

Functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients

Estado funcional dos linfócitos T CD4+ e CD8+ e seu papel na progressão lenta da infecção por HIV em pacientes pediátricos

Miguel Antonio Alfonzo¹, Alexandra Diaz², Luigina Siciliano³,
Maria Graciela López³, Alida Hung¹, Juan Felix Garcia³

Resumo

Objetivo: Avaliar o estado funcional dos linfócitos T CD4+ e CD8+ de pacientes pediátricos venezuelanos infectados pelo HIV-1.

Métodos: As crianças foram agrupadas como progressoras rápidas (PRs) ou progressoras lentas (PLs), com base no quadro clínico. Para determinar a funcionalidade dos linfócitos T CD4+ e CD8+, foram utilizadas técnicas de citometria de fluxo e caracterizados parâmetros de funcionalidade dessas células por meio de testes *ex vivo* como expressão de CD95/Fas e de CD127 e frequência de apoptose. Além disso, determinamos, em células mononucleares de sangue periférico, a proliferação do HIV e a produção de interleucina-10 (IL-10), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interferon gama (IFN- γ), e também estimamos o IFN- γ intracelular em células T CD4+.

Resultados: Nossos resultados indicam que vários mecanismos moleculares e celulares dos linfócitos T CD4+ e CD8+ tiveram piora nos PRs em comparação com PLs e controles. Ambos os tipos de linfócitos T dos PRs apresentaram aumento na expressão de CD95/Fas ($p < 0,01$), redução na expressão de CD127 ($p < 0,01$) e elevação na frequência de apoptose ($p < 0,01$). Além disso, as células T desses pacientes apresentaram diminuição na capacidade de proliferação mitogênica ($p < 0,05$), redução na porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ ($p < 0,05$) e menor capacidade de produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ ($p < 0,01$) em comparação com PLs e controles.

Conclusão: Nossos resultados indicam que o declínio das respostas moleculares e celulares dos linfócitos T está relacionado a uma rápida progressão e à diminuição na resistência à infecção pelo HIV-1 em crianças.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(2):161-8: HIV, progressão, pacientes pediátricos, função imunológica.

Abstract

Objective: To evaluate simultaneously the functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from Venezuelan HIV-1-infected pediatric patients.

Methods: Children were assigned to subgroups of rapid progressors (RPs) and slow progressors (SPs), based on clinical features. To determine the degree of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte functionality, flow cytometry techniques were used, and diverse parameters of the functionality of these cells were characterized by *ex vivo* tests, such as expression of CD95/Fas and CD127, and frequency of apoptosis. In addition, we determined, in cultured peripheral blood mononuclear cells, HIV-specific proliferation and the production of interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ), besides measuring intracellular IFN- γ in CD4+ T cells.

Results: Our results indicate that several molecular and cellular mechanisms of CD4+ and CD8+ T lymphocytes are deteriorated in RPs in comparison with SPs and controls. Indeed, both types of T lymphocytes from RPs exhibited an increased expression of CD95/Fas ($p < 0.01$), a significantly reduced expression of CD127 ($p < 0.01$), and an augmented frequency of apoptosis ($p < 0.01$). Furthermore, T cells from these patients displayed a diminished capacity of mitogen proliferation ($p < 0.05$), a reduced percentage of IFN- γ producing CD4+ T lymphocytes ($p < 0.05$), and a smaller capacity of IL-10, TNF- α and IFN- γ production ($p < 0.01$) in comparison with SP and control patients.

Conclusion: Our findings indicate that the decline of the normal T lymphocyte molecular and cellular responses is related to a rapid progression and a decreased resistance to HIV-1 infection in children.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(2):161-8: HIV, progression, pediatric patients, immune function.

1. PhD. Universidad Central de Venezuela, Ciencias Fisiológicas, Caracas, Distrito Capital, Venezuela.
2. Graduate Student. Universidad Central de Venezuela, Ciencias Fisiológicas, Caracas, Distrito Capital, Venezuela.
3. MD. Hospital de Niños J. M. de los Ríos, Servicio de Infectología, Caracas, Distrito Capital, Venezuela.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Apoio financeiro: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, CDCH-UCV (subsídio nº 09-00-5810-2005).

Como citar este artigo: Alfonzo MA, Diaz A, Siciliano L, López MG, Hung A, Garcia JF. Functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(2):161-8.

Artigo submetido em 12.10.11, aceito em 18.01.12.

<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2183>

Introdução

A infecção por HIV é responsável por altos índices de morbimortalidade em crianças, representando mais de 20% das mortes relacionadas à infecção pelo HIV-1 no mundo¹. Um quarto das crianças infectadas por transmissão vertical nascidas em países desenvolvidos evoluem para doença grave ou óbito no primeiro ano de vida sem uma terapia antirretroviral eficaz, proporção que aumenta para a metade aos 5 anos de idade². Foi identificado um comportamento clínico bimodal nas crianças infectadas por transmissão vertical. Assim, 10 a 30% dos pacientes, chamados de progressores rápidos (PRs), começam a apresentar os sintomas da AIDS nos primeiros meses devida (no período de 1 ano), enquanto que um grupo minoritário de pacientes, denominados progressores lentos (PLs), permanece assintomático por vários anos e pode inclusive chegar à idade escolar³⁻⁵. Embora alguns fatores imunológicos e virológicos^{6,7} associados à progressão para a doença tenham sido identificados, tais como sintomas clínicos (hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia manifestadas nos primeiros anos de vida)^{6,8}, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à não progressão em crianças infectadas pelo HIV-1 ainda não foram bem compreendidos.

