



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**ÉERICA FARIAS DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MARCADORES DA  
ATIVAÇÃO IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS  
PELO HIV-1 COM DIFERENTES NÍVEIS DE  
RESTAURAÇÃO DA IMUNIDADE**

Salvador, BA  
2015

**ÉRICA FARIAS DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MARCADORES DA  
ATIVAÇÃO IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS  
PELO HIV-1 COM DIFERENTES NÍVEIS DE  
RESTAURAÇÃO DA IMUNIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Salvador, BA  
2015

Ficha Catalográfica

Oliveira, Èrica Farias de

Avaliação da frequência de marcadores da ativação imune em pacientes infectados pelo hiv-1 com diferentes níveis de restauração da imunidade/Èrica Farias de Oliveira.- Salvador, 2015.

50f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Dissertação (pós-graduação ) Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia

1. Células T CD4+. 2. Células T CD8+. 3. Citometria de fluxo. 4. HIV.  
5. Marcadores de ativação. I. Alves, Carlos Roberto Brites. II. Universidade Federal da Bahia. III Título.

CDU: 578.828

À minha irmã Edilene Farias de Oliveira, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e por ser a grande lutadora que é.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus, por me permitir trilhar este caminho e por me dar forças no decorrer da jornada.

Aos meus amados pais Edson Alves de Oliveira (*in memoriam*) e Neuza Farias de Oliveira por estarem sempre ao meu lado apoiando qualquer decisão e por todo amor ao longo destes anos.

Aos meus irmãos Edileusa, Edilene, Edson Luís e Elenilda por todo companheirismo e amizade.

A Uildeman Franco por me apoiar, incentivar, e por toda paciência ao longo deste trabalho.

Às minhas amigas Amanda Almeida, Karla Amaral e Luciana de Jesus, pelo incentivo e pela amizade.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Brites, pelo apoio, pela confiança e pelos valiosos ensinamentos a cada dia.

Ao colega Dr. Alex Torres pela grande colaboração ao longo da pesquisa e por todo o tempo dedicado.

Ao Dr. Eduardo Neto pelo grande apoio sempre que solicitado.

Aos colegas Augusto da Hora e Natanael Dantas pelo auxílio com a coleta de material dos pacientes incluídos no estudo.

Aos colegas do LAPI pelo agradável convívio ao longo deste período.

"Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura".

(Carlos Drummond de Andrade)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A expressão de marcadores de ativação, tais como CD38 e HLA-DR, é frequentemente observada na infecção pelo HIV-1 e tem sido proposto como um marcador de progressão da infecção. **OBJETIVO:** Analisar os níveis de ativação celular através das frequências destes marcadores em portadores do HIV-1 e coinfeções virais. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram incluídos 129 pacientes HIV positivos e distribuídos em quatro grupos classificados como, virgem de tratamento (VT), e três diferentes grupos em tratamento e com supressão viral estável, de acordo com o nível de restauração imune: completa (RC,  $CD4 > 500$  e  $r CD4/8 > 1$ ), parcial (RP,  $CD4 > 500$  e  $r < 1$ ) e inadequada (RI,  $CD4 < 500$  e  $r < 1$ ). Indivíduos soronegativos para HIV, HTLV, HBV, HCV e sífilis foram definidos como grupo controle (GC). A frequência de ativação imune celular foi avaliada por citometria de fluxo a partir da expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pelas células TCD4+ e CD8+. Foram realizadas sorologias para CMV e EBV nas amostras de todos os indivíduos, bem como HTLV, HBV, HCV e sífilis nos pacientes infectados pelo HIV-1.

**RESULTADOS:** Os achados demonstraram maior expressão do HLA-DR (17,12%) em comparação ao CD38 (2,02%). Os níveis do HLA-DR foram mais elevados no grupo VT (26,56%) do que no GII (13,01%,  $p = 0,000$ ), no grupo controle (9,92%,  $p = 0,000$ ) e no GI (5,40%,  $p = 0,000$ ). CD38+ esteve aumentado no GII (5,0%), no GC (3,92%) e no GIII (3,14%) comparado ao GI (1,70%,  $p = 0,007$ ,  $p = 0,004$  e  $p = 0,029$  respectivamente). Células T CD8+ mostraram maior ativação por HLA-DR do que as células T CD4+, enquanto que para o CD38 não houve correlação estatisticamente significativa. O resultado mais expressivo das sorologias foi para EBV e CMV, inclusive no GC, seguido por sífilis e HCV nos pacientes. **O CONCLUSÃO:** Nosso trabalho indica que a razão CD4/CD8 pode ser um bom marcador de ativação imune, em associação ao HLA-DR.

**Palavras chave:** Células T CD4+. Células T CD8+. Citometria de fluxo. HIV. Marcadores de ativação.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The expression of activation markers, such as CD38 and HLA-DR, is regularly observed in HIV-1 patients and has been proposed as a marker of progression of the infection. **OBJECTIVE:** Analyze cellular activation levels by measuring the frequencies of these markers among HIV-1 patients. **MATERIAL E METHODS:** Were included 129 HIV positive patients and divided into four groups classified as virgin treatment (VT) and three different treatment groups and with stable viral suppression, according to the level of immune restoration: full (RC, CD4>500 and r CD4/8>1), partial (RP, CD4>500 and r <1) and inadequate (RI, CD4<500 and r<1). Serum negative individuals for HIV, HTLV, HBV, HCV and syphilis were defined as the control group (GC). The frequency of activated immune cells was assessed by flow cytometry and indicted by expression of CD38 + and HLA-DR markers in CD4 + and CD8 + cells. Foram realizadas sorologias para CMV e EBV nas amostras de todos os indivíduos, bem como HTLV, HBV, HCV e sífilis nos pacientes infectados pelo HIV-1. **RESULTS:** Results demonstrate a higher expression frequency of HLA-DR (17,12%) compared to CD38 (2,02 %). HLA-DR levels are significantly higher in VT group (26,56%) than in GII (13,01%), p = 0,000, in the control group (9,92%, p = 0,000) and GI (5,40%, p = 0,000). CD38+ presents an increased B group (5,0%), in the control group (3,92%) and in the group C (3,14%) compared to group A (1,70%, p = 0,007, p = 0,004 and p = 0,029 respectively). CD8 T cells showed greater activation by HLA-DR than CD4 cells, whereas for CD38 revealed no statistically significant correlation. The most significant result was the serology for EBV and CMV infections, including GC, followed by syphilis and HCV in patients. **CONCLUSION:** Our data indicates that the CD4/CD8 ratio may be a good marker of immune activation, in association to marker HLA-DR.

**Keywords:** Activation markers. Flow cytometry. HIV. T CD4+ cells. T CD8+ cells.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Expressão do HLA-DR pelas populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+....	19
Figura 2. Análise das contagens absolutas das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo .....	29
Figura 3. Análise dos marcadores de ativação imunológica expresso pelas populações de linfócitos T CD3+ e T CD4+ por citometria de fluxo.....	30
Figura 4. Distribuição dos valores absolutos da expressão do CD38 pela população CD3+ nos grupos.....	35
Figura 5. Distribuição dos valores absolutos da expressão do CD38 pela população CD4+ nos grupos.....	36
Figura 6. Distribuição dos valores absolutos da expressão do HLA-DR pela população CD3+ nos grupos.....	36
Figura 7. Distribuição dos valores absolutos da expressão do HLA-DR pela população CD4+ nos grupos.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos por grupo.....	32
Tabela 2. Frequência do uso de cigarro e drogas no passado e atualmente, e consumo de álcool, por grupo.....	33
Tabela 3. Medianas (interquartil) referentes à contagem dos linfócitos T CD3+.....	34
Tabela 4. Medianas (interquartil) referentes ao percentual da expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pelos linfócitos T CD3+, CD4+ e pelos leucócitos totais.....	34
Tabela 5. Valores referentes à expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pelos linfócitos T CD8+.....	35
Tabela 6. Percentual das coinfeções por grupo.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HTLV	Vírus Linfotrópico Humano
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
CMV	Citomegalovírus
EBV	Epstein Barr Vírus
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano (DR)
CD38	Cluster of Differentiation ou Grupo de Diferenciação
TARV	Terapia Antirretroviral
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
CV	Carga Viral
NK	Natural Killer
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
MHC-I	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IFN- $\alpha$	Interferon tipo I alfa
IFN- $\gamma$	Interferon tipo II gama
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral tipo alfa
AZT	Zidovudina
TT	Toxóide Tetânico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
PerCP	Complexo Ativado de Proteína Clorofil Peridina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
PE	Ficoeritrina
PeCy5	Estreptavidina
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgar Santos
CEDAP	Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa
GC	Grupo Controle
VT	Virgem de Tratamento
RC	Restauração Imune Completa (CD4+>500, R>1)
GP	Restauração Imune Parcial (CD4+>500, R<1)
GI	Restauração Imune Inadequada (CD4+<500, R<1)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	13
2.1. Vírus da Imunodeficiência Humana	13
2.2. Números do Brasil e no Mundo	14
2.3. Resposta Imune Celular	15
2.4. Marcadores de Ativação Celular	18
2.5. Tratamento	20
2.6. Infecções Oportunistas	22
2.6.1. Citomegalovírus	23
2.6.2. Epstein Barr Vírus	24
2.7. Justificativa	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
4.1. Seleção das Amostras	27
4.2. Estratificação das Amostras	27
4.3. Coleta e Tratamento das Amostras	28
4.4. Sorologias	28
4.5. Citometria de Fluxo	28
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	31
<b>6. RESULTADOS</b>	32
6.1. Características Gerais dos Indivíduos	32
6.2. Identificação das Populações Celulares e dos Marcadores de Ativação por Citometria de Fluxo	33
6.3. Contagem de Células e Expressão dos Marcadores de Ativação pelas Populações de Linfócitos em Cada Grupo	34
6.4. Avaliação da interferência do uso de drogas/cigarro no passado, atualmente, e consumo de bebida alcoólica na carga viral, número de células e ativação celular	38
6.5. Avaliação da Interferência do tempo de diagnóstico na carga viral, Número de Células e Ativação celular	38
6.6. Avaliação das coinfeções	38
<b>7. DISCUSSÃO</b>	39
<b>8. CONCLUSÃO</b>	44
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	45

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1983, um retrovírus (depois nomeado de vírus da imunodeficiência humana ou HIV) foi isolado de um paciente com AIDS. Vinte e cinco anos após o primeiro caso relatado, mais de 65 milhões de pessoas tem sido infectadas com HIV, e mais de 25 milhões tem morrido de AIDS. Em todo o mundo, mais de 40% das novas infecções entre adultos são em jovens de 15 a 24 anos. Dados apontam que 95% destas infecções e mortes tem ocorrido em países em desenvolvimento.<sup>1</sup>

A introdução da terapia antirretroviral revolucionou o tratamento e o gerenciamento de pacientes com infecção pelo HIV.<sup>2</sup> A notável redução da taxa de morte para HIV/AIDS mediada pela supressão da replicação do HIV, com melhora na contagem de células T CD4+ e proteção ao sistema imune, foi possível após a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), que inclui a combinação de três ou mais medicações a partir de pelo menos, duas classes diferentes de drogas<sup>3</sup> e que se mostrou muito mais eficaz que monoterapia ou dupla terapia.<sup>4</sup>

A infecção pelo HIV é caracterizada por ativação imune crônica e depleção das células T CD4+, levando à disfunção do sistema imunológico. Ativação imune é a maior causa da patogênese da doença HIV e isto se reflete no aumento da expressão de marcadores de ativação de superfície, como HLA-DR e CD-38. A importância desta ativação em pacientes com infecção HIV é observada pelo aumento da expressão de CD38 nas células T CD4+ e CD8+ e tem sido melhor correlacionado com a progressão da doença do que a contagem de células CD4+ ou carga viral.<sup>5</sup> A maioria dos pacientes com a contagem de células T CD4+ restaurada ao valor normal continuam apresentando elevados níveis de ativação das células T, evidenciado pela proporção destas células expressando CD38 e HLA-DR.<sup>6</sup>

Em pacientes infectados pelo HIV, a carga viral aumenta consistentemente quando o sistema imunológico do portador do vírus é ativado por estímulos exógenos como as infecções oportunistas.<sup>7</sup> Pacientes imunodeprimidos, como resultado da infecção pelo HIV, podem ser infectados por vários agentes oportunistas que causam doença própria ou potencialmente aceleram a progressão da doença pelo HIV.<sup>8</sup> Os herpesvírus humanos são patógenos amplamente distribuídos que causam doenças benignas e malignas. Evidência sorológica desta infecção é encontrada na maioria da população em todo o mundo, ocorrendo a disseminação pelo contato com secreções infectadas.<sup>9</sup> Infecções primárias, geralmente adquiridas com pouca idade, levam a uma infecção latente ao longo da vida, com a reativação intermitente, resultando em doença assintomática. O funcionamento adequado do sistema imune do hospedeiro é essencial para resolver infecções líticas e inibir reativação de latência em pessoas imunocompetentes. A reativação destes patógenos é muito mais frequente entre indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do HIV,<sup>10</sup> e a infecção pelo HIV está associada com aumentado risco de infecção por herpes viroses e suas doenças relacionadas.<sup>9</sup>

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vírus da Imunodeficiência Humana

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pertence à família retroviridae, subfamília lentiviridae e gênero lentivirus. Vírions maduros do HIV possuem morfologia esférica de 100-120 nm de diâmetro e são constituídos de uma membrana bicamada lipídica que cerca um núcleo denso, em forma de cone truncado, que contém as moléculas do RNA genômico, protease, transcriptase reversa, integrase, Vpu, Vif, Vpr e Nef, e alguns fatores celulares. O genoma do HIV-1 é composto por duas moléculas idênticas de RNA fita simples de 9,2 kb, enquanto que a forma persistente do genoma do vírus é o DNA proviral de cadeia dupla no interior das células infectadas.<sup>11</sup>

