

Juliana Ribeiro Romeiro

Avaliação longitudinal do perfil fenotípico de leucócitos e análise do gene codificador de CCR5 do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 que progridem lentamente na infecção

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - Minas Gerais

2011

Juliana Ribeiro Romeiro

Avaliação longitudinal do perfil fenotípico de leucócitos e análise do gene codificador de CCR5 do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 que progridem lentamente na infecção

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Dra. Silvana Maria Elói Santos

Co-orientador: Dr. Jorge Andrade Pinto

Co-orientadora: Dra. Agdemir Valéria Aleixo

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - Minas Gerais

2011

R763a Romeiro, Juliana Ribeiro.
Avaliação longitudinal do perfil fenotípico de leucócitos e análise do gene codificador de CCR5 do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 que progridem lentamente na infecção [manuscrito]. / Juliana Ribeiro Romeiro. - - Belo Horizonte: 2011. 106f.: il.
Orientadora: Silvana Maria Eloi Santos.
Co-Orientador: Jorge Andrade Pinto.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Citometria de Fluxo. 2. Infecções por HIV. 3. Transmissão Vertical de Doença Infecciosa. 4. Estudos Longitudinais. 5. Criança. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Eloi. II. Pinto, Jorge Andrade. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WC 503

Avaliação longitudinal do perfil fenotípico de leucócitos e análise do gene codificador de CCR5 do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 que progridem lentamente na infecção

Juliana Ribeiro Romeiro

Nível: Doutorado

Data da defesa: 18 / 11 / 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Comissão Examinadora formada pelos Professores:

Profa. Dra. Fabiana Maria Kakehasi

Profa. Dra. Flávia Gomes Faleiro Ferreira

Profa. Dra. Mariléia Chaves Andrade

Profa. Dra. Taciana de Figueiredo Soares

Profa. Dra. Agdemir Valéria Aleixo - Co-orientador

Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto - Co-orientador

Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Francisco José Penna

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Área de Concentração em Propedêutica Complementar

COORDENADOR: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

SUB-COORDENADOR: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

MEMBROS DO COLEGIADO

Profª. Dra. Helenice Gobbi

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Profª. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes

Profª. Dra. Silvana Maria Elói Santos

Izabela Ferreira Amorim (Representante Discente Titular)

Letícia Figueiredo (Representante Discente Suplente)

Dedico este trabalho ao meu filho, Felipe, que me ensinou a pureza do amor materno.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Silvana Maria Elói Santos, não só pela orientação, mas também pela oportunidade, colaboração, ensinamentos, paciência e carinho.

Ao Dr. Jorge Andrade Pinto, pela orientação, ensinamentos e oportunidades proporcionadas.

A Dra. Agdemir Valéria Aleixo, pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade.

A Maria Luiza por todo tempo dedicado, ensinamentos, companheirismo e a grande amizade.

À colega Marcelle Marie Martins Maia pela ajuda na formatação do banco de dados e na análise dos resultados.

A Letícia pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A Bete pela oportunidade proporcionada e grande amizade.

Ao Manoel pela grande colaboração nas coletas sanguíneas.

Ao Jéferson e Jerry pela paciência, carinho e auxílio técnico.

Ao meu marido, Léo, pela paciência, amor e carinho com que acompanhou cada fase deste trabalho. Agradeço pelo apoio e incentivo constantes, fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Agradeço pelo auxílio em todas as etapas desta pesquisa.

Ao meu filho Felipe, que veio dar um novo significado à minha vida durante a realização desta tese.

Aos meus pais, Reinaldo e Márcia, pela presença constante em minha vida durante todos esses anos. Agradeço pelo estímulo e incentivo à minha profissão, pelo exemplo de perseverança, pelas oportunidades que me deram durante toda a minha formação e por estarem comigo na concretização deste trabalho. Sem eles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Bruno, Simone e Camila, pela história compartilhada.

Aos sobrinhos, Pedro e Guilherme, por me mostrarem a beleza do viver.

A Deus, pela vida e pela superação de todas as dificuldades.