A taxa de progressão para doença na infecção pelo HIV-1 varia consideravelmente entre os indivíduos, devido a uma complexa interação entre fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro e o potencial patogênico do vírus^{9,10}. Em crianças, devemos considerar vários fatores: a relativa imaturidade imunológica, a destruição do timo mediada pelo HIV-1 em um momento de timopoiese ativa, e o compartilhamento de antígenos leucocitários humanos de classe I entre a mãe e o bebê¹¹⁻¹³. Poucos estudos investigaram o estado funcional dos linfócitos T CD4+ e CD8+ em PRs e PLs¹¹ com o objetivo de estabelecer relações entre evolução clínica e aspectos imunológicos. A contribuição relativa dos fatores imunológicos do hospedeiro para retardar a progressão para doença em crianças venezuelanas ainda não foi investigada em detalhes. Na tentativa de estudar esses mecanismos, decidimos analisar uma coorte de crianças venezuelanas infectadas pelo HIV-1, classificadas, de acordo com o quadro clínico, no grupo dos PRs ou dos PLs, a fim de caracterizar diversos parâmetros das células T CD4+ e CD8+ por meio de testes *ex vivo*, tais como expressão de CD95/Fas (receptor de morte) e de CD127 (receptor de sinais de sobrevivência) e frequência de apoptose. Além disso, determinamos, em uma cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) obtidas desses pacientes, os níveis de proliferação do HIV e de produção de interleucina-10 (IL-10), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interferon gama (IFN- γ), e também estimamos os níveis de IFN- γ intracelular em células T CD4+. Todas essas atividades biológicas das células T foram comparadas àquelas observadas em crianças saudáveis do mesmo hospital. Essas análises podem trazer informações importantes sobre a patogênese do HIV-1 e sobre o papel da imunidade protetora na infecção pelo HIV-1 em bebês.

Materiais e métodos

Pacientes e delineamento do estudo

Recrutamos 15 crianças venezuelanas infectadas pelo HIV-1 provenientes do Hospital J. M. de Los Ríos (Caracas, Venezuela), que haviam sido infectadas pelas mães soropositivas intrauterinamente, durante o parto ou através da amamentação. Todos os pacientes eram virgens de tratamento com terapia antirretroviral de alta potência antes do início do estudo. Foram utilizados 5 mL de amostras de sangue total para a realização de todos os testes. Esse grupo pediátrico foi dividido em seis crianças PL se nove PRs, que eram monitoradas no centro de saúde. O grupo dos PLs apresentou mediana de 25,5 meses de idade (19-36 meses), e incluiu pacientes com ou sem sinais ou sintomas moderados associados ao HIV-1 (classificados nos estágios N2 ou A2, de acordo com a classificação dos Centers for Disease Control and Prevention, CDC). O grupo dos PRs apresentou mediana de 12 meses de idade (3-26 meses) e um início de manifestações clínicas graves (categoria C dos CDC) e/ou imunossupressão significativa (categoria 3 dos CDC) no primeiro ano de vida. Onze bebês HIV negativos do Serviço de Crianças Saudáveis do mesmo hospital participaram como controles. O grupo controle apresentou mediana de 19 meses de idade (8-36 meses). Este estudo foi aprovado pelo conselho de bioética do hospital, e todos os pais assinaram um termo de consentimento informado.

Medição da carga viral

Os níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 RNA foram estimados por meio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa, utilizando-se um *kit* comercial (Amplicor HIV Monitor Test, Roche Molecular Systems, EUA), com um limite médio de detecção de 2,3 log 10 cópias/mL.

Imunofenotipagem celular

As células T circulantes e seus subconjuntos foram determinados em amostras de sangue total por marcação fluorescente padrão, seguida de análise de citometria de fluxo utilizando esferas fluorescentes como padrão interno (Beckman, Coulter, EUA) e anticorpos monoclonais comerciais (MoAbs, do inglês *monoclonal antibodies*) da empresa BD Biosciences, EUA. Foram utilizados os seguintes MoAbs: anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD8-APC, anti-CD45RA-FITC e anti-CD45RO-PE. Resumidamente, 100 μ L das amostras de sangue foram incubados com MoAbs conjugados por 30 min em gelo, ao abrigo da luz, e então lavados. Os glóbulos vermelhos foram lisados com a solução de lise FACS Lysing Solution (BD Biosciences, EUA) e as amostras foram imediatamente submetidas a citometria de fluxo no aparelho BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Os eventos foram reunidos em uma região de linfócitos vivos com base em padrões de dispersão frontal e lateral e analisados utilizando o programa BD CellQuest (BD Biosciences, EUA).