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, devido à sua dependência de fatores da célula hospedeira para completar seu ciclo de vida. O HIV-1 não é uma exceção, uma vez que se baseia exclusivamente na maquinaria celular para expressar os componentes necessários para a montagem do vírus da progênie. Além disso, o HIV-1 é altamente dependente de fatores celulares para a sua liberação definitiva a partir de células produtoras de novas partículas virais.<sup>12</sup> O alvo do HIV-1 especificamente é o sistema imunológico humano, infectando primariamente células T CD4+, macrófagos e células dendríticas. A infecção destrói células CD4+ por vários mecanismos, levando a um enfraquecimento geral do sistema imune, ao início de infecções oportunistas e, por último, à morte.<sup>13</sup>

A entrada do HIV-1 numa célula-alvo ocorre por meio da glicoproteína gp120 do envelope viral que interage com um conjunto de moléculas da superfície celular, que incluem o receptor principal, CD4, e um receptor de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4), que atua como um co receptor, estando ambos presentes como homodímeros e heterodímeros na membrana plasmática.<sup>14</sup> O receptor CCR5 é de maior importância na patogênese da doença, e o uso deste receptor por cepas de HIV-1 primárias, parece ser crucial para o estabelecimento de uma infecção persistente.<sup>15</sup>

Eventos imediatos se iniciam quando o HIV-1 se liga ao receptor e co receptor da célula-alvo. Em seguida, as membranas viral e celular se fundem e o núcleo do vírus entra no citoplasma celular, onde a enzima viral transcriptase reversa transcreve o RNA em DNA de cadeia dupla, que transita para o núcleo, onde a integrase viral catalisa a integração da cópia do DNA ao cromossomo do hospedeiro para gerar o provírus integrado. Durante os eventos tardios subsequentes, a RNA polimerase II da célula hospedeira transcreve o DNA proviral de volta para RNA viral. O RNA viral é então transportado para o citoplasma e traduzido em vários precursores poliprotéicos estruturais (Gag, Gag-Pol e Env) e em várias proteínas acessórias e de regulação. Um subgrupo destas proteínas virais é responsável pelo tráfego até a membrana onde é

montado uma nova partícula viral. Durante a liberação das partículas ocorre um processo de maturação, no qual a protease viral cliva as poliproteínas precursoras Gag e GagPol em proteínas maduras, que conduzem à formação do núcleo maduro. A maturação do vírus é essencial para a infectividade da partícula.<sup>11,13</sup>

A formação destas partículas maduras infecciosas do HIV-1 ocorre em duas etapas: brotamento da partícula imatura não infecciosa e maturação do vírus infeccioso. A formação da partícula requer o transporte da poliproteína viral Gag para a membrana plasmática, onde se associa com outros componentes virais e celulares para produzir uma estrutura de brotamento. Os vírions são liberados a partir da superfície da célula, como imaturos, portanto, partículas não infecciosas, contendo uma camada esférica da poliproteína Gag debaixo da membrana viral. A ação da protease viral nestas poliproteínas inicia a maturação do vírus concomitante ou após o brotamento. A clivagem proteolítica em locais definidos, numa ordem definida, leva à formação de proteínas da matriz (MA), do capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC), p6 e dois peptídeos menores. Processamento proteolítico não é necessário para a formação das partículas ou brotamento; é necessário para condensação destas partículas imaturas, para o amadurecimento da Gag, gerando o core viral em forma de cone, essencial para a infectividade do HIV-1. Prevenção da clivagem e da maturação utilizando inibidores específicos da protease viral é um dos pilares do esquema terapêutico atual para pacientes com AIDS.<sup>16</sup>

## 2.2. Números no Brasil e no Mundo

Esforços nacionais e comunitários para deter a epidemia pelo HIV estão se propagando em todo o mundo. Uma quantidade menor de pessoas tem sido infectada pelo vírus, assim como um menor número de indivíduos está morrendo de doenças relacionadas à AIDS, e um número bem maior de pessoas estão fazendo uso do tratamento antirretroviral. No entanto, o progresso ainda é irregular e, em alguns lugares, muito lento. Na maioria dos países, alguns comportamentos de alto risco estão impulsionando a epidemia pelo HIV: sexo desprotegido e a partilha de agulhas contaminadas. Mundialmente, profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens tem probabilidade 13 vezes maior de estar vivendo com HIV, enquanto pessoas que usam drogas injetáveis são 22 vezes mais propensas a viverem com o vírus, em comparação com outras pessoas.<sup>17</sup>

Algumas intervenções, como profilaxia e início da TARV independente da contagem de células T CD4+, tem contribuído para reduções significativas no número de infecção pelo HIV em adultos e crianças, de 2,5 milhões em 2009 para 2,1 milhões em 2013.<sup>18</sup>

Em 2012 houve 2,3 milhões de novas infecções pelo HIV em todo o mundo, o que representa um declínio de 33% com relação ao número de novas infecções em 2001, que era de 3,4 (3,1-3,7) milhões. Ao mesmo tempo, o número de mortes por AIDS também tem declinado, de 1,6 (1,4-1,9) milhão de casos em 2012, para 2,3 (2,1-2,6)

milhões em 2005.<sup>19</sup> Globalmente, em 2013, houveram 1,8 milhões de novas infecções por HIV, 29,2 milhões de casos prevalentes e 1,3 milhões de mortes ocasionadas pelo vírus. Através de intervenções, como a TARV, 19,1 milhões de vidas tem sido salvas, 70,3% em países em desenvolvimento.<sup>20</sup> O número anual de novas infecções pelo HIV em adultos e adolescentes diminuiu cerca de 50% em 26 países entre 2001 e 2012.<sup>19</sup>

Em 2012 foram notificados 39.185 casos de AIDS no Brasil. Este número vem se mantendo estável nos últimos 5 anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, com 30,9/100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro Oeste (19,5) e Região Nordeste (14,8). Neste mesmo ano foram declarados 11.896 óbitos por AIDS no Brasil, o que corresponde a um coeficiente de mortalidade de 5,5 por 100.000 habitantes. Os coeficientes por região foram de 7,7 na Região Sul, seguido de 5,6 no Norte e Sudeste, 4,7 no Centro Oeste e 4,0 no Nordeste. Nos últimos 10 anos observou-se uma redução de 14% na taxa de mortalidade no Brasil.<sup>21</sup>

### 2.3. Resposta Imune Celular ao HIV-1

Muitos vírus desenvolveram mecanismos para estabelecer a persistência no hospedeiro. Normalmente, o foco envolve reservatórios virais, sítios celulares ou anatômicos em que o vírus pode persistir apesar das respostas imunes antivirais. Alguns vírus estabelecem um estado reversível não produtivo, ou latente, de infecção, que permite escapar dos mecanismos imunológicos.<sup>22</sup>

O vírus da imunodeficiência humana persiste nos indivíduos infectados apesar da resposta do sistema imunológico.<sup>23</sup> Clinicamente, a infecção pode ser dividida em três fases. Durante a primeira fase, conhecida como infecção primária, o vírus replica rapidamente no hospedeiro, com a viremia se desenvolvendo nas primeiras semanas de exposição, levando a um grande número de células infectadas na circulação e carga viral (CV) muito elevada, o que é parcialmente controlado pelos linfócitos T CD8+. Respostas de anticorpo são desenvolvidas logo em seguida e dentro de algumas semanas o nível de vírus no sangue diminui, o que coincide com o desenvolvimento de uma resposta imune contra o vírus. A viremia no entanto não é reduzida a zero, ela cai para uma marca típica de  $10^4$  a  $10^5$  cópias/mL de plasma. Estudos demonstram a importância das células T CD8+ no controle da infecção primária. Os efeitos combinados de CTL e outros elementos da resposta imunológica levam a uma diminuição da CV, embora a eliminação dos focos virais nunca seja atingida. Este nível é mantido durante um período assintomático prolongado, o que caracteriza a segunda fase da infecção. Nesta fase, ocorre a replicação viral nos tecidos linfoides periféricos e a perda gradual de linfócitos T CD4+, levando eventualmente a um colapso da resposta imune contra o vírus e outros patógenos, e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da AIDS, que culmina na terceira e última fase da infecção. Embora a fase assintomática possa representar um período de latência clínica, o vírus replica continuamente durante

este tempo, podendo ser detectado na circulação, embora em níveis mais baixos do que os observados na primeira ou na última fase. A fase final da infecção é caracterizada, portanto, pelo surgimento da imunodeficiência clínica.<sup>22,23</sup>

Um ano ou dois antes do desenvolvimento da AIDS, muitas vezes há um declínio mais rápido dos linfócitos T CD4+. Esta diminuição pode ser precedida por um aumento da CV, com a replicação ocorrendo além do tecido linfoide. Em alguns casos, a progressão da doença está associada com a evolução de espécies virais mais patogênicas que utilizam o receptor de quimiocinas CXCR4 ao invés do CCR5. À medida que a contagem das células T CD4+ cai abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> de sangue, infecções oportunistas começam a ocorrer. O grau de declínio das células T CD4+ é um excelente preditor do risco de infecções específicas, proporcionando forte apoio à noção de que a perda destas células é a causa central da imunodeficiência nesta doença.<sup>22</sup>

Tanto as células T CD4+ quanto as CD8+ são mais ativadas na infecção aguda e crônica pelo HIV, e portanto, proliferam rapidamente e tem uma meia vida curta. Isso explica porque ambos os índices de produção e morte destas células são aumentados ao longo da infecção.<sup>24</sup>

Apesar da presença de imunodeficiência, virtualmente todos os componentes celulares do sistema imune, linfócitos B, células NK, linfócitos T e macrófagos, mostram evidência de ativação imune. Elevada proliferação de células T CD4+ e CD8+ pode ser observada *in vitro* e *in vivo*. Elevados níveis de citocinas pró inflamatórias incluindo IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 estão também presentes em pacientes com infecção pelo HIV, mas não está claro se isto é, direta ou indiretamente, parte da resposta do hospedeiro ao HIV.<sup>5</sup>

Há também anormalidades funcionais nos linfócitos T CD4+, incluindo um defeito no início da resposta anti HIV-1. No entanto, os defeitos das células T CD4+ não impedem o surgimento de vigorosa e sustentada resposta de células B e T CD8+ ao HIV.<sup>23</sup>

Vários fatores são conhecidos por influenciar a replicação viral e definir o “set point” viral durante a infecção aguda. Aptidão do vírus, genética e resposta imune do hospedeiro são alguns dos fatores que modulam a infecção aguda. Os anticorpos neutralizantes contra o HIV-1 são vistos em menor escala durante a infecção pelo HIV, mas estudos recentes sugerem um papel definitivo da resposta imune celular específica para o HIV no controle da replicação viral durante esta fase da infecção. Há também uma evidência substancial que mostra uma expansão massiva das células T CD8+, durante esta fase, que coincide com o declínio inicial da viremia plasmática. Estas células citotóxicas HIV específicas, tem o potencial para eliminar células infectadas diretamente via MHC-I restrita a citólise ou por um mecanismo não citotóxico através da secreção de fatores solúveis (citocinas). Assim, a relevância biológica da resposta imune de células T CD8+ é evidente a partir de estudos em humanos e primatas em infecção aguda pelo HIV/SIV.<sup>25</sup>

A falta de controle imunológico que caracteriza a infecção pelo HIV-1 tem sido associada a um defeito na resposta das células T auxiliares específicas ao vírus, necessária para manter uma função de linfócito T citotóxico eficaz durante a fase de infecção crônica. Embora muitos estudos tenham detectado a presença de IFN- $\gamma$  secretado pelas células T CD4+ específicas ao HIV, estas células não são completamente funcionais, e as respostas proliferativas de linfócitos específicos ao vírus são geralmente fracas ou ausentes em todos os estágios da doença,<sup>26</sup> sendo um indicativo de infecção progressiva, subsequentemente mostrando ser largamente causada pela perda de funções, em particular com defeito na secreção de IL-2 e supressão não física. Respostas de células T CD4+ específicas ao HIV são detectadas na grande maioria dos indivíduos infectados, mas a sua magnitude é normalmente baixa e várias vezes menor do que a magnitude da resposta de linfócitos T CD8+ nos mesmos indivíduos.<sup>27</sup>

A taxa de declínio das células T CD4+ parece ser determinada pelo nível de replicação viral em curso, onde pacientes com CV mais elevada progridem para AIDS mais rapidamente. Os mecanismos subjacentes à depleção de CD4+ não são completamente compreendidos, mas provavelmente incluem um aumento da taxa de destruição destas células na periferia e uma diminuição na produção de células T do timo,<sup>22</sup> uma vez que as células pluripotentes hematopoéticas com o passar do tempo, tem a habilidade prejudicada, o que pode afetar sua capacidade proliferativa. Como resultado destas alterações, a linfopose de células B e T é diminuída.<sup>28</sup>

A progressiva perda de células T CD4+ em indivíduos infectados pelo HIV está na raiz da AIDS. Apesar de mais de três décadas de estudo, o exato mecanismo subjacente à morte das células T CD4+ durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana ainda é pouco compreendida e tem sido apontada como uma das questões chave na pesquisa do HIV. Em quase todos os casos a perda destas células tem sido associada a apoptose em estudos *in vivo* e *ex vivo*. A resposta celular ao vírus é associada com produção de interferon tipo I e ativação das caspases 1 e 3. A ativação da caspase 3 leva a apoptose sem inflamação, enquanto a ativação da caspase 1 pode desencadear piroptose, uma forma altamente inflamatória da morte celular programada que leva à liberação do conteúdo citoplasmático, incluindo citocinas inflamatórias, no espaço extracelular.<sup>29</sup>

