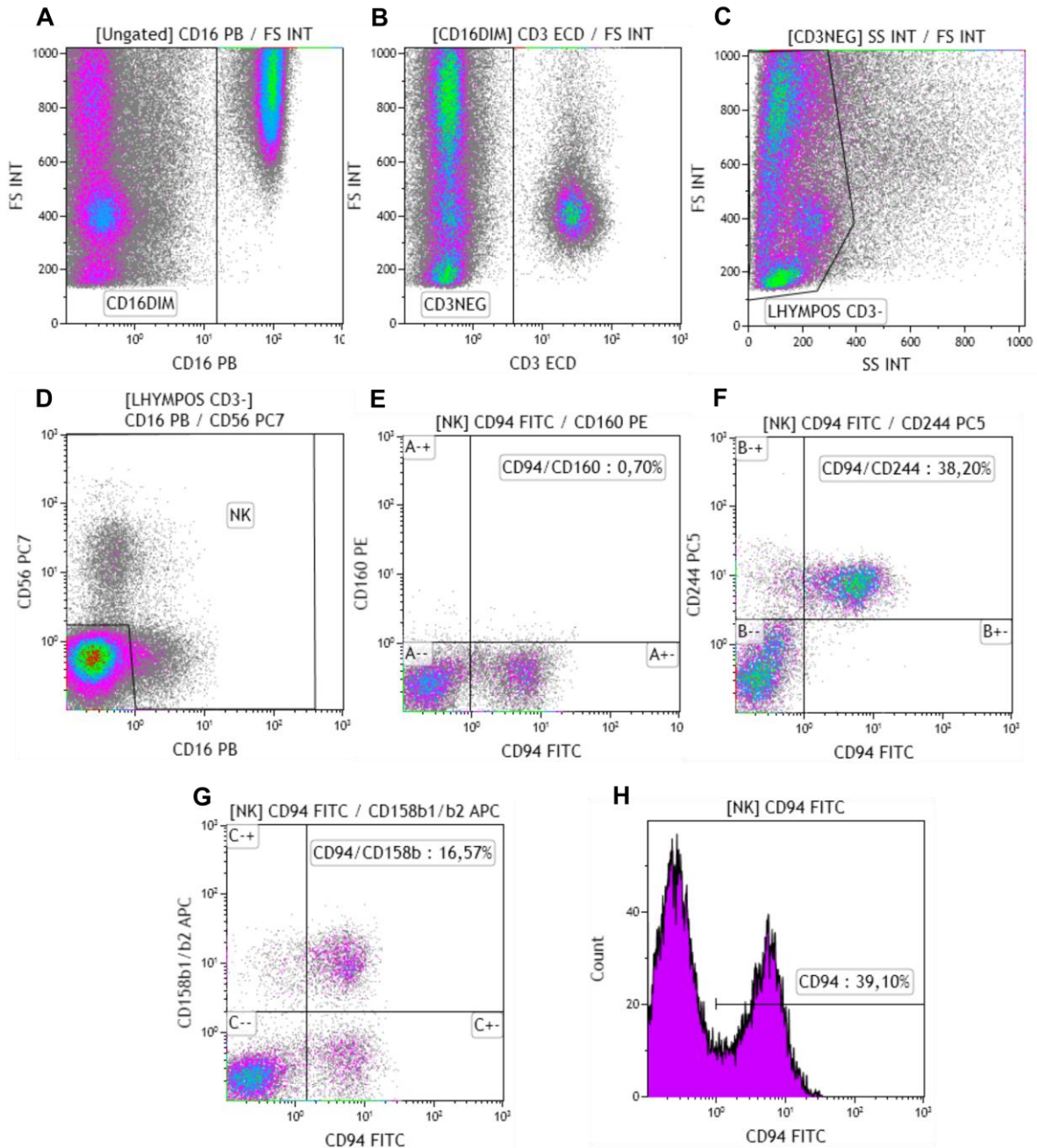


Figura 5. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células NK *ex vivo*.

As células CD16DIM foram demarcadas como população estratégica inicial (A), seguindo-se à exclusão da população de linfócitos T CD3⁺ (B), no contexto de “dot-plot” FSC vs. SSC (C), e ao estabelecimento das células NK CD3⁻CD56⁺CD16⁺ (D), alvo das avaliações posteriores de coexpressão (“dot-plots” de fluorescências) (E, F e G) e expressão simples (histogramas) (H) de diferentes moléculas, como CD94, CD160, CD244 e CD158b1/b2,j. Perfil de expressão representativo, obtido para um participante TBP.

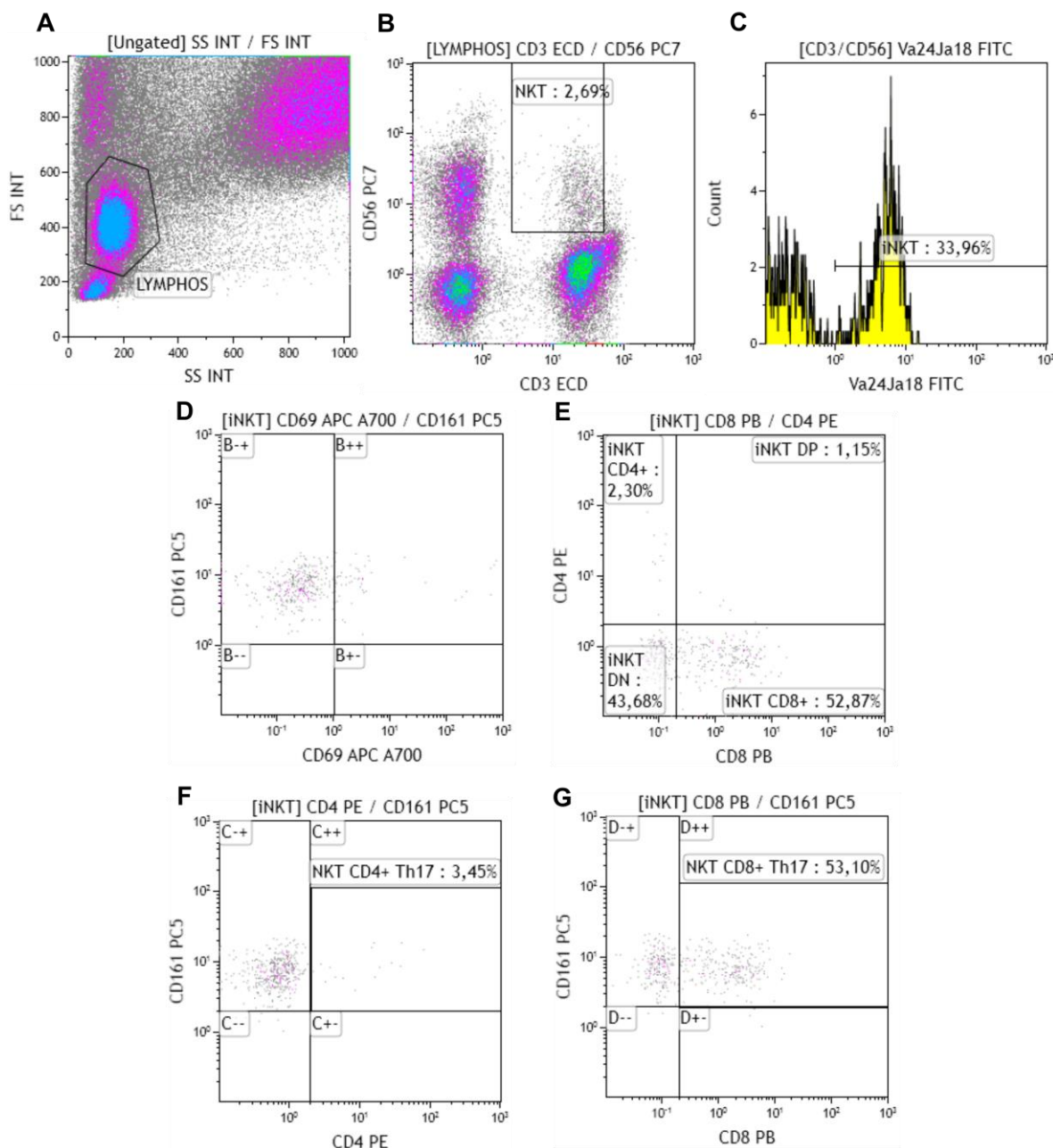


Figura 6. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células iNKT *ex vivo*.

A população total de linfócitos foi demarcada como população estratégica inicial, no contexto de “dot-plot” FSC vs. SSC (A), seguindo-se à definição da população de células NKT totais CD3⁺CD56⁺, com exclusão das CD3^{bright} (B). Em associação a essas células, o histograma de fluorescência para as células Va24Ja18⁺, identifica as células iNKT (C). Seguiu-se a avaliação da expressão de CD161 e CD69 (D), assim como a definição das subpopulações iNKTCD4⁺ e iNKTCD8⁺, iNKTDN (duplo-negativas) e iNKTDP (duplo-positivas) (E). Subpopulações iNKT CD4⁺ e CD8⁺ com perfil Th17 também foram avaliadas pela expressão de CD161 (F e G). Perfil de expressão representativo, obtido para um participante TBP.

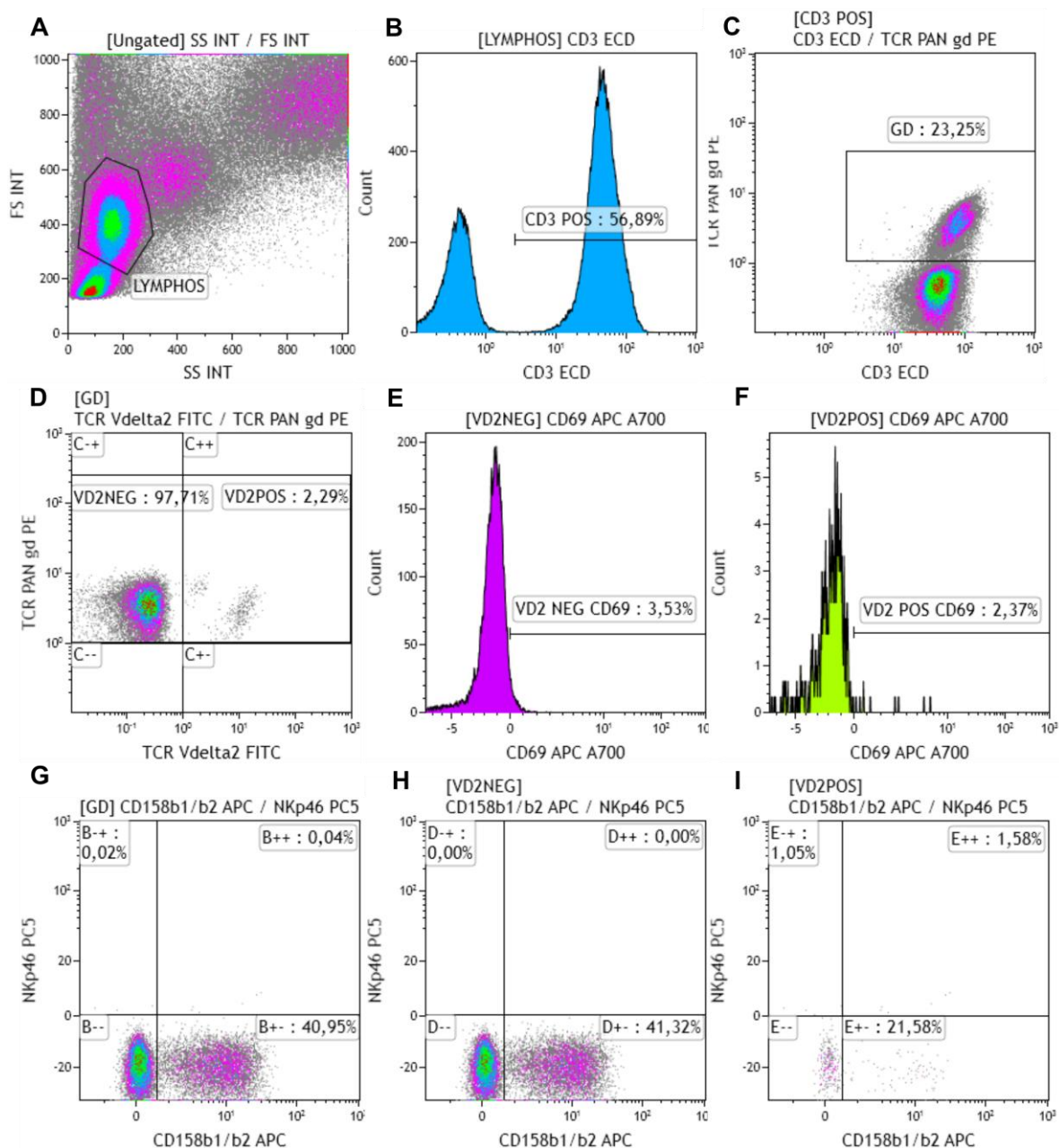


Figura 7. Protocolo citofluorimétrico para definição e análise das células T $\gamma\delta$ *ex vivo*.

A população total de linfócitos foi demarcada como população estratégica inicial, no contexto de “dot-plot” FSC vs. SSC (A), seguindo-se à definição da população de linfócitos T CD3⁺ (B). Em associação a esses linfócitos, as células T $\gamma\delta$ totais (Pan $\gamma\delta$) foram identificadas (C), frente às quais o perfil de expressão de V δ 2 definiu duas subpopulações (D). Para essas subpopulações e para as células T $\gamma\delta$ totais foi investigada a expressão simples (histogramas) (E e F) e/ou coexpressão (“dot-plots” de fluorescências) (G, H e I) de diferentes moléculas, como CD69, NKp46 e CD158b1/b2. Perfil de expressão representativo, obtido para um participante TBP.

3.8 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico

Para a avaliação do potencial funcional das células NK, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de 40 mL de sangue heparinizado. O plasma foi previamente separado da porção celular, após 10 min de centrifugação a 425 G, em TA, e o volume sanguíneo repostado com PBS (pH 7.1). O sangue reconstituído foi, então, adicionado ao reagente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Company, Saint Louis, MO, EUA), na proporção de 2:1, seguido de centrifugação de 30 min a 425 G em TA. Os PBMCs recuperados foram submetidos à lavagem por centrifugação em PBS por 10 min a 425 G em TA. Após a lavagem, os PBMCs foram submetidos à contagem diferencial para avaliação da viabilidade, em azul de trypan, em contador de células automático *Countess* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As células foram finalmente ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL, em meio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, EUA) para serem utilizadas nas avaliações *in vitro*.

3.9 Ensaio Funcional de Células NK *in vitro*

O potencial funcional de células NK foi avaliado através da sua capacidade citotóxica e pela produção intracelular de citocinas. O ensaio citotóxico consistiu da análise, por citometria de fluxo, da expressão da molécula LAMP-1 (CD107a) na superfície celular. A eficiência das células NK ainda foi investigada através da detecção de citocinas pró-inflamatórias, especificamente IFN- γ e TNF.

3.9.1 Linhagem Celular K562

O estímulo citotóxico das células NK foi obtido pela cocultura de PBMCs com as células da linhagem eritro-leucêmicas humanas K562 (ATCC CCL-243). Essas células apresentam a capacidade de promover a ativação espontânea de células NK, uma vez que não expressam molécula de MHC de classe I (Alter et al. 2004).

As células K562 foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² (Iwaki Glass, Asahi Techno Glass, Japão), contendo 10 mL de meio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA) enriquecido com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA), 100

U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As garrafas foram mantidas em estufa de calor úmido (Modelo COM-18AC, Panasonic Healthcare LTD., Japão), a 37°C, a 5% de CO₂, e na horizontal. Passagens foram realizadas uma vez por semana, sendo as células ressuspensas por remoção mecânica, com o auxílio de “cell scraper”, ou pela lavagem da superfície da garrafa com o uso de pipeta sorológica.

3.9.2 Co-culturas de Células NK com K562

As PBMCs previamente isoladas foram co-cultivadas frente às células da linhagem K562, na proporção de 1:1, sendo assim ressuspensas em meio RPMI 1640, enriquecido com 10% de SFB, de forma que sua concentração final fosse de 1x10⁶ células/mL por poço. Placas de 96 poços com fundo em “U” foram inicialmente sensibilizadas com 5µL do anticorpo anti-CD107a-FITC (BD Biosciences, USA) e acrescidas das células K562, ou de meio de cultura, nos poços dos controles negativos, ou de éster de forbol (PMA– 10ng/mL; Sigma-Aldrich, EUA) e ionomicina (500µg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), nos poços dos controles positivos. As PBMCs foram, então, adicionadas e, por fim, as células receberam uma solução contendo monensina (Sigma-Aldrich, EUA) e brefeldina-A (Sigma-Aldrich, EUA), nas respectivas concentrações de 6 µg/mL e 5 µg/mL. A placa foi mantida em estufa de calor úmido, à 37°C e 5% de CO₂, por um período de 16h (cultura “overnight”). Após esse período, foram adicionados 2 µL de cada um dos anticorpos monoclonais específicos, definidores das células NK anti-CD3-ECD, anti-CD56-PC5 e anti-CD16-PC5, e as células permaneceram em incubação durante 20 min, em TA e em ausência de luz. Seguiu-se a fixação dos anticorpos monoclonais e permeabilização da membrana celular das PBMCs, para a detecção das citocinas intracelulares, utilizando-se o kit “IntraPrep Permeabilization Reagent” (Beckman Coulter, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os anticorpos monoclonais anti-IFN-γ-PE e anti-TNF-PE, foram adicionados durante a permeabilização, após a qual uma lavagem por centrifugação, com PBS, durante 4 min, a 612 G finalizou o processo. As células foram, então, ressuspensas em PBS e imediatamente avaliadas em citômetros de fluxo Gallios ou MoFlo Astrios (Beckman Coulter, EUA), quando foram adquiridos até 5.000 eventos na região definidora das células NK CD3⁺CD56⁺CD16⁺.

3.9.3 Estratégia de Análise das Células NK *In Vitro*

A análise dos potenciais de degranulação, bem como de produção de citocinas pró-inflamatórias das células NK *in vitro*, seguiu-se com base na estratégia citofluorimétrica definida e apresentada na Figura 8.

A região inicial de linfócitos foi definida com a criação um “dot-plot” FSC vs. SSC (LYMPHOS) (Fig. 8.A), à qual foi associado um segundo “dot-plot” CD16/CD56 vs. CD3, a fim de excluir as células CD3⁺ (Fig. 8.B). Uma região NK foi, então, definida, abrangendo as células CD16CD56⁺/CD3⁻, a partir da qual foram criados um “dot-plot” CD107a vs. TNF (ou IFN- γ) (Fig. 8.C), e dois histogramas, para a determinação das células NK em degranulação (Fig. 8.D) e produtoras de TNF ou IFN- γ (CD107a⁺/TNF⁺) (Fig. 8.E), daquelas em degranulação ativa e aquelas produtoras das citocinas pró-inflamatórias (TNF ou IFN- γ), respectivamente.

A Figura 8 exemplifica a análise da produção TNF observada para um dos participantes TBEP do estudo, mas a mesma estratégia foi utilizada para IFN- γ (Dados não mostrados).

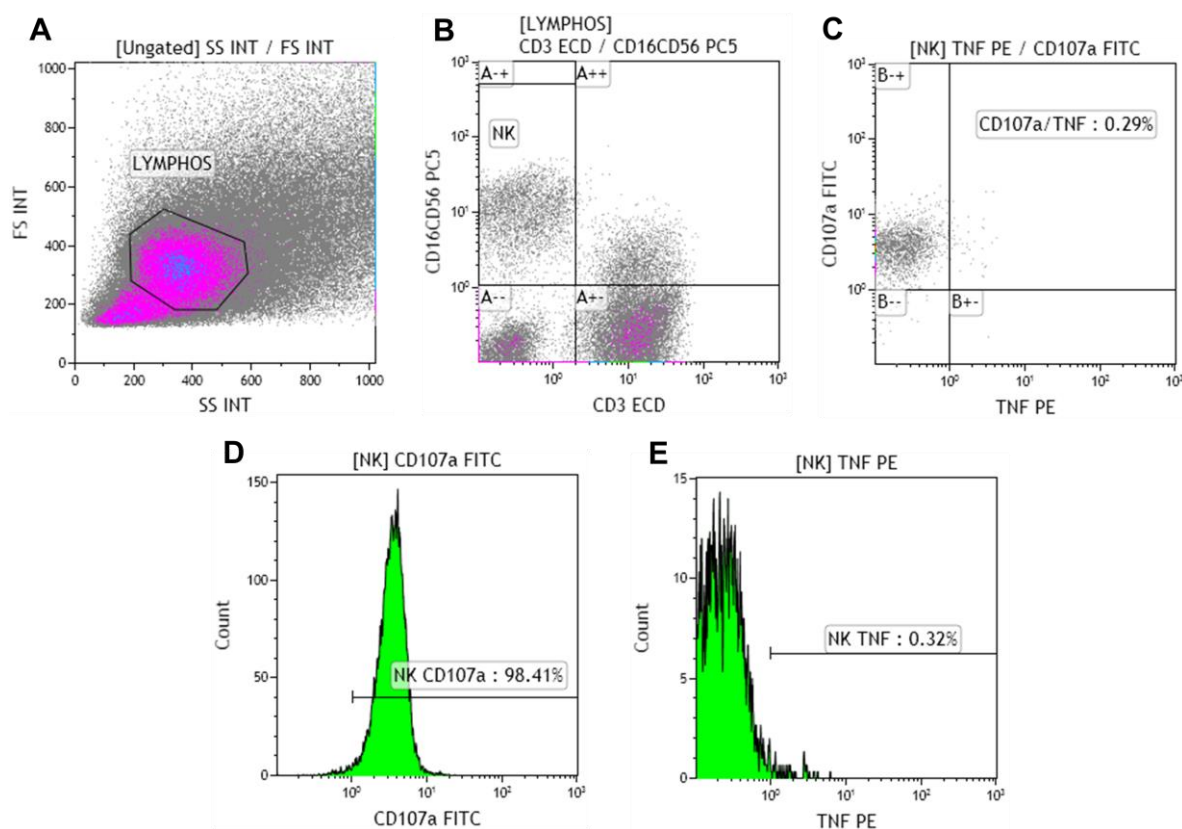


Figura 8. Protocolo citofluorimétrico para análise funcional das células NK *in vitro*.

A população total de linfócitos foi demarcada como população estratégica inicial, no contexto de dot-plot FSC vs. SSC (A), seguindo-se à definição da população de células NK CD3⁻CD56⁺CD16⁺ (B). Em

associação a essas células, a coexpressão de CD107a e TNF (“dot-plots” de fluorescências) (C) e a expressão simples dessas moléculas (histogramas) (D e E) foram determinadas. Perfil de expressão de CD107a e TNF representativo, obtido para um participante TBP.

3.10 Análises de Dados

Todos os dados obtidos foram digitados e armazenados em planilha Excel (Microsoft Excel 2011). A análise estatística descritiva foi realizada utilizando-se os “softwares” Stata 11.0 (STATA Corp. College Station, Texas, EUA) e GraphPad Prism, e os gráficos realizados com os “softwares” GraphPad Prism e Excel. Inicialmente, foram determinadas as medianas, mínimo, máximo e os intervalos interquartílicos para cada um dos parâmetros investigados nos três grupos do estudo: HIV/TBEP, HIV/TBP e TBP. Os dados foram, então, submetidos a testes não-paramétricos, como o teste de qui-quadrado para a avaliação das variáveis categóricas entre os três grupos, o teste de Kruskal-Wallis para a avaliação dos três grupos em conjunto, e o teste não-pareado de Wilcoxon para comparação intergrupos, considerando-se as análises periféricas *ex vivo* e *in vitro*. O resultado foi considerado estatisticamente significativo quando a probabilidade de significância ou o valor-p apresentou-se menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas com a participação e orientação de um profissional estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Casuística

Os participantes avaliados neste estudo foram definidos de acordo com a presença de infecção pelo HIV-1 e as manifestações clínicas da tuberculose. Foram avaliados seis participantes coinfectados pelo HIV-1 e *Mtb* com apresentação ganglionar (HIV-TBEP), frente aos grupos controles, compostos de 15 participantes coinfectados pelo HIV-1 e *Mtb* com apresentação pulmonar (HIV-TBP), além de 15 participantes mono infectados pelo *Mtb* com apresentação pulmonar (TBP).

Todos os participantes foram submetidos à testagem sorológica para as hepatites B e C, HTLV-I e II, sífilis, toxoplasmose e Doença de Chagas, e apresentaram resultados negativos. Ainda, os participantes do grupo TBP também foram testados para HIV-1, confirmando ausência de infecção.

A casuística foi analisada quanto às suas características sociodemográficas. A Tabela 3 apresenta a distribuição dos participantes segundo as variáveis nominais idade, gênero e raça. Uma mediana de 32 anos foi observada para os participantes do HIV-TBEP, variando do mais novo com 26 anos para o mais velho com 34 anos [Interquartil (IQR): 29–33]. Para os pacientes HIV-TBP, uma faixa etária de 19 a 57 anos foi observada, com mediana de 34 anos (IQR: 32–42), enquanto a idade dos participantes TBP variou entre 21 e 62 anos (Mediana: 36; IQR: 31–44). Portanto, não houve diferença entre os grupos quanto à distribuição dessa variável ($p=0.378$).

Em relação à raça, os participantes se autodeclararam brancos, mestiços e negros (Tabela 3). A distribuição dos mesmos quanto às características raciais também não apresentou diferença significativa entre os três grupos clínicos ($p=0,223$). O mesmo foi observado para a variável de gênero, para a qual foram observadas frequências semelhantes entre os grupos estudados ($p=0,516$). No entanto, independente do grupo clínico, a maioria dos participantes avaliados são do gênero masculino (63,9%).