Análise da expressão de Fas (CD95) e de IL-7R α (CD127)

Para avaliar a expressão de Fas (CD95) e de IL-7R α (CD127) na superfície celular dos linfócitos T CD4+ e CD8+, foi utilizado o método de imunofluorescência direta com MoAbs de camundongo conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou com fitoeritrina (PE), respectivamente. Em resumo, 100 μ L de sangue total foram incubados com os anticorpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC ou anti-CD8-APC, anti-CD95-FITC e anti-CD127-PE por 15 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas e os glóbulos vermelhos lisados utilizando-se a solução de lise FACS Lysing Solution (BDBiosciences, EUA). Por fim, as células foram lavadas e analisadas imediatamente em um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur Flow Cytometer, BD Biosciences, EUA). Anticorpos irrelevantes de camundongo com os mesmos isotipos foram utilizados como controles negativos para determinar a fluorescência de fundo. A expressão do antígeno foi quantificada por citometria de fluxo como a porcentagem de células positivas em uma determinada população de células.

Deteção de apoptose

A apoptose espontânea foi avaliada em amostras frescas de sangue total. As células foram marcadas com anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio, utilizando o *kit* Annexin V Apoptosis Detection *kit* I (BD Pharmingen, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O grau de apoptose foi quantificado por citometria de fluxo como a porcentagem de células positivas para anexina V em uma determinada população de células. Tanto as células vivas quanto as apoptóticas foram incluídas na análise, e os detritos celulares foram excluídos.

Ensaio in vitro da proliferação de linfócitos

CMSPs foram isoladas de amostras de sangue tratadas com ácido etilenodiaminotetracético através de centrifugação por gradiente de densidade (Histopaque, Sigma, EUA). Essas CMSPs foram então crescidas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço em 0,2 mL de RPMI-1640 (Gibco, Life Technology, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de sulfaço de streptomina (todos da empresa GIBCO, EUA) na presença dos seguintes estímulos: 5 μ g/mL de fito hemaglutinina (PHA, Sigma, EUA) e um envelope do HIV-1 (HIV-1 Env) sobreposto a peptídeos 20-mer (cada peptídeona concentração de 1 μ g/mL) (BD Biosciences, EUA). As células não estimuladas foram utilizadas como controle. O nível de proliferação dos leucócitos foi determinado após 72 h de cultura pela incorporação de bromo de oxiuridina (BrdU, Sigma, EUA), que foi adicionada nas últimas 4-5 h de cultura. As células foram lavadas, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-BrdU conjugado com FITC, anti-CD3-PerCP e anti-CD4-APC (BD Biosciences, EUA) por 30 min. Foi realizada mais uma lavagem, e as células foram ressuspensas em 1% de formaldeído, submetidas a citometria de fluxo no aparelho BD FACSCalibur (BD

Biosciences, EUA) e analisadas utilizando o programa BD CellQuest (BD Biosciences, EUA).

Medição da produção de citocinas

A produção de citocinas foi determinada em sobrenadantes de CMSPs cultivados por 72 h na presença de PHA ou de um conjunto de peptídeos 20-mer sobrepostos ao HIV-1 Env, como descrito acima. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C até a realização da análise. Foi utilizado o *kit* Cytometric Bead Array (BD Biosciences, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A metodologia do *kit* combina os princípios dos imunoenaios "sanduíche" com a capacidade da citometria de fluxo de determinar as características de múltiplas partículas, então pudemos determinar os níveis de três citocinas humanas (IL-10, TNF- α e IFN- γ) simultaneamente em uma única amostra de sobrenadante.

Marcação intracelular de citocinas

A produção de IFN- γ como uma resposta específica das células TCD4+ contra o HIV-1 foi quantificada por marcação intracelular de citocinas. Resumidamente, 5×10^5 CMSPs foram estimuladas com PHA (5 μ g/mL) ou com um conjunto de peptídeos 20-mer sobrepostos pelo HIV-1 Env (cada peptídeona concentração de 1 μ g/mL) (BDBiosciences, EUA). Após 72 h, foram adicionados 10 μ g/mL de brefeldina A (Sigma, EUA) para evitar a exportação de citocinas intracelulares. Depois de lavadas, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-IFN- γ conjugado com FITC, anti-CD3-PerCP e anti-CD4-APC (todos da empresa BD Biosciences, EUA). As células foram posteriormente lavadas e ressuspensas em 1% de formaldeído. As amostras foram submetidas a citometria de fluxo com o aparelho BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA) e as células T CD4+ foram reunidas para análise por meio do programa BD CellQuest (BD Biosciences, EUA).