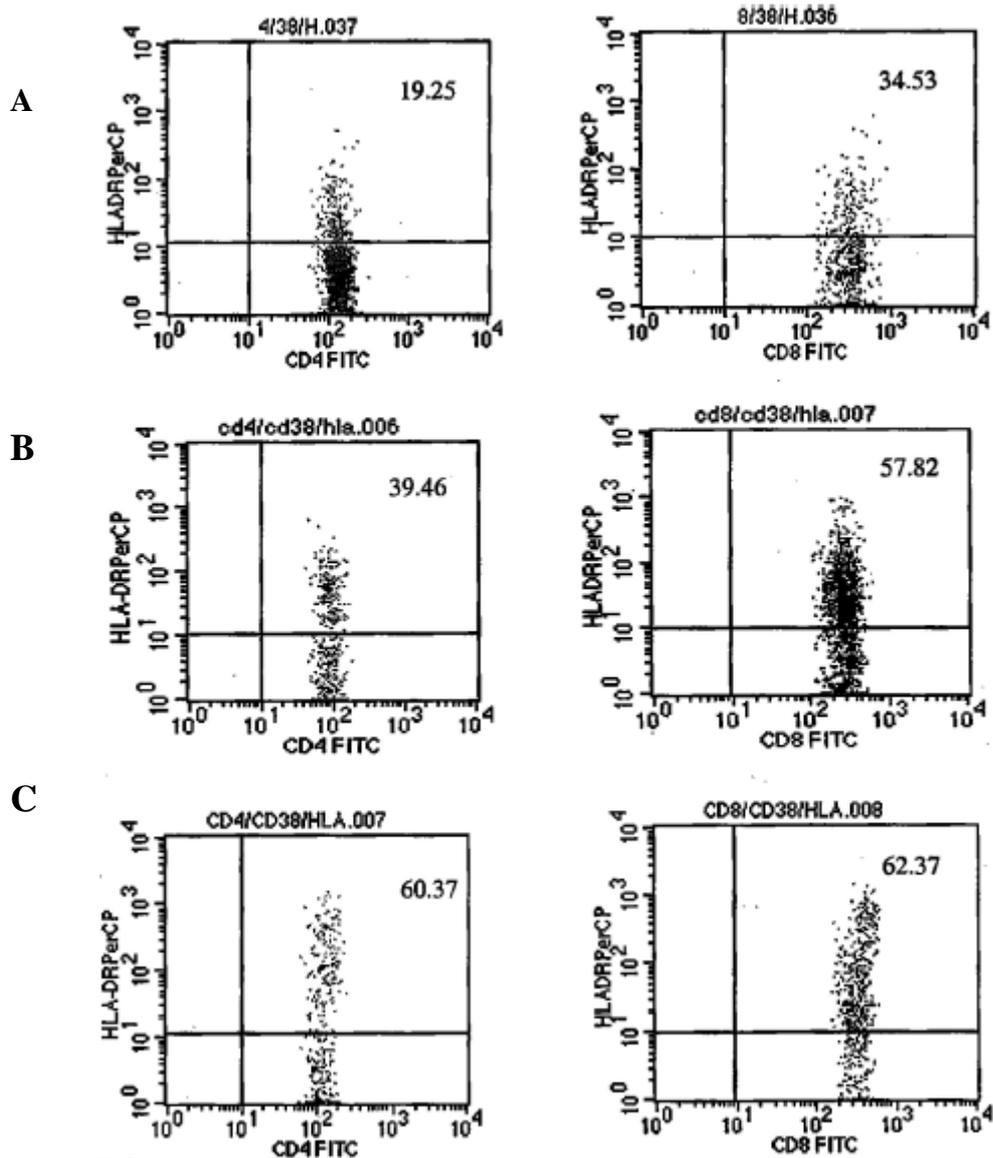
A descoberta de que o HIV tem preferência pelas células CD4+ e é citopático para estas, estabelece a hipótese de que o vírus provoca deficiência imune por matar diretamente esta população impedindo a renovação de células T. Os mecanismos moleculares envolvidos na morte das células T CD4+ tem sido amplamente estudados, levando a novos conhecimentos sobre os efeitos a jusante da infecção abortiva e integração viral na morte celular. No entanto, as taxas de apoptose aumentaram em indivíduos infectados pelo HIV, não estando apenas restrito às células CD4+ infectadas, mas também sendo observadas nos linfócitos T CD4+ não infectados e em outros tipos celulares que ainda não são alvo para a infecção, sugerindo que os efeitos citopáticos do HIV ainda não estão completamente elucidados.<sup>24</sup>

#### 2.4. Marcadores de Ativação Celular

Ativação imunológica crônica é uma característica da infecção pelo HIV-1 que contribui para a perda das células T CD4+ e progressão da doença para AIDS e morte<sup>30</sup> sendo a ativação das células T CD8+ a maior causa da patologia pelo vírus.<sup>31</sup> A ativação imune persistente é caracterizada por elevados níveis de citocinas e quimiocinas no soro, desregulação das células B, interferência com o equilíbrio das células T, ativação de linfócitos, refletida pela expressão de marcadores tais como CD38 e HLA-DR, e aumento da apoptose. Notavelmente, níveis de ativação das células T CD4+ e CD8+ são fortes preditores da progressão da doença e controle viral, entretanto as causas desta ativação não são completamente entendidas.<sup>30</sup>

Linfócitos T CD4+ são mais suscetíveis à infecção pelo HIV quando estão ativados do que em estado de repouso, e tanto a entrada do HIV quanto a fusão requerem ativação das células T. Evidências, *in vitro* e *in vivo*, mostram que hiperativação do sistema imune tem um papel central em promover a progressão da infecção pelo HIV.<sup>7,32</sup> Ativação dos linfócitos T pode ser avaliada pelo estudo de moléculas de superfície e, HLA-DR e CD38 são dois bem conhecidos antígenos cuja expressão é positivamente regulada nestas células ativadas.<sup>7</sup> A expressão de HLA-DR e CD38 aumenta dramaticamente nas células CD8+ com a progressão da doença.<sup>33</sup> Vários estudos tem mostrado que elevada expressão de CD38 é um forte marcador prognóstico em pacientes HIV que prediz a progressão da doença independente da CV no plasma e da contagem de células T CD4+ no sangue periférico. Além disso, a expressão de CD38 correlacionada com a progressão da doença, também prevê um declínio ainda maior das células T CD4+.<sup>34</sup>

O declínio de células T CD4+ na infecção pelo HIV é fortemente associado com o aumento dos níveis dos marcadores de ativação na população T CD4+. Um consistente aumento da ativação das células T CD8+ também foi encontrado em pacientes infectados causado por estímulo viral crônico, que poderia levar à exaustão funcional destas células, conforme mostra a figura 1.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Expressão do HLA-DR pelas populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+. (A) paciente controle, (B) paciente infectado pelo HIV-1 com CD4 395/ $\mu$ L, (C) paciente com AIDS com CD4 47/ $\mu$ L. Os linfócitos foram identificados por gate em dispersão frontal e lateral, em seguida células T CD4+ e CD8+ foram marcadas. A expressão do HLA-DR está indicada no quadrante.

**Fonte:** Activation and coreceptor expression of T lymphocytes in HIV/AIDS patients of China. Shang H, Zhang Z, Jiang Y et al. *J Clin Immunol* 2005; 25:68-72.

O início da terapia antirretroviral leva a uma diminuição dramática dos marcadores de ativação imune em pacientes infectados pelo HIV, e a persistência da expressão destes marcadores está associada com uma falha na terapia.<sup>34</sup> Entretanto, os regimes antirretrovirais tem limitações em termos de eficácia imunológica. A maioria dos pacientes que tem a contagem do número absoluto de células T CD4+ restaurada,

continua a apresentar elevados níveis de ativação dos linfócitos T. Esta persistente ativação do sistema imunológico durante a terapia tem, provavelmente, significado clínico, assim como ocorre nos pacientes não tratados.<sup>6</sup> Estudos recentes tem sugerido que a regulação positiva persistente destas moléculas em pacientes tratados pode ser utilizada como marcador de replicação viral residual, e estes resultados, em conjunto, apontam para a necessidade de monitoramento destes marcadores em pacientes em uso de TARV.<sup>34</sup>

Marcadores solúveis de ativação imune têm sido associados com elevado risco de morte e doença cardiovascular neste cenário. Ativação crônica tem sido também associada com aumentado risco de desenvolver doença autoimune e câncer na população não infectada pelo HIV. As razões pelas quais o sistema imune permanece em ativação persistente, mesmo em face de terapia antirretroviral efetiva, não estão claras. Causas potenciais incluem 1) replicação viral persistente, 2) replicação sistêmica persistente de coinfeção viral como herpes ou hepatite, 3) translocação microbiana persistente e/ou desregulação das células T e B.<sup>6</sup>

Muitos estudos tem mostrado que os níveis virais aumentam consistentemente quando o sistema imunológico do indivíduo infectado é ativado por estímulos exógenos, como infecções oportunistas.<sup>7</sup> Estes resultados corroboram o trabalho de Smith e colaboradores,<sup>30</sup> no qual dados mostram que infecções persistentes por herpesvírus contribuem substancialmente para ativação crônica em indivíduos infectados pelo HIV.

A viremia residual é outro fator que leva à ativação imune persistente em pacientes HIV tratados, como resultado de uma persistente replicação viral de baixo nível. Vários estudos tem demonstrado que baixos níveis de HIV no plasma podem ser detectados na maioria dos pacientes infectados com sucesso no tratamento. Os resultados destes estudos indicam que o nível desta viremia permanece estável por pelo menos sete anos.<sup>6</sup>

## 2.5. Tratamento

A introdução da terapia antirretroviral revolucionou o tratamento e o gerenciamento de pacientes com infecção pelo HIV. Novos medicamentos foram aprovados, incluindo aqueles que oferecem novos mecanismos de ação, melhorias na potência e atividade contra o vírus multi resistente, e um perfil de segurança favorável. Esquemas simplificados tem sido introduzidos nos últimos anos, proporcionando uma carga de comprimidos e dosagem de menor frequência. Esta avaliação incide sobre questões relevantes para o clínico, incluindo quando iniciar a terapia, a escolha das drogas e indicações para mudar o regime inicial.<sup>35</sup>

O primeiro medicamento para HIV/AIDS, zidovudina (mais comumente conhecido como AZT) foi aprovado em 1987, cerca de 6 anos depois do primeiro caso relatado de AIDS e 4 anos após a identificação do agente infeccioso como o HIV. A rápida aprovação do AZT e terapias subsequentes resultou de pesquisa fundamental da

combinação de vantagens regulatórias, redirecionamento das drogas e colaborações construtivas de grupos de estudo HIV/AIDS. Cada um desses fatores desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento de novas drogas.<sup>36</sup>

O caminho para o tratamento moderno contra o HIV-1 teve início há aproximadamente 25 anos atrás, e, atualmente, as terapias disponíveis tem comprovadamente reduzido a morbidade e mortalidade da AIDS. Esta redução notável na taxa de mortalidade foi mediada pela supressão da replicação do vírus, pelas melhorias que se seguiram na contagem das células T CD4+ e proteção substancial do sistema imunológico, possível graças a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), que tipicamente inclui uma combinação de três ou mais medicamentos antirretrovirais de pelo menos duas classes de drogas diferentes.<sup>37</sup> Porém, embora ganhos consideráveis tenham sido feitos na gestão da doença, a cura e vacina permanecem elusivas, e ainda há um grande potencial de terapias para mitigar doenças secundárias e avançar na qualidade de vida do paciente.<sup>36</sup>

A terapia transformou a infecção pelo HIV-1 a partir de uma sentença de morte em uma doença crônica controlável. A otimização gradual da HAART limitou os efeitos colaterais e melhorou a aderência, mas as altas taxas de replicação viral retornam se o tratamento é interrompido. Apesar da supressão da replicação viral ao longo da vida ser possível em pacientes aderentes, os problemas de acesso, custo, efeitos colaterais e o perigo de resistência à terapia, reforçam a necessidade de se encontrar a cura para a infecção. Uma das barreiras à cura é a existência de reservatórios latentes de longa duração para o HIV-1, que permitem a persistência viral apesar do tratamento. O progresso em delinear os mecanismos que contribuem para a latência do vírus, e o desenvolvimento de modelos *in vitro* e modelo animal, tem permitido o desenvolvimento e testes de terapias em que o alvo é o reservatório latente.<sup>38</sup>

Uma série de diferentes drogas que tem como alvo quatro etapas distintas do ciclo de replicação do HIV-1 são atualmente aprovadas para administração em indivíduos HIV positivos. Inibidores da transcriptase reversa nucleotídeo (NRTI) e inibidores da transcriptase reversa não nucleotídeo (NNRTI) são alvos da etapa de transcrição reversa, que converte o RNA genômico viral em DNA de cadeia dupla linear, enquanto que os inibidores de protease (PI) inibem a atividade da enzima protease que é crítica para a maturação de partículas virais que brotam das células infectadas. Dois inibidores diferentes podem bloquear a entrada do vírus em novas células alvo, anulando a interação entre a gp120 viral e o co receptor CCR5 ou anulando a disponibilidade da gp41 que impulsiona a fusão entre as membranas celular e viral. Os inibidores de transferência de cadeia da integrase (INSTI), bloqueiam a atividade da integrase que é necessária para inserir o DNA viral no cromossomo da célula hospedeira. A HAART prescreve um NRTI, NNRTI e PI como comprimido único ou em várias combinações. A abordagem combinatória das drogas para o tratamento suprime significativamente a probabilidade de seleção de cepas resistentes do HIV-1 que surgem rapidamente durante a monoterapia.<sup>39</sup>

Apesar do sucesso da terapia antirretroviral combinada na história natural da infecção pelo HIV, a terapia tem falhado em sua tentativa de restaurar completamente a saúde do indivíduo. A maioria dos pacientes virgens de tratamento mostra uma relação invertida CD4/CD8. Na população em geral, este achado é considerado um marcador de imunossenescência. Na infecção por HIV não tratada, a relação de CD4/CD8 tem sido investigada como um preditor de mau prognóstico, e tem sido utilizada para prever a restauração da função imunológica, e a ocorrência de comorbidades associadas ou não à AIDS. No entanto, depois de vários anos de tratamento, alguns pacientes ainda mostram uma relação invertida, apesar da normalização na contagem dos linfócitos T CD4+. O significado clínico e biológico desta constatação permanecem desconhecidos.<sup>40</sup>

A importância da contagem das células T CD4+ como um forte preditor de infecções oportunistas tem sido amplamente investigada, mas pouca atenção tem sido dada à significância da contagem das células T CD8+. Durante a infecção por HIV, antes do tratamento, a contagem de T CD8+ aumenta e T CD4+ diminui. Durante a supressão viral alguns indivíduos elevam a contagem de T CD4+ simultaneamente ao declínio dos linfócitos T CD8+ levando à normalização da relação CD4/CD8. Outros indivíduos, entretanto, mantêm altos níveis de células T CD8+ na circulação e persistentemente uma baixa razão CD4/CD8. Nestes pacientes tratados a razão parece correlacionar-se com marcadores de ativação das células T e senescência.<sup>41</sup>

Os dados encontrados por Serrano-Villar *et al*<sup>40</sup> sugerem que a razão CD4/CD8 em indivíduos infectados pelo HIV e em TARV efetiva, poderia ser um marcador substituto de ativação imune e possivelmente de imunossenescência. A relação CD4/CD8 merece mais atenção pois pode ajudar a identificar indivíduos com ativação imune em curso apesar de um longo tempo de supressão viral.