O monitoramento laboratorial da infecção pelo HIV-1 é classicamente realizado através de parâmetros imunológicos e virológicos, respectivamente, pelas contagens absolutas das células T CD4⁺ e T CD8⁺, e pela quantificação da carga viral plasmática (Ministério da Saúde 2017). Com a finalidade de homogeneizar o grau de imunodeficiência dos pacientes coinfectados pelo HIV-1, contagens

absolutas de linfócitos T CD4⁺ iguais ou inferiores a 350 cels./mm³ de sangue foram um dos critérios considerados para a inclusão desses participantes, além da ausência de tratamento para TB e de cART, uma vez que a investigação teve por objetivo identificar potenciais perfis das células imunes inatas relacionados com a manifestação extrapulmonar da TB. Deste modo, contagens absolutas semelhantes de células T CD4⁺ foram observadas entre os grupos HIV-TBEP e HIV-TBP, para as quais não houve diferença estatística significativa [Medianas: 98 cels./mm³ (IQR: 45–175 cels./mm³); e 41 cels./mm³ (IQR: 8–90 cels./mm³), respectivamente]. No entanto, uma tendência a contagens mais baixas foi observada entre aqueles participantes HIV-TBP ($p=0,1093$; Tabela 3). Como esperado, valores de T CD4⁺ significativamente mais elevados foram observados para os participantes TBP ($p\leq 0,001$; Tabela 3).

Por sua vez, os valores medianos das contagens absolutas de linfócitos T CD8⁺ observados para os grupos coinfectados [HIV-TBEP: 751 cels./mm³ (424–999 cels./mm³); HIV-TBP: 314 cels./mm³ (235–758 cels./mm³)] mostraram-se semelhantes àqueles observados para os pacientes TBP [453 cels./mm³ (361–827 cels./mm³)]. Apesar dessas contagens não se diferenciarem entre os grupos coinfectados, contagens ligeiramente mais elevadas foram observadas para os portadores de TB ganglionar ($p=0,166$) (Tabela 3).

Por consequência das contagens absolutas de T CD4⁺ reduzidas, a relação CD4/CD8 apresentou-se inferior a 1,0 entre os pacientes coinfectados, enquanto nos participantes acometidos apenas pela TB, essa relação não sofreu alteração, apresentando-se $> 1,0$, como pode ser visualizado na Tabela 3.

Quanto ao parâmetro virológico de acompanhamento da infecção pelo HIV-1, os participantes HIV-TBEP apresentaram valores medianos de carga viral plasmática, próximos àqueles dos participantes HIV-TBP, embora sutilmente menor [5,15 log₁₀cópias/mL (4,61–5,57 log₁₀cópias/mL) e 5,63 log₁₀cópias/mL (5,25–5,95 log₁₀cópias/mL), respectivamente].

Tabela 3. Distribuição das variáveis sociodemográficas, imunológicas e virológica dos três grupos clínicos avaliados no estudo.

	HIV-TBEP (n=6)	HIV-TBP (n=15)	TBP (n=15)	P-valor
Idade (anos)[†]	32 (29 – 33)	34 (32 – 42)	36 (31 – 44)	0,378
Gênero, n (%)				
Masculino	4 (66,6)	11 (73,4)	8 (53,4)	0,516
Raça n (%)				
Branco	3 (50,0)	2 (13,4)	7 (46,6)	0,223
Mestiço	3 (50,0)	9 (60,0)	6 (40,0)	
Negro	–	4 (26,6)	2 (13,4)	
Parâmetros imunológicos[†]				
T CD4⁺ (cels./mm³)	98 (45– 175)	41 (8 – 90)	809* (699 – 980)	<0,001
T CD8⁺ (cels./mm³)	751 (424 – 999)	314 (235 – 758)	453 (361 – 827)	0,166
CD4/CD8	0,13 (0,07 – 0,23)	0,06 (0,03 – 0,14)	1,71* (0,98 – 2,30)	<0,001
Parâmetro virológico[†]				
Carga viral (log₁₀ cópias/mL)	5,15 (4,61–5,57)	5,63 (5,25–5,95)	NA	0,083 [‡]

Valor de *p* referente ao teste de Kruskal-Wallis para a avaliação das variáveis contínuas e ao teste de qui-quadrado entre os três grupos; [‡]*p*-valor referente ao teste não-pareado de Wilcoxon entre os grupos HIV-TBEP e HIV-TBP; **p*≤0,001 em relação aos grupos clínicos HIV-TBEP e HIV-TBP; [†]Dados das variáveis: idade, parâmetros imunológicos e virológico expressos em mediana (interquartis); n=número de casos; NA=não aplicável.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas para as contagens absolutas de T CD4⁺ (Fig. 9.A) ou para a carga viral plasmática (Fig. 9.B), entre os participantes HIV-TBEP e HIV-TBP, uma imunossupressão mais acentuada, paralela a uma viremia ligeiramente mais elevada, foram observadas nos casos de tuberculose pulmonar associada ao HIV-1.

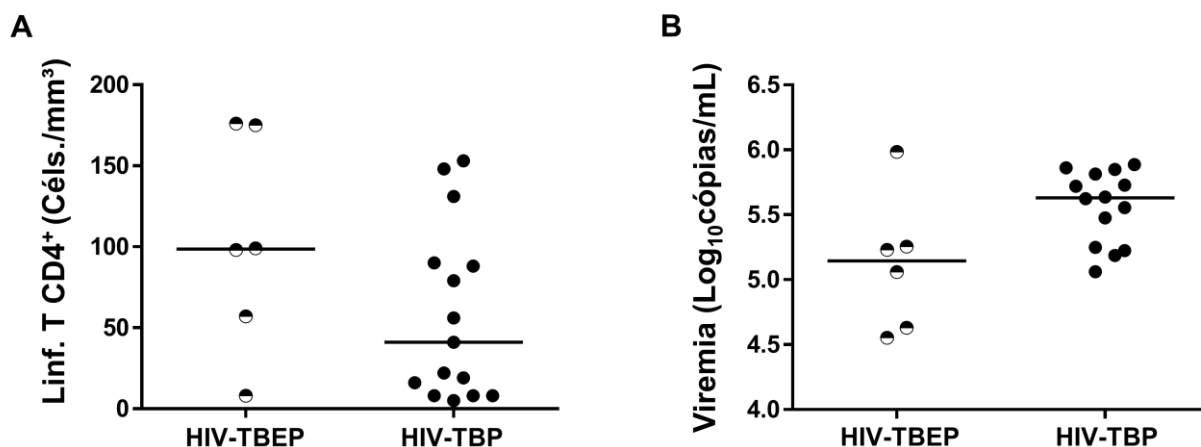


Figura 9. Distribuição das contagens absolutas dos linfócitos T CD4⁺ (cél./mm³) (A) e da quantificação da carga viral plasmática (Log₁₀cópias/mL) (B) dos participantes infectados pelo HIV-1.

HIV-TBEP: pacientes com tuberculose extrapulmonar; HIV-TBP: pacientes com tuberculose pulmonar. As barras horizontais representam as medianas.

4.2 Caracterização *Ex Vivo* do Repertório de Células NK

O repertório periférico de células NK foi caracterizado *ex vivo*, através da expressão de uma gama de diferentes moléculas envolvidas nos processos de ativação, inibição e coestimulação celular, para os três grupos de participantes clinicamente distintos.

Primeiramente, foi analisada a frequência de células NK totais, a qual foi calculada considerando-se os eventos citofluorimétricos definidos fenotipicamente como CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺, a partir dos linfócitos totais (Fig. 5.A-D). A distribuição encontrada para essas células entre os participantes HIV-TBEP, HIV-TBP e TBP pode ser observada na Figura 10.

Uma tendência à frequência mediana reduzida de células NK foi observada entre os participantes coinfectados, especialmente para aqueles com a forma extrapulmonar da doença [HIV-TBEP: 3,06% (2,51–18,39%), e HIV-TBP: 4,16% (1,52–10,95%)], quando comparados ao grupo mono infectado pelo *Mtb* [12,59% (8,19–20,30%)]. Entretanto, apenas entre o grupo HIV-TBP e este último essa redução foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Fig. 10).

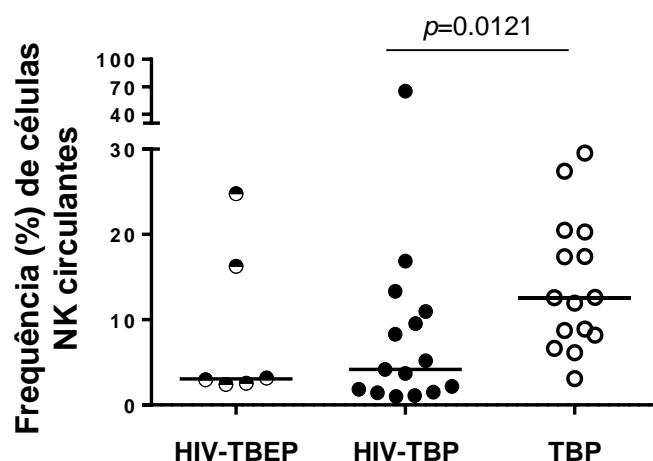


Figura 10. Distribuição *ex vivo* de células NK nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV-1, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Uma vez definidas as frequências das células NK, seguiu-se então, com sua caracterização quanto à expressão de diferentes moléculas, pertencentes às famílias KIR (Fig. 11.A-F), de receptores de lectina tipo C (Fig. 11.H-L), NCR (Fig. 11.M-P), entre outras (Fig. 11.G,Q-T).

O perfil de receptores do tipo KIR, da superfamília das imunoglobulinas, foi explorado utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD158a, CD158b1/b2,j, CD158d, CD158e, CD158e1/e2 e CD158i, os quais identificam a expressão de uma gama de receptores envolvidos especialmente na inibição, mas também na ativação das células NK. Como pode ser visualizado na Figura 11 (A-F), perfis de distribuição semelhantes foram observados entre os participantes com diferentes características clínicas, para todos os KIRs avaliados, e apenas uma significância estatística foi detectada para o receptor CD158i (Fig. 11.F).

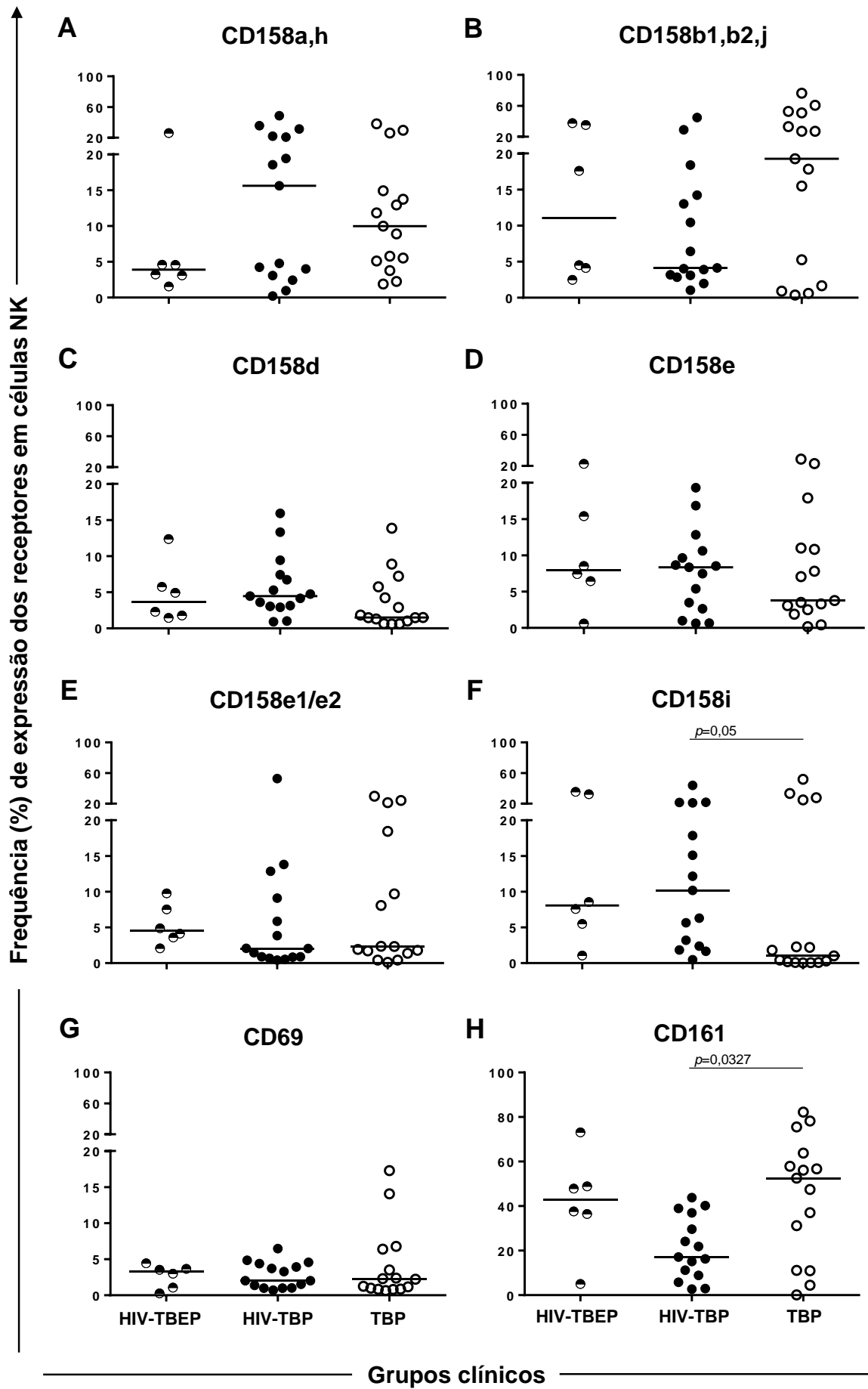


Figura 11.

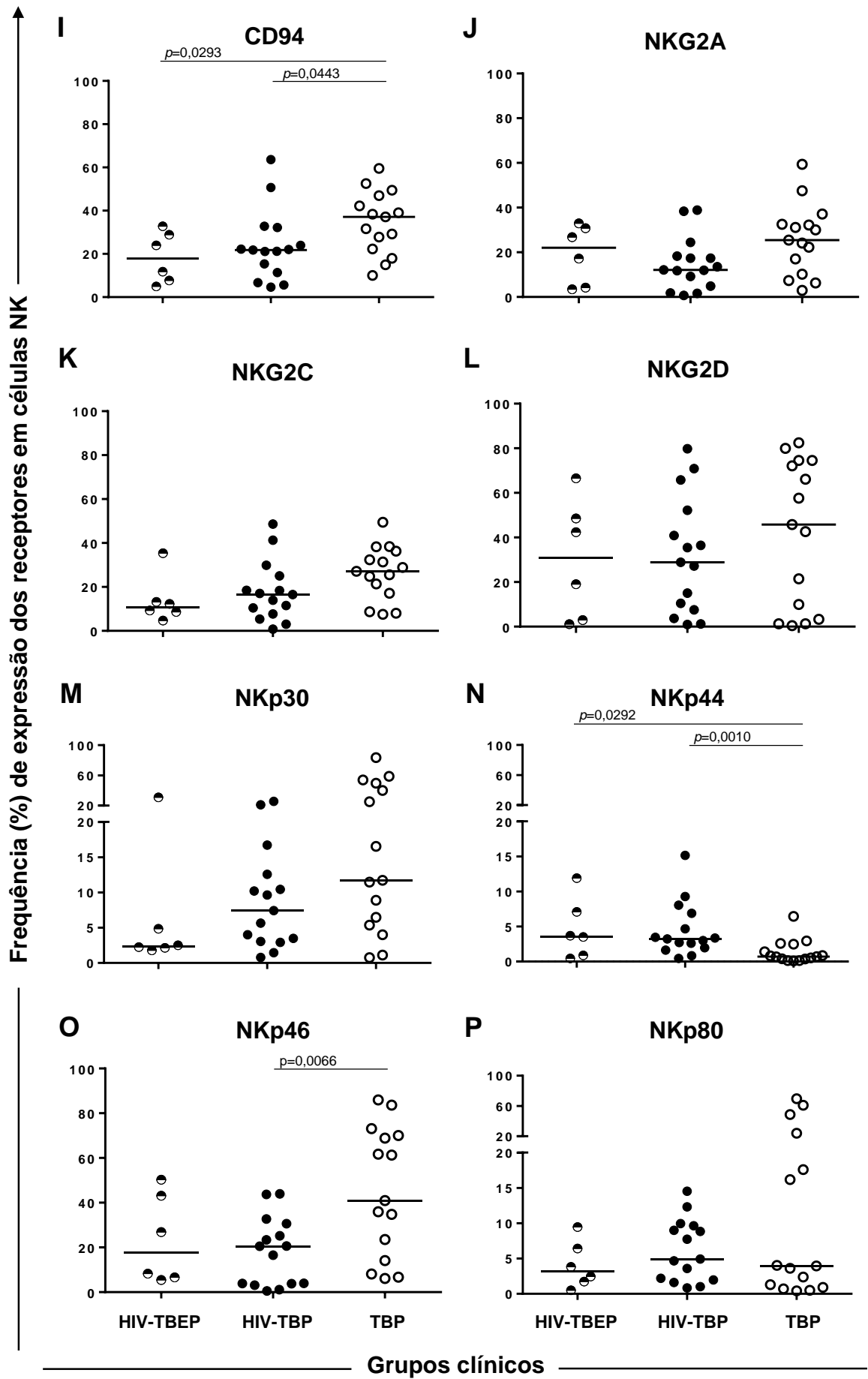


Figura 11.

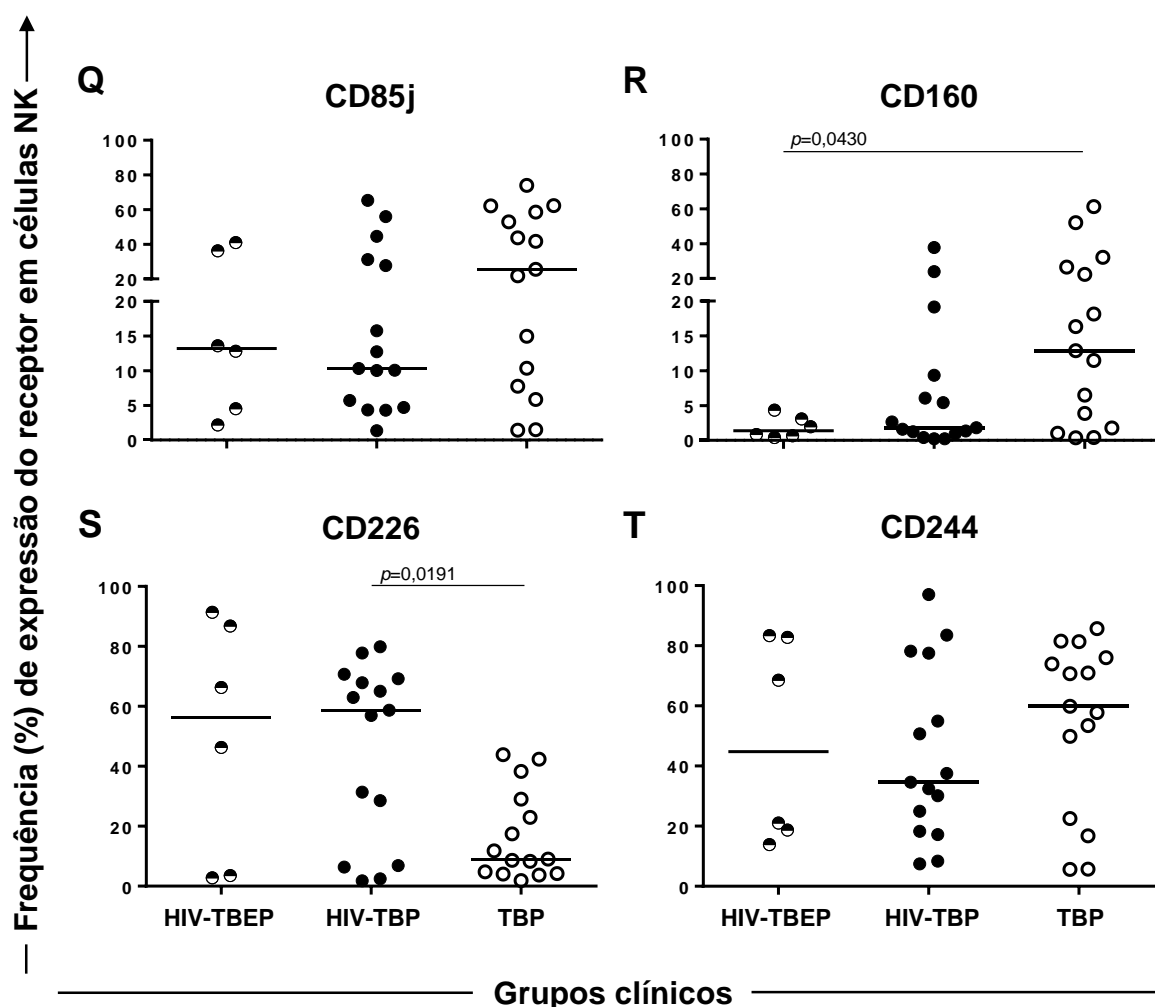


Figura 11. Distribuição de expressão *ex vivo* dos receptores do tipo KIR [CD158a (A), CD158b1,b2,j (B), CD158d (C), CD158e (D), CD158e1,e2 (E), CD158i (F)], receptores do tipo lectina C [CD69 (G), CD161 (H), CD94 (I), NKG2A (J), NKG2C (K), NKG2D (L)], NCRs [NKp30 (M), NKp44 (N), NKp46 (O), NKp80 (P)], entre outros [CD85j (Q), CD160 (R), CD226 (S) e CD244 (T)], em células NK CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 com a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e com tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15), e não infectados pelo HIV-1, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Para o receptor CD158a, a análise entre os pacientes infectados pelo HIV, embora um $p=0,35$ tenha sido alcançado, uma frequência de expressão mediana inferior entre os pacientes HIV-TBEP [3,90% (2,71 –9,95%)] foi observada frente àqueles HIV-TBP [15,60% (3,08 –22,0%)] (Fig. 11.A).

Além disso, o receptor CD158i apresentou expressão inferior entre os participantes mono infectados pelo *Mtb* [1,01% (0,1–24,91%)], quando observados frente àqueles co infectados pelo HIV-1 com apresentação pulmonar de TB [10,17% (2,39–21,15%), $p\leq 0,05$]. Ainda, uma tendência à expressão inferior foi observada quando comparados pacientes TBP e HIV-TBEP [8,06% (4,38–33,14%), $p=0,07$] (Fig. 11.F).

Além dos receptores KIR, receptores da superfamília das lectinas tipo C também foram avaliados, como as moléculas CD69, CD161, CD94 (Fig. 11.G-I), e os receptores da família NKG2: NKG2A, NKG2C e NKG2D (Fig. 11.J-L).

A molécula CD69, a qual é rapidamente sintetizada e expressa frente à ativação das células leucocitárias (Ziegler et al. 1994), possui função ativadora nas células NK, induzindo a atividade citotóxica e a produção de citocinas (Pisegna et al. 2002). Expressões semelhantes foram detectadas entre os participantes, independente do grupo clínico avaliado, sem qualquer diferença estatística significativa observada, para valores medianos de 3,27% (0,88–3,86%) para pacientes HIV-TBEP, 2,03% (1,01–4,40%) para HIV-TBP, e 2,23% (0,85–6,39%) para aqueles TBP (Fig. 11.G).

No entanto, para o receptor CD161, outra lectina do tipo C decisiva da função das células NK (Fergusson et al. 2011), uma expressão significativamente mais elevada foi observada para o grupo TBP [54,33% (26,13–66,71%)], comparada àquela apresentada pelos participantes HIV-TBP [17,11% (8,86–36,98%); $p \leq 0,05$], mas não frente aos pacientes HIV-TBEP [42,74% (28,61–54,91%)] (Fig. 11.H).

De mesmo modo, para a molécula acessória dos complexos de receptores NKG2, a molécula CD94, foi detectada uma frequência mediana significativamente maior entre os pacientes mono infectados com TBP [37,11% (22,25–46,97%)], em relação a ambos os grupos clinicamente distintos de pacientes co infectados pelo HIV-1 e por *Mtb* [TBEP: 17,85% (6,99–29,89%), e TBP: 21,81% (11,41–32,18%); $p \leq 0,05$] (Fig. 11.I).

Para os receptores da família NKG2, não houve diferença entre as frequências de expressão de NKG2A [HIV-TBEP: 22,0% (4,01–31,33%); HIV-TBP: 12,09% (4,86–18,32%); e TBP: 25,49% (10,20–32,50%)] (Fig. 11.J), ou NKG2C [HIV-TBEP: 10,81% (7,66–18,74%); HIV-TBP: 16,51% (7,69–25,05%); e TBP: 27,15% (17,15–36,32%)] (Fig. 11.K), embora seu heterodímero CD94 tenha apresentado uma frequência superior nos pacientes com TB, como previamente descrito (Fig. 11.I).

Por sua vez, o receptor de ativação NKG2D (Fig. 11.L), o qual é constitutivamente expresso em todas as células NK humanas em repouso (Lanier 2015), apresentou uma distribuição de expressão semelhante entre os grupos, sem

qualquer diferença estatística. No entanto, medianas discretamente mais baixas foram observadas para os pacientes infectados pelo HIV-1 [(HIV-TBEP: 30,73% (2,48–53,02%), HIV-TBP: 28,91% (7,56–52,23%), e TBP: 45,75% (3,30–74,50%)].

A família de receptores NCR também foi contemplada pela análise dos receptores da superfamília das lectinas tipo C NKp30, NKp44, e NKp46 (Fig.11.M-O), e da superfamília das Igs, NKp80 (Fig. 11.P).

O receptor NKp44, expresso somente em células ativadas (Middleton et al. 2002), foi significativamente mais expresso nas células dos participantes infectados pelo HIV-1 [HIV-TBEP [3,6% (0,78–8,30%), e HIV-TBP: 3,24% (1,97–6,88%)], quando comparado aos casos de TB apenas [0,72% (0,37–2,48%); $p \leq 0,05$] (Fig. 11.N). Para o receptor NKp46, a frequência mediana de células positivas somente apresentou-se reduzida no grupo coinfestado HIV-TBP [20,55% (3,76–30,64%)], quando comparada à expressão observada para o grupo monoinfectado TBP [40,92% (14,14–70,07%); $p \leq 0,05$] (Fig. 11.O). Para o receptor NKp30 nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os pacientes [(HIV-TBEP: 2,39% (2,05–11,41%); HIV-TBP: 7,42% (3,06–12,57%); e TBP: 11,72% (5,04–49,67%)] (Fig. 11.M). O mesmo repetiu-se para o receptor NKp80 [HIV-TBEP:3,15% (1,44–7,19%); HIV-TBP:4,94% (1,97–9,63%); e TBP: 3,94% (0,92–24,04%)] (Fig. 11.P).