Análise estatística

Os dados experimentais são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças (valores de p) foram avaliadas por meio do teste bicaudal e não paramétrico U de Mann-Whitney e do teste bicaudal *t* de Student para os dados com distribuição normal. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Subconjuntos de células T e carga viral em crianças infectadas pelo HIV

As subpopulações de linfócitos T e as cargas virais dos grupos analisados estão resumidas na Tabela 1. Observou-se uma diminuição significativa nos valores absolutos e percentuais da contagem de células T CD4+ em ambos os grupos de pacientes infectados pelo HIV em comparação com os bebês saudáveis ($p < 0,01$). Embora os PLs tenham demonstrado uma tendência a apresentar valores absolutos mais elevados de linfócitos T CD4+ se comparados aos PRs, a diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, a porcentagem de células T CD8+ de ambos os grupos de

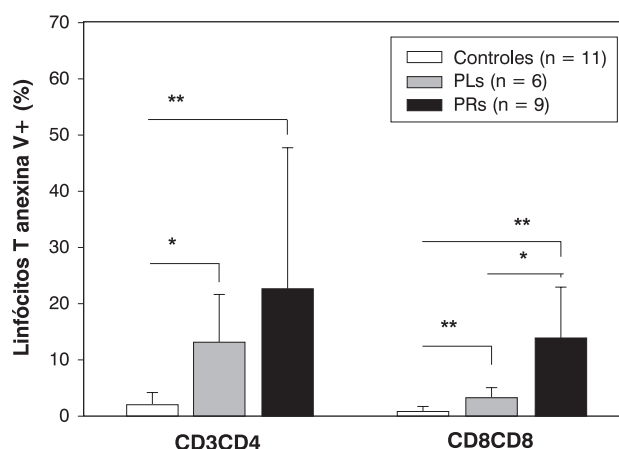
pacientes com HIV apresentou valores mais elevados do que os do grupo controle, mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Da mesma forma, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número absoluto de linfócitos T CD8+ entre os PLs e os PRs. Em relação à carga viral, não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos de pacientes com HIV, embora os valores fossem mais elevados nos PRs se comparados aos dos PLs (Tabela 1).

Expressão de IL-7R α (CD127) e de Fas (CD95) nos subconjuntos de células T

Analizamos a expressão *ex vivo* de CD95 em linfócitos T CD4+ e CD8+, e os resultados são apresentados na Tabela 1. Os pacientes infectados pelo HIV apresentaram valores mais elevados com relação aos do grupo controle, e as diferenças entre os PRs e o grupo controle foram estatisticamente significativas. Avaliamos as atividades das células T, tais como a porcentagem da expressão *ex vivo* da subunidade IL-7R α (CD127) em linfócitos T CD4+ e CD8+. Pode-se observar na Tabela 1 que houve uma diminuição significativa na expressão do receptor nos PRs em relação ao grupo controle, enquanto que os PLs apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle.

Apoptose espontânea em linfócitos T CD4+ e CD8+ de pacientes infectados pelo HIV e controles

Determinamos a frequência de morte celular associada à apoptose espontânea. Ambos os grupos de pacientes infectados apresentaram valores significativamente elevados de apoptose espontânea de células T CD4+ e CD8+ se comparados aos do grupo de crianças saudáveis. É digno de nota o fato de que os PRs apresentaram os maiores valores de células apoptóticas, embora contassem com uma população maior de células T CD8+ se comparados aos PLs (Figura 1).



* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle.
PLs = progressores lentos; PRs = progressores rápidos.

Figura 1 - Apoptose espontânea *ex vivo* em células TCD4+ e CD8+. Os dados apresentam a porcentagem de células anexina V+/PI- (apoptóticas precoces) nas populações de linfócitos CD4+ e CD8+ reunidas. Cada valor representa a média \pm desvio padrão. Todos os testes foram realizados duas vezes em cada amostra

Resposta proliferativa dos linfócitos a mitógenose específica contra o vírus

Embora ambos os grupos de pacientes tivessem apresentado um aumento significativo na proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ na presença de PHA se comparada à ausência de estímulo, as respostas proliferativas nunca alcançaram os valores do grupo controle, que são significativamente mais elevados (Figura 2). Por sua vez, quando as CMSPs foram cultivadas na presença de antígenos virais específicos, não foi observado aumento importante na proliferação nem dos linfócitos T CD4+ nem dos linfócitos T CD8+ em pacientes

Tabela 1 - Cargaviral, subpopulações de linfócitos e expressão de CD95 e CD127 em bebês infectados pelo HIV-1 e saudáveis

Grupos	Células T CD4+				Células T CD8+				Carga viral (cópias/mL)
	Células/ μ L	%	CD95	CD127	Células/ μ L	%	CD95	CD127	
Controle	2.966 \pm 1.583	57,3 \pm 23,7	18,5 \pm 11,4	33,6 \pm 10,2	1.033 \pm 567	31,7 \pm 11,8	9,6 \pm 10,0	22,6 \pm 20,1	-
PLs	598 \pm 468*	24,4 \pm 17,3*	26,5 \pm 16,6	30,1 \pm 29,5	1.250 \pm 1.053	54,2 \pm 14,4	15,3 \pm 9,0	21,8 \pm 28,0	53.621 \pm 39.757
PRs	465 \pm 29*	24,8 \pm 14,8*	37,8 \pm 14,5*	11,6 \pm 11,0*	1.011 \pm 571	56,9 \pm 17,2	38,6 \pm 27,7*	9,1 \pm 4,3*	355.529 \pm 199.472

PL = progressores lentos; PR = progressores rápidos.