## 2.6. Infecções Oportunistas

Como já avaliado anteriormente, a HAART trouxe melhorias e qualidade de vida para o paciente HIV positivo, mas nem todos os pacientes em uso de terapia são capazes de restabelecer o número de células T CD4+. Por outro lado, a recuperação da contagem dos linfócitos T CD4+ de pacientes em tratamento, não significa restauração das funções imunes. Estudos tem descrito dano funcional tanto na resposta imune inata quanto na adquirida apesar de tratamento efetivo.<sup>42</sup>

Pacientes imunodeprimidos, devido a infecção pelo HIV, podem ser infectados por diversos agentes oportunistas que causam diversas doenças ou aceleram a progressão da doença pelo HIV,<sup>8</sup> e exemplos clássicos destes agentes oportunistas que estabelecem infecções persistentes em humanos, são os herpesvírus.<sup>43</sup> Infecções primárias por estes patógenos levam a uma infecção latente ao longo da vida com reativação intermitente, resultando em doença assintomática em imunocompetentes. O sistema imune do hospedeiro é essencial para resolver infecções líticas e inibir reativação de latência.

Consequentemente a reativação das herpesvíroses é muito mais frequente em pacientes infectados pelo HIV-1 com um risco aumentado de desenvolver doenças relacionadas.<sup>10</sup>

Dos herpesvírus, o EBV e o CMV, infectam cerca de 90% da população.<sup>43</sup> Neste contexto, associação entre a detecção de infecção por CMV no sangue e um aumento do risco de doença causada pelo vírus é bem estabelecido,<sup>8</sup> sendo a doença mais comum, e uma séria infecção oportunista em pacientes com AIDS.<sup>44</sup>

### 2.6.1. CMV

Citomegalovírus é um membro da família dos herpesvírus humano, de DNA 230 kb de dupla fita, que pode residir no hospedeiro por toda vida. Os reservatórios celulares são leucócitos, células epiteliais, glândulas salivares e colo do útero, podendo ser encontrado em fluidos corporais de pessoas infectadas, e detectado na urina, saliva, sangue, lágrima, sêmen e leite materno. Resultados sugerem que PBMC são também reservatório viral, sendo os monócitos as células predominantemente infectadas.<sup>45</sup>

CMV é um patógeno ubíquo que geralmente causa infecção assintomática ou levemente sintomática em hospedeiros imunocompetentes. Em contraste, infecção por CMV em pacientes imunocomprometidos leva a alta morbidade e mortalidade.<sup>46</sup> É um patógeno bem conhecido na população em geral, que após a infecção primária, assim como outros herpesvírus, permanece latente no hospedeiro e pode ser reativado posteriormente,<sup>47</sup> mas é controlado por imunidade celular efetiva em indivíduos saudáveis.<sup>48</sup> Em contraste, doença significativa, seja por ativação primária ou por reativação, é tipicamente vista em indivíduos imunocomprometidos seja por quimioterapia, transplante ou AIDS.<sup>47</sup>

Durante a última década, o CMV foi ligado ao envelhecimento prematuro do sistema imunológico (imunossenescência), assim como manifestações clínicas prematuras de patologia vascular, particularmente no contexto da infecção pelo HIV. Este patógeno é conhecido por induzir uma vasta resposta de células T, mas ao mesmo tempo por possuir vários mecanismos de evasão imune, o mais conhecido deles, provavelmente, é o estado de latência, com expressão de proteína limitada. O CMV dispõe de uma grande variedade de estratégias para evitar uma resposta imune eficiente e esta provavelmente é a razão para a sua sobrevivência bem sucedida na população.<sup>49</sup>

Aproximadamente 95% dos indivíduos HIV positivos são infectados por CMV. A introdução da terapia antirretroviral tem reduzido a incidência de desenvolvimento de doença associada ao CMV, porém, pacientes que são incapazes de controlar a replicação deste vírus tem aumentado risco de progressão na doença pelo HIV e de chegar à morte.<sup>50</sup>

Desde a introdução da HAART, houve um dramático declínio da incidência de infecções oportunistas, inclusive doenças pelo CMV. Em parte isto é correlacionado com o aumento da contagem de células T CD4+, entretanto, existem vários relatos de

doença por CMV em indivíduos em uso de terapia com contagem de linfócitos T CD4+ acima de 200 células/mm<sup>3</sup>, o que está associado com falta de imunidade específica ao CMV.<sup>51</sup>

Doisne e colaboradores<sup>52</sup> relatam que durante infecção primária pelo HIV, células T CD8+ específicas para outras viroses, como CMV e EBV, também mostraram um significativo grau de ativação. Isto demonstra que a ativação ocorre durante a fase aguda da infecção pelo HIV e contribui em parte para a marcada expansão de células T CD8+ ativadas.

### 2.6.2. EBV

O Epstein Barr vírus, assim como o CMV, é um herpesvírus humano ubíquo que infecta a maior parte da população mundial adulta. O modo primário de transmissão é pela saliva, através da qual o vírus invade a mucosa orofaríngea infectando os linfócitos B e estabelecendo latência nestas células.<sup>53,54</sup> O EBV tem uma potente habilidade capaz de induzir proliferação descontrolada e transformação da célula infectada. Pacientes infectados pelo HIV-1 têm elevado risco de desenvolver doenças relacionadas a este herpesvírus, variando desde desordens linfoproliferativas até linfomas não Hodgkin's de células B.<sup>55</sup>

Além da imunodepressão, a ativação imune crônica, uma marca da infecção pelo HIV-1, pode ter um papel crítico na gênese de linfomas das células B. Ativação celular dirigida pelo HIV-1 e imunovigilância prejudicada contra o EBV pode resultar na estimulação crônica das células B e expansão destas células infectadas, aumentando, portanto, o risco de desenvolver doenças malignas relacionadas ao EBV.<sup>55</sup>

A introdução da HAART e profilaxia contra doenças oportunistas tem melhorado significativamente a taxa de sobrevivência dos pacientes portadores do HIV-1. No entanto, a influência desta terapia nas doenças malignas associadas ao EBV não está completamente clara.<sup>53</sup>

O aumento da carga viral para o HIV decorrente de falha ou interrupção da HAART impulsiona resposta de células T CD4+ indicando que a reativação do vírus e consequentemente, o aumento da carga antigênica, promove a expansão dos linfócitos T CD4+ específicos ao HIV. Dinâmica similar é vista em resposta ao CMV e EBV demonstrando que a replicação do HIV-1 não afeta exclusivamente a frequência de células T CD4+ específicas a ele mas também células específicas para outros antígenos persistentes.<sup>56</sup>

Viremia induzida pelo HIV e citocinas pró inflamatórias tem um papel importante no estímulo e expansão das células B infectadas pelo EBV. Apesar da reconstituição imune parcial, o estímulo das células B dirigido por ativação imune persistente representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças malignas associadas ao EBV.<sup>55</sup>

## 2.7. Justificativa

Trinta anos depois da descoberta do HIV-1 ainda não temos perspectiva de cura da infecção. Terapia antirretroviral combinada reduziu significativamente a mortalidade e morbidade, com novos regimes mais potentes e que apresentam menos efeitos colaterais, no entanto, estes medicamentos não restauram completamente a saúde ou o estado imunológico dos pacientes infectados. Infecção pelo HIV-1 não tratada é caracterizada por constante replicação viral que leva a perda de células CD4 + T e prevê a progressão da doença.<sup>57</sup>

Os linfócitos T ativados, identificados pela expressão de CD38 e HLA-DR, são fortemente implicados na patogênese da infecção pelo HIV-1, levando à hipótese de que, a ativação imune pode contribuir para a depleção das células T CD4+ indiretamente através de vários mecanismos, como imunossenescência e supressão imune. Diante disso, é possível sugerir que, estratégias terapêuticas para reduzir o número de células CD4+ expressando CD38 e HLA-DR podem limitar a replicação do vírus e conseqüentemente a progressão da doença.<sup>58</sup>

Vários estudos já realizados mostram uma forte associação destes marcadores de ativação imunológica com a infecção pelo HIV. Em função da importância destes marcadores, neste estudo avaliaremos a frequência dos mesmos, em associação à razão CD4/CD8, o que constitui um problema para os portadores do HIV, uma vez que pode conduzir o sistema imunológico à exaustão.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de ativação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através da frequência da expressão dos marcadores de ativação celular, CD38 e HLA-DR, em pacientes infectados pelo HIV-1 sob terapia antirretroviral estável.

#### 3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Correlacionar a razão CD4/CD8 com os marcadores de ativação celular.

3.2.2. Avaliar a frequência de coinfeções virais e sua associação com a ativação imunológica

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção das amostras

A amostra total foi composta por indivíduos aprovados para doação de sangue no Hemocentro da Bahia (HEMOBA) com linfócitos T CD4+ acima de 500 células/ $\mu$ L e por indivíduos portadores do HIV-1 no Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) e no Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP).

Para a inclusão no estudo foram selecionados voluntários doadores de sangue acima de 18 anos, aprovados para doação pelo HEMOBA, que compõem o grupo controle. Para a inclusão dos casos, foram selecionados voluntários portadores do HIV-1, maiores de 18 anos, em uso de TARV estável por um mínimo de seis meses e carga viral menor que 50 cópias/mL por pelo menos seis meses

Como critérios de exclusão, mulheres grávidas, uso de drogas imunossupressoras ou imunomoduladoras nos últimos 60 dias e presença de neoplasia oportunista em atividade.

Todos os participantes foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após o protocolo ter sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia. Os voluntários responderam ainda um questionário para compor as informações necessárias associadas ao estudo e para caracterização dos diferentes grupos.

Um número de 129 pacientes portadores do vírus foi incluído no estudo, somado a 31 voluntários doadores de sangue do Hemoba, totalizando 160 indivíduos.

### 4.2. Estratificação das amostras

As amostras foram separadas em 5 grupos: grupo controle (GC), formado pelos doadores de sangue do Hemoba, totalizando 31 indivíduos; grupo virgem de tratamento (VT), composto por 45 pacientes portadores do HIV-1 que nunca fizeram uso de TARV; e três grupos HIV positivos em uso de antirretroviral, distintos quanto ao número de células T CD4+ e razão CD4/CD8 (R). Estes grupos foram identificados como RC (restauração completa), com indivíduos com  $CD4 > 500$  e  $R > 1$ , RP (restauração parcial), com  $CD4 > 500$  e  $R < 1$ , e RI (restauração inadequada), com  $CD4 < 500$  e  $R < 1$ . O grupo RC foi composto por 27 indivíduos, o RP por 30 e o RI por 27, que somados ao grupo VT, totalizaram um número de 129 pacientes portadores do HIV.

#### 4.3. Coleta e tratamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 4 mL contendo EDTA e acondicionadas em temperatura ambiente sendo levadas ao laboratório logo após a coleta. Foi feita a separação de 1,2 mL do plasma e conservação a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior triagem sorológica (HBV, HCV, HTLV, EBV, CMV e Sífilis). A análise de citometria de fluxo foi realizada no sangue total, tanto para a contagem celular quanto para a mensuração dos marcadores de ativação.

#### 4.4. Sorologias

As amostras dos pacientes controles foram analisadas apenas para CMV e EBV uma vez que eram indivíduos doadores do HEMOBA aprovados para doação, e portanto, já tinham as demais sorologias negativas. Os pacientes portadores do HIV-1 foram avaliados quanto à detecção de IgG para todas as sorologias citadas acima, através do método de quimioluminescência.