Quanto aos demais membros da superfamília das imunoglobulinas avaliados, o CD160, um receptor de ativação de grande importância para as células NK (Tu et al. 2015), apresentou uma frequência de expressão reduzida nos participantes coinfestados pelo HIV-1 e pelo *Mtb* com TB ganglionar [HIV-TBEP: 1,41% (0,60–3,40%)], cujos valores demonstraram-se significativamente menores que nos pacientes de TBP [12,89% (1,80–26,57%); $p \leq 0,05$] (Fig. 11.R). Por outro lado, o receptor de ativação CD226 ou DNAM-1, envolvido no processo de formação da sinapse imunológica citotóxica (Xiong et al. 2015), apresentou uma frequência de expressão mais elevada no grupo HIV-TBP [58,72% (6,91–69,23%)], sendo significativamente maior em relação ao grupo monoinfectado pelo *Mtb* [9,01% (4,23–29,05%); $p \leq 0,05$] (Fig. 11.S).

Por fim, nenhuma diferença estatística pôde ser observada para as frequências de expressão do receptor inibitório CD85j, pertencente à família ILT, ou para o receptor CD244 ou 2B4, membro da família SLAM de receptores

imunoregulatórios (Mathew et al. 2009). Uma redução sutil na expressão de CD85j foi observada frente a infecção pelo HIV-1 [HIV-TBEP: 13,21% (3,93–37,39%), e HIV-TBP: 10,33% (4,69–31,14%)], em relação aos pacientes de TB não infectados pelo vírus [(TBP: 25,57% (7,77–58,52%)]. Para o CD244, um perfil semelhante de expressão foi observado entre os três grupos clínicos avaliados [(HIV-TBEP: 44,77% (17,47–82,96%), HIV-TBP: 34,61% (18,30–77,52%), e TBP: 59,88% (22,57–76,03%)].

As frequências de coexpressão de determinados receptores pelas células NK também puderam ser avaliadas, considerando-se a estratégia de combinações de anticorpos monoclonais utilizadas na metodologia do estudo. Deste modo, foi possível identificar o nível de comprometimento de uma mesma célula NK, quanto à expressão de dois receptores distintos, com características de ativação e inibição. As principais diferenças nas frequências de coexpressões foram observadas entre os grupos HIV-TBP e TBP (Fig. 12).

As frequências de coexpressão dos receptores CD226/CD158i (Fig 12.A), CD226/NKG2A (Fig 12.B), CD158i/CD161 (Fig 12.C), CD158i/NKG2A (Fig 12.D) e CD158d/NKp44 (Fig. 12.F) foram significativamente mais elevadas no grupo infectado pelo HIV-1, com a forma pulmonar de TB [respectivamente: 4,96% (1,33–11,38%), 5,56% (0,63–9,68%), 4,94% (1,12–17,11%), 2,45% (0,68–8,27%), 2,23% (0,69%–3,77%)], quando comparadas àquelas observadas para os pacientes com TB pulmonar apenas [respectivamente: 0,38% (0,09–1,19%), 0,84% (0,59–2,36%), 0,10% (0–1,13%), 0,38% (0,06–1,33%), 0,54% (0,10–2,15%); $p \leq 0,05$].

Por outro lado, a frequência de coexpressão de NKp30/NK46 demonstrou-se reduzida no grupo HIV-TBP [7,06% (1,17–15,68%)], quando comparada ao grupo TBP [18,57% (6,73–55,49%); $p \leq 0,05$] (Fig. 12.E).

As demais coexpressões avaliadas, de acordo com as combinações de anticorpos monoclonais utilizadas, não apresentaram diferenças estatísticas significativas (dados não mostrados). No entanto, foi possível identificar uma perturbação do repertório de NK nos pacientes infectados pelo HIV-1 com TB pulmonar, o que pode indicar uma participação dessas células na imunidade desses participantes.

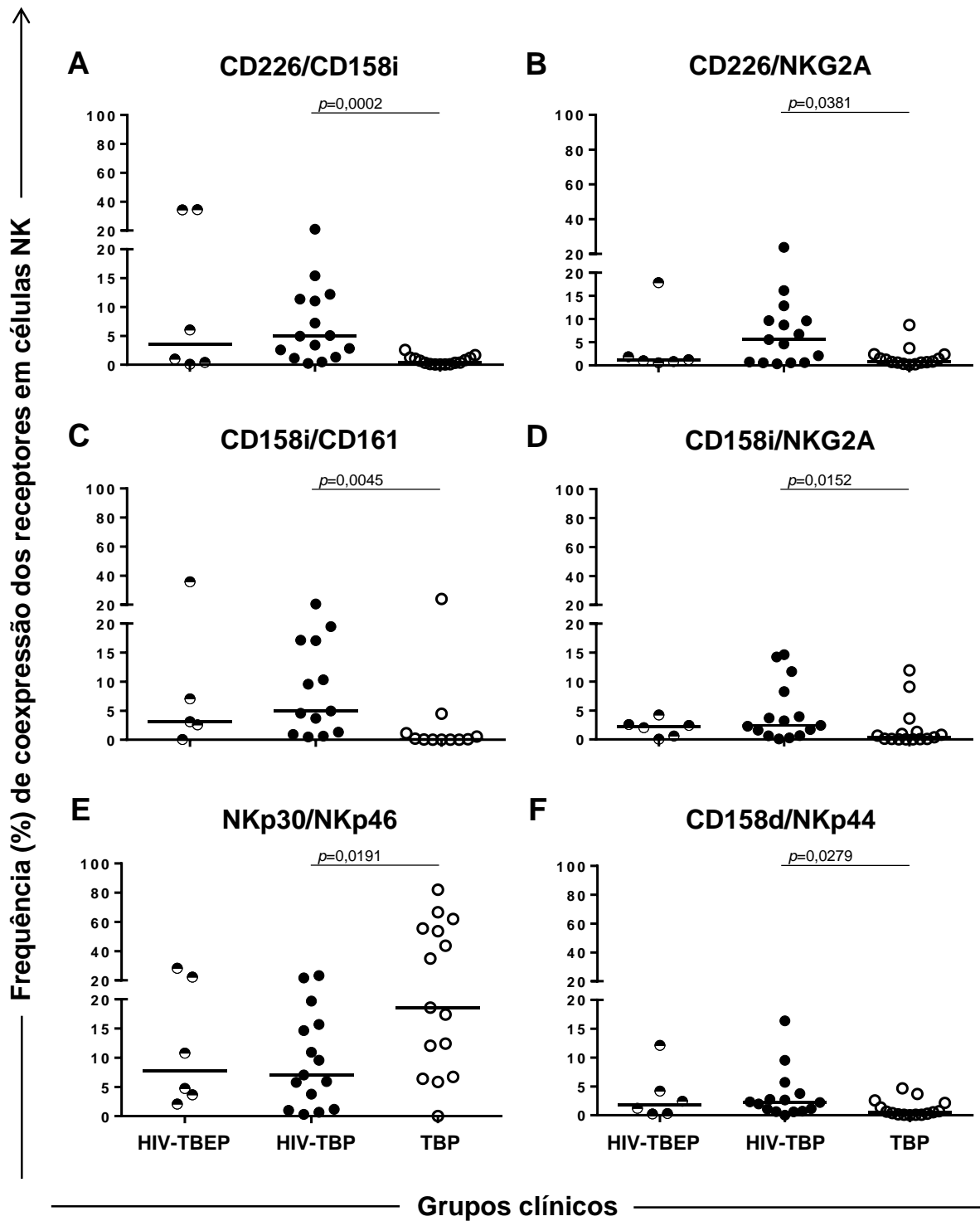


Figura 12. Distribuição *ex vivo* de coexpressão dos receptores CD226/CD158i (A), CD226/NKG2A (B), CD158i/CD161 (C), CD158i/NKG2A (D), NKp30/NKp46 (E) e CD158d/NKp44 (F) pelas células NK nos três grupos de pacientes clinicamente distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15).

4.3 Caracterização *Ex Vivo* das Células iNKT

Dando continuidade à análise *ex vivo* do perfil das células linfoides inatas, as células NKT também foram alvo do presente estudo, mais especificamente aquelas do tipo I ou iNKT (Juno et al. 2012). Identificadas através da expressão da cadeia invariante $V\alpha 24J\alpha 18^+$, essas células foram definidas no contexto das células NKT $CD3^+/CD56^+$ totais. A partir das células $V\alpha 24J\alpha 18^+$ foram então determinadas as subpopulações iNKT avaliadas (Fig. 6.A-C).

Assim como conduzido para as células NK, inicialmente foi investigada frequência das células NKT totais e iNKT nos três grupos clínicos: HIV-TBEP, HIV-TBP e TBP. Para as células NKT totais, a distribuição das frequências apresentou-se semelhante entre os três grupos [(HIV-TBEP: 1,54% (0,86–2,73%), HIV-TBP: 1,01% (0,35–2,0%), e TBP: 1,69% (1,02–4,65%)], portanto, nenhuma diferença estatística pôde ser observada (Fig. 13).

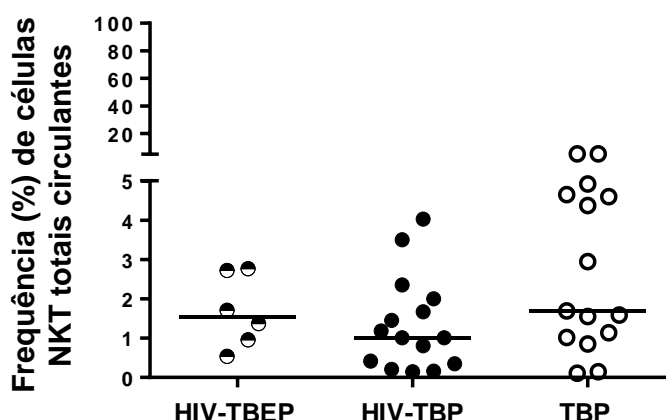


Figura 13. Distribuição *ex vivo* de células NKT totais nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Quanto às células iNKT, embora uma aparente redução de células tenha sido observado no grupo infectado pelo HIV-1 com a forma extrapulmonar de TB [3,60% (2,44–8,70%)], em relação aos demais pacientes [HIV-TBP: 8,01% (4,48–10,64%), e

TBP: 7,01% (3,34–9,67%)], esta redução não apresentou significância estatística (Fig. 14).

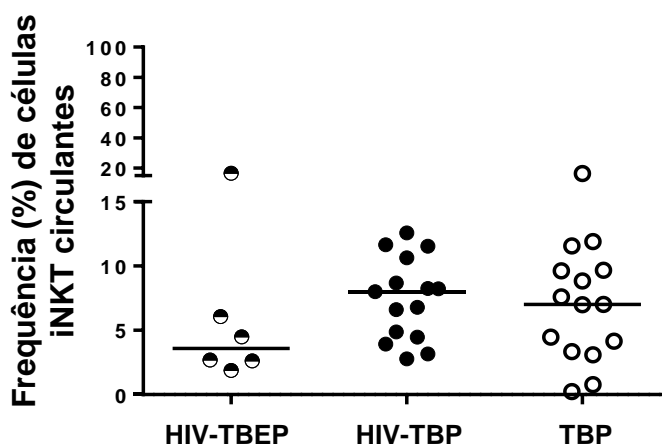


Figura 14. Distribuição *ex vivo* de células iNKT nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Os níveis de ativação e o estágio de diferenciação das células iNKT foram investigados através da coexpressão das moléculas CD69 e CD161. Células iNKT mais ativadas e em estágio mais avançado de diferenciação foram observadas numa maior frequência nos grupos infectados pelo HIV-1 [HIV-TBEP: 49,83% (17,37–63,67%), e HIV-TBP: 33,78% (17,86–58,96%)], quando comparadas aos pacientes com TB pulmonar [13,16% (5,50–25,00%); $p \leq 0,05$], como pode ser visualizado na figura 15. Não houve diferença significativa nos níveis circulantes dessas células entre os pacientes infectados pelo HIV-1, embora uma mediana mais elevada tenha sido apresentada pelos pacientes com TB extrapulmonar.

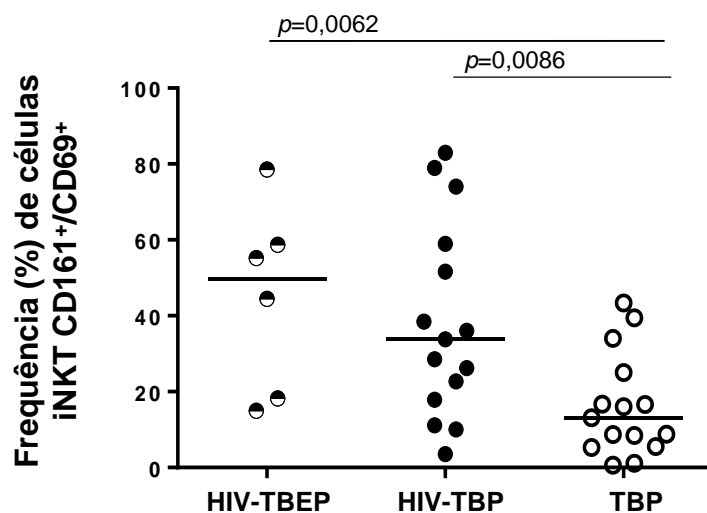


Figura 15. Distribuição *ex vivo* das células CD161+/CD69+ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

As subpopulações de células iNKT CD4⁺ e CD8⁺ periféricas também foram investigadas (Fig. 16.A-D). A subpopulação iNKT CD4⁺/CD8⁻ apresentou uma distribuição de frequências semelhante entre os três grupos, e desse modo, nenhuma significância estatística foi observada (Fig. 16.A). Para a subpopulação CD4⁻/CD8⁺, apesar de valores medianos aparentemente mais baixos terem sido apresentados pelos pacientes infectados pelo HIV-1 [HIV-TBEP: 21,81% (14,06 – 52,19%), HIV-TBP: 19,15% (8,77 – 52,63%), e TBP: 47,66% (9,21 – 74,78%)], nenhuma significância estatística pôde ser observada (Fig. 16.B). Adicionalmente, ainda que a subpopulação CD4⁻/CD8⁻ tenha sido expressa em maior frequência pelo grupo HIV-TBEP [34,68 (8,34 – 64,17%)] em relação aos outros grupos [HIV-TBP: 22,22 (10,53 – 39,28%), e TBP: 18,75 (10,55 – 43,40%)], nenhuma diferença estatística também pôde ser observada (Fig. 16.C). Por sua vez, a subpopulação CD4⁺/CD8⁺ apresentou frequências mais elevadas no grupo HIV-TBP [23,68% (2,25–37,50%)], quando comparadas aquelas observadas para o grupo TBP [3,65% (1,40–8,70%); $p \leq 0,05$] (Fig. 16.D).

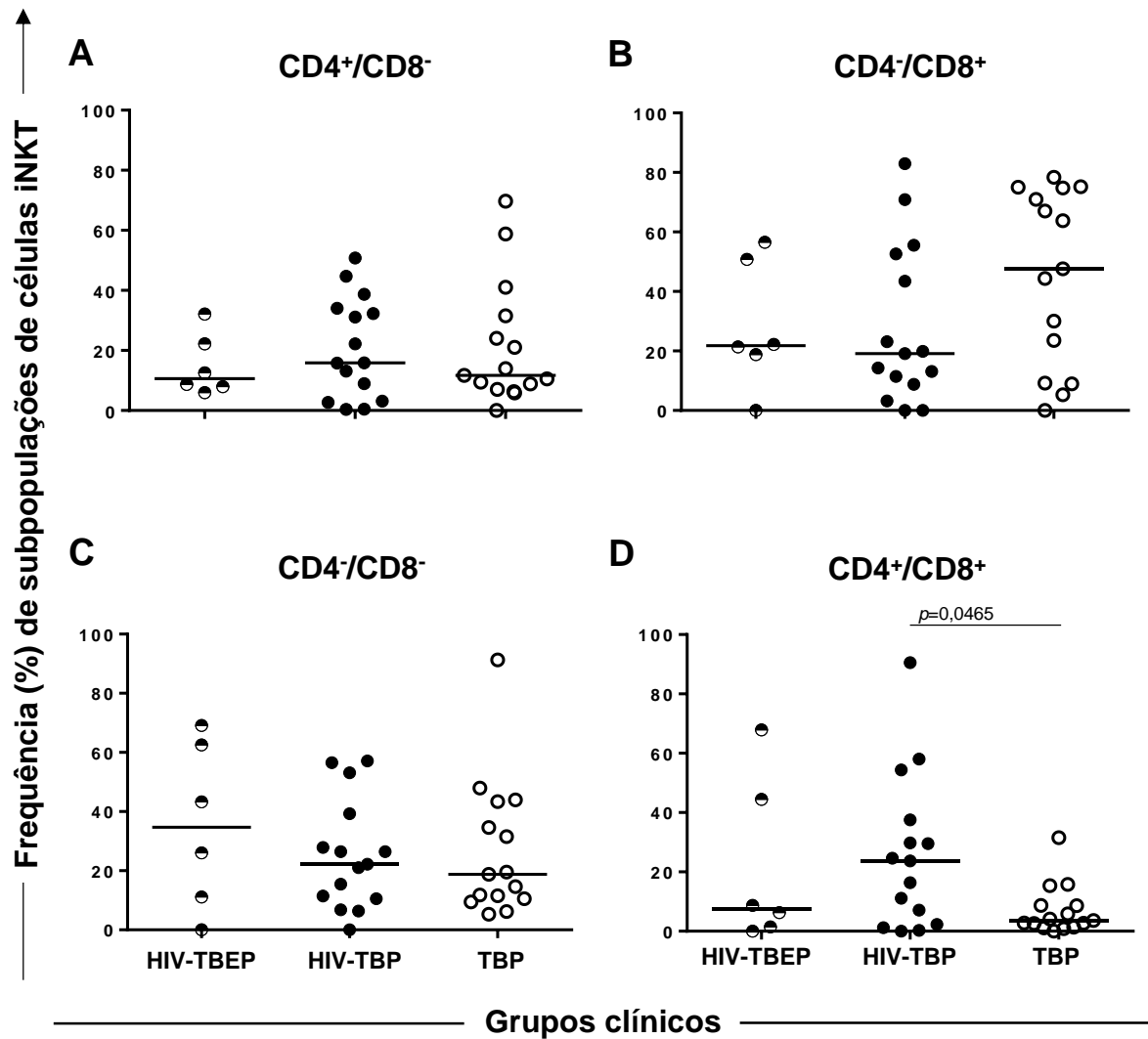


Figura 16. Distribuição *ex vivo* das subpopulações CD4⁺/CD8⁻ (A), CD4⁻/CD8⁺ (B), CD4⁻/CD8⁻ (C) e CD4⁺/CD8⁺ (D) de células iNKT nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

As subpopulações de células iNKT também foram avaliadas quanto ao nível de ativação, de acordo com a expressão da molécula CD69, cujas distribuições das frequências observadas para os três grupos clinicamente distintos estão demonstradas na figura 17.

Para a subpopulação iNKT CD4⁺, pôde ser observada uma frequência relativamente maior de células ativadas no grupo HIV-TBP [2,21% (0,71–8,51%)], em comparação ao grupo TBP [0,81% (0,47–1,00%); $p \leq 0,05$] (Fig. 17.A). Embora não haja significância estatística, a mediana da distribuição de células ativadas, observada para o grupo HIV-TBEP, apresentou-se bem mais elevada que aquelas encontradas para os outros grupos [5,85% (0,60%–22,77%)].

Já para a subpopulação iNKT CD8⁺, os participantes coinfectados de ambos os grupos também apresentaram frequências de células ativadas superiores, e estatisticamente significativas em relação ao grupo mono infectado por *Mtb* [HIV-TBEP: 29,40% (19,62–57,05%), HIV-TBP: 10,32% (8,93–27,87%), e TBP 4,35% (1,46– 9,21%); $p \leq 0,05$] (Fig. 17.B).

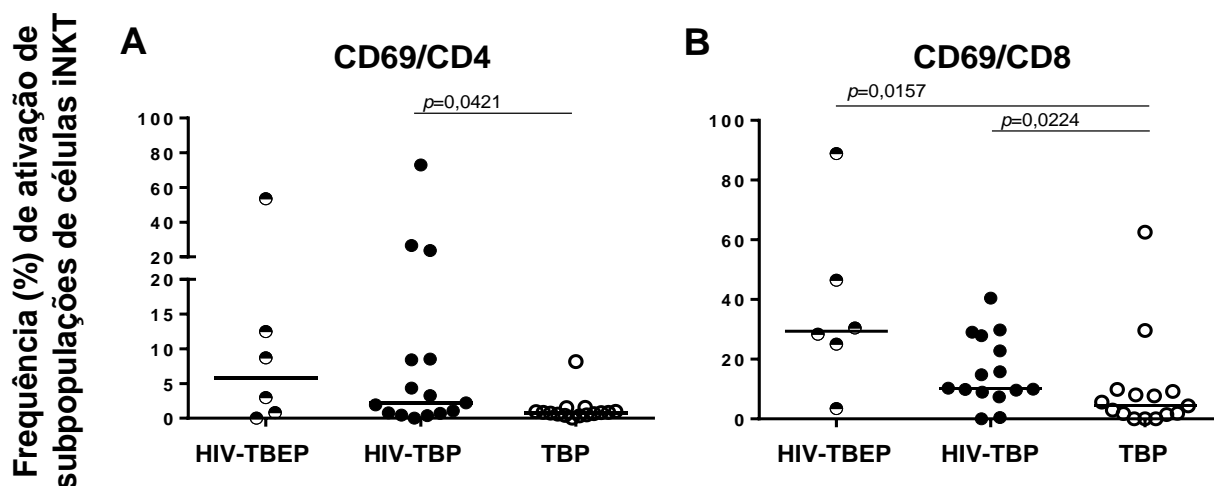


Figura 17. Distribuição *ex vivo* de subpopulações CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) de células iNKT ativadas nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Por fim, na figura 18 podem ser visualizados os comportamentos de expressão do perfil Th17 de resposta imune, identificado pela expressão de CD161 (Annunziato et al. 2007; Kleinschek et al. 2009; Ito & Seishima 2010; Moreira-Teixeira et al. 2011), observados para as subpopulações iNKT CD4⁺ e CD8⁺, nos três grupos clínicos estudados. Foi possível observar distribuições semelhantes das frequências de expressão de células iNKT CD4⁺/CD161⁺ (Fig. 18.A) e CD8⁺/CD161⁺ (Fig. 18.B) para os pacientes HIV-TBEP [7,18% (1,12–17,26%) e 19,33% (0–33,16%), respectivamente], HIV-TBP [7,89% (1,68–22,22%) e 24,79% (6,45–44,44%), respectivamente], e TBP [9,21% (3,44–15,80%) e 32,08% (7,89–63,94%), respectivamente], sem qualquer diferença estatística detectada.

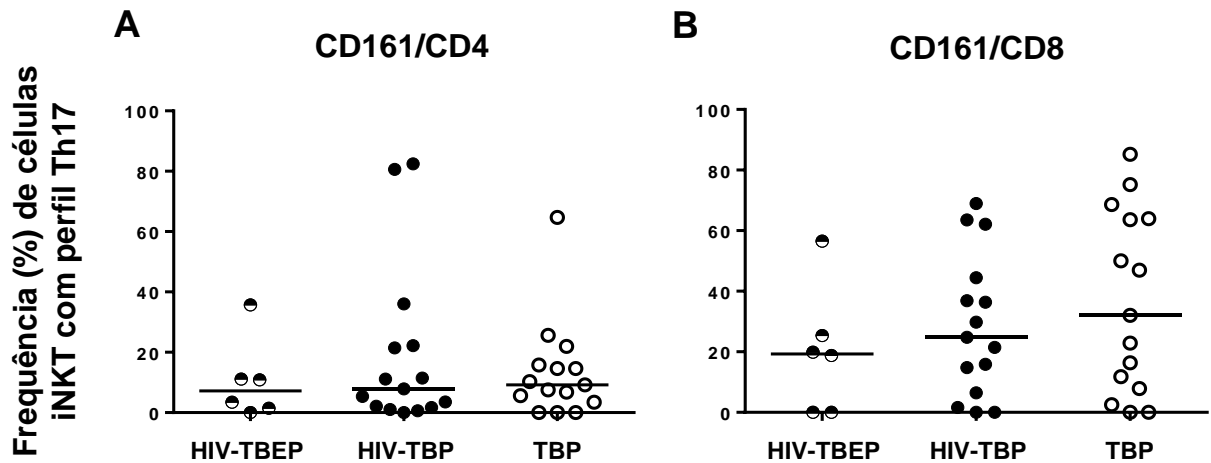


Figura 18. Distribuição das subpopulações CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) de células iNKT com perfil Th17 nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Frente aos achados das análises das células iNKT, destaca-se a provável exaustão celular observada para os participantes infectados pelo HIV-1, refletidas nos níveis de ativação e diferenciação celular nesses pacientes, envolvendo especialmente as células iNKT CD8⁺ citotóxicas (Bendelac et al. 2007).

4.4 Caracterização *Ex Vivo* das Células T $\gamma\delta$

Para completar a avaliação da resposta imune celular inata, o perfil *ex vivo* dos linfócitos T $\gamma\delta$ também foi investigado nos grupos HIV-TBEP, HIV-TBP e TBP. A população geral de células T $\gamma\delta$ foi definida como CD3⁺/GD⁺, através da utilização de um anticorpo monoclonal com especificidade para todas as cadeias $\gamma\delta$ (Fig. 7.A-C). Em função destas, as subpopulações $\gamma\delta$ foram avaliadas tendo como base a expressão ou não do segmento V δ 2, presente na maioria dos receptores em humanos (Fig. 7.D). Receptores de células NK, coestimulatórios e inibitórios das células T $\gamma\delta$, também foram avaliados (Fig. 7.E-I).