* $p < 0,01$ versus controle.

Os valores absolutos, percentuais e de carga viral são expressos como média \pm desvio padrão. Todos os testes experimentais foram realizados uma única vez. Diferenças (valores de p) foram avaliadas utilizando-se o teste bicaudal e não paramétrico U de Mann-Whitney.

infectados pelo HIV, apresentando valores de proliferação semelhantes aos dos controles (Figuras 2A e 2B).

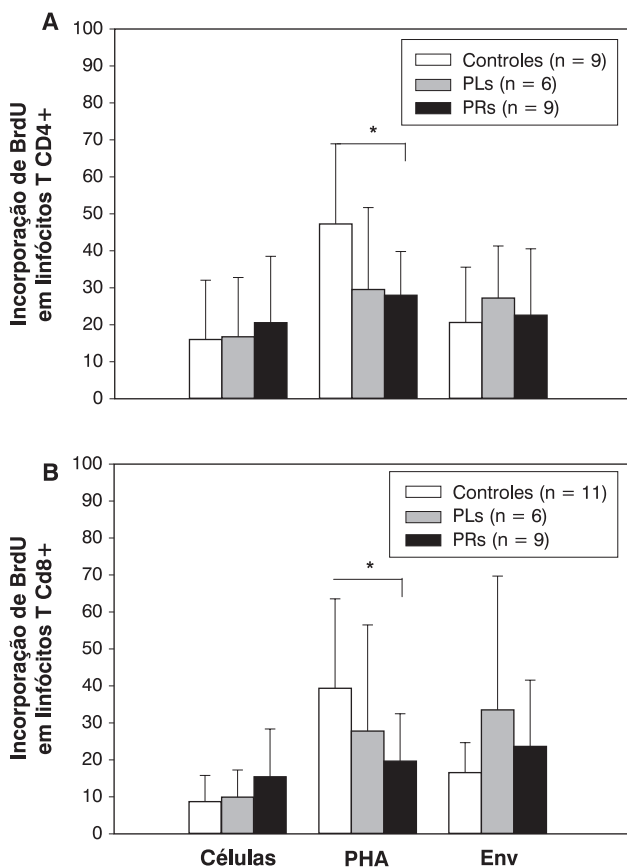
Produção de citocinas em CMSPs de pacientes com HIV

CMSPs dos dois diferentes grupos de infectados pelo HIV (PLs e PRs) foram cultivadas por 72 h em diferentes condições de estímulo. A produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ foi quantificada (Figura 3). Os resultados indicaram que a produção espontânea de IL-10 (células não estimuladas) foi menor em ambos os grupos de pacientes infectados pelo HIV se comparada à do grupo controle, mas as diferenças não foram significativas. Na presença de PHA, a produção de IL-10 foi significativamente menor em ambos os grupos de pacientes na comparação com o grupo controle ($p < 0,01$), enquanto que a produção de IFN- γ e TNF- α foi significativamente menor apenas nos PRs, se comparados aos controles

($p < 0,01$). Na presença de peptídeos de Env, a produção dessas citocinas em ambos os grupos de pacientes não foi alterada, e os valores foram semelhantes aos observados no grupo controle e em células não estimuladas.

Produção de IFN- γ em T CD4+ de controles e de crianças infectadas pelo HIV

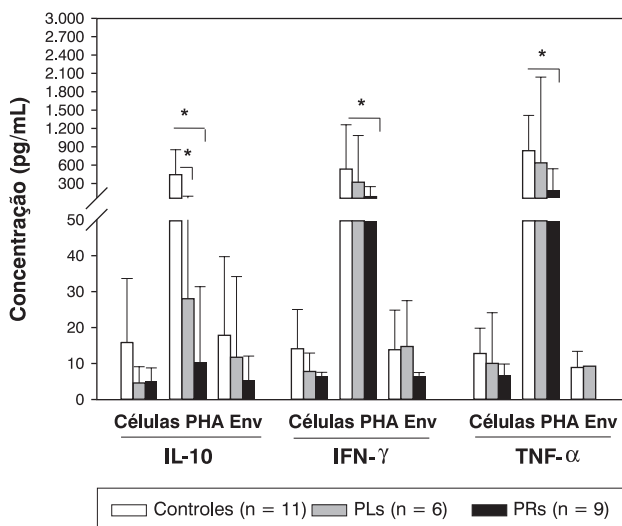
Os linfócitos T CD4+ são a fonte principal de produção de IFN- γ , que é uma das mais importantes citocinas antivirais na infecção pelo HIV-1. Analisamos a capacidade de produção *in vitro* dessa citocina pelas células T CD4+ em pacientes pediátricos, determinada no compartimento intracelular. Os resultados são apresentados na Figura 4. Observou-se que, nas células cultivadas na presença de PHA, a produção dessa citocina aumentou significativamente em todos os grupos analisados. No entanto, a porcentagem de células TCD4+ produtoras de IFN- γ em ambos os grupos de pacientes infectados pelo HIV foram menores do que a porcentagem do grupo controle, sendo significativamente diferente nos PRs ($p < 0,01$). A presença do antígeno viral (Env) não modificou a produção dessa citocina em nenhum dos grupos analisados, demonstrando valores semelhantes àqueles relatados na ausência de estímulos antigênicos. No entanto, os PLs apresentaram uma tendência a apresentar valores mais elevados em comparação aos controles.