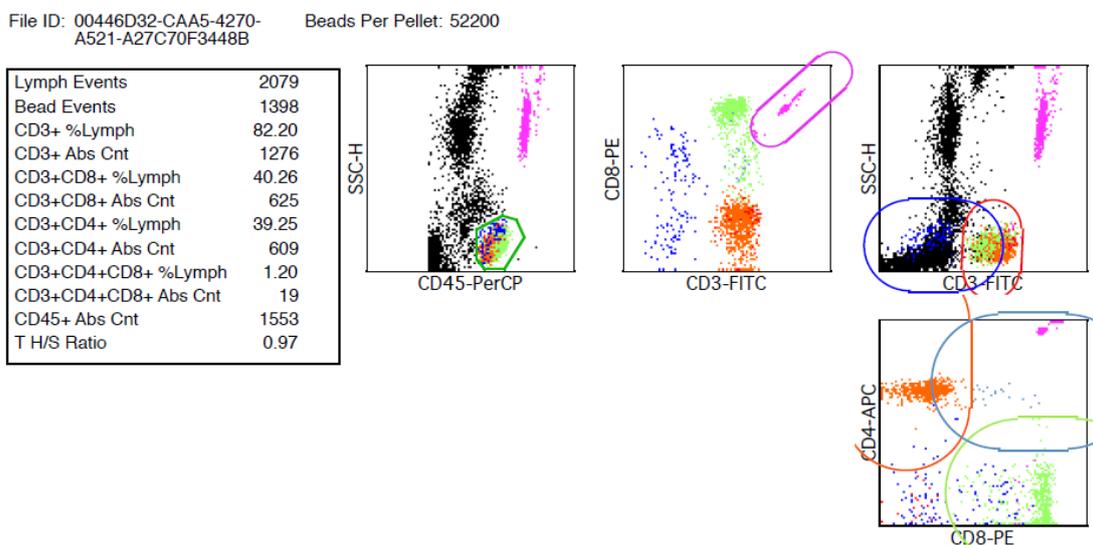
#### 4.5. Citometria de Fluxo

As amostras de todos os voluntários foram analisadas por citometria de fluxo, que permite uma imunofenotipagem celular. A citometria é uma tecnologia capaz de analisar simultaneamente diversos parâmetros de células ou partículas em suspensão. Seu princípio está na incidência de uma fonte de luz laser que intercepta cada partícula, e a dispersão desta luz fornece dados relativos ao tamanho e à granulidade desta partícula. Moléculas ou estruturas de interesse podem ser estudadas pela marcação com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos, que são compostos fluorescentes que emitem um comprimento de onda capaz de ser detectado pelo citômetro de fluxo.

A contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi realizada pela ligação dos anticorpos monoclonais anti-CD3<sup>+</sup>, anti-CD4<sup>+</sup>, anti-CD8<sup>+</sup> e anti-CD45<sup>+</sup>. O anti-CD3<sup>+</sup> é um marcador específico dos linfócitos T, que associado ao anti-CD4<sup>+</sup> caracteriza os linfócitos T auxiliares, e associado ao anti-CD8<sup>+</sup> caracteriza os linfócitos T citotóxicos. Foram caracterizados ainda os leucócitos e linfócitos totais através da marcação com o anti-CD45<sup>+</sup>, presente na superfície de todas estas células.

Para a realização deste procedimento foram utilizados tubos Trucount da Becton Dickinson. Neste protocolo utilizamos 50 $\mu\text{L}$  do sangue total de cada paciente, que foi adicionado a 20 $\mu\text{L}$  do anticorpo contendo anti-CD3 associado ao fluorocromo Complexo Ativado de Proteína Clorofil-Peridina (PerCP), anti-CD4 associado ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8 associado a Ficoeritrina (PE) e anti-CD45 associado a Estreptavidina (PeCy5). Após uma rápida agitação para complexação dos monoclonais à superfície das células, as amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos a uma temperatura entre 20 e 25 $^{\circ}\text{C}$ . Esta incubação é necessária devido a

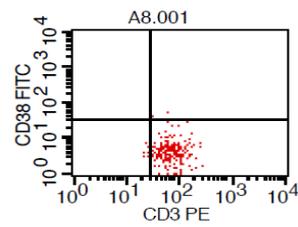
fotosensibilidade dos fluorocromos associados aos anticorpos monoclonais. Posteriormente foi adicionado 450µL de solução tampão de lise, com a finalidade de lisar as hemácias presentes nas amostras, e depois foram novamente incubadas nas mesmas condições. Após a incubação as amostras foram lidas no citômetro de fluxo FACSCalibur da Becton Dickinson. Com a identificação celular o programa realiza as contagens das células selecionadas, como mostra a figura 2.



**Figura 2. Análise das contagens absolutas das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo**

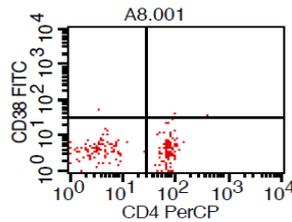
No primeiro e terceiro gráficos identifica-se a população de leucócitos totais CD45+ e linfócitos T CD3+, respectivamente, através da positividade do anticorpo por complexidade interna das células e realizada a seleção desta população. Os gráficos subsequentes analisam as contagens destas células pela positividade do anticorpo monoclonal específico para CD3, CD4 e CD8. Os valores absolutos e percentuais são expressos na tabela à esquerda.

Para a análise da frequência dos marcadores de ativação celular, CD38 e HLA-DR, utilizamos 2 tubos de poliestireno para cada amostra. No primeiro tubo acrescentamos 100µL do sangue total e adicionamos 3µL de cada monoclonal isoladamente, anti-CD38 associado ao fluorocromo FITC, anti-CD3 associado ao PE, anti-CD4 associado ao PerCP e anti-HLA-DR associado ao APC. No segundo tudo após a adição dos 100µL da amostra acrescentamos 3µL do monoclonal CD38 associado ao FITC e do anti-CD45 associado ao PeCy5. Após esta etapa, os tubos passaram por agitação e foram incubados ao abrigo da luz por 20 minutos a uma temperatura entre 20 e 25°C. Posteriormente, foi acrescentado 1mL de solução tampão de lise, nova agitação, e submetido a nova incubação por 20 minutos nas mesmas condições anteriores. Após este período de incubação, foram realizados três ciclos de lavagem das células, cada ciclo com 1mL de solução salina, e centrifugados por 10 minutos a 2500 rotações por minutos (RPM) em temperatura entre 20 e 25°C. Ao final das lavagens foi acrescentado 400µL de solução salina para ressuspensão das células e analisados no citômetro FACSCalibur pelo software Cellquest. Uma vez selecionados os marcadores nas populações específicas, é possível conhecer a expressão dos mesmos em cada população, como mostra a figura 3.



File: A8.001 Tube: TUBO 1  
Acquisition Date: 25-Apr-14 Gate: G1

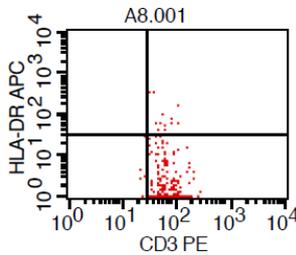
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1	0.04	0.00	26.42	26.42	38.54	38.54
UR	48	2.00	0.24	90.76	76.02	56.36	51.80
LL	132	5.49	0.66	23.67	23.45	5.08	4.34
LR	2223	92.47	11.11	74.60	65.25	5.10	4.07



Quadrant Statistics

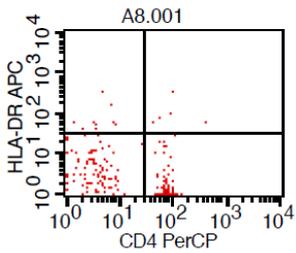
File: A8.001 Tube: TUBO 1  
Acquisition Date: 25-Apr-14 Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	10	0.42	0.05	5.23	3.44	54.47	51.63
UR	39	1.62	0.19	78.04	69.09	56.39	51.46
LL	964	40.10	4.82	4.04	3.32	4.73	3.93
LR	1391	57.86	6.95	77.27	73.04	5.36	4.20



Sample ID: A8 Patient ID: A8  
Acquisition Date: 25-Apr-14 Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	16	0.67	0.08	24.38	24.24	704.33	99.94
UR	137	5.70	0.69	60.78	55.44	90.26	67.96
LL	117	4.87	0.58	23.59	23.37	5.28	2.81
LR	2134	88.77	10.67	75.85	66.16	3.59	1.96



Sample ID: A8 Patient ID: A8  
Acquisition Date: 25-Apr-14 Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	97	4.03	0.48	4.14	3.49	83.86	64.73
UR	56	2.33	0.28	151.64	81.27	276.80	82.55
LL	877	36.48	4.39	4.04	3.31	5.99	3.50
LR	1374	57.15	6.87	74.26	72.61	2.21	1.40

**Figura 3. Análise dos marcadores de ativação imunológica expresso pelas populações de linfócitos T CD3+ e T CD4+ por citometria de fluxo** No primeiro e segundo gráficos identifica-se a expressão do CD38 pela população de linfócitos T CD3+ e T CD4+, respectivamente. No terceiro e quarto gráficos tem-se a expressão do HLA-DR nas populações de células T CD3+ e T CD4+.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A idade não apresentou distribuição normal e foi apresentada em mediana e intervalo interquartil, máximo e mínimo. A distribuição por sexo foi apresentada em proporções, bem como a cor dos indivíduos, dividida em branca, e negra/parda. Os valores referentes ao número de células e à expressão dos marcadores também estão apresentados em mediana e intervalo interquartil, máximo e mínimo, que foram obtidos através do teste de frequência.

A comparação de medianas das variáveis idade, contagem celular e ativação imune, entre os 5 grupos de estudo foi feita utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

A comparação de medianas das variáveis ativação imune e número de células entre 2 grupos foi feita com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que se tratavam de variáveis categóricas independentes com distribuição anormal. Os testes foram realizados ajustando a aceitação de diferença para uma probabilidade de 0,025 ( $p < 0,025$ ). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características gerais dos indivíduos

As características gerais por grupo estão resumidas nas tabelas 1 e 2. Na tabela 1 estão valores referentes à idade, e percentuais de sexo e cor dos indivíduos por grupo. Na tabela 2 estão os percentuais do uso de cigarro, drogas e álcool por grupo.

**Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos por grupo.**

Características	Grupo Controle (Sem HIV)	Pacientes com HIV				Virgem de Tratamento	p
		Restauração					
		Completa	Parcial	Inadequada			
	N= 31	N=27	N=30	N=27	N=45	N=160	
Idade - Mediana (Interquartil)	41 (25-59)	51(33-75)	48(32-68)	49(30-64)	31(20-64)	0,001	
Sexo Feminino (%)	32,3	44,4	50,0	18,5	48,9	0,062	
Cor Negra (%)*	96,8	74,1	80,0	100,0	97,8	0,000	

\*Versus branca.

Os grupos de restauração completa, parcial e inadequada apresentaram valores próximos referentes à mediana da idade ( $p = 0,106$ ), não sendo possível portanto, comparar o impacto da imunossenescência nestes grupos. Por outro lado, o grupo VT apresentou menor idade em geral, uma vez que são pacientes com pouco tempo de diagnóstico e que ainda não iniciaram o tratamento. Observa-se que em geral o sexo masculino é mais acometido pelo vírus HIV e que os grupos com restauração completa e parcial são os que apresentam uma maior quantidade de indivíduos brancos.

**Tabela 2. Frequência (%) do uso de cigarro e drogas no passado, e atualmente, e consumo de álcool, por grupo.**

Características	Grupo Controle	Restauração Completa	Restauração Parcial	Restauração Inadequada	Virgem de Tratamento	P
	N=31	N=27	N=30	N=27	N=45	N=160
Cigarro anterior	25,8	51,9	60,0	63,0	62,2	0,008
Cigarro atual	3,2	3,7	26,7	22,2	26,7	0,011
Drogas anterior	6,4	7,4	10,0	18,5	28,9	0,034
Drogas atual	0	3,7	3,3	3,7	8,9	0,59
Álcool	61,3	59,3	43,3	51,9	66,7	0,457

O grupo VT se destaca por ser o de maior consumo de drogas tanto no passado quanto atualmente, seguido pelo grupo RI, que teve um alto índice do uso de drogas no passado.

## 6.2. Identificação das populações celulares e dos marcadores de ativação por citometria de fluxo

Na contagem absoluta do número de células de subpopulações de linfócitos T, inicialmente identificamos as células pelas propriedades da presença do monoclonal anti-CD3 e pela complexidade interna das mesmas e utilizamos a marcação destas células também através de monoclonais anti-CD4 e anti-CD8. É possível então selecionar a população de interesse (“estratégia de gate”) pela presença do anticorpo específico para cada célula. Os marcadores avaliados foram CD38 e HLA-DR, que foram determinados nas populações de células T CD4+ e T CD8+ através dos monoclonais anti-CD38 e anti-HLA-DR, anti-CD3+ e anti-CD4+. No momento da leitura é possível selecionar a população de interesse pela “estratégia de gate” devido a presença dos anticorpos monoclonais específico para cada marcador nas populações selecionadas.

## 6.3. Contagem de células e expressão dos marcadores de ativação pelas populações de linfócitos em cada grupo.

Os valores referentes à contagem dos linfócitos e aos marcadores de ativação por população nos grupos, estão expressos nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. As figuras 4 a 7 representam os marcadores por população.