Quanto à população de células T $\gamma\delta$ totais, uma distribuição de frequências reduzida e estatisticamente significativa foi observada para os participantes coinfetados pelo HIV-1 e TB extrapulmonar [3,61% (2,21–5,25%)], em relação àqueles participantes com a forma pulmonar [6,35% (5,46–11,50%); $p \leq 0,05$], como

mostrado na figura 19. Nenhuma diferença significativa foi observada quando esses pacientes foram comparados ao grupo monoinfestado por *Mtb* [5,46% (2,77–7,27%)].

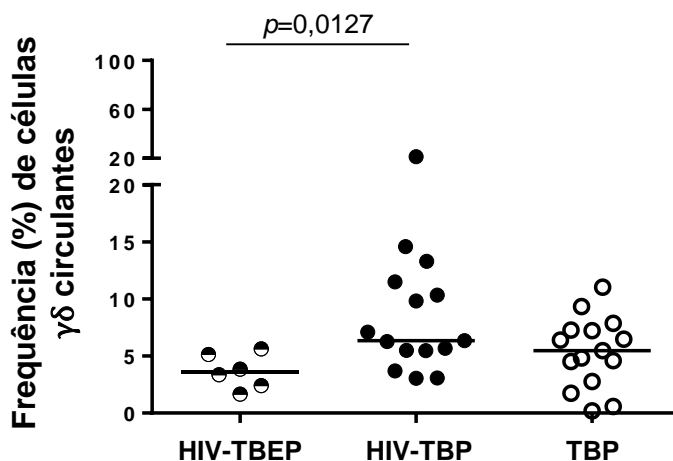


Figura 19. Distribuição ex vivo das células T $\gamma\delta$ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

As frequências de coexpressão de receptores de células NK e do receptor de ativação CD69 em células T $\gamma\delta$ foram analisadas para a população T $\gamma\delta$ total, e as associações com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos podem ser observadas na figura 20.

As principais diferenças estatísticas foram encontradas entre os participantes com manifestação pulmonar da TB, coinfestados ou não. A frequência de coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 foi significativamente maior em HIV-TBP [0,39% (0,08–1,18%)], em relação ao grupo TBP [0,06% (0–0,27%); $p \leq 0,05$] (Fig. 20.A). O mesmo foi observado para a frequência de coexpressão dos receptores CD158a/NKG2D [HIV-TBP: 0,05% (0–0,53%) e TBP 0,0% (0–0,60%); $p \leq 0,05$] e CD158b1,b2,j/CD69 [HIV-TBP: 1,60% (0–6,82%) e TBP: 0% (0–0,35%); $p \leq 0,05$] (Fig. 20.B e 20.C, respectivamente). Para a coexpressão dos receptores NKp46/CD69, uma frequência significativamente maior foi observada nos dois grupos infectados pelo HIV-1 [HIV-TBEP: 0,13% (0,07–0,46%) e HIV-TBP: 0,50% (0,04–0,84%)], quando comparados aos monoinfestados pelo *Mtb* [TBP: 0% (0–0,19%);

$p \leq 0,05$] (Fig. 20.D). A análise das coexpressões de CD158a/CD69 e NKG2D/CD69 também foram realizadas, contudo, não foram observadas diferenças estatísticas (dados não mostrados).

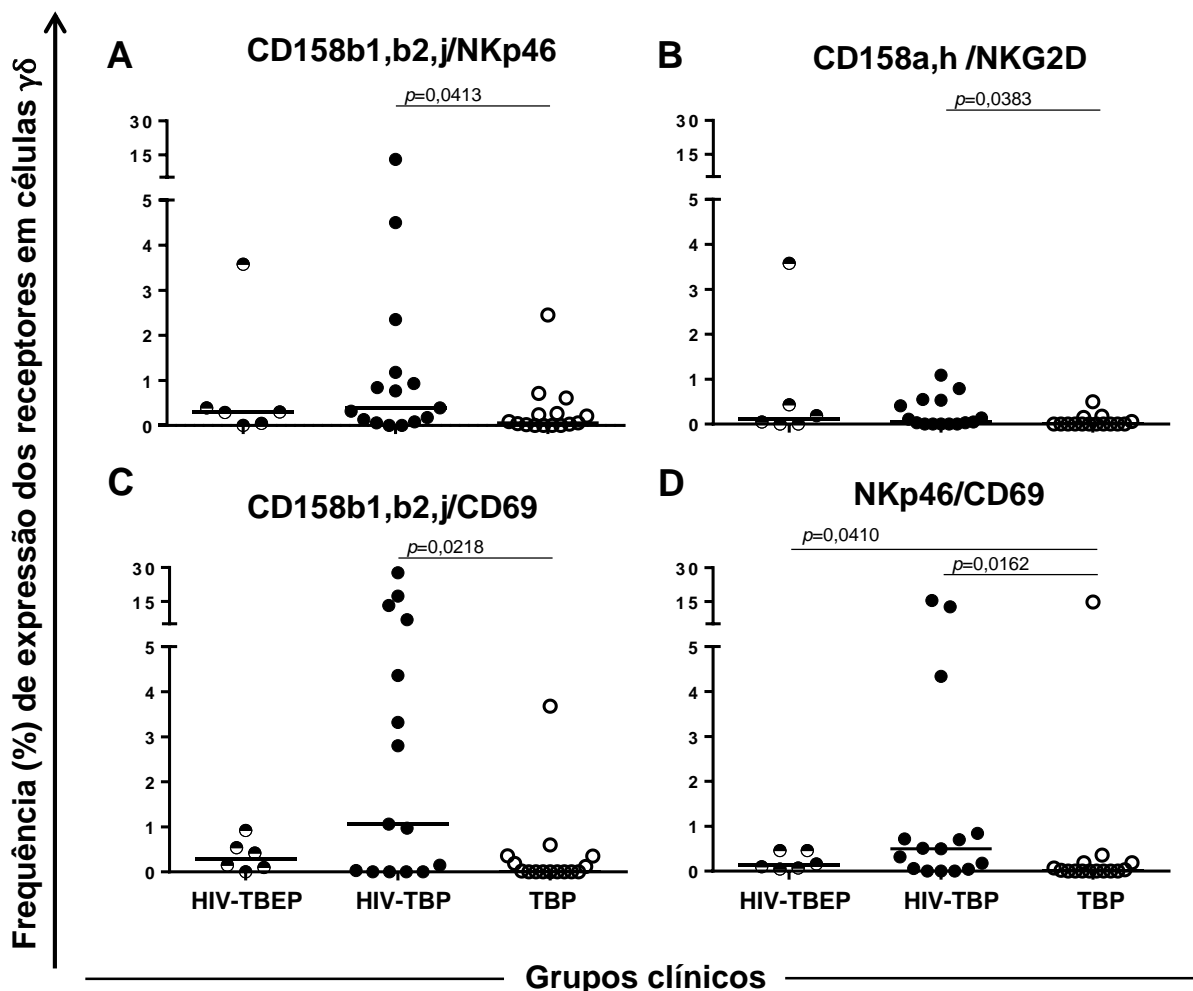


Figura 20. Distribuição *ex vivo* de coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 (A), CD158a,h/NKG2D (B), CD158b1,b2,j/CD69 (C) e NKp46/CD69 (D) pelas células T $\gamma\delta$ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

As frequências das subpopulações $V\delta 2^+$ e $V\delta 2^-$ foram, então, investigadas, no contexto da população celular T $\gamma\delta$ total (Fig. 7.D). A frequência de distribuição das células T $\gamma\delta$ $V\delta 2^+$ demonstrou-se inferior nos grupos coinfectados [HIV-TBEP: 14,0% (7,75–54,65%) e HIV-TBP: 14,99% (6,07–29,29%)], quando comparados ao grupo TBP [56,02% (21,90–75,42%); $p \leq 0,05$] (Fig. 21).

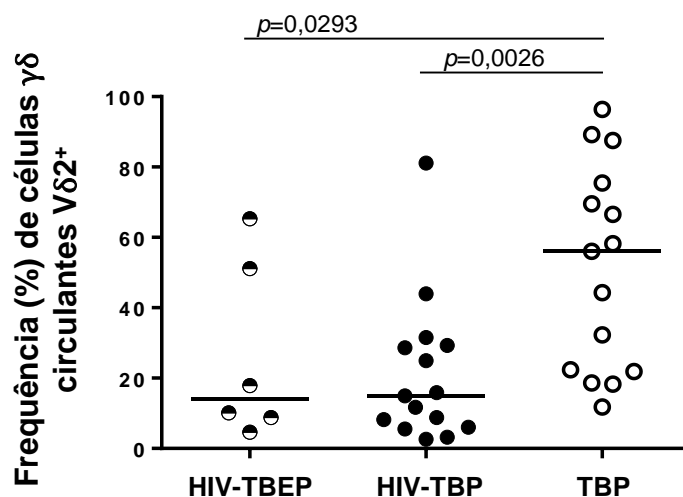


Figura 21. Distribuição *ex vivo* de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Essas subpopulações T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ também foram individualmente avaliadas quanto à expressão dos receptores de NK e CD69 (Fig. 22 e 23, respectivamente). De modo semelhante ao observado para a população T $\gamma\delta$, diferenças significativas foram observadas, em especial, entre os pacientes com TB pulmonar. Para os receptores NKp46 (Fig. 22.B) e NKG2D (Fig. 22.C), frequências medianas de expressão foram maiores no grupo HIV-TBP [22,41% (3,58–42,27%), e 17,17% (6,18–63,43%), respectivamente], em relação ao grupo TBP [2,87% (1,31–12,03%), e 3,04% (1,37–6,17%), respectivamente; $p \leq 0,05$]. No entanto, o receptor CD69 teve sua frequência de expressão aumentada nos grupos coinfectados [HIV-TBEP: 4,06% (1,03–9,49%) e HIV-TBP: 11,79% (5,83–18,69%)], quando comparados ao grupo monoinfectado [0,31% (0,20 – 1,12%); $p \leq 0,05$] (Fig. 22.A). De modo interessante, nenhuma diferença estatística foi observada para os receptores CD158a e CD158b1,b2,j (Fig. 22.D e 22.E, respectivamente).

Para a subpopulação de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁻, como pode ser observado na figura 24, diferenças significativas também envolveram os pacientes com TB pulmonar. O receptor NKG2D apresentou maior frequência de expressão no grupo HIV-TBP [17,60% (4,16–48,46%)] (Fig. 23.C), quando comparado ao grupo TBP [1,04% (0,29–23,93%)], enquanto o receptor CD69 demonstrou frequência de expressão aumentada nos grupos HIV-TBEP e HIV-TBP [5,99% (3,31–12,08%) e

9,14% (4,25–16,38%), respectivamente], em relação ao grupo TBP [1,36% (0,60 – 3,68%)] (Fig. 23.A). Apesar de nenhuma diferença estatística tenha sido observada para os demais receptores avaliados, uma possível redução dos valores medianos para CD158a,h pôde ser visualizada nos participantes infectados pelo HIV-1 [(HIV-TBEP: 56,33% (14,56–77,06%) e HIV-TBP: 30,19% (9,12–54,14%)], frente aos pacientes TBP [70,62% (0–94,47%)] (Fig. 23.D).

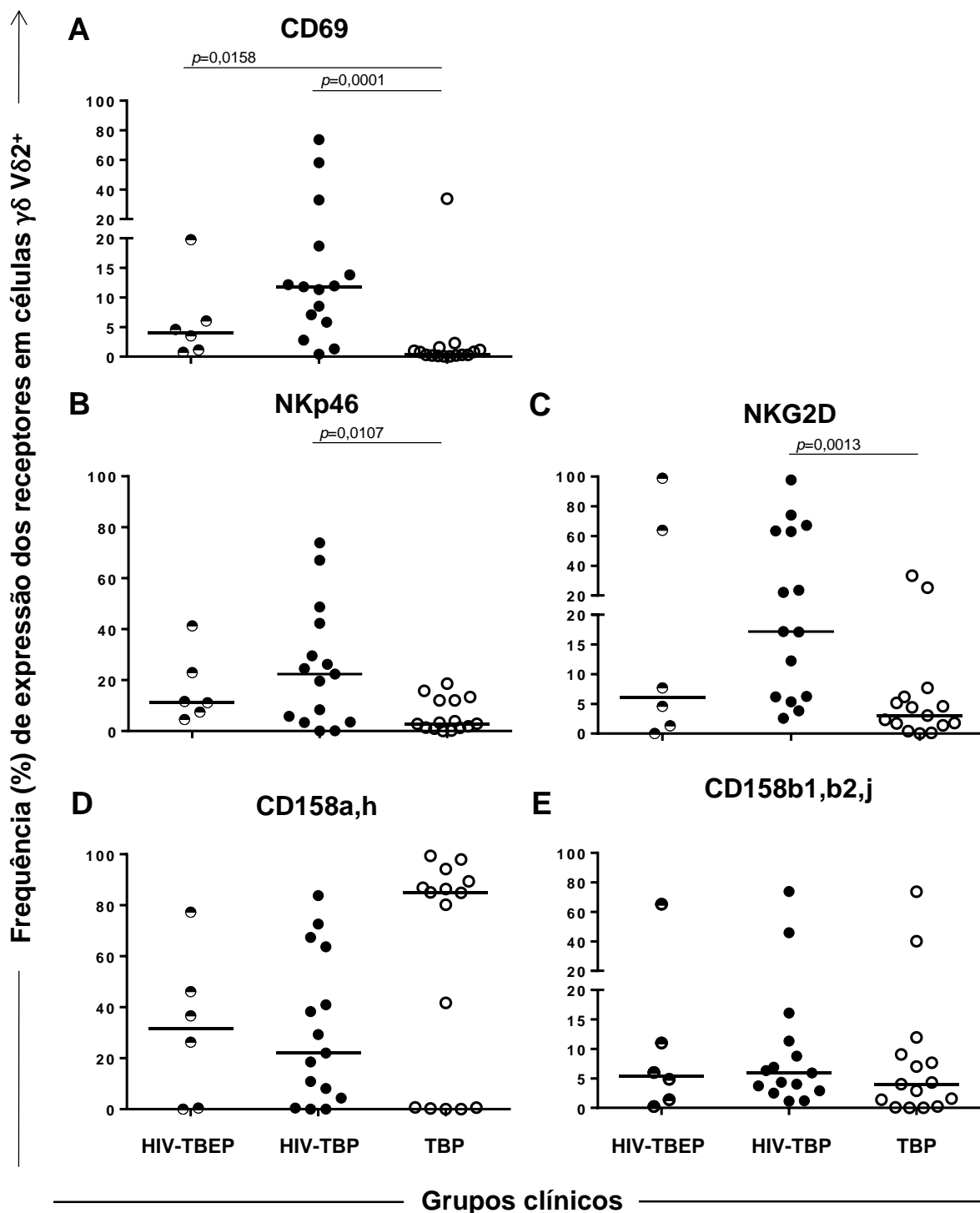


Figura 22. Distribuição *ex vivo* dos receptores CD69 (A), NKp46 (B), NKG2D (C), CD158a,h (D) e CD158b1,b2,j (E) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2+ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

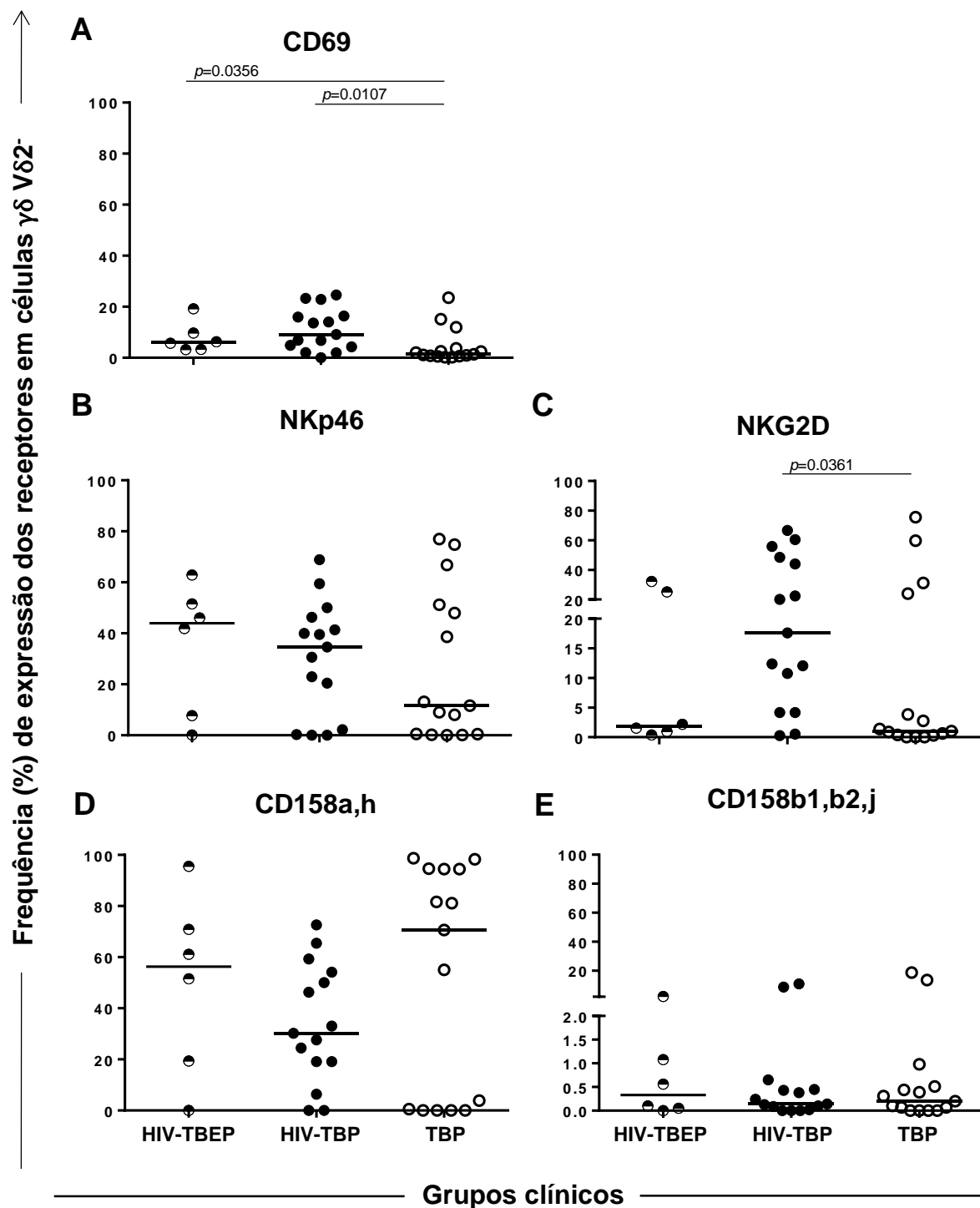


Figura 23. Distribuição *ex vivo* da expressão dos receptores CD69 (A), NKp46 (B), NKG2D (C), CD158a,h (D) e CD158b1,b2,j (E) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2⁻ nos três grupos clínicos distintos. Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

E para concluir as análises das células T $\gamma\delta$, também foram consideradas as coexpressões dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 e CD158a,h/NKG2D, para a subpopulação V δ 2⁺ (Fig. 24.A e 24.B, respectivamente). A frequência de expressão

dos receptores CD158b1,b2/NKp46 demonstrou-se aumentada no grupo HIV-TBP [2,81 (0,63 – 5,92)], em relação ao grupo TBP [0,045% (0,0 – 1,00%), $p \leq 0,05$], conforme apresentado na figura 24.A. A frequência de coexpressão dos receptores NKG2D/CD158a,h não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Fig. 24.B). Quanto à população de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺, nenhuma coexpressão apresentou diferença significativa entre os grupos clinicamente distintos e, portanto, os dados não foram apresentados.

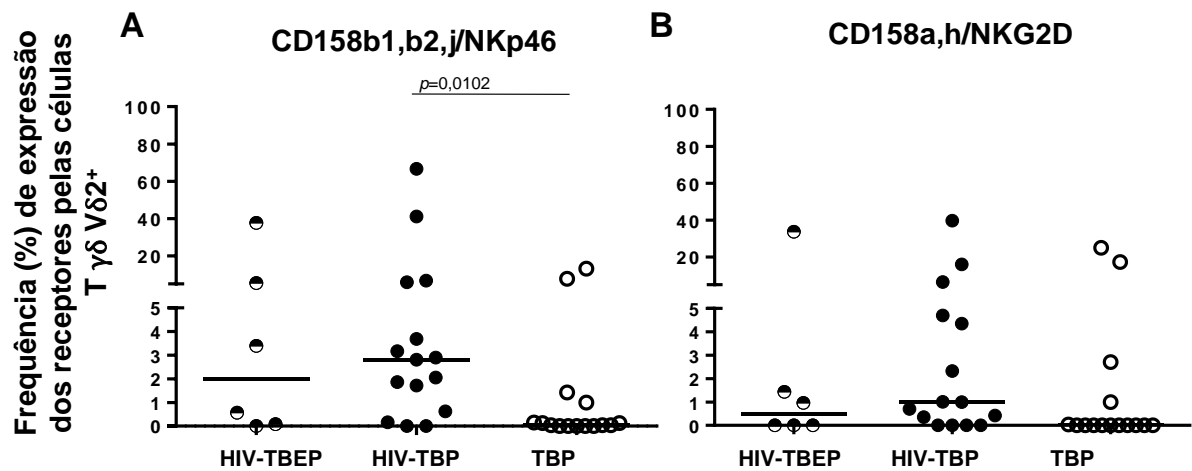


Figura 24. Distribuição *ex vivo* de coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46 (A) e CD158a,h/NKG2D (B) pelas células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

4.5 Avaliação Funcional das Células NK *In Vitro*

O potencial funcional das células NK, ou seja, a capacidade dessas células de promover a lise citotóxica das células-alvo, bem como de produzir citocinas efetoras da resposta imune, foi avaliado *in vitro*. Para isto, PBMCs foram obtidas de amostras de sangue periférico e submetidas aos ensaios funcionais para a detecção de CD107a e das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF.

Inicialmente, as células NK definidas como CD3⁻/CD56⁺/CD16⁺, foram avaliadas quanto à sua frequência basal, após ensaio *in vitro* de 16 horas (Fig. 5.A-D). A distribuição das frequências das células NK para cada um dos três grupos clinicamente distintos pode ser observada na figura 25. Em ausência de estímulo, frequências semelhantes foram observadas entre os grupos, sem qualquer diferença significativa. As mesmas foram diferentes daquelas observadas na análise *ex vivo* (Fig. 10).

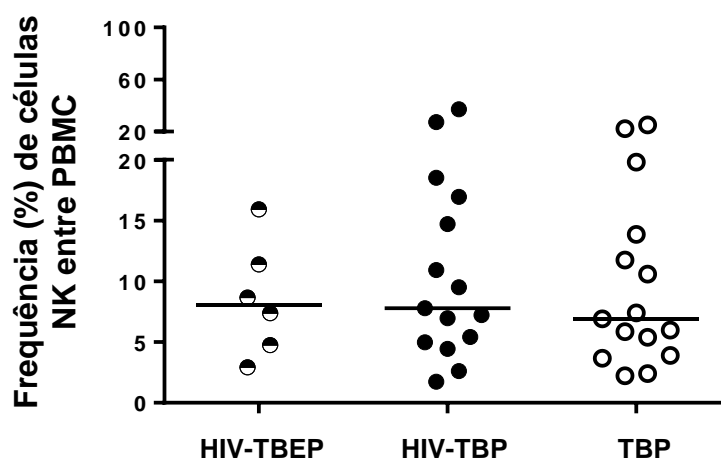


Figura 25. Distribuição *in vitro* de células NK nos três grupos clínicos distintos.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

A fim de avaliar a capacidade citotóxica das células NK, PBMCs foram cocultivadas frente a linhagem celular K562 e analisadas quanto à expressão de CD107a, marcador indireto da atividade de degranulação dessas células (Parkinson-Lawrence et al. 2005; Chan et al. 2007). As frequências de expressão de CD107a

pelas células NK frente à K562 e em ausência de estímulo (controle), observadas para os três grupos clinicamente distintos, encontram-se na figura 26. Para todos os três grupos, observou-se aumento significativo na expressão de CD107a pelas células NK, quando submetidas ao estímulo (K562) ($p \leq 0,05$). Os valores médios encontrados neste estudo assemelham-se aos valores observados na população sadia para as duas morbidades (Pean et al. 2012).

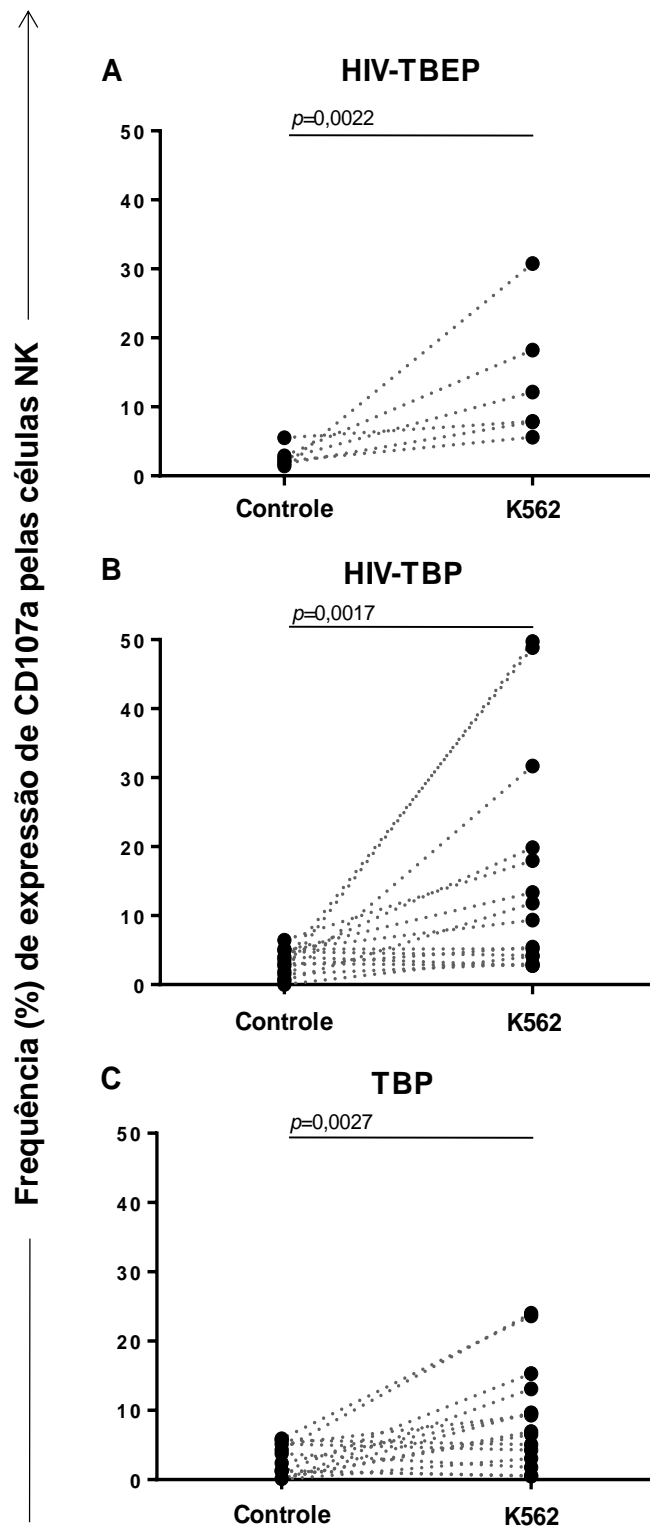


Figura 26. Distribuição *in vitro* da expressão de CD107a pelas células NK, na presença (K562) ou em ausência (controle) de estímulo.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6) (A), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) (B) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15) (C).