* $p < 0,05$ versus células não estimuladas (atividade basal).

BrdU = bromodeoxiuridina; CMSPs = células mononucleares de sangue periférico; PHA = fitohemaglutinina; PLs = progressores lentos; PRs = progressores rápidos.

Figura 2 - Proliferação de linfócitos. CMSPs foram cultivadas por 72 h na presença de PHA, antígenos virais (Env) ou apenas em meio de cultura (células não estimuladas). A proliferação dos linfócitos T CD4+ (A) e CD8+ (B) foi estimada como a porcentagem de incorporação de BrdU. Cada valor representa a média \pm desvio padrão. Todos os ensaios de proliferação foram realizados em triplicata



* $p < 0,01$ versus células não estimuladas.

CMSPs = células mononucleares de sangue periférico; IFN- γ = interferon gama; IL-10 = interleucina-10; PHA = fitohemaglutinina; PLs = progressores lentos; PRs = progressores rápidos.

Figura 3 - Produção de citocinas (IL-10, TNF- α e IFN- γ) (pg/mL) por CMSPs isoladas de bebês infectados pelo HIV e controles. A quantificação das citocinas foi realizada em sobrenadantes de CMSPs cultivados por 72 h na presença de PHA, antígenos virais (Env) ou apenas em meio de cultura (células não estimuladas). Cada valor representa a média \pm desvio padrão. Todos os testes para citocina foram realizados em triplicata

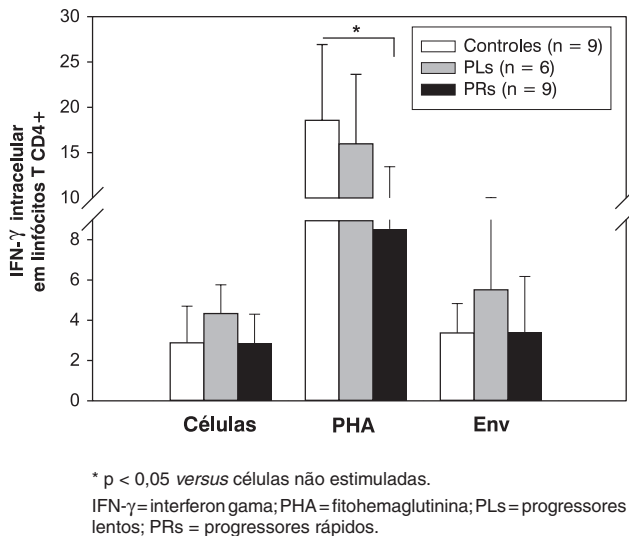


Figura 4 - Marcação intracelular de citocinas de linfócitos T CD4+. O nível de IFN- γ intracelular foi quantificado em linfócitos T CD4+ após estímulo por 72 h com PHA, antígenos virais (Env), ou apenas com meio de cultura (células não estimuladas). Cada valor representa a média \pm desvio padrão. Todas as marcações de citocinas foram realizadas em triplicata

Discussão

Nossa pesquisa baseou-se na hipótese de que a funcionalidade das células T tem papel importante na progressão das crianças infectadas pelo HIV por transmissão vertical, o que pode explicar as diferenças no quadro clínico entre PRs e PLs. Na tentativa de examinar essa hipótese, realizamos um estudo no qual algumas respostas biológicas dos linfócitos T CD4+ e CD8+ foram avaliadas simultaneamente por meio de análise *ex vivo* e *in vitro* utilizando PHA e antígenos virais (Env) para analisar a funcionalidade das células T de pacientes pediátricos venezuelanos infectados pelo HIV com diferentes estados clínicos, agrupados em PRs e PLs, e comparar essas atividades biológicas com as observadas em células T de crianças venezuelanas saudáveis.

Nossos resultados demonstram que os PRs apresentaram maior perda de linfócitos CD4+ no sangue e níveis inferiores de linfócitos T CD8+ em comparação com os PLs. Essas alterações são consequência da infecção pelo HIV^{14,15}, que torna as células T ativadas mais suscetíveis à apoptose mediada por Fas/Fas ligante¹⁶, evento correlacionado com a progressão para doença, como descrito¹⁷. Curiosamente, os PRs apresentaram uma maior proporção de células T CD4+ e CD8+ apoptóticas em comparação com os PLs.

Para a avaliação das atividades biológicas das células T, a expressão de Fas/CD95 é um parâmetro importante de apoptose. Dessa forma a expressão *ex vivo* de Fas/CD95 observada nos linfócitos T CD4+ e CD8+ foi maior nos PRs do que nos PLs. Curiosamente, houve diferença na carga viral entre os dois grupos de pacientes com HIV, sendo maior nos PRs do que nos PLs. Possivelmente, a menor expressão de CD95

em ambos os tipos de linfócitos T nos PLs teve como causa a menor carga viral desses pacientes, e consequentemente demonstra uma frequência menor de apoptose nessas células, o que foi descrito em adultos infectados pelo HIV¹⁸.