**Tabela 3. Medianas (interquartil) referentes à contagem dos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+.**

Células	Grupo Controle	Restauração Completa	Restauração Parcial	Restauração Inadequada	Virgem de Tratamento	P
CD3+ Mediana (interquartil)	1407 (749-3849)	1432 (579-4617)	1830 (933-3119)	1303 (549-2241)	1355 (437-3724)	0,015
CD3+CD4+ Mediana (interquartil)	592 (103-969)	481 (118-935)	718 (102-955)	346 (14-793)	398 (15-955)	0,000
CD3+CD8+ Mediana (interquartil)	540 (185-1495)	566 (17-2245)	1017 (575-1894)	782 (364-1934)	833 (323-2962)	0,000

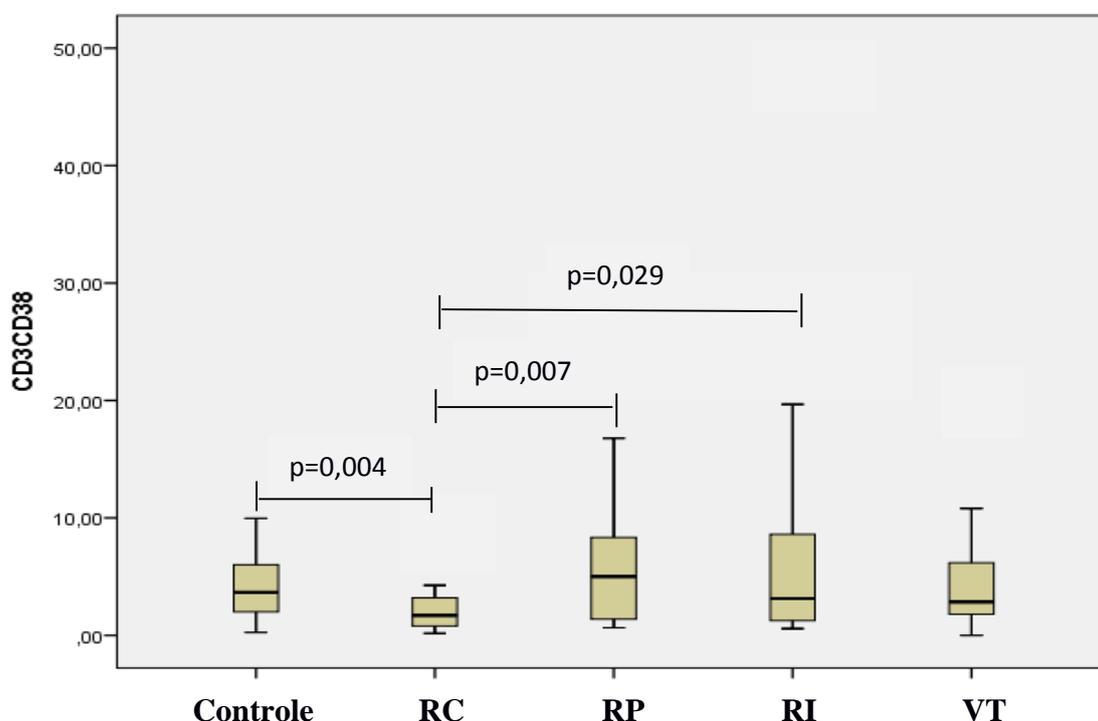
**Tabela 4. Medianas (interquartil) referentes ao percentual da expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pelos linfócitos T CD3+, CD4+ e pelos leucócitos totais.**

Marcadores de Ativação	Grupo Controle	Restauração Completa	Restauração Parcial	Restauração Inadequada	Virgem de Tratamento
CD3CD38 Mediana (interquartil)	3,9 (0,2-10)	1,7 (0,2-8,6)	5,0 (0,6-26)	3,1 (0,6-48)	2,5 (0-17,9)
CD4CD38 Mediana (interquartil)	2,7 (0,14-7,7)	0,9 (0-6,9)	3,4 (0,3-25)	2,2 (0,2-13,8)	1,5 (0-8,3)
CD3HLA-DR Mediana (interquartil)	9,9 (4,4-86,8)	5,4 (2,5-30,4)	13 (4,4-46,1)	23 (3-58,9)	26,6 (3,6-59,8)
CD4HLA-DR Mediana (interquartil)	4,2 (1,5-55,3)	1,6 (0,8-9,3)	2,5 (0,5-32,7)	4,8 (0,5-25,1)	7,8 (0,5-20,6)
CD45CD38 Mediana (interquartil)	11,5 (1-32,4)	6,0 (1,7-38,5)	14,6 (3,4-37)	8,9 (1,4-44,8)	7,5 (1-73)

Não houve marcação das células T CD8+ na citometria de fluxo. Uma vez que a população CD3+ compreende basicamente os linfócitos T CD4+ e T CD8+ optamos por marcar apenas as populações T CD3+ e T CD4+, e portanto, os valores referentes à expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pela população de linfócitos T CD8+, foi obtida através de cálculo matemático. No momento da leitura da amostra é possível delimitar, no gráfico, as populações de interesse, garantindo que estes resultados se refiram apenas a estas populações. Os valores estão representados na tabela 5.

**Tabela 5. Valores referentes à expressão dos marcadores CD38 e HLA-DR pelos linfócitos T CD8+.**

Marcadores de Ativação	Grupo Controle	Restauração Completa	Restauração Parcial	Restauração Inadequada	Virgem de Tratamento
CD8CD38	1,2	0,8	1,6	0,9	1,0
CD8HLA-DR	5,7	3,8	10,5	18,2	18,8



**Figura 4. Distribuição dos valores absolutos da expressão do CD38 pela população CD3+ nos grupos.**

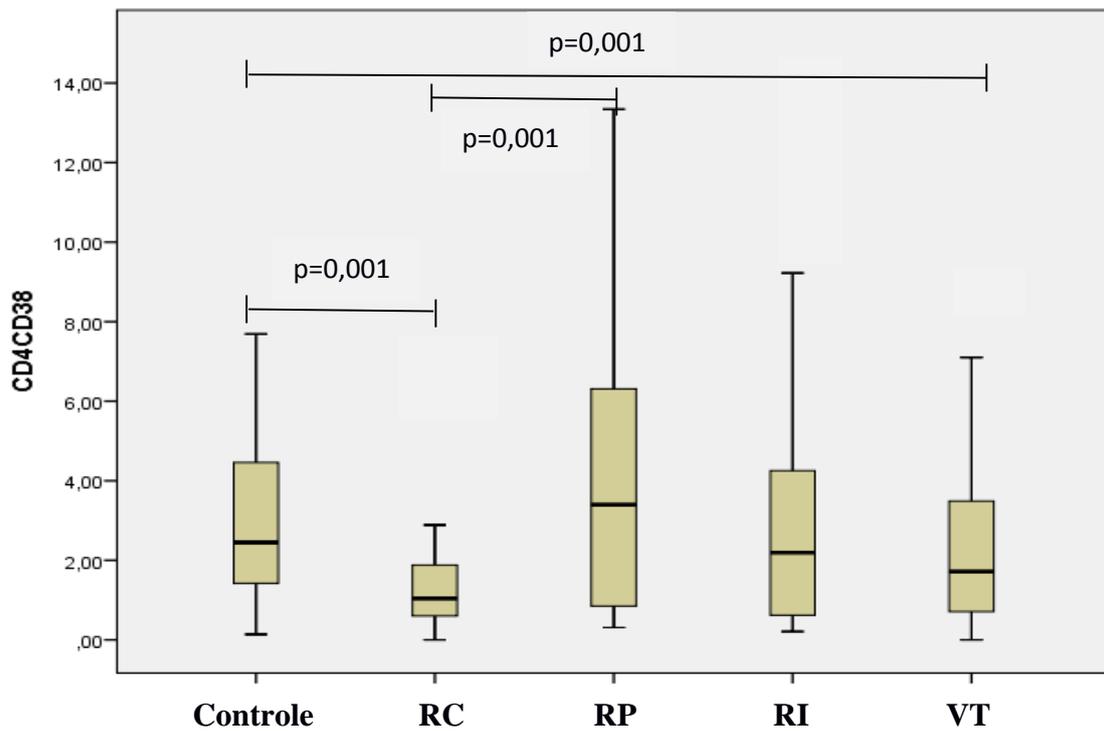


Figura 5. Distribuição dos valores absolutos da expressão do CD38 pela população CD4+ nos grupos.

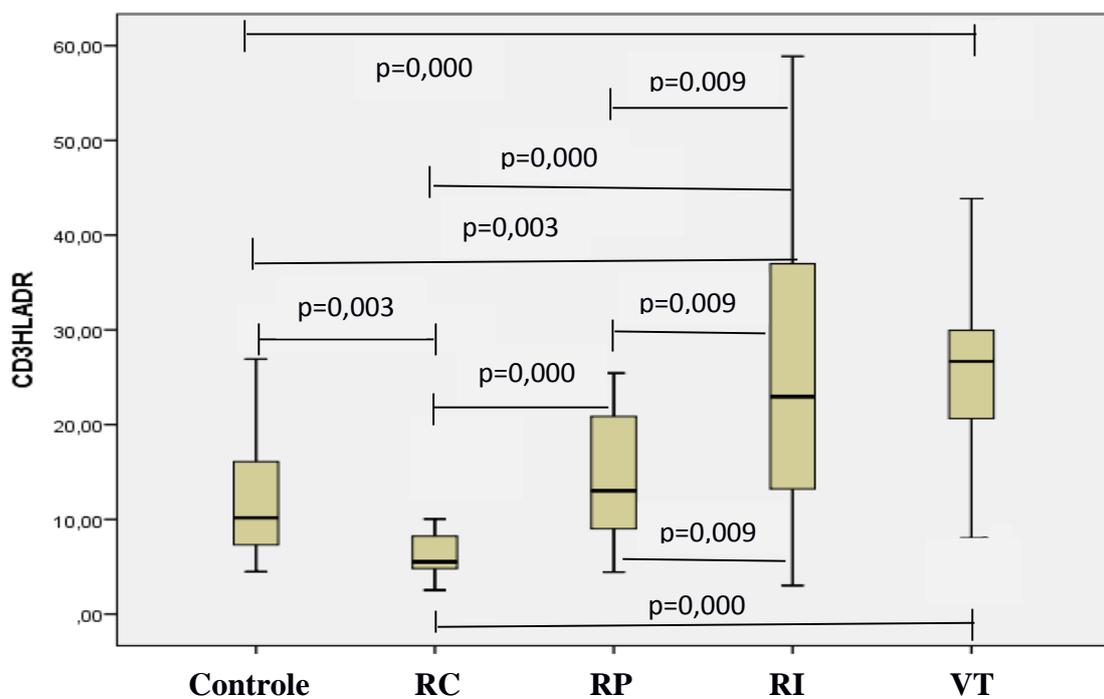
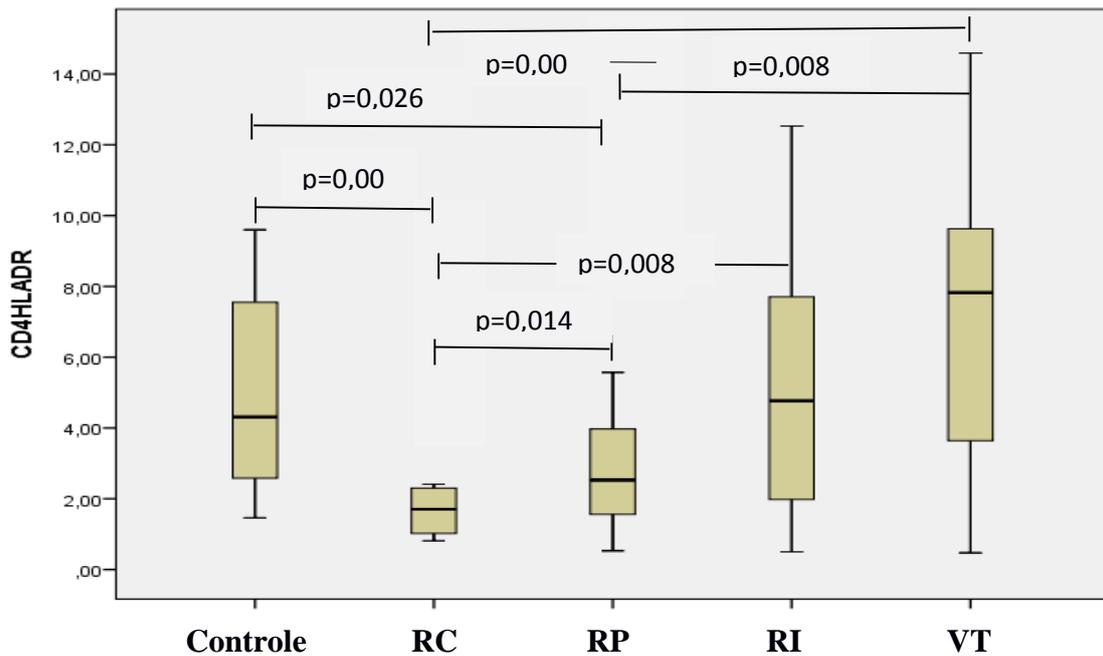


Figura 6. Distribuição dos valores absolutos da expressão do HLA-DR pela população CD3+ nos grupos.



**Figura 7. Distribuição dos valores absolutos da expressão do HLA-DR pela população CD4+ nos grupos.**

#### 6.4. Avaliação da interferência do uso de drogas/cigarro no passado, atualmente, e consumo de bebida alcoólica na carga viral, número de células e ativação celular

Foi encontrado interferência do uso de drogas para a CV atual dos pacientes ( $p=0,002$ ) na comparação entre todos os grupos. Houve relação também com a razão CD4/CD8 ( $p=0,009$ ), com o percentual de células T CD3+CD4+ ( $0,002$ ) e com os leucócitos totais, CD45 ( $p=0,017$ ). Para o consumo de drogas atual houve relação significativa para a expressão de HLA-DR na população T CD3+, na comparação entre todos os grupos ( $p=0,033$ ). O uso de álcool mostrou interferência para a CV atual dos pacientes ( $p=0,048$ ) na comparação entre os grupos. Houve relação significativa do uso de bebida alcoólica também com o percentual de células T CD3+CD4+ ( $p=0,032$ ) e com a expressão do HLA-DR por esta mesma população ( $p=0,022$ ).

#### 6.5. Avaliação da interferência do tempo de diagnóstico na carga viral, número de células a ativação celular

O tempo de diagnóstico interferiu no número de células T CD4+ atual dos pacientes ( $p=0,001$ ) na comparação entre os grupos

## 6.6. Avaliação das coinfeccções

As coinfeccções avaliadas foram HBV, HCV, HTLV, CMV, EBV e sífilis. A análise foi realizada através de triagem sorológica para detecção da presença do anticorpo IgG específico. A tabela 5 traz os resultados encontrados.