O potencial degranulatório das células NK, frente ao estímulo com K562, foi semelhante entre os três grupos clinicamente distintos avaliados, uma vez que não houve diferenças estatísticas significativas. No entanto, como pode ser identificado na figura 27, um potencial de degranulação mediano aparentemente inferior foi estabelecido para os pacientes com TB pulmonar mono infectados [6,93% (3,05–13,11%)], frente às medianas observadas para os demais pacientes [HIV-TBEP: 10,02% (7,27–21,37%) e HIV-TBP: 9,37% (4,09–19,87%)].

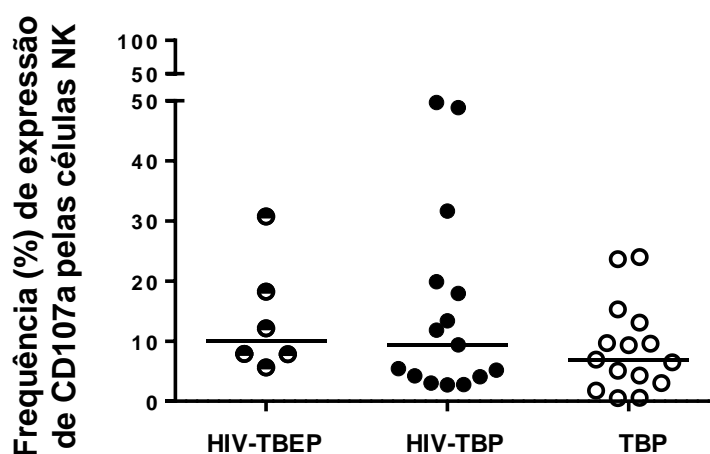


Figura 27. Distribuição *in vitro* da expressão de CD107a pelas células NK, frente ao estímulo com K562.

Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Em complemento à análise funcional das células NK, foi avaliada a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF por essas células (Fig. 28.A e 28.B, respectivamente). Distribuições semelhantes das frequências de células produtoras de IFN- γ ou de TNF foram observadas para os participantes co-infectados pelo HIV-1 e por *Mtb*, ou ainda, mono-infectados. Portanto, nenhuma diferença estatística pôde ser observada.

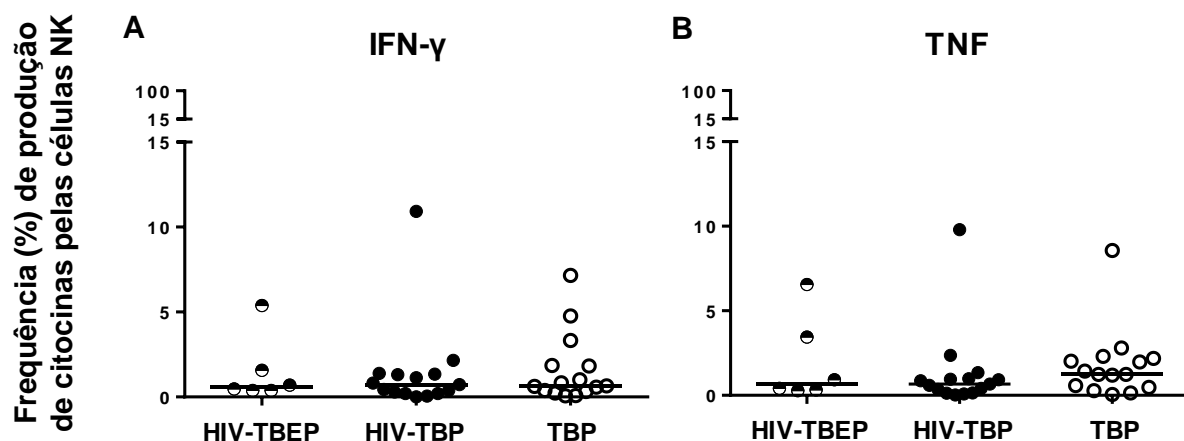


Figura 28. Distribuição *in vitro* da expressão de IFN- γ (A) e TNF (B) intracelular em células NK, frente ao estímulo em PBMC dos participantes incluídos nos três grupos clínicos distintos. Infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

Por fim, foi avaliada a frequência de células duplo-funcionais, ou seja, que apresentaram, ao mesmo tempo, capacidade citotóxica e de produção de citocinas (Reeves et al. 2010). Perfis semelhantes foram observados para as frequências dessas células entre os três grupos clinicamente distintos (Fig. 29.A e 29.B). Embora uma tendência a mediana ligeiramente superior tenha sido observada para o grupo TBP, quanto à frequência de células CD107a⁺/TNF⁺, nenhuma diferença estatística significativa foi detectada (Fig. 29.B).

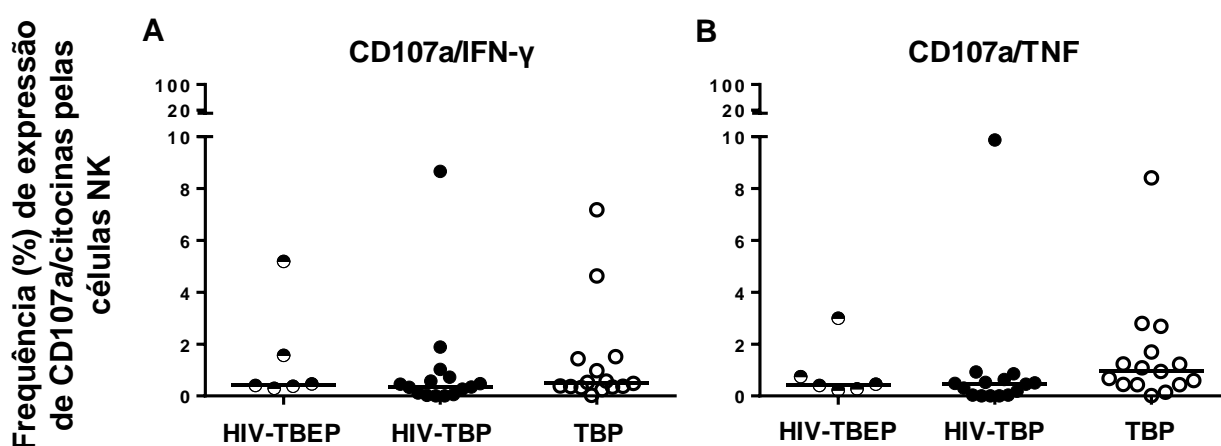


Figura 29. Frequência da expressão de CD107a/IFN- γ (A) e CD107a/TNF (B) em células NK *in vitro* frente ao estímulo com K562. Participantes infectados pelo HIV-1 e apresentando a forma extrapulmonar de TB (HIV-TBEP; n=6), infectados pelo HIV-1 e apresentando tuberculose pulmonar (HIV-TBP; n=15) e não infectados pelo HIV, com tuberculose pulmonar (TBP; n=15). As barras horizontais representam as medianas.

5 DISCUSSÃO

A TB é considerada hoje a doença infecciosa de maior letalidade no mundo, à frente mesmo do HIV/AIDS, sendo responsável por 1,3 milhão de mortes, com 10,4 milhões de casos novos da doença em 2016, de acordo com o boletim mais recente da OMS (2017). No mesmo ano, o Brasil registrou 66.796 casos novos de TB, além de 4.543 óbitos em decorrência da doença (Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico de Tuberculose 2017).

A transmissão do agente causador da TB ocorre através da inalação de bacilos expelidos pelas vias aéreas de indivíduos com a forma pulmonar ou laríngea da doença (Turner & Bothamley 2015). O desfecho da infecção, no que diz respeito ao seu estabelecimento, controle ou forma ativa, é definido através das interações entre o hospedeiro e o patógeno, com o ambiente podendo também contribuir (Prezzemolo et al. 2014). Um determinante importante a ser considerado no desenvolvimento da forma ativa da TB é o perfil da resposta imune do hospedeiro, a qual pode sofrer influência de diversos fatores, destacando-se a coinfeção pelo HIV-1, uma das principais doenças crônicas de caráter infeccioso a promover a desestruturação da resposta imune (Prezzemolo et al. 2014).

Apesar da existência de cura para a TB e tratamento para a infecção pelo HIV-1, a associação HIV/TB ainda é um grande desafio para a saúde pública, sendo considerada uma entidade patológica distinta. O risco de TB ativa aumenta de 2 a 5 vezes quando um indivíduo é infectado pelo HIV-1, assim sendo ao longo das fases aguda e crônica da infecção. Com a progressão para AIDS, esse risco se torna pelo menos 20 vezes maior ao observado na população geral (Bell & Noursadeghi 2018). No Brasil, segundo avaliação do Ministério da Saúde, esse risco chega a ser 28 vezes maior (Boletim Epidemiológico Coinfecção TB-HIV 2017). E nesse contexto, a manifestação extrapulmonar da TB ganha atenção pela sua dificuldade e demora de diagnóstico, bem como pelo aumento de frequência de casos entre pacientes coinfectados pelo HIV-1 (Bethlem 2012).

No presente estudo, o perfil de células da imunidade inata foi investigado em pacientes infectados pelo HIV-1 com TB ganglionar, a apresentação extrapulmonar mais comum da TB nesse grupo (Salvador et al. 2015), com a finalidade de melhor compreender a imunopatogenia dessa manifestação. Para isso, foram avaliados seis

participantes infectados pelo HIV-1 com TB ganglionar, junto a 15 participantes coinfectados pelo HIV-1 com manifestação pulmonar da TB e 15 participantes com TB pulmonar monoinfectados. Numa análise inicial, os participantes foram avaliados quanto às variáveis categóricas de idade, gênero e raça, as quais não diferiram entre os grupos clínicos avaliados.

A TB apresenta-se de forma mais incidente em homens do que em mulheres, sendo que no ano de 2016, o número de casos novos registrados no mundo foi 1,6 vezes maior em indivíduos do gênero masculino (WHO 2016). Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significantes para a distribuição dos participantes dos gêneros masculino e feminino nos três grupos clínicos, de modo semelhante ao cenário mundial, um maior número de homens foi incluído em nosso estudo, totalizando 23 participantes, para 13 mulheres, uma razão de 1,77. Um estudo realizado no município de Duque de Caxias – RJ também apresentou maior número de diagnósticos de TB em homens, do que em mulheres (Belo et al. 2010), assim como um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, no qual esse cenário também foi observado (da Silva et al. 2013). Não se sabe ao certo a que essa diferença entre gêneros possa estar associada. Contudo, discute-se sobre impacto de fatores econômicos e socioculturais, além de fatores biológicos (Belo et al. 2010).

A TB *per se* pode ser considerada uma doença imunossupressora (Pilheu et al. 1997). A infecção pelo HIV-1, por sua vez, tem na depleção de células T CD4⁺ sua principal característica definidora, e como desfecho uma imunodeficiência severa (Pawlowski 2012). Na coinfeção HIV/*Mtb*, os patógenos potencializam um ao outro, impactando o curso clínico de ambas as infecções, e acelerando a deterioração das funções imunológicas, o que aumenta o risco de progressão da infecção pelo *Mtb* para doença ativa, quando níveis baixos de células T CD4⁺ são alcançados (Pawlowski et al. 2012). Deste modo, os participantes infectados pelo HIV-1 avaliados neste estudo foram incluídos, tendo como critério contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ iguais ou inferiores a 350 céls./mm³ de sangue, com a finalidade de homogeneizar o grau de imunodeficiência dos quadros de TB pulmonar e extrapulmonar, quanto às células T CD4⁺. Portanto, a avaliação das contagens absolutas das células T CD4⁺, utilizada no monitoramento laboratorial da infecção pelo HIV-1, demonstrou que todos os participantes apresentaram valores inferiores a 200 céls./mm³ de sangue, o que classifica a todos como casos de AIDS, ou estágio 3 da infecção pelo HIV-1, segundo critérios definidos e revistos pelo “Centers of

Disease Control and Prevention” (CDC) em 2016. De fato, o risco de TB ativa nessa fase é muito alto, como mostrado na figura 3.

As células T CD4⁺ apresentam papel importante para a formação e manutenção da estrutura do granuloma durante a infecção inicial pelo *Mtb* (Nunes-Alves et al. 2014). Em geral, os indivíduos infectados pelo HIV-1 tendem a formar granulomas disfuncionais, que falham na contenção do bacilo (Nunes-Alves et al. 2014). Ainda, o número reduzido de células T CD4⁺ já foi associado ao escape do bacilo dos pulmões, disseminação e acometimento de outros sítios para o estabelecimento da infecção (O’Garra et al. 2013). No entanto, as contagens de células T CD4⁺ não apresentaram diferença estatística entre os pacientes coinfectados com TB pulmonar e TB ganglionar, embora uma imunossupressão aparentemente mais acentuada pôde ser observada para os casos pulmonares. Esta observação reforça a possível participação de outros componentes da resposta imune na perda da delimitação da infecção ao sítio pulmonar, e remete à hipótese de outros mecanismos estarem envolvidos na imunopatogênese da associação HIV/TB, como por exemplo, alterações nas microbiotas pulmonar e do intestino, que impactam de modo negativo a imunidade nesses pacientes (Nwosu et al. 2014; Cervantes 2017).

Outro compartimento imunológico que sofre impacto na infecção pelo HIV-1 é o de células T CD8⁺. A produção aumentada de células T CD8⁺ pode ser detectada nos indivíduos infectados durante as fases precedentes à AIDS, quando, então, são acometidos por grave redução de linfócitos T (Hellerstein et al. 1999). Apesar da contagem de células T CD8⁺ ter apresentado valores semelhantes entre os grupos infectados pelo HIV-1 estudados, observamos uma mediana um pouco mais elevada naqueles indivíduos infectados pelo HIV-1, com apresentação ganglionar da TB. Portanto, também para esta subpopulação de linfócitos T, um comprometimento imunológico mais acentuado e uma doença ainda mais avançada parece presente na coinfeção, nos casos de TB pulmonar.

Em indivíduos vivendo com HIV/AIDS, a redução do número de células T CD4⁺ e o aumento da contagem de células T CD8⁺ resultam na inversão da razão CD4/CD8, o que caracteriza um mau prognóstico da doença (Cao et al. 2016). Todos os indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentaram razão de células T

CD4⁺/CD8⁺ visivelmente reduzidas em função da desestruturação imunológica causada pelo HIV-1, e consistente com o avanço da infecção.

Acompanhando os perfis observados para as contagens de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e o estágio avançado da infecção pelo HIV-1 (Naif 2013), a quantificação da carga viral plasmática apresentou valores elevados para ambos grupos clínicos estudados, sem diferença estatística significativa entre eles, mas com perfil de distribuição aparentemente superior para os pacientes com TB pulmonar. Portanto, uma aparente facilitação da replicação viral pode estar acontecendo na infecção pulmonar. Isso pode ser consequência de alterações da microbiota pulmonar e do processo inflamatório local (Cervantes 2017).

Dado o impacto da infecção pelo HIV-1 sobre o sistema imunológico, consideramos importante avaliar a participação de outros componentes celulares do sistema imune que possam estar relacionados com a patogênese da TB extrapulmonar, a qual envolve a perda do controle da TB no sítio pulmonar e a disseminação do patógeno, com o acometimento de outros tecidos do organismo (Bethlem 2012). Deste modo, o presente estudo se propôs a avaliar as células linfóides da imunidade inata.

Neste contexto, as células NK, as quais possuem papel importante tanto na infecção pelo HIV-1 (Kottlil et al. 2003; Alter et al. 2004; Alter et al. 2007; Scott-Algara et al. 2008; Pean et al. 2012), quanto na TB (Ehlers & Schaible 2013; Vankayalapati et al. 2005; Marcenaro et al. 2008; Esin et al. 2013), foram avaliadas quanto à expressão de uma gama de moléculas de superfície que caracterizam de modo amplo o repertório circulante dessas células chave da imunidade inata. Definidas como CD3⁻CD56⁺CD16⁺ (Robertson & Ritz 1990), essas células são capazes de identificar alterações na superfície das células alvo, como aquelas infectadas por vírus, seja pela diminuição de expressão de moléculas próprias (“missing self”) ou pela expressão de moléculas exógenas ou moléculas próprias num contexto alterado, como condições de estresse celular (“induced self”), como exemplificado na figura 4. Ao expressar moléculas de estresse, células infectadas pelo HIV-1 podem tornar-se alvos das células NK, uma vez que essas moléculas são reconhecidas por receptores ativadores (Hölzemer et al. 2017).

No presente estudo, os participantes coinfectados pelo HIV-1 e *Mtb* apresentaram frequências *ex vivo* de células NK muito reduzidas em comparação aos participantes TB monoinfectados. Embora as análises *in vitro* tenham apresentado um perfil distinto do observado *ex vivo*, como será abordado mais à frente, o impacto da infecção pelo HIV-1 nos pacientes com TB deve ser considerado. Esta observação condiz com os achados de Alter et al. (2004), que também demonstraram uma redução significativa dessas células na infecção persistente pelo HIV-1. Uma vez que as células NK são uma das primeiras populações de células efectoras a sofrer expansão durante a infecção aguda pelo HIV-1, a cronicidade da infecção viral pode resultar na exaustão deste compartimento celular, levando à perda da capacidade de proliferação homeostática (Sun & Lanier 2011). Na TB, estas células atuam como uma importante fonte de IFN- γ , citocina essencial para a ativação dos macrófagos, dando início à sua atividade antimicrobiana e, como consequência, ao desencadeamento da resposta imune dessas células contra o *Mtb* (Choreno Parra et al. 2017). Esta redução observada poderia impactar diretamente o controle do *Mtb*. No entanto, não houve diferença entre os níveis de células NK dos pacientes coinfectados, com TB pulmonar e TB ganglionar. Portanto, a alteração quantitativa das células NK não parece se associar à manifestação clínica da TB.

As células NK apresentam um repertório extremamente variado, em função das diversas combinações possíveis entre seus receptores ativadores e inibitórios (Strauss-Albee et al. 2015), e o balanço dos sinais recebidos por essas moléculas regula a atividade celular (Shifrin et al. 2014). A caracterização do repertório de células NK nos pacientes coinfectados pelo HIV-1 com TBEP consistiu no principal objetivo deste estudo.

Os receptores KIR representam a maior família de receptores expressos pelas células NK, a qual possui membros com função inibidora e estimulatória. Infecções virais, como o HIV-1, geralmente alteram a expressão dos ligantes desses receptores, ativando suas funções (Hözlzemer et al. 2017). Uma investigação envolvendo oito diferentes receptores KIR foi conduzida, através de seis diferentes anticorpos monoclonais.

Entre os três grupos clínicos avaliados, não foram detectadas diferenças significativas quanto à expressão de receptores pertencentes a esta família. Para os

receptores CD158a (inibição) e CD158i (ativação) foram observadas apenas tendências de maior expressão nos pacientes com TB pulmonar coinfetados, e menor para os pacientes com *Mtb*-monoinfectados respectivamente, em relação aos demais grupos clínicos. Pean et al. (2012) também avaliaram a expressão dos receptores CD158a, CD158b, CD158e e CD158i, e, do mesmo modo, observaram perfis de distribuição semelhantes para estas moléculas, entre pacientes HIV/TB que desenvolveram ou não episódios de IRIS, pacientes monoinfectados pelo HIV-1, pacientes monoinfectados pelo *Mtb*, e indivíduos sadios para ambas infecções. Essas observações indicam um aparente equilíbrio de expressão nessa família de receptores, a qual não parece ser alterada frente à associação HIVTB.

Para a molécula CD69, um marcador de ativação celular que atua como molécula ativadora para as células NK, níveis de expressão bastante restritos foram observados para os pacientes dos três grupos clínicos avaliados no presente estudo, e que não apresentaram diferenças entre si, provavelmente indicando ausência ou baixa ativação dessas células nos pacientes avaliados. Pean et al. (2012), demonstraram uma alta frequência de expressão de CD69 nas células NK de pacientes HIV/TB em relação aos controles, detectada para 40 a 60% dessas células.

A molécula CD161 é um receptor inibitório para as células NK, embora um perfil regulador também tenha sido depositado a esse receptor (Poggi et al. 1996; Aldemir et al. 2005, Pozo et al. 2006). Frequências de expressão significativamente reduzida para esse receptor foram observadas nos casos de TB pulmonar coinfetados pelo HIV-1, em comparação aos casos de TB pulmonar na ausência do vírus. No contexto da inibição ou da regulação, a resposta de células NK poderia estar desregulada e propensa à ativação. Por outro lado, pacientes com TB ganglionar apresentaram níveis semelhantes de expressão de CD161 comparadas àqueles pacientes com TB pulmonar monoinfectados. No caso desta molécula, Pean et al. (2012), em contrapartida ao CD69, não observaram diferenças de expressão entre os grupos avaliados.

A molécula CD94 é considerada acessória aos receptores NKG2A e NKG2C da família NKG2, pois forma com estes, heterodímeros, através de pontes dissulfeto (Lanier 2005). Neste estudo observamos frequência de CD94 significativamente maior no grupo de TB pulmonar monoinfectado, em relação aos grupos

coinfectedados, indicando o impacto da infecção pelo HIV-1 também sobre a expressão desta molécula. Por outro lado, as moléculas NKG2A e NKG2C não apresentaram diferenças de expressão entre os três grupos clínicos avaliados. Interessante observar que estas moléculas, em especial NKG2C, apresentaram perfis de distribuição bastante semelhantes àqueles observados para o CD94 e, portanto, a expressão reduzida de CD94 observada nos pacientes coinfectedados pôde ter restringido a expressão dos demais componentes dos dímeros. No entanto, uma expressão sutilmente reduzida pôde ser percebida para NKG2C nos pacientes infectados pelo HIV-1, em especial naqueles com TB ganglionar. Uma vez que este receptor tem sido relacionado ao perfil de memória das células NK (Gumá et al. 2006), alterações mesmo sutis em sua expressão, bem como em seu heterodímero, podem significar um impacto importante na resposta imune inata nesses pacientes, vulnerabilizando ainda mais os mesmos. A análise de coexpressão destes receptores não pôde ser realizada em decorrência do painel de anticorpos monoclonais definido para o estudo, o qual não contemplou as três moléculas em um mesmo painel de avaliação.

O marcador NKG2D, constitutivo em praticamente todas as células NK em repouso, reconhece alterações em células infectadas ou alteradas por tumores, resultando em sua ativação (Leal et al. 2017). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas de expressão de NKG2D entre os três grupos clínicos avaliados, embora medianas visualmente menores tenham sido observadas para os pacientes coinfectedados. Estudos com controladores virêmicos têm associado o aumento de expressão de NKG2D à capacidade citolítica preservada das células NK nesses pacientes (Marras et al. 2013). Por outro lado, na IRIS, sua expressão reduzida foi associada a um perfil inibitório de mecanismo “feedback” de controle interno à reação (Pean et al. 2012). Portanto, essa molécula parece estar relacionada, tanto à função, quanto à regulação das células NK, podendo estar comprometida nos pacientes aqui avaliados.

Os receptores pertencentes à família NCR também foram avaliados para os três grupos clínicos, incluindo a avaliação dos receptores de lectina tipo C, NKp30, NKp44 e NKp46, e da superfamília das Igs, NKp80. Os receptores NKp30, NKp44 e NKp46, são expressos exclusivamente pelas células NK, e enquanto as moléculas NKp30, NKp46 e NKp80 são expressas de forma constitutivas por estas células, o

receptor NKp44 somente é expresso por células NK ativadas (Vankayalapati et al. 2005; Pegram et al. 2011).

De acordo com o observado por De Maria et al. (2003), os receptores NKp30, NKp44 e NKp46 sofrem redução com a cronicidade da infecção pelo HIV. Pean et al. (2012), observaram também uma expressão inferior destes receptores em pacientes infectados pelo HIV-1, independente do acometimento por TB ou IRIS, quando comparados a indivíduos saudáveis. A mesma redução de expressão do receptor NKp46 foi observada para os pacientes infectados pelo HIV-1 com a forma pulmonar da TB avaliados neste estudo, quando comparados àqueles mono infectados por *Mtb*. Embora não tenham sido estatisticamente significativas, frequências reduzidas de células NKp46⁺ também foram observadas para os pacientes com TB ganglionar, co infectados. Para o receptor NKp30, no entanto, a distribuição de frequências apresentou-se de forma semelhante entre os três grupos clínicos avaliados. No entanto, uma tendência a valores mais elevados nos pacientes de TB mono infectados pôde ser percebida. Por outro lado, diferente do observado em outros estudos, para o receptor NKp44, foram detectadas frequências de expressão significativamente maiores entre os participantes infectados pelo HIV-1, em relação aos mono infectados por *Mtb*, este fato pode estar relacionado ao estado de ativação generalizado característico da infecção pelo HIV-1 e associado ao profundo comprometimento imunológico observado nesses pacientes, mais do que à ativação funcional das células NK *per se*.

Em relação ao receptor NKp80, não foram observadas diferenças significativas de expressão entre os grupos avaliados. Num estudo realizado por Mavilio et al. (2003) também foi observado que a frequência de expressão do receptor NKp80 nas células NK era semelhante entre controles e participantes infectados pelo HIV-1, independente dos níveis de viremia. Pean et al. (2012) também não observaram diferenças estatísticas entre os pacientes HIV/TB e os grupos controles avaliados.