A IL-7 é uma citocina importante para o desenvolvimento e a manutenção eficientes das subpopulações de linfócitos T. Essa citocinase liga à subunidade alfa do seu receptor (IL-7R α), localizado na superfície dos linfócitos T e Be das células *natural killer*^{19,20}. Demonstramos que a expressão de IL-7R α tanto no linfócito T CD4+ quanto no CD8+ diminuiu significativamente no grupo dos PRs, enquanto que os PLs apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle. Esse achado experimental pode sugerir que as células dos PLs apresentam uma maior probabilidade de sobrevivência, e, portanto, esses pacientes são capazes de manter sua imunidade celular de forma mais eficaz do que os PRs. Para corroborar essa suposição, foram encontrados níveis maiores de linfócitos T CD4+ e CD8+ e uma menor frequência de apoptose nesses linfócitos em PLs. Nesse sentido, nossos resultados são consistentes com os relatados em estudos prévios, os quais demonstram que a expressão de IL-7R α está inversamente correlacionada à ativação imune e à apoptose e positivamente correlacionada com a contagem de células T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV²¹. A perda da expressão de IL-7R α induzida pela ativação imune pode diminuir a produção de Bcl-2 e de Bcl-xl, tornando as células mais suscetíveis à apoptose²². Nossos dados corroboram a ideia de que uma menor expressão de IL-7R α pode estar relacionada a uma maior frequência de apoptose nessas células T.

Aprofundando-nos em mais mecanismos moleculares, investigamos vários mecanismos efetores dos linfócitos T CD4+ e CD8+, tais como a produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ pelas CMSP se as respostas proliferativas desses linfócitos T a mitógenos ou antígenos virais. De acordo com nossa análise, os PRs demonstraram uma maior deterioração da capacidade funcional das células T CD4+ e CD8+ se comparados aos PLs. De fato, encontramos nos PRs uma perda parcial expressiva da resposta proliferativa ao PHA nos linfócitos T CD4+ e CD8+, uma menor produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ pelas CMSP se uma diminuição na porcentagem de células T CD4+ produtoras de IFN- γ , determinada por marcação intracelular de citocinas. A maior perda da capacidade de proliferação das células T na presença de PHA em PRs está de acordo com resultados obtidos anteriormente, os quais demonstram que adultos não progressores apresentam uma maior capacidade de proliferação das células T se comparados aos PRs²³. Curiosamente, todas essas respostas efetoras se perderam completamente em ambos os grupos de pacientes quando suas CMSPs foram cultivadas na presença do antígeno viral (Env). Essa falta de resposta pode ser explicada pelo efeito inibidor das proteínas virais e/ou pela perda de clones específicos contra o HIV durante a progressão da infecção^{24,25}, ou pelo fato de que a infecção viral afetou as linhagens de células T no timo e destruiu a capacidade de produção de clones anti-HIV, como descrito¹¹⁻¹³. Esse achado experimental requer maiores investigações para identificar os mecanismos moleculares responsáveis por essa falta de resposta por parte das crianças infectadas pelo HIV frente ao antígeno viral (Env).

Tradicionalmente, tem se estabelecido que, durante a infecção pelo HIV, ocorre uma alteração nas respostas imunológicas Th1/Th2. A resposta Th1 (geralmente uma resposta antiviral) diminui conforme a doença evolui, enquanto que a resposta Th2 (associada a uma menor resposta antiviral) aumenta, comprometendo a proteção em pacientes infectados pelo HIV²⁶. Assim, a menor produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ encontrada em nossos PRs pode comprometer significativamente a imunidade das suas células T, pois sabe-se que a IL-10 pode induzir o recrutamento, a atividade citotóxica e a proliferação das células T CD8+²⁷, e que TNF- α e IFN- γ também são necessários para acarretar e manter respostas antivirais como as descritas para os linfócitos T CD8+ citotóxicos, o que depende da presença dessas citocinas para acarretar mecanismos efetores²⁸. Foram descritos achados semelhantes associados a esse desequilíbrio entre Th1/Th2 em crianças PRs, o que pode comprometer significativamente a imunidade das suas células T. Por fim, achados semelhantes, tais como a perda gradual da expressão de IFN- γ em células T CD8+ foi observada em adultos que estão progredindo para a AIDS²⁹, e estudos recentes³⁰ indicam que pacientes com HIV-1 que apresentam um melhor manejo da doença (conhecidos como não progressores por longo tempo) têm um aumento significativa na população de células T CD8+ se comparados aos PRs.

Em resumo, descobrimos que o estado funcional das células T CD4+ e CD8+ é diferente entre pacientes pediátricos venezuelanos infectados pelo HIV. Assim, crianças infectadas pelo HIV com progressão rápida para a doença (PRs) apresentaram um maior comprometimento da imunidade funcional do que os bebês nos quais a doença evoluía lentamente (PLs). A identificação dos mecanismos moleculares e celulares que contribuem para a manutenção das respostas imunes protetoras é um importante pilar para a terapêutica e o desenvolvimento de vacinas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Hospital J. M. de Los Rios e de forma especial aos pacientes e aos pais das crianças que participaram deste estudo. Além disso, este trabalho foi financiado pelo Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico - Universidad Central de Venezuela, CDCH-UCV (subsídio nº 09-00-5810-2005).