**Tabela 6. Percentual das coinfeccções por grupo**

Características	Grupo Controle	Restauração Completa	Restauração Parcial	Restauração Inadequada	Virgem de Tratamento
EBV (anti-VCA)	100	100	100	100	97,78
CMV (anti-CMV)	87,10	100	100	96,30	97,78
Sífilis (treponêmico)	0	25,92	46,67	44,44	35,56
HTLV (anti-HTLV)	0	0	6,67	3,70	0
HCV (anti-HCV)	0	7,41	36,67	18,52	0
HBV (AgHBs)	0	22,22	10,0	0	4,44

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram observadas diferenças significativas na expressão de HLA-DR nos grupos, porém, a expressão do CD38 sofreu menor variação.

A expressão do HLA-DR aumentou à proporção que diminuía a reconstituição imune do paciente (referente à contagem de células T CD4+ e à razão CD4/CD8), sendo mais elevada nos grupos de restauração inadequada e virgem de tratamento, este último com 93,33% dos pacientes com a razão CD4/CD8 abaixo de 1. O grupo com restauração imunológica plena, como esperado, apresentou menor expressão do marcador. Os resultados encontrados sugerem que a reconstituição imune, avaliada pela razão CD4/CD8, associada a marcadores de ativação imunológica, pode colaborar com informações relevantes em indivíduos tratados e com supressão virológica, assim como em indivíduos não tratados.

O grupo controle, embora sem infecção pelo HIV-1, também apresentou expressão do HLA-DR consideravelmente, inclusive mais elevada do que o grupo de restauração plena. Pode-se sugerir que a qualidade de vida tenha um papel importante neste achado. Hoje em dia, pacientes portadores do HIV tendem a buscar um padrão de vida mais saudável e isso pode impactar positivamente no sistema imunológico. A dieta também desempenha um papel importante no sistema imune de pacientes com HIV, porque quantidades suficientes de macro e micronutrientes são essenciais para o seu funcionamento normal.<sup>59</sup> O desequilíbrio do estado nutricional é um dos principais cofatores na infecção pelo HIV e pode contribuir para a morte durante a progressão para AIDS.<sup>60</sup> Profissionais da área de saúde devem reforçar aos pacientes a importância de uma dieta saudável para ajudar a preservar a função imunológica e minimizar os riscos impostos pela doença e pelo tratamento.<sup>59</sup>

A ativação imunológica nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em pacientes infectados pelo HIV é um forte preditor de progressão da doença e controle viral, no entanto, as causas desta ativação não são completamente compreendidas e, além disso, é provável que a ativação destas células seja mediada por processos distintos. Os mecanismos que conduzem à ativação e depleção dos linfócitos T CD4+ são de particular interesse uma vez que sua manutenção é fundamental para postergar o início da AIDS.<sup>30</sup>

Dados anteriores mostram que, embora a maioria dos estudos avalie a ativação imunológica através das porcentagens de células T que expressam o marcador CD38, o prognóstico de ativação aumentou quando a ativação imune foi avaliada pela coexpressão de CD38 com HLA-DR, sugerindo que a expressão de vários marcadores sobre as células T poderia ser indicativo de um estado de hiperativação. As células T duplamente ativadas com CD38 e HLA-DR predisseram significativamente a progressão para AIDS.<sup>61</sup>

Vários estudos têm demonstrado que além da contagem e percentual de células T CD4+, a razão CD4/CD8 prevê o risco de morbidades relacionadas ou não à AIDS. Além disso, um estudo de 2012 mostrou que pacientes infectados pelo HIV em uso de HAART prolongado e portanto, com prolongado período de supressão viral, a contagem e percentual de linfócitos T CD4+ e razão CD4/CD8 na linha de base, são preditores independentes de recuperação imunológica e que a falta no aumento de qualquer um destes indicadores parece ser prejudicial para a realização de uma boa recuperação imunológica a longo prazo em pacientes sob uso de terapia.<sup>62</sup>

Uma baixa razão CD4/CD8, identifica indivíduos com anormalidades imunológicas e um pior prognóstico. Esta situação apresenta maior ativação imunológica, inata e adaptativa, imunossenescência, desequilíbrio de células CD4 + e CD8 + na mucosa do intestino e maior risco de morbidade e mortalidade. Em contraste, aqueles que normalizam a relação CD4/CD8 tem traços de um sistema imune saudável. Observa-se que o início da TARV cedo pode contribuir para uma normalização mais rápida e robusta da proporção CD4/CD8 em comparação com iniciação tardia. Assim, a proporção de células CD4/CD8 pode ajudar a discriminar ainda mais o risco de progressão da doença em indivíduos tratados com sucesso e, uma resposta bem sucedida à terapia pode levar tanto à normalização da contagem de células CD4 + T periféricas quanto à proporção de células T CD4 + em relação às células T CD8 +.<sup>41</sup>

Em um estudo de coorte com indivíduos adultos infectados pelo HIV, buscou-se determinar correlação da ativação imune com o uso de TARV durante infecção precoce ou crônica. A associação mais consistente foi entre a frequência de células T CD4+ e CD8+ expressando HLA-DR. Não foi observada correlação para o CD38 isoladamente, e isto pode ser devido ao fato, pelo menos em parte, de que o CD38 é expresso não só em células ativadas, mas também em células T naives. A relação com a expressão de HLA-DR foi consistente entre os doentes tratados no início da infecção e aqueles tratados com infecção crônica.<sup>63</sup>

Embora a falha na normalização da relação CD4/CD8, apesar da restauração na contagem das células T CD4+ periféricas seja uma observação comum na prática clínica, poucos estudos têm abordado o significado biológico deste fenômeno. A importância da carga viral e da contagem dos linfócitos T CD4+ como marcadores substitutos da eficácia da terapia na gestão global dos indivíduos infectados pelo HIV pode ter levado a negligenciar a importância da relação de CD4/CD8. Estudos anteriores à introdução da HAART em 1996, reconheciam a relação CD4/CD8 como um preditor para AIDS, proporcionando semelhantes informações de prognóstico ao da contagem de CD4. Para o nosso conhecimento, nenhum estudo tem abordado especificamente o significado biológico ou clínico da razão CD4/CD8 em indivíduos infectados pelo HIV em uso de TARV supressiva. A maioria dos estudos nesta área tem sido conduzida na população em geral, em que a relação CD4/CD8 tem sido proposta como um marcador do perfil de risco imunológico, o que implica em um conjunto de defeitos que definem a imunossenescência.<sup>40</sup>

Ainda no que se refere à razão CD4/CD8, a associação entre esta e a ativação imunológica na infecção pelo HIV tem uma simples explicação biológica. Considerando-se que este parâmetro tenha sido previamente associado com envelhecimento imunológico e sistêmico juntamente com o fato da imunossenescência ser induzida por ativação imune crônica, sugere-se que esta relação CD4/CD8 pode ser um marcador substituto da imunossenescência também na infecção pelo HIV. Conseqüentemente, um ponto de suma importância a ser explorado é se a persistência de uma baixa relação CD4/CD8 apesar de TARV supressiva, também poderia identificar indivíduos infectados pelo HIV com envelhecimento sistêmico acelerado.<sup>40</sup>

No presente trabalho, foi encontrado uma maior expressão de HLA-DR nas células T CD8+ (analisadas pela diferença entre CD3+ e CD4+) do que nas células T CD4+. Isto pode estar associado ao perfil imunológico deste grupo celular, uma vez que são as células responsáveis pela resposta imune às infecções virais. Um estudo realizado na China por Shang e colaboradores<sup>7</sup> corrobora estes achados.

Nosso trabalho avaliou ainda o uso de drogas, cigarros e a ingestão de bebida alcoólica que, segundo a literatura, pode influenciar o sistema imunológico. O uso de drogas interferiu na carga viral dos pacientes, na razão CD4/CD8, no número celular e na expressão de HLA-DR pela população CD3+. A infecção pelo HIV e progressão da AIDS são afetados por um certo número de cofatores, incluindo o abuso de drogas. Os opioides, cocaína, álcool e outras substâncias tem sido implicados como fatores de risco para a infecção pelo HIV, todos eles com o potencial de comprometer a imunidade do hospedeiro e facilitar a replicação viral. Usuários de drogas injetáveis correm um risco significativo de infecção pelo HIV e contribui para a disseminação mais rápida do vírus. O impacto negativo do abuso de drogas no sistema imune do hospedeiro é um fator para a promoção da infecção pelo HIV. Assim, o uso de drogas tem sido sugerido como um cofator na imunopatogênese da doença pelo HIV.<sup>64</sup> Um estudo realizado por Reynolds e colaboradores<sup>65</sup> descobriu que a heroína potencializa a replicação do HIV em astrócitos humanos normais, e outro trabalho, realizado por Selimova et al,<sup>66</sup> demonstrou o aumento da replicação do vírus nas fases iniciais do ciclo de vida em células T. Estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos HIV positivos usuários de cocaína têm menor contagem de células T CD4 +, aumento do risco de progressão da doença e de morte relacionada a AIDS. *In vitro*, a cocaína aumenta a replicação do HIV-1 nas PBMC de humanos e aumenta a CV em camundongos. Tem sido proposto que a cocaína aumenta a infecção/replicação do HIV-1 por inibição de quimiocinas protetoras e/ou por alta regulação do correceptor de entrada do vírus.<sup>67</sup>

O grupo que apresentou maior consumo de drogas foi justamente o grupo VT, tanto no passado como atualmente, ainda com uso de 8,89%, seguido pelo grupo RI com elevado índice de drogas no passado (18,52%). Este dado está em concordância com o que foi citado acima, quanto ao potencial das drogas de comprometer a imunidade do paciente e facilitar a replicação viral, o que é exemplificado pela baixa relação CD4/CD8 e alto índice de marcadores de ativação imune.

A ingestão de bebida alcoólica interferiu na carga viral, percentual de linfócitos T CD4+ e expressão do HLA-DR pela população de células T CD4+. O abuso no uso de álcool parece alterar a infectividade do vírus HIV-1, a resposta imune do hospedeiro, e a progressão da doença e lesão do tecido, com impacto específico sobre a progressão da doença. O consumo por pacientes portadores do vírus afeta o sistema nervoso central e o sistema imunológico além do fígado, coração, pulmões, e do sistema músculo esquelético. Os efeitos imunossupressores bem conhecidos associados ao consumo de álcool têm sido propostos por aumentar a susceptibilidade à infecção pelo HIV, prejudicando os mecanismos imunológicos responsáveis pelo controle da carga viral. A ativação imunológica notada com o consumo excessivo de álcool tem uma provável probabilidade de contribuir para o impacto de desregulação do sistema imune levando à progressão da doença e lesão de tecido. Também tem sido demonstrado que a ingestão alcoólica aguda, aumenta a replicação de HIV em PBMC isoladas, e prejudica o estímulo às respostas de linfócitos.<sup>68</sup>

No que diz respeito ao tempo de diagnóstico houve diferença significativa para o número de células T CD4+ atual. Em pacientes com maior tempo de diagnóstico, é de se esperar que, com o passar do tempo haja uma diminuição da contagem de células CD4+ à medida que ocorre a progressão da doença. Os pacientes foram divididos em grupos conforme a contagem de células T CD4+, e dentro de cada grupo os menores valores atuais para os linfócitos CD4+ em geral, são de pacientes com maior tempo de diagnóstico. Segundo dados de Pinzone e colaboradores,<sup>42</sup> algumas características demográficas como sexo masculino e idade mais avançada, têm sido associadas com ganho reduzido de células T CD4+. Este achado pode ser explicado pelo fato de que a produção celular é maior no sexo feminino e em sujeitos mais jovens e está associada a nova produção de células T CD4+. Houve variação também para os marcadores CD38 e HLA-DR, onde os valores mais elevados da expressão destes marcadores foram encontrados entre os pacientes com maior tempo de diagnóstico, na maioria das vezes, acima de 12 anos.

A análise para sorologia confirmou a presença de IgG para CMV em 98,45% dos pacientes portadores do vírus e em 87,10% dos pacientes controles. O EBV esteve presente em 99,22% dos pacientes infectados pelo HIV-1 e em 100% do grupo controle, como esperado, uma vez que são os herpesvírus mais comuns em pacientes imunocomprometidos, bem como na população em geral. Citomegalovírus é o maior patógeno oportunista entre pessoas infectadas pelo HIV,<sup>69</sup> e as doenças causadas por este vírus tem, assumidamente, o papel mais significativo na vida das pessoas que vivem com AIDS.<sup>70</sup> Os pacientes infectados com o HIV-1 têm alto risco de desenvolver doenças relacionadas ao Epstein Barr vírus. Ativação imune crônica é uma marca da patogenia do HIV-1 e pode desempenhar um papel na estimulação e expansão das células B infectadas com EBV.<sup>55</sup> Para o grupo controle, a presença destes herpesvírus provavelmente não influencia na ativação imune uma vez que se encontram em estado latente, e diante do achado em nosso grupo de estudo, não há como avaliar o papel

destes herpesvírus bem como sua interferência na expressão dos marcadores de ativação dos pacientes HIV, já que os resultados impossibilitam uma comparação.