Vankayalapati et al. (2005) avaliaram as células NK de indivíduos saudáveis após cultura com monócitos e macrófagos alveolares infectados pelo *Mtb*, detectando aumento da expressão dos receptores NKp30, NKp46 e NKG2D, o que demonstra que esses receptores possam ter participação na lise de células infectadas pela micobactéria. Frente a esses resultados e aos observados para os pacientes

avaliados no presente estudo, esses receptores podem estar falhando em ativar as células NK contra o *Mtb* frente à coinfeção pelo HIV-1.

O membro da superfamília Ig CD226 é expresso constitutivamente em cerca de 50% das células NK, e possui papel coestimulatório importante para essas células (Pegram et al. 2011). Interessante observar que, no presente estudo, uma expressão significativamente elevada de CD226 foi observada para os pacientes coinfectados pelo HIV-1, independente da apresentação clínica da TB, em relação a uma expressão aparentemente normal observada para aqueles monoinfectados. Dada a importância deste receptor na coestimulação e participação na sinapse imunológica de células NK, a expressão não comprometida deste receptor na coinfeção pelo HIV-1 pode representar um mecanismo compensatório para a ativação das células NK.

O receptor CD85j é uma molécula inibitória expressa por células NK e seu mecanismo para controle da atividade destas células permanece desconhecido (Pegram et al. 2011). Já foi demonstrado que células NK expressando CD85j possuem habilidade para controlar a replicação do HIV-1 em DCs *in vitro* (Scott-Algara et al. 2008). No presente estudo, observou-se uma ligeira redução na frequência de expressão desse receptor em pacientes coinfectados pelo HIV-1, mas que, contudo, não foi significativa em relação àqueles monoinfectados. No entanto, esta redução ainda pode impactar a regulação da resposta das células NK.

O receptor CD244 é expresso por praticamente todas as células NK humanas (Mathew et al. 2009). Os sinais recebidos por esse receptor comportam-se de maneira ativadora ou inibitória, dependendo do estágio de maturação dessas células, o que lhe confere o posto de receptor multifuncional (Pegram et al. 2011). Diferentes estudos não observaram diferenças para a expressão do receptor CD244, entre pacientes infectados pelo HIV-1, coinfectados pelo HIV-1 com TB, monoinfectados pelo *Mtb* e indivíduos sadios (Mavilio et al. 2003; Pean et al. 2012). De modo semelhante, não foram observadas diferenças estatísticas entre os três grupos clínicos avaliados neste estudo. No entanto, para as três apresentações clínicas em questão, foram observados participantes com frequências de células positivas para o CD224 bastante reduzidas para um receptor de ampla expressão, o que remete a um quadro de imunossupressão para as células NK desses participantes.

As coexpressões dos receptores na superfície das células NK puderam ser avaliadas para algumas combinações de moléculas, considerando o painel de anticorpos monoclonais utilizado. Esta é uma análise interessante pois fornece informações adicionais sobre o perfil das células NK quanto à expressão simultânea de receptores, que podem ter ou não a mesma característica funcional. Todas as diferenças significativas de frequência de expressão envolveram participantes com TB pulmonar, coinfectados ou não pelo HIV-1. As coexpressões CD226/CD158i (Ativação/Ativação), CD226/NKG2A (Ativação/Inibição), CD158i/CD161 (Ativação/Inibição), CD158i/NKG2A (Ativação/Inibição) e CD158d/NKp44 (Inibição/Ativação) foram mais frequentes entre os participantes coinfectados com TB pulmonar. Em contrapartida, a coexpressão NKp30/NK46 (Ativação/Ativação) foi significativamente menos frequente nesses participantes, quando comparada aos participantes com TB pulmonar monoinfectados. As demais coexpressões avaliadas não apresentaram diferenças estatísticas. Embora a maioria dessas combinações de receptores represente um potencial de ativação, a baixa expressão de uma molécula como CD69, por exemplo, indica que o processo de ativação não está acontecendo de fato nessas células.

No geral, o repertório de receptores de células NK avaliado não apresentou diferenças significativas que pudessem caracterizar um perfil mais ou menos inibidor ou de ativação para essas células, e que demonstrasse melhor o papel potencial das mesmas na manifestação ganglionar da TB em participantes coinfectados pelo HIV-1. Esse cenário pode ser visualizado na figura 30, a qual apresenta uma compilação das frequências de expressão das moléculas avaliadas para o repertório e células NK, para os participantes clinicamente distintos.

Isso demonstra que esse compartimento celular da imunidade inata possa de fato ter sido bastante afetado pela imunossupressão relacionada à infecção pelo HIV, bem como pela própria TB. De fato, Pean et al. (2012) levantaram a hipótese de que pacientes que desenvolvem IRIS durante a cART possuam uma resposta imune inata mais potente contra células infectadas pelo *Mtb*, como sugerido pela atividade citotóxica elevada de suas células NK, antes do início da terapia. Ao longo do projeto principal do qual este estudo faz parte, nenhum caso de IRIS foi detectado entre os participantes com TB (pulmonar ou extrapulmonar) coinfectados pelo HIV-1 durante a cART, remetendo a uma imunidade inata prévia

desestruturada. Corroboram com esta hipótese os dados referentes à avaliação funcional das células Nk, discutidos ao final deste capítulo.

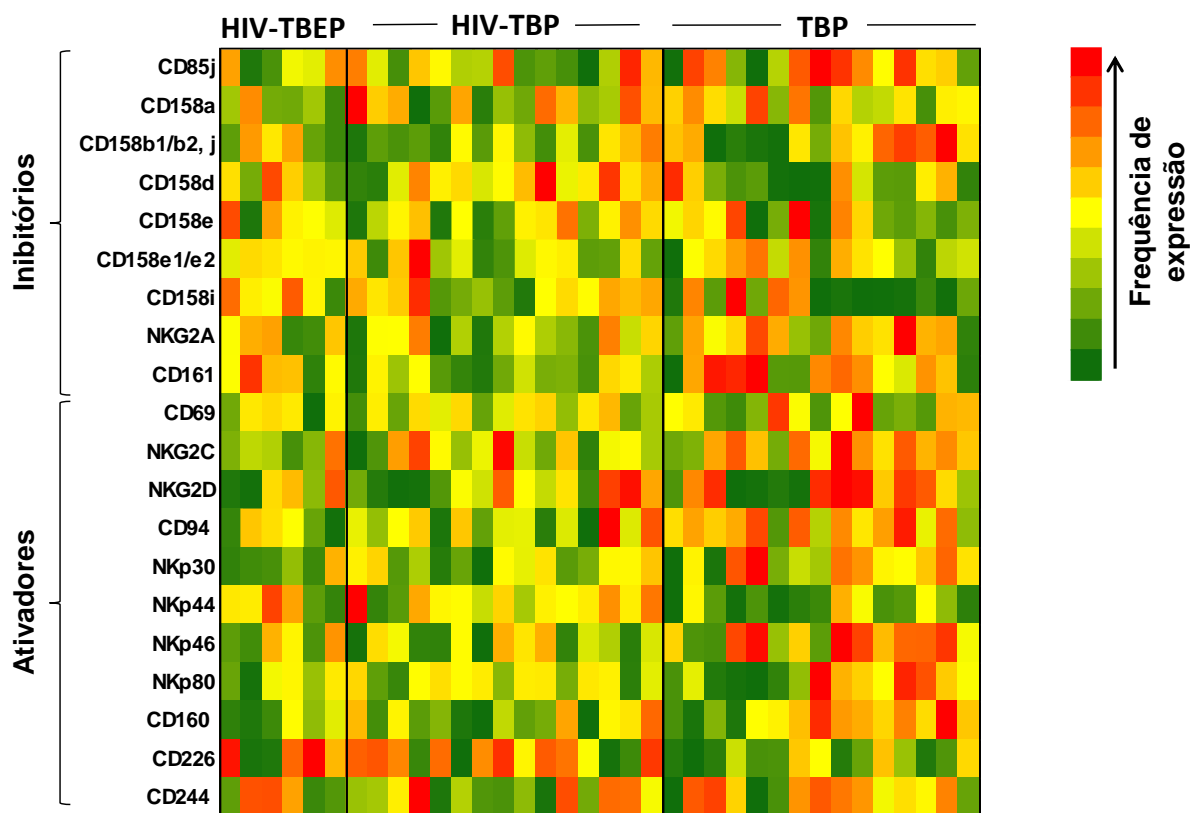


Figura 30. Heat map representativo da expressão individual de cada receptor pelas células NK, nos três grupos de pacientes clinicamente distintos.

O espectro de cores varia do verde intenso para o vermelho intenso, passando pelo amarelo e laranja, respectivamente em função das frequências de expressão menores para maiores, detectadas para os indivíduos infectados pelo HIV-1 com TB extrapulmonar (HIV-TBEP), infectados pelo HIV-1 com TB pulmonar (HIV-TBP), e mono infectados pelo *Mtb*, com TB pulmonar (TBP).

Além disso, o número reduzido de participantes coinfetados pelo HIV-1 com TB ganglionar incluídos no grupo clínico principal do estudo, pode ter atuado como um fator limitador dos resultados observados.

Em paralelo às células NK, as células NKT, componentes efetores da interface entre as imunidades inata e adquirida, também foram avaliadas no presente estudo, quanto à participação na imunopatogênese da forma ganglionar da TB. Estas células apresentam fenótipo parcialmente ativado e respondem rapidamente a infecções, sendo capazes de modular o perfil de outras células do sistema imunológico (Sada-Ovalle et al. 2008). Além disso, possuem receptores característicos dos linfócitos T convencionais e das células NK.

A associação entre as células NKT e as doenças pode ser classificada em três categorias. Na primeira, alterações nas células NKT (funcionais ou quantitativas) podem comprometer a regulação imune e aumentar a predisposição à afecções e infecções (Swann et al. 2007; Wu & Van Kaer 2009). Na segunda, as NKT são numérica e funcionalmente competentes, mas desenvolvem uma resposta imune patogênica que contribui com o desenvolvimento da doença (Balato et al. 2009). Na terceira, a estimulação da função NKT pode ser benéfica para a resolução da morbidade (Wu et al. 2009).

Na infecção pelo HIV-1, observa-se uma redução quantitativa dessas células ainda na fase aguda, o que certamente colabora para a progressão para a fase crônica da infecção (Fernandez et al. 2014) e, por isso, identifica-se aqui uma categoria II para a associação da NKT com a infecção. Já na TB, é possível estabelecer uma associação com qualquer uma das três categorias, uma vez que a literatura mostra redução dessas células associada à TB ativa e sugere sua ativação na infecção pelo *Mtb*, a qual pode ser imunogênica ou imunopatogênica (Montoya et al. 2008; Sutherland et al., 2009). Como seria, então, essa classificação frente a coinfeção HIV/*Mtb*, ainda não foi elucidado.

A avaliação das células NKT totais no presente estudo demonstrou frequências semelhantes entre os participantes avaliados, sem diferenças estatísticas significativas observadas. As células iNKT ou tipo I, invariáveis para a expressão do segmento V α 24J α 18, foram também avaliadas. Para os três grupos clínicos incluídos, foi observada uma tendência a frequência reduzida das células iNKT nos participantes coinfectados pelo HIV-1 com apresentação ganglionar da TB, em relação aos demais participantes, embora sem diferença estatística significativa. Portanto, a infecção pelo HIV-1 não parece impactar a frequência das células NKT/iNKT de pacientes com TB. Essa redução aparente observada para os pacientes com TB ganglionar poderia estar associada ao desfecho extrapulmonar da TB, mas a ausência de significância estatística, provavelmente pelo número reduzido de amostras avaliadas, não permite maiores conclusões.

Por outro lado, os participantes coinfectados pelo HIV-1 demonstraram uma frequência maior de expressão de células CD161⁺/CD69⁺, indicando um perfil iNKT ativado e possivelmente comprometido com a produção de IL-17 nesses participantes. A IL-17 é, por natureza, um mediador inflamatório e a expressão de

CD161 por células iNKT está associada à secreção de IL-17 por essas células (Ito & Seishima 2010; Moreira-Teixeira et al. 2011). No entanto, o desenvolvimento deste perfil de secreção é dependente de um ambiente inflamatório, com a presença de TGF- β , IL-1 β e IL-23 (Moreira-Teixeira et al. 2011). Portanto, para os pacientes avaliados, a produção de IL-17 pelas células iNKT CD161⁺ ativadas, dependerá do perfil do ambiente onde essas células foram ativadas, provavelmente dos pulmões e nódulos linfáticos.

Baseado na expressão das moléculas CD4 e CD8, as células iNKT podem ser classificadas em quatro subpopulações, sendo as subpopulações CD4⁺/CD8⁻ e duplo-negativas as mais frequentes em indivíduos saudáveis (Montoya et al. 2007). As quatro subpopulações foram detectadas para os três grupos clínicos estudados, e diferença estatística significativa foi observada para a frequência da subpopulação duplo-positiva, aumentada nos pacientes com TB pulmonar coinfectedados pelo HIV-1 em relação aos não coinfectedados pelo HIV-1. Embora uma frequência aparentemente superior da subpopulação CD4⁺/CD8⁺ tenha sido observada nos pacientes monoinfectedados, e o mesmo para a população duplo-negativa para aqueles com TB ganglionar coinfectedados, estas variações não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Chama a atenção a presença das células CD4⁺/CD8⁺ em nossa coorte, uma vez que não são observadas em indivíduos saudáveis (Montoya et al. 2007) e potenciais alvos para a infecção pelo HIV-1, nesses pacientes em estágio avançado da infecção, o que pode indicar células iNKT com perfil imaturo.

Por sua vez, células iNKT CD4⁺ demonstraram um perfil significativamente mais ativado, ou maior expressão de CD69, nos pacientes coinfectedados com TB pulmonar, em relação àqueles *Mtb*-monoinfectedados. Para as células iNKT CD8⁺, essa ativação significativa foi observada para todos os pacientes coinfectedados pelo HIV-1, em relação ao grupo monoinfectedado. Esses dados demonstram que, ainda que a frequência de células iNKT circulantes no sangue periférico tenha sido semelhante entre os três grupos, as células iNKT daqueles participantes infectados pelo HIV-1 apresentavam-se mais ativadas.

Ainda que as células CD161⁺ possam produzir citocinas do tipo Th1 e Th2, esse marcador é considerado próprio de células com perfil Th17 (Maggi et al. 2010). Entretanto, a capacidade de produzir IL-17 é dependente do ambiente inflamatório de

ativação dessas células (Moreira-Teixeira et al. 2011). Entre os grupos clínicos avaliados, a proporção de células CD161⁺ não foi significativamente diferente para as subpopulações CD4⁺ ou CD8⁺.

De um modo geral, um desgaste do compartimento de células iNKT foi observado neste estudo, principalmente em decorrência da infecção pelo HIV-1, certamente relacionado ao processo de ativação associado à essa infecção e ao ambiente inflamatório, embora um perfil sugestivo de Th17 tenha sido observado para essas células nestes pacientes.

Por fim, as células T $\gamma\delta$ também foram avaliadas no presente trabalho. Em contraposto às células T $\alpha\beta$ convencionais, esses linfócitos inatos são capazes de alterar seu estado de repouso para ativação rapidamente ao encontrarem uma diversidade de patógenos, entre eles o *Mtb* (Zhang & Sugawara 2012).

Em estudo realizado por Bourgarit et al. (2009), nenhuma diferença foi detectada quanto à frequência de células T $\gamma\delta$ circulantes entre pacientes HIV/TB, com e sem manifestações de IRIS. Carvalho et al. (2002), ao compararem amostras de pacientes com TB coinfectedados pelo HIV-1, indivíduos mono infectados pelo HIV-1 e doadores sadios, foram capazes de identificar frequências menores de células T $\gamma\delta$ circulantes nos grupos infectados pelo HIV-1. Entretanto, no presente estudo, foram observadas frequências significativamente menores de células T $\gamma\delta$ em participantes coinfectedados e com a forma ganglionar de TB, quando comparados àqueles com a forma pulmonar da TB. Essa observação vai de encontro à hipótese do presente estudo, sobre a participação das células da imunidade inata na imunopatogênese da manifestação ganglionar da TB extrapulmonar em participantes coinfectedados HIV-1/*Mtb*. É evidente que esta informação é muito vaga, e a presença reduzida das células T $\gamma\delta$ em participantes coinfectedados com TB ganglionar pode ser uma consequência e não uma causa para esta manifestação clínica da TB. Além disso, o pequeno número de pacientes recrutados para esse grupo certamente é um fator limitante para achados mais robustos, mas a infecção pelo HIV-1 pode não ter sido o único fator a impactar a distribuição desta população celular. No entanto, a restrição quantitativa destas células não deve ser ignorada, mas considerada para a patogênese da TB ganglionar, e mais estudos devem ser conduzidos nesse contexto.

Zhang et al. (2006) observaram que a proliferação de células T $\gamma\delta$ parece relacionada ao percentual de células NK CD56⁺ e que, apesar do IFN- γ ser uma citocina de extrema importância para a ativação de outras células do sistema imune, sua produção não apresenta impacto na expansão das células T $\gamma\delta$. Em outras palavras, as células NK podem interferir com a expansão da população de células T $\gamma\delta$, ainda que na ausência de IFN- γ . Alterações nas células NK podem, portanto, funcionar como um pano de fundo para as alterações das células T $\gamma\delta$. Portanto, esta observação torna as alterações detectadas para as células NK um fator importante a ser considerado às restrições observada para as células T $\gamma\delta$.

A coexpressão dos receptores CD158b1,b2,j/NKp46, CD158a/NKG2D, CD158b1,b2/CD69 e NKp46/CD69 pelas células T $\gamma\delta$ foi avaliada dentre os diferentes grupos clínicos incluídos no estudo. Como resultado, as principais diferenças foram observadas entre os pacientes com TB, coinfectados pelo HIV-1 ou *Mtb*-monoinfectados, sempre com os primeiros apresentando maiores frequências de coexpressão. No entanto, nenhum perfil diferenciado foi observado para os pacientes coinfectados com TB ganglionar.

Em estudo realizado por Christopoulos et al. (2016), a circulação da subpopulação de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ demonstrou-se reduzida em participantes imunossuprimidos, quando comparados a indivíduos adultos saudáveis. Adicionalmente, Carvalho et al. (2002) observaram redução da subpopulação V δ 2⁺ em participantes coinfectados pelo HIV-1, independente da forma clínica de TB, em relação aos indivíduos saudáveis. Igualmente, Poles et al. (2003) associaram a redução de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ periféricas à infecção pelo HIV-1. Além disso, Soriano-Sarabia et al. (2015) observaram que as células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ são passíveis de serem infectadas pelo HIV-1, uma vez que expressam constitutivamente a molécula de CD4 em níveis reduzidos, atuando como um reservatório durante a latência da infecção viral. Essa redução da frequência de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ causa uma inversão na razão V δ 1/V δ 2 nos indivíduos infectados pelo HIV-1, passando as células V δ 1⁺ a serem mais frequentes na periferia (Autran et al. 1989). Em concordância com o descrito na literatura, menores frequências de células T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ foram observadas para os pacientes infectados pelo HIV-1, independente da apresentação clínica da TB, em relação aos participantes *Mtb*-monoinfectados. Juntos, esses dados demonstram que, ainda que a infecção pelo HIV-1 *per se* possa não ter impactado diretamente a frequência de células T $\gamma\delta$ totais, uma perturbação nesse compartimento celular foi observada,

baseada na frequência alterada da subpopulação $V\delta^{2+}$, que ocorre, possivelmente, pela infecção dessas células em particular pelo HIV-1.

Foram observadas frequências ainda maiores de expressões dos receptores NKp46, no compartimento $V\delta^{2+}$, e NKG2D, para ambas subpopulações $V\delta^{2+}$ e $V\delta^{-}$, entre os pacientes coinfectados com TB pulmonar, em relação àqueles *Mtb*-monoinfectados. Já o marcador de ativação CD69 demonstrou frequência superior de expressão nos grupos HIV-TBEP e HIV-TB em relação ao grupo TBP, para as duas subpopulações de células T $\gamma\delta$ analisadas. Isto demonstra que, independente da frequência de circulação dessa subpopulação, as células tornam-se ativadas em função da infecção pelo HIV-1.

Bourgarit et al. (2009) observaram frequências menores de expressão dos receptores CD158a,h e CD158b pelas células T $\gamma\delta$ $V\delta^{2+}$ de participantes soropositivos para o HIV-1, que posteriormente desenvolveram episódios de IRIS. Entretanto, no presente estudo, não foi possível detectar diferenças significativas para a frequência de células T $\gamma\delta$ $V\delta^{2+}$ CD158a,h⁺ ou CD158b⁺, de modo a possibilitar qualquer associação com a manifestação ganglionar da TB.

Finalmente, foram avaliadas as coexpressões de receptores nas subpopulações $V\delta^{2+}$ e $V\delta^{-}$. Contudo, apenas a coexpressão CD158b1,b2,j/NKp46 pelas células $V\delta^{2+}$, apresentou diferenças estatísticas, sendo significativamente maior na TB pulmonar frente à coinfecção pelo HIV-1.

Alterações importantes foram observadas *ex vivo* para a população de células T $\gamma\delta$, que podem de fato estar relacionadas à manifestação ganglionar de TBEP.

Ainda que tenham sido observadas alterações na frequência de células NK totais entre os grupos clínicos estudados, sua análise fenotípica é insuficiente para definir as condições de funcionalidade das mesmas. Desse modo, o perfil citotóxico das células NK também foi investigado no presente estudo. Até o presente momento, é desconhecido se alterações na função ou no perfil de receptores expressos pelas células NK são capazes de proporcionar disseminação do agente causador da TB para sítios extrapulmonares.

Inicialmente, foi avaliada a frequência de células NK nas PBMCs dos três grupos clínicos estudados. As células NK demonstraram distribuição semelhante

entre os indivíduos clinicamente distintos. Entretanto, perfis de distribuição das frequências *in vitro* foram distintos daqueles inicialmente observados nas análises *ex vivo*. Diversos fatores podem ser responsáveis por esta diferença, como: a) a escolha dos fluorocromos acoplados aos anticorpos específicos utilizados para a definição das populações CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ em cada ensaio; b) a coleta com anticoagulante EDTA ou heparina, de acordo com o objetivo de cada amostra, se para avaliação do repertório ou funcional; c) as diferenças metodológicas empregadas entre ambas as avaliações, que incluiu a separação das PBMCs através de gradiente de densidade, das demais populações sanguíneas, para a avaliação *in vitro*, além da realização de cultura “overnight”; e d) a proliferação das células NK *in vitro* podem também ter colaborado para as diferenças observadas, em especial para as células dos pacientes coinfetados pelo HIV-1.

De modo geral, as células NK dos três grupos clínicos distintos foram capazes de promover resposta imune de função citotóxica frente ao estímulo com a linhagem celular K562. No entanto, ao serem analisadas as frequências de células em degranulação após o estímulo, estas não apresentaram diferenças significativas entre os pacientes avaliados, sendo observada apenas uma tendência de redução na sua frequência para os pacientes com TB pulmonar mono infectados, em relação aos demais. Pean et al. (2012) também avaliaram a capacidade de degranulação das células NK na associação HIV/TB e observaram que as células NK dos pacientes com IRIS apresentavam uma frequência de degranulação significativamente maior do que as células daqueles pacientes HIV/TB que não apresentaram a reação paradoxal.

Esse estudo, como previamente discutido, levantou a hipótese de que a presença de uma imunidade inata preservada frente ao *Mtb* antes da submissão à cART estaria envolvida no desenvolvimento da IRIS. Uma vez que a cART reconstitui a resposta imune dos pacientes, a presença de uma imunidade inata funcional, com células NK com significativo potencial degranulatório, poderia eficientemente participar da ativação das células da resposta imune adaptativa, que por sua vez possui papel de destaque no desenvolvimento da IRIS (Pean et al. 2012). No contexto do presente estudo, a degranulação restrita observada para as células NK, compatível com uma função mais comprometida dessas células, em conjunto com as restrições do repertório observadas, poderiam também ser

associadas à ausência de casos de IRIS entre os pacientes estudados, observada no âmbito do projeto principal (dados não apresentados).

Embora grande parte do aspecto funcional das células NK na defesa contra células tumorais esteja associado à sua capacidade citotóxica, a produção de citocinas também possui seu papel de destaque quanto à modulação do perfil da resposta imune na defesa contra agentes patogênicos (Choreno Parra et al. 2017). A capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células NK, necessárias à ativação de macrófagos contra o *Mtb*, também foi investigada.

Após estímulo com células K562, não foram observadas diferenças significativas para uma produção de IFN- γ ou TNF entre os grupos clínicos avaliados. No entanto, a produção de TNF apresentou tendência à redução em participantes infectados pelo HIV-1. Além disso, para as células duplo funcionais, capazes de produzir citocinas e liberar grânulos citotóxicos, nenhuma diferença estatística também pôde ser observada. Os dados encontrados na literatura a respeito da produção dessas citocinas são controversos. Pean et al. (2012), avaliaram a produção de IFN- γ pelas células NK entre pacientes infectados pelo HIV-1 com TB que apresentavam manifestações de IRIS ou não, e nenhuma diferença foi observada. Ainda, Mavilio et al. (2003) observaram produção reduzida de IFN- γ pelas células NK de pacientes virêmicos infectados pelo HIV-1, em relação àqueles avirêmicos. Em contrapartida, Alter et al. (2004) observaram produção elevada de IFN- γ e TNF pelas células NK obtidas de participantes soropositivos para o HIV-1 e virêmicos, em detrimento daqueles avirêmicos. Tomados juntos, esses dados levam a crer que a produção de IFN- γ e TNF possa estar sendo impactada pelas duas morbidades nos indivíduos incluídos em nosso estudo.