Referências

- UNAIDS. UNAIDS annual report 2008: towards universal access. Geneva: UNAIDS; 2009. http://data.unaids.org/pub/Report/2009/jc1736_2008_annual_report_en.pdf. Acesso: 01/06/2009.
- Gray L, Newell ML, Thorne C, Peckham C, Levy J; European Collaborative Study. *Fluctuations in symptoms in human immunodeficiency virus-infected children: the first 10 years of life*. Pediatrics. 2001;108:116-22.
- Dickover RE, Dillon M, Gillette SG, Deveikis A, Keller M, Plaeger-Marshall S, et al. *Rapid increases in load of human immunodeficiency virus correlate with early disease progression and loss of CD4 cells in vertically infected infants*. J Infect Dis. 1994;170:1279-84.
- De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, Ruga E, Comar M, Giacca M, et al. *Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Clin Invest. 1996;97:323-30.
- Salvatori F, Masiero S, Giaquinto C, Wade CM, Brown AJ, Chieco-Bianchi L, et al. *Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in perinatally infected infants with rapid and slow progression to disease*. J Virol. 1997;71:4694-706.
- Kalish LA, McIntosh K, Read JS, Diaz C, Landesman SH, Pitt J, et al. *Evaluation of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 load, CD4 T cell level, and clinical class as time-fixed and time-varying markers of disease progression in HIV-1-infected children*. J Infect Dis. 1999;180:1514-20.
- Rich KC, Fowler MG, Mofenson LM, Abboud R, Pitt J, Diaz C, et al. *Maternal and infant factors predicting disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected infants*. Women and Infants Transmission Study Group. Pediatrics. 2000;105:e8.
- Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. European Collaborative Study. Lancet. 1991;337:253-60.
- Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, et al. *Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients*. Science. 1995;270:988-91.
- Rhodes DI, Ashton L, Solomon A, Carr A, Cooper D, Kaldor J, et al. *Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression*. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. J Virol. 2000;74:10581-8.
- Goulder PJ, Jeena P, Tudor-Williams G, Burchett S. *Paediatric HIV infection: correlates of protective immunity and global perspectives in prevention and management*. Br Med Bull. 2001;58:89-108.
- Ometto L, Bertorelle R, Mainardi M, Zanchetta M, Tognazzo S, Rampon O, et al. *Polymorphisms in the CCR 5 promoter region influence disease progression in perinatally human immunodeficiency virus type 1-infected children*. J Infect Dis. 2001;183:814-8.
- Kuhn L, Abrams EJ, Palumbo P, Bulterys M, Aga R, Louie L, et al. *Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression*. AIDS. 2004;18:1281-9.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. *CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?* Nat Med. 2002;8:319-23.
- Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. *CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults*. J Clin Invest. 1995;95:2061-6.
- Casella CR, Rapaport EL, Finkel TH. *Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing*. J Virol. 1999;73:92-100.
- Samuelsson A, Broström C, van Dijk N, Sönnnerborg A, Chiodi F. *Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection - correlation with clinical progression, viral load, and loss of humoral immunity*. Virology. 1997;238:180-8.
- Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. Nat Immunol. 2000;1:469-74.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol. 2000;1:426-32.
- Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, et al. *Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Exp Med. 2002;195:1515-22.
- Koesters SA, Alimonti JB, Wachihhi C, Matu L, Anzala O, Kimani J, et al. *IL-7/Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation*. Eur J Immunol. 2006;36:336-44.

22. Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Delfraissy JF, Thèze J. [The correlation between levels of IL-7 Ralpha expression and responsiveness to IL-7 is lost in CD4 lymphocytes from HIV-infected patients.](#) AIDS. 2007;21:101-3.
23. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. [Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.](#) Science. 1997;278:1447-50.
24. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. [The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle.](#) J Virol. 1995;69:6304-13.
25. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. [Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes.](#) Nat Med. 1995;1:129-34.
26. Clerici M, Shearer GM. [The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights.](#) Immunol Today. 1994;15:575-81.
27. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. [Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.](#) J Immunol. 1998;160:3188-93.
28. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. [Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection.](#) J Exp Med. 2005;201:1053-9.
29. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, et al. [HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors.](#) Nat Immunol. 2002;3:1061-8.
30. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. [HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells.](#) Blood. 2006;107:4781-9.

Correspondência:

Miguel Antonio Alfonso
Laboratorio de Inmunofisiologia Celular,
Universidad Central de Venezuela
Escuela de Medicina Jose M. Vargas, piso 5
Esquina San Jose, Plaza San Lorenzo
San Jose, Caracas, Distrito Capital 1010, Venezuela
Tel.: +58 212 5628610
Fax: +58 212 5628610
E-mail: miguelacho1998@hotmail.com