Para as demais coinfeções o resultado mais expressivo foi para sífilis, presente em 37,98% dos pacientes, porém nossa triagem testou apenas a presença de IgG, que é indicativo de infecção passada, mas não informa sobre infecção em atividade. Os grupos RP e RI apresentaram maior prevalência deste marcador, que foi menos frequente no grupo de restauração completa. As doenças sexualmente transmissíveis são um problema constante na infecção pelo HIV.<sup>71</sup> Evidências sugerem que há uma sinergia entre sífilis e HIV, e que o *T. pallidum* tem a capacidade de ativar células do sistema imunológico.<sup>72</sup> Para os resultados da coinfeção pelo HCV, 13,95% dos pacientes portadores do HIV foram positivos para IgG, sendo o grupo de restauração parcial o de maior prevalência de infecção. Dados do trabalho de Feuth et al<sup>73</sup> mostraram que as células T de pacientes coinfectados pelo HCV apresentaram aumento dos marcadores de ativação e exaustão em comparação a controles saudáveis, sugerindo que HIV e HCV tem um papel complementar na ativação das células T na coinfeção. Os demais resultados foram menos expressivos, com 8,53% dos pacientes coinfectados com o HBV e 2,32% com o HTLV. Vale ressaltar que todos os testes foram feitos para avaliar a presença de IgG e, portanto, não se pode afirmar que estas coinfeções estejam interferindo nos níveis de ativação, uma vez que, a infecção pode não ser recente.

No presente trabalho não foi possível avaliar o impacto das coinfeções diante do resultado obtido em nosso grupo de estudo, bem como outros fatores que por ventura interfiram na ativação imunológica, como por exemplo, produção de citocinas, entretanto, obtivemos um grupo amostral robusto e conseqüentemente um resultado significativo dentro do que foi proposto.

## **8. CONCLUSÃO**

O presente trabalho sugere uma forte associação da expressão do HLA-DR com o sistema imunológico dos pacientes portadores do HIV-1, e a relação CD4/CD8 somada a esta expressão, constitui um bom marcador de ativação imune. A terapia antirretroviral em associação à restauração imune completa apresenta um importante papel na redução da ativação imunológica, como ficou claro a partir dos resultados encontrados, com menor ativação no grupo RC do que no próprio grupo controle, o que reforça a importância do início imediato da terapia antirretroviral.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Merson MH. The HIV-AIDS pandemic at 25-The global response. *N Engl J Med.* 2006;354(23):2414-17.
2. Pandhi D, Ailawadi P. Initiation of antirretroviral therapy. *Indian J Sex Transm Dis.* 2014;35(1):1-11.
3. Broder S. The development of antirretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res.* 2010;85(1):1-38.
4. Bertozzi S, Padian NS, Wegbreit J, DeMaria LM, Feldman B, Gayle H, *et al.* HIV/AIDS prevention and treatment. *Disease Control Priorities in Developing Countries* 2006;331-69.
5. Catalfamo M, Mascio MD, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, Adelsberger J, *et al.* HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *PNAS* 2008;105:19851-56.
6. Jacobson MA, Ditmer DP, Sinclair E, Martin JN, Deeks SG, Hunt P, *et al.* Human herpesvirus replication and abnormal CD8+ T cell activation and low CD4+ T cell counts in antiretroviral-suppressed HIV-infected patients. *PLoS One* 2009;4:1-6.
7. Shang H, Zhang Z, Jiang Y, Han X, Wang Y, Zhang M, *et al.* Activation and coreceptor expression of T lymphocytes in HIV/AIDS patients of China. *J Clin Immunol* 2005;25:68-72.
8. Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2004;363:2116-21.
9. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko AS, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2006;44:2409-15.
10. Schaftenaar E, Verjans GMGM, Getu S, McIntyre JA, Struthers HE, Osterhaus ADME, *et al.* High Seroprevalence of human herpesviruses in HIV-infected individuals attending primary healthcare facilities in rural South Africa. *PLoS One* 2014;9:1-7.
11. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol.* 2005;34:233-44.
12. Weiss ER, Göttlinger H. The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J Mol Biol.* 2011;410:525-33.

13. Balasubramaniam M, Freed EO. New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26(4):236-51.
14. Martínez-Muñoz L, Barroso R, Dyrhaug SY, Navarro G, Lucas P, Soriano SF, *et al.* CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp 120 binding to the cell surface. *PNAS* 2014;111(19):1960-69.
15. Ostrowski MA, Justement SJ, Catanzaro A, Hallahan CA, Ehler LA, Mizell SB, *et al.* Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol.* 1998;161:3195-201.
16. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Kräusslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO* 2003;22(7):1707-15.
17. UNAIDS. 2013 Local epidemics issues brief.
18. World Health Organization: Global update on the Health Sector Response to HIV. Geneva: Switzerland; 2014.
19. UNAIDS. 2013 Report in the global AIDS epidemic.
20. Murray CJ, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, Roberts DA, *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384:1005-70.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS. Brasília; 2013.
22. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms of viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:665-08.
23. Bailey J, Blankson JN, Wind-Rotolo M, Siliciano RF. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(4):470-76.
24. Miedema F, Hazenberg MD, Tesselaar K, Van Baarle D, Boer RJ, Borghans JA. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Front Immunol.* 2013;4:1-14.
25. Saksena NK, Wu JQ, Potter SJ, Wilkinson J, Wang B. Human immunodeficiency virus interactions with CD8+ T lymphocytes. *Curr HIV Res.* 2008;6:1-9.
26. Hainaut M, Verscheure V, Ducarme M, Schandené L, Levy J, Mascart F. Cellular immune responses in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infected children: is immune restoration by highly active antiretroviral therapy comparable to non-progression? *Clin Exp Immunol.* 2011;165:77-84.

27. Porichis F, Kaufmann DE. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS* 2011;6:174-80.
28. Pritz T, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age. *Immunol Lett.* 2014;162:310-15
29. 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.
30. Smith MZ, Bastidas S, Karrer U, Oxenius A. Impact of antigen specificity on CD4+ T cell activation in chronic HIV-1 infection. *BMC Infect Dis.* 2013;13:100.
31. Musyoki S, Mining S, Nyongesa P. Level of CD8 T lymphocytes activation in HIV-infected pregnant women: in the context of CD38 and HLA-DR activation markers. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014;2014:715279.
32. Zhang Z, Shang H, Jiang Y, Liu J, Dai D, Diao Y, *et al.* Activation and coreceptor expression of T lymphocytes induced by highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV/AIDS patients. *Chin Med J.* 2006;119(23):1966-71.
33. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, *et al.* Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol.* 1994;95(3):436-41.
34. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Relationship between CD38 expression on peripheral blood T-cells and monocytes, and response to antiretroviral therapy: a one-year longitudinal study of a cohort of chronically infected ART-naive HIV-1+ patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007; 72(1):22-33.
35. Pandhi D, Ailawadi P. Initiation of antiretroviral therapy. *Indian J Sex Transm Dis.* 2014;35(1)1-11.
36. Kinch MS, Patridge E. An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: HIV/AIDS drugs. *Drug Discov Today.* 2014;19(10):1510-13.
37. Broder S. Twenty-five years of translational medicine in antiretroviral therapy: promises to keep. *Sci Transl Med.* 2010;2(39):39ps33.
38. Durand MC, Blankson JN, Siliciano RF. Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol.* 2012;33(11):554-62.
39. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 2013;10(4):279-90.
40. Serrano-Villar S, Gutiérrez C, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Díaz L, Fernández MA, *et al.* The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T cell activation despite long-term viral suppression. *J Infect.* 2013;66(1):57-66.

41. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee AS, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, *et al.* HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004078.
42. Pinzone MR, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. HIV RNA suppression and immune restoration: can we do better? *Clin Dev Immunol.* 2012;2012(515962):1-12.
43. Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Tan AT, Fink K, Ooi EE, *et al.* Contribution of herpesvirus specific CD8 T cells to antiviral T cell response in humans. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001051.
44. Ceron DS. Cytomegalovirus infection: the point in 2001. *HIV Med.* 2001;2(4):255-59.
45. Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol.* 2004;65(5):500-06.
46. Springer KL, Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(3):582-86.
47. Michalopoulos N, Triantafillopoulou K, Beretouli E, Laskou S, Papavramidis TS, Pliakos I, *et al.* Small bowel perforation due to CMV enteritis infection in na HIV-positive patient. *BMC Res Notes.* 2013;6:45.
48. Brantsaeter AB, Johannessen A, Holberg-Petersen M, Sandvik L, Naman E, Kivuyo SL, *et al.* Cytomegalovirus viremia in dried blood spots is associated with na increased risk of death in HIV-infected patients: a cohort study from rural Tanzania. *Int J Infect Dis.* 2012;16(12):879-85.
49. Terrazzini N, Kern F. Cell-mediated immunity to human CMV infection: a brief overview. *F1000 Prime Rep.* 2014;6:28-6.
50. Stone SF, Price P, French MA. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):585-88.
51. Singh KP, Howard JL, Wild SP, Jones SL, Hoy J, Lewin SR. Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4+ T cell recovery. *Clin Immunol.* 2007;124(2):200-06.
52. Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, *et al.* CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol.* 2004;173(4):2410-18.

53. Ling PD, Vilchez RA, Keitel WA, Poston DG, Peng RS, White ZS, *et al.* Epstein-Barr Virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2003;37(9):1244-49.
54. Piriou E, Jansen CA, Dort KV, Cuyper ID, Nanlohy NM, Lange JMA, *et al.* Reconstitution of EBV latente but not lytic antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells after HIV treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol.* 2005;175:2010-17.
55. Petrara MR, Cattelan AM, Zanchetta M, Sasset L, Freguja R, Gianesin K, *et al.* Epstein-Barr Virus load and imune activation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Virol.* 2012;53(3):195-200.
56. Haas A, Rehr M, Graw F, Rusert P, Bossart W, Kuster H, *et al.* HIV-1 replication activates CD4+ T cells with specificities for persistente herpes viroses. *EMBO Mol Med.* 2010;2(6):231-44.
57. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: na update. *Retrovirology.* 2013;10:67-104.
58. Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M, *et al.* HLA-DR+ CD38+ CD4+ T lymphocytes have elevated CCR5 expression and produce the majority of R5-tropic HIV-1 RNA *in vivo*. *J Virol.* 2011;85(19):10189-200.
59. Tanaka LF, Latorre MD, Silva AM, Konstantyner TC, Mendes EC, Marques HH. Poor diet quality among Brazilian adolescents with HIV/AIDS. *J Pediatr (Rio J).* 2014;S0021-7557(14)00151.
60. Suttajit M. Advances in nutrition support for quality of life in HIV+/AIDS. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16:318-22.
61. Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalskia E, Frederick T, Landay A, *et al.* Association of HIV clinical disease progression with profiles of early imune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS.* 2013; 27(9):1473-81.
62. Fogli M, Iaria M, Foca E, Giagulli C, Caccuri F, Maggi F, *et al.* For timing of HAART is less more? CD4+/CD8+ ratio and CD4+ percentage as surrogate markers for more complex immunological features. *New Microbiol.* 2014;37(1):75-80.
63. Cockerham LR, Siliciano JD, Sinclair E, O'Doherty U, Palmer S, Yukl SA, *et al.* CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. *PLoS One.* 2014;9(10):e110731.
64. Wang X, Ho WZ. Drugs of abuse and HIV infection/replication: implications for mother-fetus transmission. *Life Sci.* 2011;88(21-22):972-79.
65. Reynolds JL, Mahajan SD, Sykes D, Nair MP. Heroin-induces differential protein expression by normal human astrocytes (NHA). *Am J Infect Dis.* 2006;2(2):49-57.

66. Selimova LM, Khanina TA, Kazennova EV, Zverev S, Pokrovskii VV, Bobkov AF. Effect of heroincontaining substances on the infectivity of the human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Vopr Virusol.* 2002;47(5):16–20.
67. Mantri CK, Dash JP, Mantri JV, Dash CCV. Cocaine enhances HIV-1 replication in CD4+ T cells by down-regulating MiR-125b. *PLoS One.* 2012;7(12):e51387.
68. Molina PE, Bagby GJ, Nelson S. Biomedical consequences of alcohol use disorders in the HIV-infected host. *Curr HIV Res.* 2014;12(4):265-75.
69. Fielding K, Koba A, Grant AD, Charalambous S, Day J, Spak C, *et al.* Cytomegalovirus viremia as a risk factor for mortality prior to antiretroviral therapy among HIV-infected gold miners in South Africa. *PLoS One.* 2011;6(10):e25571.
70. Tay-Kearney ML, Enger C, Semba RD, Royal III W, Dunn JP, Jabs DA. T cell subsets and cytomegalovirus retinitis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1997;176(3):790-94.
71. Marrazzo JM. What's new in sexually transmitted infections in the HIV care setting: focus on syphilis and gonorrhea. *Top Antivir Med.* 2014;22(5):698-701.
72. Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, Valderrama L, Trujillo R, Saravia NG, *et al.* *Treponema pallidum* elicits innate and adaptive cellular immune responses in skin and blood during secondary syphilis: a flow-cytometric analysis. *J Infect Dis.* 2007;196(6):879-87.
73. Feuth T, Arends JE, Fransen JH, Nanlohy NM, van Erpecum KJ, Siersema PD, *et al.* Complementary role of HCV and HIV in T-cell activation and exhaustion in HIV/HCV coinfection. *PLoS One.* 2013;8(3):e59302.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TERMO DE APROVAÇÃO  
“AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MARCADORES DA ATIVAÇÃO IMUNE EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESTAURAÇÃO  
DA IMUNIDADE”

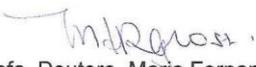
Mestranda - **Érica Farias de Oliveira**  
Orientador - **Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Professor Doutor Carlos Roberto Brites Alves  
FAMEB/UFBA

  
Prof. Doutor Lucas Pedreira de Carvalho  
PPGIm/ICS/UFBA

  
Profa. Doutora Maria Fernanda Rios Grassi  
FIOCRUZ/BAHIA

Salvador, 26 de março de 2015

  
Profa. Silvia Lima Costa  
Coordenadora - PPGIm-ICS-UFBA