Em suma, não foram observadas alterações no perfil de receptores expressos pelas células NK dos participantes coinfetados pelo HIV-1 e com TB ganglionar, em relação àqueles coinfetados com manifestação pulmonar da TB, que permitisse a este estudo identificar sua participação na imunopatogenia e desfecho da TBEP. No entanto, é importante frisar que o número reduzido de indivíduos incluídos neste grupo clínico específico possa ter atuado como fator limitante aos resultados alcançados. As células iNKT parecem ter uma participação na imunopatogenia da coinfeção, mas não no desfecho de TB, uma vez que frequências superiores de células iNKT com perfil NKT17 ativado foi observado entre os participantes com TB

não infectados pelo HIV-1. Porém, para as células T $\gamma\delta$, a diferença de frequências observadas entre esses dois grupos clínicos fortalece nossa hipótese quanto à participação das células da imunidade inata na manifestação extrapulmonar da TB. Essa alteração, entretanto, pode ser tanto causa como consequência do estabelecimento do sítio extrapulmonar da infecção. Portanto, análises mais detalhadas quanto a função dessas células são necessárias, além da avaliação de outras formas extrapulmonares da doença, incluindo análises *in situ*, e envolvendo um número maior de casos serão necessários para que as observações realizadas nesse estudo sejam de fato conclusivas.

A impossibilidade da coleta de tecido ganglionar deixa uma lacuna a ser preenchida em nosso estudo. Esta avaliação poderia oferecer maiores esclarecimentos sobre o escape do *Mtb* do sítio pulmonar, bem como sobre a apresentação ganglionar de tuberculose, ou ainda, a identificação de um biomarcador poderia auxiliar no diagnóstico e manejo clínico dos indivíduos com HIV/TB.

É de extrema importância considerarmos outros fatores que possam promover impacto ao desfecho da TB em pacientes coinfectedados pelo HIV-1. Recentemente, diversos estudos vêm associando mudanças ocorridas na microbiota pulmonar para o desenvolvimento da TB (Cervantes 2017). Em condições saudáveis, é observado o equilíbrio entre a microbiota e a resposta imune do hospedeiro, promovendo educação e modulação do sistema imunológico. Entretanto, fatores como diabetes, mal nutrição, idade e morbidades, são capazes de promover a disbiose e desenvolver inflamação (Hong et al. 2016). A infecção pelo HIV-1 promove depleção das células T CD4⁺, além de células da imunidade inata importantes na apresentação de antígenos, como DCs e macrófagos. Durante os primeiros anos de infecção pelo HIV-1, o GALT, que detém cerca de 60% das células T CD4⁺ de um indivíduo, é o mais afetado pela imunossupressão, resultando no aumento da permeabilidade da barreira intestinal e na translocação microbiana (Nwosu et al. 2014). De fato, a ativação persistente do sistema imunológico, resultante da infecção pelo HIV-1, é capaz de promover disbiose no intestino humano (Nwosu et al. 2014). Contudo, uma conexão entre a composição da microbiota de diferentes órgãos já foi observada. Em outras palavras, a alteração da microbiota de determinado sítio do organismo é capaz de influenciar no arranjo da microbiota de outro (Hauptmann & Schaible 2016). Já foi demonstrado que o

intestino, maior abrigo de bactérias comensais do organismo, é capaz de impactar a resposta inflamatória no pulmão (Cervantes 2017).

Desse modo, alterações das microbiotas intestinal e pulmonar podem impactar as apresentações extrapulmonares de TB em participantes infectados pelo HIV-1, interferindo com a resposta imune inata. Seria a composição da microbiota pulmonar daqueles indivíduos que apresentam a forma extrapulmonar de TB, diferente daqueles que apresentam a forma pulmonar, de forma a permitir o escape do patógeno? Ainda, até que ponto a composição da microbiota intestinal é capaz de influenciar o desfecho da TBEP? Estudos futuros serão necessários para elucidar tais questões.

6 PERSPECTIVAS

Com a finalidade de dar continuidade ao presente estudo, e aprimorar os resultados obtidos, será realizada a avaliação da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de cada um dos receptores avaliados para as células NK, iNKT e T $\gamma\delta$, entre os grupos estudados.

O recrutamento de participante infectados pelo HIV-1 com TBEP será mantido, com o intuito de aumentar o número de participantes com TB ganglionar, a inclusão de outras formas clínicas de TB extrapulmonar, e especialmente, com a finalidade de inclusão de amostras de biópsias ganglionares, permitindo uma comparação entre análises *ex vivo* e *in situ*. Uma maior inclusão fornecerá um resultado mais robusto, com foco especial para análises das células T $\gamma\delta$ e seu envolvimento na imunopatogênese da manifestação das formas extrapulmonares de TB em participantes infectados pelo HIV-1.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados neste estudo, foi possível concluir que:

- ✓ A infecção crônica pelo HIV-1 impacta o compartimento de células NK, promovendo redução na frequência dessas células em pacientes com TB;
- ✓ Para as moléculas avaliadas em células NK, nenhuma caracterização de expressão de receptores com perfil ativador ou inibitório pôde ser observada nos grupos clínicos incluídos neste estudo. Portanto, a apresentação ganglionar de tuberculose nos indivíduos infectados pelo HIV-1 não pôde ser associada a um perfil específico de células NK;
- ✓ Não foram observadas alterações quantitativas para as células iNKT nos participantes HIV/TB, mas um perfil ativado e de células NKT17 foi identificado para esses participantes, sugerindo a participação das células iNKT na patogênese da coinfeção HIV/*Mtb*;
- ✓ As células T $\gamma\delta$ apresentaram frequência reduzida nos participantes infectados pelo HIV-1, com apresentação ganglionar de TB, sugerindo participação dessas células no desfecho clínico de TB;
- ✓ O perfil funcional das células NK demonstrou-se indiferente entre os grupos avaliados, o que sugere a um processo de deficiência estabelecido para essas células tanto na associação HIV/TB como na infecção pelo *Mtb*;
- ✓ Com exceção da alteração observada para as células T $\gamma\delta$, as demais diferenças observadas para as células imunes inatas avaliadas foram consequência da infecção pelo HIV-1 e não se relacionaram à apresentação clínica da TB.

8 REFERÊNCIAS

Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science*. 2005;308(5719):227-31.

Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev*. 2010;235(1):105-16.

Airo P, Caruso A, Stellini R, Antonioli C, Malacarne F, Licenziati S, et al. Characterization of gammadelta T cells expressing CD158b, a killer cell inhibitory receptor, in a patient with chronic CD4(+) lymphocytopenia and disseminated *Mycobacterium intracellulare* infection. *Clin Immunol*. 2000;96(1):67-75.

Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol*. 2005;175(12):7791-5.

Almehmadi M, Flanagan BF, Khan N, Alomar S, Christmas SE. Increased numbers and functional activity of CD56(+) T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*. 2014;142(2):258-68.

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

Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichtenfeld M, et al. Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J Immunol*. 2004;173(8):5305-11.

Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2007;195(10):1452-60.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1849-61.

Autran B, Triebel F, Katlama C, Rozenbaum W, Hercend T, Debre P. T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1989;75(2):206-10.

Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol.* 2009;129(7):1628-42.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

Barakonyi A, Rabot M, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Polgar B, Schiavon V, et al. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol.* 2004;173(9):5349-54.

Barry 3rd CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(12):845-55.

Bell LCK, Noursadeghi M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2):80-90.

Belo MTCT, Luiz RR, Hanson C, Selig L, Teixeira EG, Chalfoun T, et al. Tuberculosis and gender in a priority city in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2010;36(5):621-5.

Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:297-336.

Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):131-42.

Bethlem EP. Manifestações Clínicas da Tuberculose Pleural, Ganglionar,

Beziat V, Liu LL, Malmberg JA, Ivarsson MA, Sohlberg E, Bjorklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood.* 2013;121(14):2678-88.

Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):467-78.

Bourgarit A, Carcelain G, Samri A, Parizot C, Lafaurie M, Abgrall S, et al. Tuberculosis-associated immune restoration syndrome in HIV-1-infected patients involves tuberculin-specific CD4 Th1 cells and KIR-negative gammadelta T cells. *J Immunol*. 2009;183(6):3915-23.

Bozzano F, Marras F, De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014027.

Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*. 2008;112(7):2826-35.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-71.

Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004;200(6):749-59.

Brostjan C, Sobanov Y, Glienke J, Hayer S, Lehrach H, Francis F, et al. The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes Immun*. 2000;1(8):504-8.

Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2211-20.

Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Blood*. 2011;118(1):129-38.

Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.

Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011;132(3):315-25.

Cao W, Mehraj V, Trottier B, Baril JG, Leblanc R, Lebouche B, et al. Early Initiation Rather Than Prolonged Duration of Antiretroviral Therapy in HIV Infection Contributes to the Normalization of CD8 T-Cell Counts. *Clin Infect Dis*. 2016;62(2):250-7.

Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol*. 2012;3:347.

Carrington M, Martin MP, van Bergen J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends Microbiol*. 2008;16(12):620-7.

Carvalho AC, Matteelli A, Airo P, Tedoldi S, Casalini C, Imberti L, et al. gammadelta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis with and without HIV co-infection. *Thorax*. 2002;57(4):357-60.

CDC. Centers for Disease, Control and Prevention. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Healthy Care Providers. 2013.

Cervantes JL. Lung Microbiota in Tuberculosis. There are no small roles, only small actors. *Mycobact Dis*. 2017;7(3):244.

Champagne E. gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(2):117-37.

Chan KS, Kaur A. Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus macaques. *J Immunol Methods*. 2007;325(1-2):20-34.

Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev*. 2007;215:46-58.

Choreno Parra JA, Martinez Zuniga N, Jimenez Zamudio LA, Jimenez Alvarez LA, Salinas Lara C, Zuniga J. Memory of Natural Killer Cells: A New Chance against *Mycobacterium tuberculosis*? *Front Immunol*. 2017;8:967.

Christopoulos P, Bukatz D, Kock S, Malkovsky M, Finke J, Fisch P. Improved analysis of TCRgammadelta variable region expression in humans. *J Immunol Methods*. 2016;434:66-72.

Coelho Filho JC, Takenami I, Arruda S. Revisiting the Rich's formula: an update about granulomas in human tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(2):234-8.

Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Torrado E, Saraiva M, et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2010;207(8):1609-16.

da Silva TP, Giacoia-Gripp CB, 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):e66095.

da Silva TP, Giacoia-Gripp CBW, Schmaltz CA, Sant'Anna FM, Saad MH, Matos JA, et al. Risk factors for increased immune reconstitution in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in tuberculosis HIV-infected, antiretroviral-naive patients. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):606.

Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghori N, Herbomel P, Ramakrishnan L. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*. 2002;17(6):693-702.

Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 2009;136(1):37-49.

Davis ZB, Cooley SA, Cichocki F, Felices M, Wangen R, Luo X, et al. Adaptive Natural Killer Cell and Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-Expressing T Cell Responses are Induced by Cytomegalovirus and Are Associated with Protection against Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Donor Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(9):1653-62.

De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol*. 2003;33(9):2410-8.

Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004;104(4):942-7.

Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol*. 1994;156(2):529-36.

do Prado TN, Miranda AE, de Souza FM, Dias Edos S, Sousa LK, Arakaki-Sanchez D, et al. Factors associated with tuberculosis by HIV status in the Brazilian national surveillance system: a cross sectional study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:415.

Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505(7484):509-14.

Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe*. 2016;19(3):280-91.

Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*. 2009;60:471-84.

Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev*. 2009;5(1):22-34.

Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. *Immunity*. 2011;34(5):807-19.

Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol*. 2012;3:411.

Elgarhy LH, Shareef MM, Moustafa SM. Granulysin expression increases with increasing clinical severity of psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(4):361-6.

Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol*. 2011;32(8):364-72.

Esin S, Counoupas C, Aulicino A, Brancatisano FL, Maisetta G, Bottai D, et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scand J Immunol.* 2013;77(6):460-9.

Espindola MS, Soares LS, Galvao-Lima LJ, Zambuzi FA, Cacemiro MC, Brauer VS, et al. HIV infection: focus on the innate immune cells. *Immunol Res.* 2016;64(5-6):1118-32.

Fadda L, O'Connor GM, Kumar S, Piechocka-Trocha A, Gardiner CM, Carrington M, et al. Common HIV-1 peptide variants mediate differential binding of KIR3DL1 to HLA-Bw4 molecules. *J Virol.* 2011;85(12):5970-4.

Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol.* 2011;2:36.

Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol.* 2004;172(3):1455-62.

Fernandez CS, Kelleher AD, Finlayson R, Godfrey DI, Kent SJ. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(7):578-90.

Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol.* 2012;189(10):5082-8.

Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood.* 2012;119(11):2665-74.

Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 2000;165(2):978-87.

Gadkowski LB, Stout JE. Cavitary pulmonary disease. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):305-33, table of contents.

Galloway NL, Doitsh G, Monroe KM, Yang Z, Munoz-Arias I, Levy DN, et al. Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. *Cell Rep.* 2015;12(10):1555-63.

Gansert JL, Kiessler V, Engele M, Wittke F, Rollinghoff M, Krensky AM, et al. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol.* 2003;170(6):3154-61.

Geldmacher C, Ngwenyama N, Schuetz A, Petrovas C, Reither K, Heeregrave EJ, et al. Preferential infection and depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2010;207(13):2869-81.

Geniturinária e do Sistema Nervoso Central. Pulmão RJ [Internet]. 2012; 21:[19-22 pp.].

Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis.* 2014;14:9.

Gonzalez-Martin J, Garcia-Garcia JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. [Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(5):297.e1-20.

Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood.* 2006;107(9):3624-31.

Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 2002;195(5):625-36.

Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Campos C, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Solana R, et al. Differential Effect of Cytomegalovirus Infection with Age on the Expression of CD57, CD300a, and CD161 on T-Cell Subpopulations. *Front Immunol.* 2017;8:649.

Hauptmann M, Schaible UE. Linking microbiota and respiratory disease. *FEBS Lett.* 2016;590(21):3721-38.

Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 2009;31(2):184-96.

Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* 1999;5(1):83-9.

Hinchey J, Lee S, Jeon BY, Basaraba RJ, Venkataswamy MM, Chen B, et al. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2279-88.

Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J Hum Genet.* 2015;60(11):703-8.

Holzemer A, Garcia-Beltran WF, Altfeld M. Natural Killer Cell Interactions with Classical and Non-Classical Human Leukocyte Antigen Class I in HIV-1 Infection. *Front Immunol.* 2017;8:1496.

Hong BY, Maulen NP, Adami AJ, Granados H, Balcells ME, Cervantes J. Microbiome Changes during Tuberculosis and Antituberculous Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(4):915-26.

Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeon L, Abdallah AM, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol.* 2012;14(8):1287-98.

Hu PF, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Hirji K, Jewett A, et al. Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16⁺CD56⁺ cells and expansion of a population of CD16^{dim}CD56⁻ cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;10(3):331-40.

Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol.* 2013;4:69.

Iannello A, Debbeche O, Martin E, Attalah LH, Samarani S, Ahmad A. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J Leukoc Biol.* 2006;79(1):16-35.

Ito H, Seishima M. Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:641757.

Ivarsson MA, Michaelsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol.* 2014;5:184.

Jamwal SV, Mehrotra P, Singh A, Siddiqui Z, Basu A, Rao KV. Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. *Sci Rep.* 2016;6:23089.

Janeway CA, Jr., Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today.* 1988;9(3):73-6.

Jaryal A, Raina R, Sarkar M, Sharma A. Manifestations of tuberculosis in HIV/AIDS patients and its relationship with CD4 count. *Lung India.* 2011;28(4):263-6.

Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002838.

Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. The primary response of human gamma/delta + T cells to *Mycobacterium tuberculosis* is restricted to V gamma 9-bearing cells. *J Exp Med.* 1991;173(6):1331-8.

Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med.* 1990;171(3):667-79.

Kabelitz D, Dechanet-Merville J. Editorial: "Recent Advances in Gamma/Delta T Cell Biology: New Ligands, New Functions, and New Translational Perspectives". *Front Immunol.* 2015;6:371.

Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology.* 2015;479-480:180-93.

Kalsdorf B, Scriba TJ, Wood K, Day CL, Dheda K, Dawson R, et al. HIV-1 infection impairs the bronchoalveolar T-cell response to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(12):1262-70.

Kamya P, Boulet S, Tsoukas CM, Routy JP, Thomas R, Cote P, et al. Receptor-ligand requirements for increased NK cell polyfunctional potential in slow progressors infected with HIV-1 coexpressing KIR3DL1**h*/**y* and HLA-B*57. *J Virol.* 2011;85(12):5949-60.

Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000;164(4):2016-20.

Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):670-80.

Kim PJ, Pai SY, Brigl M, Besra GS, Gumperz J, Ho IC. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol.* 2006;177(10):6650-9.

Kleinnijenhuis J, van Crevel R, Netea MG. Trained immunity: consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(1):29-35.

Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2009;206(3):525-34.

Kottlilil S, Chun TW, Moir S, Liu S, McLaughlin M, Hallahan CW, et al. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis.* 2003;187(7):1038-45.

Krishnan N, Robertson BD, Thwaites G. The mechanisms and consequences of the extra-pulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2010;90(6):361-6.

Kronenberg M, Kinjo Y. Innate-like recognition of microbes by invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(4):391-6.

Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(3):221-9.

Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol.* 2012;3:335.

Kufa T, Mabuto T, Muchiri E, Charalambous S, Rosillon D, Churchyard G, et al. Incidence of HIV-associated tuberculosis among individuals taking combination antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(11):e111209.

Kumar V, Delovitch TL. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology.* 2014;142(3):321-36.

Kumawat K, Pathak SK, Spetz AL, Kundu M, Basu J. Exogenous Nef is an inhibitor of Mycobacterium tuberculosis-induced tumor necrosis factor-alpha production and macrophage apoptosis. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12629-37.

Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol.* 2009;186(2):255-68.

Lambert C, Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;61(1):45-53.

Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* 1994;153(6):2417-28.

Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(6):575-82.

Latha TS, Reddy MC, Durbaka PV, Rachamalla A, Pallu R, Lomada D. gammadelta T Cell-Mediated Immune Responses in Disease and Therapy. *Front Immunol.* 2014;5:571.

Lawand M, Dechanet-Merville J, Dieu-Nosjean MC. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol.* 2017;8:761.

- Le Bouteiller P, Tabiasco J, Polgar B, Kozma N, Giustiniani J, Siewiera J, et al. CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunol Lett.* 2011;138(2):93-6.
- Leal FE, Premeaux TA, Abdel-Mohsen M, Ndhlovu LC. Role of Natural Killer Cells in HIV-Associated Malignancies. *Front Immunol.* 2017;8:315.
- Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med.* 2002;195(5):637-41.
- Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1146-54.
- Li F, Gao B, Xu W, Chen L, Xiong S. The Defect in Autophagy Induction by Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis Is Correlated with Poor Tuberculosis Outcomes. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147810.
- Liao C-M, Zimmer MI, Wang C-R. The Functions of Type I and Type II Natural Killer T (NKT) Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2013. p. 8.
- Lima JF, Oliveira LM, Pereira NZ, Duarte AJ, Sato MN. Polyfunctional natural killer cells with a low activation profile in response to Toll-like receptor 3 activation in HIV-1-exposed seronegative subjects. *Sci Rep.* 2017;7(1):524.
- Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, et al. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2008;82(10):4785-92.
- Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:227-58.
- Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(36):14725-32.

Maeda M, Carpenito C, Russell RC, Dasanji J, Veinotte LL, Ohta H, et al. Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. *J Immunol.* 2005;175(7):4426-32.

Maggi L, Santarasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, et al. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol.* 2010;40(8):2174-81.

Maher D. Re-thinking global health sector efforts for HIV and tuberculosis epidemic control: promoting integration of programme activities within a strengthened health system. *BMC Public Health.* 2010;10:394.

Maiza H, Leca G, Mansur IG, Schiavon V, Boumsell L, Bensussan A. A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J Exp Med.* 1993;178(3):1121-6.

Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8(2):47-55.

Marcenaro E, Ferranti B, Falco M, Moretta L, Moretta A. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol.* 2008;20(9):1155-67.

Marras F, Nicco E, Bozzano F, Di Biagio A, Dentone C, Pontali E, et al. Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate NKp44 on IL-2 stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(29):11970-5.

Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:954602.

Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002;31(4):429-34.

Mathew SO, Rao KK, Kim JR, Bambard ND, Mathew PA. Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1632-41.

Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):358-68.

Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15011-6.

Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2886-91.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):761-70.

Mert A, Bilir M, Tabak F, Ozaras R, Ozturk R, Senturk H, et al. Miliary tuberculosis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. *Respirology.* 2001;6(3):217-24.

Mesci A, Ljutic B, Makrigiannis AP, Carlyle JR. NKR-P1 biology: from prototype to missing self. *Immunol Res.* 2006;35(1-2):13-26.

Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med.* 2007;204(5):995-1001.

Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol.* 2002;10(2-3):147-64.

Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, Briken V. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- α -mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000864.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Coinfecção TB-HIV. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2017.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasil; 2017a.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasil; 2017b.

Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. In: Secretaria de Vigilância em Saúde, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. p. 284.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. In: Departamento de Vigilância PeCdIST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, editor. 1ª ed. Brasília - DF: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2017. p. 410.

Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoheh N, Griffiths G, Moita LF, et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.* 2010;12(8):1046-63.

Moll M, Kuylenstierna C, Gonzalez VD, Andersson SK, Bosnjak L, Sonnerborg A, et al. Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol.* 2009;39(3):902-11.

Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med.* 1994;180(4):1499-509.

Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol.* 2001;167(12):6736-44.

Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science.* 2014;343(6169):428-32.

Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A.* 2013;83(8):702-13.

Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, Conte R, Glatzer T, Ambrosini P, et al. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood*. 2012;119(17):3987-96.

Montoya CJ, Catano JC, Ramirez Z, Rugeles MT, Wilson SB, Landay AL. Invariant NKT cells from HIV-1 or Mycobacterium tuberculosis-infected patients express an activated phenotype. *Clin Immunol*. 2008;127(1):1-6.

Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.

Morais-Papini TF, Coelho-Dos-Reis JGA, Wendling APB, do Vale Antonelli LR, Wowk PF, Bonato VLD, et al. Systemic Immunological changes in patients with distinct clinical outcomes during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunobiology*. 2017;222(11):1014-24.

Moreira-Teixeira L, Resende M, Coffre M, Devergne O, Herbeuval JP, Hermine O, et al. Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells. *J Immunol*. 2011;186(10):5758-65.

Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2007;178(5):2706-13.

Naif HM. Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep*. 2013;5(Suppl 1):e6.

Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med*. 2013;2013:828939.

Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.

Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.

Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol.* 12. England 2014. p. 289-99.

Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, Rudi K. Gut Microbiota in HIV Infection: Implication for Disease Progression and Management. *Gastroenterol Res Pract.* 2014;2014:803185.

O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:475-527.

Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, Krensky AM. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol.* 2003;171(5):2556-62.

Parkinson-Lawrence EJ, Dean CJ, Chang M, Hopwood JJ, Meikle PJ, Brooks DA. Immunochemical analysis of CD107a (LAMP-1). *Cell Immunol.* 2005;236(1-2):161-6.

Pathak S, Wentzel-Larsen T, Asjo B. Effects of in vitro HIV-1 infection on mycobacterial growth in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 2010;78(9):4022-32.

Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002464.

Pean P, Nerrienet E, Madec Y, Borand L, Laureillard D, Fernandez M, et al. 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):3315-20.

Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2017;8:84.

Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):216-24.

Perreau M, Levy Y, Pantaleo G. Immune response to HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(4):333-40.

Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:353-84.

Pilheu JA, De Salvo MC, Gonzalez J, Rey D, Elias MC, Ruppi MC. CD4+ T-lymphocytopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997;1(5):422-6.

Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(20):3813-27.

Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, et al. Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol.* 2002;169(1):68-74.

Poggi A, Costa P, Morelli L, Cantoni C, Pella N, Spada F, et al. Expression of human NKRP1A by CD34+ immature thymocytes: NKRP1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity. *Eur J Immunol.* 1996;26(6):1266-72.

Poles MA, Barsoum S, Yu W, Yu J, Sun P, Daly J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol.* 2003;77(19):10456-67.

Pozo D, Vales-Gomez M, Mavaddat N, Williamson SC, Chisholm SE, Reyburn H. CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase. *J Immunol.* 2006;176(4):2397-406.

Radulovic K, Niess JH. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? *J Immunol Res.* 2015;2015:497056.

Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352-66.

Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352-66.

Ramana Rao PV, Rajasekaran S, Raja A. Natural killer cell-mediated cytokine response among HIV-positive south Indians with pulmonary tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30(1):33-42.

Ramirez-Lapausa M, Menendez-Saldana A, Noguerado-Asensio A. [Extrapulmonary tuberculosis]. *Rev Esp Sanid Penit.* 2015;17(1):3-11.

Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology.* 1990;22(3):153-5.

Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):520-31.

Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, et al. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood.* 2007;109(10):4296-305.

Reeves RK, Evans TI, Gillis J, Johnson RP. Simian immunodeficiency virus infection induces expansion of alpha4beta7+ and cytotoxic CD56+ NK cells. *J Virol.* 2010;84(17):8959-63.

Reilly EC, Wands JR, Brossay L. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine.* 2010;51(3):227-31.

Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five Layers of Receptor Signaling in gammadelta T-Cell Differentiation and Activation. *Front Immunol.* 2015;6:15.

Rich AR. The pathogenesis of tuberculosis. 2 ed ed. IL, USA: Charles Thomas; 1951.

Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005;175(4):2144-51.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990;76(12):2421-38.

Rodrigues NCP, Andrade MKN, O'Dwyer G, Flynn M, Braga JU, Almeida AS, et al. Distribution of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro (Brazil): a spatial analysis. *Cien Saude Colet.* 2017;22(12):4125-34.

Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*. 2012;120(24):4751-60.

Rothchild AC, Stowell B, Goyal G, Nunes-Alves C, Yang Q, Papavinasasundaram K, et al. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection. *MBio*. 2017;8(5).

Roy S, Barnes PF, Garg A, Wu S, Cosman D, Vankayalapati R. NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2008;180(3):1729-36.

Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM. Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog*. 2008;4(12):e1000239.

Sag D, Krause P, Hedrick CC, Kronenberg M, Wingender G. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3725-40.

Salvador F, Los-Arcos I, Sanchez-Montalva A, Tortola T, Curran A, Villar A, et al. Epidemiology and diagnosis of tuberculous lymphadenitis in a tuberculosis low-burden country. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(4):e509.

Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2002;76(15):7528-34.

Sandrino Sánchez M, Martínez Muñoz M, Wong Díaz LB. Tuberculosis extrapulmonar. Presentación de un caso. *Extrapulmonary Tuberculosis. A Case Report*. Cuba: Medisur; 2015. p. 442-7.

Schmaltz CA, Sant'Anna FM, Neves SC, Velasque Lde S, Lourenco MC, Morgado MG, et al. Influence of HIV infection on mortality in a cohort of patients treated for tuberculosis in the context of wide access to HAART, in Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;52(5):623-8.

Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol*. 1993;21(13):1673-9.

Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, et al. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med*. 2003;198(5):693-704.

Scott-Algara D, Arnold V, Didier C, Kattan T, Pirozzi G, Barre-Sinoussi F, et al. The CD85j+ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells. *PLoS One*. 2008;3(4):e1975.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 2016^a. Brasil: Ministério da Saúde.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. Brasil: Ministério da Saúde.

Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol*. 2014;26(2):138-44.

Sia JK, Georgieva M, Rengarajan J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *J Immunol Res*. 2015;2015:747543.

Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003;18(3):441-52.

Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol*. 2014;5:105.

Slauenwhite D, Johnston B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front Immunol*. 2015;6:255.

Smith D, Hansch H, Bancroft G, Ehlers S. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*. 1997;92(4):413-21.

Snyder-Cappione JE, Loo CP, Carvalho KI, Kuylenstierna C, Deeks SG, Hecht FM, et al. Lower cytokine secretion ex vivo by natural killer T cells in HIV-infected individuals is associated with higher CD161 expression. *Aids*. 2009;23(15):1965-70.

Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:6825493.

Soriano-Sarabia N, Archin NM, Bateson R, Dahl NP, Crooks AM, Kuruc JD, et al. Peripheral Vgamma9Vdelta2 T Cells Are a Novel Reservoir of Latent HIV Infection. *PLoS Pathog*. 2015;11(10):e1005201.

Spalgais S, Jaiswal A, Puri M, Sarin R, Agarwal U. Clinical profile and diagnosis of extrapulmonary tb in HIV infected patients: routine abdominal ultrasonography increases detection of abdominal tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 2013;60(3):147-53.

Stieh DJ, Matias E, Xu H, Fought AJ, Blanchard JL, Marx PA, et al. Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):529-40.

Strauss-Albee DM, Fukuyama J, Liang EC, Yao Y, Jarrell JA, Drake AL, et al. Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Sci Transl Med*. 2015;7(297):297ra115.

Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):645-57.

Sutherland JS, Jeffries DJ, Donkor S, Walther B, Hill PC, Adetifa IM, et al. High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(6):398-404.

Swann JB, Coquet JM, Smyth MJ, Godfrey DI. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;314:293-323.

Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res*. 2008;101:277-348.

Tessmer MS, Fatima A, Paget C, Trottein F, Brossay L. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(2):153-62.

Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J Immunol*. 2009;182(11):7287-96.

Treerat P, Prince O, Cruz-Lagunas A, Munoz-Torraco M, Salazar-Lezama MA, Selman M, et al. Novel role for IL-22 in protection during chronic Mycobacterium tuberculosis HN878 infection. *Mucosal Immunol*. 2017;10(4):1069-81.

Tu TC, Brown NK, Kim TJ, Wroblewska J, Yang X, Guo X, et al. CD160 is essential for NK-mediated IFN-gamma production. *J Exp Med*. 2015;212(3):415-29.

Turner RD, Bothamley GH. Cough and the transmission of tuberculosis. *J Infect Dis*. 2015;211(9):1367-72.

Tyler CJ, Doherty DG, Moser B, Eberl M. Human Vgamma9/Vdelta2 T cells: Innate adaptors of the immune system. *Cell Immunol*. 2015;296(1):10-21.

Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1137-45.

Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*. 2006;208(2):261-9.

UNAIDS. UNAIDS DATA 2017. Geneva; 2017.

Van Rhijn I, Kasmar A, de Jong A, Gras S, Bhati M, Doorenspleet ME, et al. A conserved human T cell population targets mycobacterial antigens presented by CD1b. *Nat Immunol*. 2013;14(7):706-13.

Vankayalapati R, Barnes PF. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89 Suppl 1:S77-80.

Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, Safi H, et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2005;175(7):4611-7.

Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):88-100.

Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin Immunol.* 2010;22(2):87-96.

Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e110.

Verrall AJ, Netea MG, Alisjahbana B, Hill PC, van Crevel R. Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: a new frontier in prevention. *Immunology.* 2014;141(4):506-13.

Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 2010;235(1):35-54.

Waldowska M, Bojarska-Junak A, Rolinski J. A brief review of clinical trials involving manipulation of invariant NKT cells as a promising approach in future cancer therapies. *Cent Eur J Immunol.* 2017;42(2):181-95.

Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, et al. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS Biol.* 2012;10(2):e1001255.

Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect.* 2003;5(1):31-7.

Wen L, Barber DF, Pao W, Wong FS, Owen MJ, Hayday A. Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol.* 1998;160(4):1965-74.

WHO. Definitions and reporting framework for tuberculosis. 2013 revision (updated December 2014).

WHO. Global tuberculosis report 2016. Geneva 2016.

WHO. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization (WHO); 2017 [15 de Dezembro de 2017]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>.

WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva 2017.

Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol.* 2012;13(9):872-9.

Winchester BG. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol.* 2001;5 Suppl A:11-9.

Wrobel P, Shojaei H, Schittek B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, et al. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol.* 2007;66(2-3):320-8.

Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens.* 2009;73(6):535-45.

Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 2009;9(1):4-14.

Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol.* 2017;8:930.

Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, et al. gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2014;10(2):119-35.

- Xiong P, Sang HW, Zhu M. Critical roles of co-activation receptor DNAX accessory molecule-1 in natural killer cell immunity. *Immunology*. 2015;146(3):369-78.
- Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol*. 2009;17(5):183-8.
- Zhang Q, Sugawara I. Immunology of tuberculosis. *World J Exp Med*. 2012;2(4):70-4.
- Zhang R, Zheng X, Li B, Wei H, Tian Z. Human NK cells positively regulate gammadelta T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2006;176(4):2610-6.
- Zheng J, Liu Y, Lau YL, Tu W. gammadelta-T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(1):50-7.
- Ziegler SE, Ramsdell F, R AM. The Activation Antigen CD69. Seattle, Washington, USA: STEM CELLS; 1994. p. 456-65.
- Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):359-67.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portadores de HIV e Tuberculose



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para portadores de HIV e Tuberculose.

Título do projeto: Caracterização da imunidade inata e biomarcadores em pacientescoinfectados com TB/HIV

INTRODUÇÃO.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você tem o HIV e esta recebendo tratamento para Tuberculose (TB). Também estamos convidando um grupo de pacientes que são infectados apenas pelo HIV, mas sem Tuberculose e um grupo de participantes saudáveis que não tem o HIV ou a Tuberculose.

O Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (IOC), o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) e o Instituto Pasteur de Paris/França estão trabalhando juntos neste estudo. Por favor, você tem tempo para tomar sua decisão. Converse com sua família e amigos sobre isto.

PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A coinfeção HIV/Tuberculose (TB) representa enorme desafio científico e de saúde pública, embora o uso de medicamentos para o HIV (antirretrovirais), usados durante o tratamento da tuberculose, melhore a sobrevivência dos pacientes, particularmente, por restaurar sua capacidade de reagir às infecções.

O uso simultâneo de antirretrovirais e medicamentos antituberculose não são de fácil administração e manejo devido às interações medicamentosas e/ou ao aparecimento de sinais e sintomas de inflamação relacionados com a melhora na capacidade do corpo de se defender das doenças. Esses sinais e sintomas que às vezes acontecem em alguns pacientes são conhecidos pelo nome “IRIS”.

Os fatores clínicos e laboratoriais associados ao início da IRIS ainda não são claramente compreendidos. Na verdade, vários estudos têm demonstrado reações que aparecem no decorrer da melhora das defesas do organismo em pacientes de TB com infecção por HIV, caracterizadas pela resposta exagerada do corpo às infecções, levando ao aparecimento de gânglios, fístula dos gânglios e fenômenos de compressão que podem, por vezes, levar a morte. .

A compreensão da origem dessas reações e a identificação de testes laboratoriais são de relevância para a melhoria do tratamento clínico. O objetivo deste estudo é determinar o envolvimento das respostas de defesa inicial do organismo e identificação de testes de laboratório associados ao início dessas inflamações em pacientes com TB que estão fazendo uso de terapia antirretroviral.

QUANTAS PESSOAS VÃO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Cento e setenta e cinco pessoas serão convidadas a participar deste estudo e serão recrutadas como segue:

- 100 participantes com infecção pelo HIV e com TB
- Até 25 pacientes com infecção pelo HIV, mas que não tenham tuberculose.
- Até 25 pacientes com TB, mas que não sejam infectados pelo HIV.
- Até 25 controles participarão deste estudo. Os controles serão pessoas escolhidas aleatoriamente (como jogar uma moeda), que não têm a infecção pelo HIV ou a tuberculose e não está apresentando qualquer sinal ou sintoma. Os controles nos ajudarão a entender o porquê alguns participantes não desenvolvem sintomas de IRIS enquanto recebem tratamento para TB.

DE QUANTO TEMPO SERÁ MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Os participantes com HIV e TB deverão vir ao centro de estudos mensalmente e coletar 50 ml de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa de sangue, nos seguintes momentos: quando o diagnóstico de tuberculose for feito, no dia em que os medicamentos anti-HIV forem iniciados, e nas semanas 4, 8 e 12 após o início dos medicamentos anti-HIV. A visita durará 90 minutos.

Os participantes que apresentem somente HIV ou tuberculose deverão vir ao centro de estudos mensalmente, conforme cronograma do seu médico, e serão submetidos a coleta de sangue (50 ml), o equivalente a duas colheres de sopa de sangue, duas vezes durante o acompanhamento.

Para os controles, apenas uma visita será necessário e irá durar apenas 30 minutos. A quantidade total de sangue coletada será de 50 ml, o equivalente a duas colheres de sopa de sangue.

O QUE ESTÁ ENVOLVIDO NO ESTUDO?

Se você tem HIV e TB, você deverá tomar seus medicamentos de acordo com a orientação do seu médico. Após cada visita, o seu sangue será enviado ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da FIOCRUZ, onde será realizada a análise das células de defesa imunológicas inatas. Os resultados destes exames não irão afetar o seu tratamento de tuberculose de forma alguma. Eles serão usados apenas para comparação com os resultados do sangue dos pacientes que tiverem apenas HIV ou somente tuberculose, ou ainda apenas com os dos controles. Você não precisa estar em jejum para coletar as amostras de sangue.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Existem alguns pequenos riscos de se ter sangue coletado. Estes incluem uma rápida dor a partir da picada da agulha, hematomas, sangramento, tontura e, raramente, infecção onde a agulha entra na veia.

BENEFÍCIOS.

Não há benefícios diretos para você por fazer parte deste estudo. Sua participação nesta pesquisa vai nos ajudar a aprender mais sobre como tratar a infecção tuberculosa latente com segurança.

CONFIDENCIALIDADE.

Iremos verificar seus registros médicos para obter informações para o estudo. Nós não usaremos o seu nome em qualquer documento relacionado ao estudo. Seu nome não será enviado para o centro de dados do estudo. Agência francesa de pesquisa (ANRS) e os monitores do estudo nos centros realizadores da pesquisa também podem verificar seus registros. Entretanto, manteremos todas as informações de seus registros médicos confidenciais.

CUSTOS E PAGAMENTO POR SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.

Não há custo para você para estar no estudo. Você não terá que pagar para quaisquer exames que são parte deste estudo. Você será reembolsado dos custos de transporte e receberá um leve café da manhã, após cada visita ao centro.

DIREITO DE RECUSA OU DESISTÊNCIA.

A participação neste estudo é voluntária. Se você preferir não participar, isso não vai alterar seus cuidados médicos regulares. Se você decidir participar do estudo, você poderá desistir a qualquer momento, sem alterar a assistência médica que você recebe. Se uma nova e importante informação surgir e, se isso puder mudar sua decisão de participar do estudo, por favor, nos avise.

TRATAMENTO ALTERNATIVO.

Se você optar por não participar deste estudo, você ainda receberá tratamento para a TB como parte da rotina padrão de cuidados para pacientes em tratamento de tuberculose, de acordo com as diretrizes brasileiras para tratamento da tuberculose.

Armazenamento das Amostras:

Você será solicitado a dar sua permissão para que algumas amostras que o médico ou enfermeiro coletarem sejam armazenadas no laboratório de AIDS e Imunologia molecular/Fiocruz/IOC até que todos os dados e resultados do estudo tenham sido publicados. O seu nome não será colocado nessas amostras, somente um número especial do estudo. Os responsáveis pelo laboratório não saberão o seu nome.

Por que o armazenamento é necessário?

Os pesquisadores podem obter muitas informações a partir de um estudo, mas no decorrer do estudo, os exames utilizados podem ser aprimorados e novos exames são desenvolvidos e, com isso, torna-se possível obter mais informações com esses exames melhores ou completamente novos. Além disso, pode ser necessário analisar novamente uma amostra de sangue, caso os resultados não estejam satisfatórios e conclusivos. Quando os voluntários de um estudo autorizam que amostras sejam armazenadas em um laboratório e usadas para os pesquisadores realizarem exames e/ou reanálise das suas amostras após a conclusão da sua participação no estudo, os pesquisadores podem obter novas informações importantes. Os seus direitos e a privacidade serão respeitados sempre.

Como a minha privacidade será protegida?

O único registro de que você participou deste estudo encontra-se na clínica, onde é mantido em separado dos registros médicos. O registro está trancado.

O seu nome não será colocado nas amostras no laboratório. As amostras só terão um código especial do estudo. Esse código será o mesmo que consta das suas informações no estudo, coletadas nas entrevistas e nos exames. As informações coletadas durante o estudo poderão ser usadas para outra pesquisa relacionada com o HIV/TB caso haja aprovação pelo Sistema CEP/CONEP do Brasil.

Autorização para armazenar as amostras biológicas no laboratório:

Todos os estudos a serem feitos com as amostras armazenadas no laboratório terão as finalidades específicas com as quais você concordou. Todos os estudos com previsão de uso das amostras deste estudo passarão por uma análise, para assegurar que o projeto corresponde ao mesmo tipo de pesquisa com o qual você concordou. Se o estudo a ser realizado envolver exames diferentes daqueles com os quais você concordou, o comitê determinará se será necessário obter autorização sua para o novo estudo. Comunique à equipe responsável sempre que quiser receber os resultados do estudo.

As pessoas sempre têm o direito de encerrar sua participação em pesquisas. Portanto, se você decidir que não quer que os pesquisadores usem as amostras armazenadas no laboratório, bastará entrar em contato com a equipe da clínica. A equipe informará aos responsáveis pelo laboratório que as amostras com o código de estudo associado ao seu nome na clínica não devem ser utilizadas. Essas amostras podem ser removidas do laboratório e destruídas se você pedir que isso seja feito.

Por favor, marque um X para indicar se você aceita ou não que suas amostras sejam armazenadas.

Autorização para o uso das amostras armazenadas para os fins estabelecidos na seção anterior.

Eu autorizo o armazenamento

Eu não autorizo o armazenamento

PESSOAS PARA CONTATO.

Se você tiver dúvidas sobre esta pesquisa entre em contato com o pesquisador Dr. José Henrique Pilotto no Instituto Oswaldo Cruz, pelo telefone 8182-9797, a cobrar, em qualquer horário, de segunda a segunda feira, inclusive nos finais de semana e feriados. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como sujeito da pesquisa e está participando do estudo no HGNI, entre em contato como Dr. Luís Henrique Claro, coordenador do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Geral de Nova Iguaçu pelo telefone 3779-9999, de segunda a sexta feira, das 08:00 as 17:00h. Se você está participando do estudo no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- IPEC, ligue para a Dra. Maria Regina Amendoeira coordenadora adjunta do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, no telefone 2561-4815, de segunda a sexta feira, das 08:00 as 17:00.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO.

A minha assinatura abaixo indica que eu concordo em participar deste estudo. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas. Eu sinto que minhas perguntas foram todas respondidas. Reconheço que participar deste estudo é a minha escolha. Eu sei que após decidir participar deste estudo, posso desistir a qualquer momento. Esse termo de consentimento livre e esclarecido foi elaborado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador e a outra com o voluntário da pesquisa. Eu receberei um original deste formulário de consentimento.

_____ /_____/____

Nome do participante (letra legível)

Data

Assinatura do participante

_____ /_____/____

Nome do Pesquisador (letra legível)

Data

Assinatura do Pesquisador

_____ /_____/____

Nome do representante legal ou testemunha imparcial (letra legível)

Data

Assinatura do representante legal ou testemunha imparcial

9.2 Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portadores de Tuberculose



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para portadores de Tuberculose.

Título do projeto: Caracterização da imunidade inata e biomarcadores em pacientes coinfectados com TB/HIV

INTRODUÇÃO.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você está recebendo tratamento para Tuberculose (TB). Também estamos convidando um grupo de pacientes que são infectados apenas pelo HIV, mas sem Tuberculose, um grupo com HIV e tuberculose, e um grupo de participantes saudáveis que não tem o HIV ou a Tuberculose.

O Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (IOC), o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) e o Instituto Pasteur de Paris/França estão trabalhando juntos neste estudo. Por favor, você tem tempo para tomar sua decisão. Converse com sua família e amigos sobre isto.

PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A coinfeção HIV/Tuberculose (TB) representa enorme desafio científico e de saúde pública, embora o uso de medicamentos para o HIV (antirretrovirais), usados durante o tratamento da tuberculose, melhore a sobrevivência dos pacientes, particularmente, por restaurar sua capacidade de reagir às infecções.

O uso simultâneo de antirretrovirais e medicamentos antituberculose não são de fácil administração e manejo devido às interações medicamentosas e/ou ao aparecimento de sinais e sintomas de inflamação relacionados com a melhora na capacidade do corpo de se defender das doenças. Esses sinais e sintomas acontecem em alguns pacientes e são conhecidos como 'IRIS'.

Os fatores clínicos e laboratoriais associados ao início da IRIS ainda não são claramente compreendidos. Na verdade, vários estudos têm demonstrado reações que aparecem no decorrer da melhora das defesas do organismo em pacientes de TB com infecção por HIV, caracterizadas pela resposta exagerada do corpo às infecções, levando ao aparecimento de gânglios, fístula dos gânglios e fenômenos de compressão que podem, por vezes, levar a morte.

A compreensão da origem dessas reações e a identificação de testes de laboratório são de relevância para a melhoria do tratamento clínico. O objetivo deste estudo é determinar o envolvimento das respostas de defesa inicial do organismo e identificar testes de laboratório associados ao início dessas inflamações em pacientes com TB que estão fazendo uso de terapia antirretroviral.

QUANTAS PESSOAS VÃO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Cento e setenta e cinco pessoas serão convidadas a participar deste estudo e serão recrutadas como segue:

- 100 participantes com infecção pelo HIV e com TB
- Até 25 pacientes com infecção pelo HIV, mas que não tenham tuberculose.
- Até 25 pacientes com TB, mas que não sejam infectados pelo HIV.
- Até 25 controles participarão deste estudo. Os controles serão pessoas escolhidas aleatoriamente (como jogar uma moeda), que não têm a infecção pelo HIV ou a tuberculose e não está apresentando qualquer sinal ou sintoma. Os controles nos ajudarão a entender o porquê alguns participantes não desenvolvem sintomas de IRIS enquanto recebem tratamento para TB.

DE QUANTO TEMPO SERÁ MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Os participantes com HIV e TB deverão vir ao centro de estudos mensalmente e coletar 50 ml de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa de sangue, nos seguintes momentos: quando o diagnóstico de tuberculose for feito, no dia em que os medicamentos anti-HIV forem iniciados, e nas semanas 4, 8 e 12 após o início dos medicamentos anti-HIV. A visita durará 90 minutos.

Os participantes que apresentem somente HIV ou tuberculose deverão vir ao centro de estudos mensalmente, conforme cronograma do seu médico, e serão submetidos a coleta de sangue (50 ml), o equivalente a duas colheres de sopa de sangue, duas vezes durante o acompanhamento.

Para os controles, apenas uma visita será necessário e irá durar apenas 30 minutos. A quantidade total de sangue coletada será de 50 ml, o equivalente a duas colheres de sopa de sangue.

O QUE ESTÁ ENVOLVIDO NO ESTUDO?

Se você tem TB, você deverá tomar seus medicamentos de acordo com a orientação do seu médico. Após cada visita, o seu sangue será enviado ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da FIOCRUZ, onde será realizada a análise das células da sua defesa imunológicas inatas. Os resultados destes exames não irão afetar o seu tratamento de tuberculose de forma alguma. Eles serão usados apenas para comparação com os resultados do sangue dos pacientes que tiverem apenas HIV ou somente tuberculose, ou

ainda apenas com os dos controles. Você não precisa estar em jejum para coletar as amostras de sangue.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Existem alguns pequenos riscos de se ter sangue coletado. Estes incluem uma rápida dor a partir da picada da agulha, hematomas, sangramento, tontura e, raramente, infecção onde a agulha entra na veia.

BENEFÍCIOS.

Não há benefícios diretos para você por fazer parte deste estudo. Sua participação nesta pesquisa vai nos ajudar a aprender mais sobre como tratar a infecção tuberculosa latente com segurança.

CONFIDENCIALIDADE.

Iremos verificar seus registros médicos para obter informações para o estudo. Nós não usaremos o seu nome em qualquer documento relacionado ao estudo. Seu nome não será enviado para o centro de dados do estudo. Agência francesa de pesquisa (ANRS) e os monitores do estudo nos centros realizadores da pesquisa também podem verificar seus registros. Entretanto, manteremos todas as informações de seus registros médicos confidenciais.

CUSTOS E PAGAMENTO POR SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.

Não há custo para você para estar no estudo. Você não terá que pagar para quaisquer exames que são parte deste estudo. Você será reembolsado dos custos de transporte e receberá um leve café da manhã, após cada visita ao centro.

DIREITO DE RECUSA OU DESISTÊNCIA.

A participação neste estudo é voluntária. Se você preferir não participar, isso não vai alterar seus cuidados médicos regulares. Se você decidir participar do estudo, você poderá desistir a qualquer momento, sem alterar a assistência médica que você recebe. Se uma nova e importante informação surgir e, se isso puder mudar sua decisão de participar do estudo, por favor, nos avise.

TRATAMENTO ALTERNATIVO.

Se você optar por não participar deste estudo, você ainda receberá tratamento para a TB como parte da rotina padrão de cuidados para pacientes em tratamento de tuberculose, de acordo com as diretrizes brasileiras para tratamento da tuberculose.

Armazenamento das Amostras:

Você será solicitado a dar sua permissão para que algumas amostras que o médico ou enfermeiro coletarem sejam armazenadas no laboratório de AIDS e Imunologia molecular/Fiocruz/IOC até que todos os dados e resultados do estudo tenham sido publicados. O seu nome não será colocado nessas amostras, somente um número especial do estudo. Os responsáveis pelo laboratório não saberão o seu nome.

Por que o armazenamento é necessário?

Os pesquisadores podem obter muitas informações a partir de um estudo, mas no decorrer do estudo, os exames utilizados podem ser aprimorados e novos exames são desenvolvidos e, com isso, torna-se possível obter mais informações com esses exames melhores ou completamente novos. Além disso, pode ser necessário analisar novamente uma amostra de sangue, caso os resultados não estejam satisfatórios e conclusivos. Quando os voluntários de um estudo autorizam que amostras sejam armazenadas em um laboratório e usadas para os pesquisadores realizarem exames e/ou reanálise das suas amostras após a conclusão da sua participação no estudo, os pesquisadores podem obter novas informações importantes. Os seus direitos e a privacidade serão respeitados sempre.

Como a minha privacidade será protegida?

O único registro de que você participou deste estudo encontra-se na clínica, onde é mantido em separado dos registros médicos. O registro está trancado.

O seu nome não será colocado nas amostras no laboratório. As amostras só terão um código especial do estudo. Esse código será o mesmo que consta das suas informações no estudo, coletadas nas entrevistas e nos exames. As informações coletadas durante o estudo poderão ser usadas para outra pesquisa relacionada com o HIV/TB caso haja aprovação pelo Sistema CEP/CONEP do Brasil.

Autorização para armazenar as amostras biológicas no laboratório:

Todos os estudos a serem feitos com as amostras armazenadas no laboratório terão as finalidades específicas com as quais você concordou. Todos os estudos com previsão de uso das amostras deste estudo passarão por uma análise, para assegurar que o projeto corresponde ao mesmo tipo de pesquisa com o qual você concordou. Se o estudo a ser realizado envolver exames diferentes daqueles com os quais você concordou, o comitê determinará se será necessário obter autorização sua para o novo estudo. Comunique à equipe responsável sempre que quiser receber os resultados do estudo.

As pessoas sempre têm o direito de encerrar sua participação em pesquisas. Portanto, se você decidir que não quer que os pesquisadores usem as amostras armazenadas no laboratório, bastará entrar em contato com a equipe da clínica. A equipe informará aos

responsáveis pelo laboratório que as amostras com o código de estudo associado ao seu nome na clínica não devem ser utilizadas. Essas amostras podem ser removidas do laboratório e destruídas se você pedir que isso seja feito.

Por favor, marque um X para indicar se você aceita que suas amostras sejam armazenadas.

Autorização para o uso das amostras armazenadas para os fins estabelecidos na seção anterior.

Eu autorizo o armazenamento

Eu não autorizo o armazenamento

PESSOAS PARA CONTATO.

Se você tiver dúvidas sobre esta pesquisa entre em contato com o pesquisador - Dr. José Henrique Pilotto no Instituto Oswaldo Cruz, pelo telefone 8182-9797 a cobrar, em qualquer horário, de segunda a sexta feira, inclusive finais de semana e feriados. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como sujeito da pesquisa e está participando do estudo no HGNI, entre em contato como Dr. Luís Henrique Claro, coordenador do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Geral de Nova Iguaçu pelo telefone 3779-9999, de segunda a sexta feira, das 08:00 as 17:00h. Se você está participando do estudo no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, ligue para a Dra. Maria Regina Amendoeira coordenadora adjunta do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, no telefone 2561-4815, de segunda a sexta feira, das 08:00 as 17:00h.