Aos pacientes

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome
- CAF – CD8 T-cell antiviral factor
- CCR - C-C receptor quimiocina
- CDC: Centers for Diseases Control and Prevention
- CD – Cluster of differentiation
- CD3 – Molécula expressa em linfócitos T
- CD4 – Molécula expressa em linfócitos T auxiliares
- CD8 – Moléculas expressas em linfócitos T citotóxicos
- CD38 – Molécula envolvida na ativação celular
- CTR-DIP: Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
- CXCR – C-X-C receptor de quimiocina
- EDTA – Etilenodiaminotetracético
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
- FL – Fluorescência
- FSC – Tamanho
- GRUPO NT – Grupo Não Tratado
- GRUPO T – Grupo Tratado
- HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy
- HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano
- IL-2 – Interleucina 2
- Log: logaritmo
- LT CD4 – Linfócitos T CD4
- LT CD8 – Linfócitos T CD8
- LTNP – Long-term Nonprogressors
- IMF – Intensidade Média de Fluorescência
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
- MFF – Solução Fixadora
- NK – Natural Killer
- OMS – Organização Mundial da Saúde

PACTG - Pediatrics AIDS Clinical Trials Group

PE – Ficoeritrina

RNAm – RNA mensageiro

SSC – Granulosidade

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TREC - T-cell receptor excision circle

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNAIDS - The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS

ÍNDICE GERAL

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	1
1.2 Características evolutivas da infecção pelo HIV na infância.....	5
1.3 Ciclo e dinâmica viral.....	6
1.4 Imunopatogênese.....	8
1.5 Particularidades da resposta imune na infecção pediátrica.....	8
1.6 Fatores imunes associados com diferentes perfis de progressão da infecção pediátrica.....	10
1.7 Fatores genéticos associados com diferentes perfis de progressão da infecção pediátrica.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODO.....	20
4.1 Crianças.....	20
4.1.1 Período de estudo.....	20
4.1.2 Critérios de Inclusão.....	21
4.2 Procedimento experimental.....	22
4.2.1 Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico.....	22
4.2.1.1 Análise convencional.....	24

4.2.1.2	Análise do marcador CD56 em subpopulações de células CD3 ⁻ CD16 ⁺	25
4.2.1.3	Análise de subpopulações de células CD3 ⁻ CD56 ⁺	27
4.2.1.4	Análise da expressão do receptor de quimiocina CCR5	29
4.2.2	Extração do DNA, Amplificação de CCR5Δ32	30
4.2.2.1	Extração do DNA	30
4.2.2.2	Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
4.2.3	Quantificação da Viremia Plasmática	31
4.3	Análise Estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Caracterização dos indivíduos do estudo	32
5.2	Análise longitudinal da freqüência de subpopulações linfocitárias do sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV	34
5.2.1	Subpopulações de células T	34
5.3	Análise longitudinal da freqüência de expressão de moléculas de ativação em leucócitos do sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV	38
5.3.1	Análise da freqüência de células T CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	38
5.3.2	Análise da freqüência de células T CD4 ⁺ CD38 ⁺	40
5.3.3	Análise da freqüência de células T CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	42
5.3.4	Análise da freqüência de células T CD8 ⁺ CD38 ⁺	44
5.3.5	Análise da freqüência de células T HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	46
5.4	Análise longitudinal da freqüência de populações e subpopulações de células NK no sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV	48

5.4.1 Distribuição percentual da população de células NK.....	48
5.4.2 Distribuição percentual de subpopulações de células NK.....	50
5.5 Expressão de receptor de quimiocina CCR5 no sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV.....	64
5.6 Análise da variante polimórfica delta32 do receptor de quimiocinas próinflamatória CCR5.....	65
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
9 ANEXOS.....	94
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	95
Anexo 2 – Artigo relacionado com a tese.....	100

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Epidemia de AIDS no mundo no ano de 2009: número total de infectados, novas infecções e óbitos (UNAIDS, 2010).....	3
TABELA 2 - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....	23
TABELA 3 – Combinação de anticorpos utilizados para realização de imunofenotipagem.....	23
TABELA 4 – Características demográficas, clínicas, imunológicas e virológicas das crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Ciclo de replicação viral do HIV-1.....	7
FIGURA 2 - Receptor e Correceptores celulares e envelope viral. O tropismo do HIV define a célula CD4 que o vírus será capaz de infectar. Os co-receptores celulares reconhecidos pela gp120 do HIV são: CCR5 (tropismo ao CCR5 ou R5); CXCR4 (tropismo ao CXCR4 ou X4).....	14
FIGURA 3 - Representação esquemática de polimorfismo no gene CCR5.....	15
FIGURA 4 - Organograma da população atendida no CTR/DIP.....	20
FIGURA 5 - Avaliação do percentual das subpopulações de células T e o percentual de células CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ em células do sangue periférico utilizando a estratégia de análise convencional. O primeiro passo constitui na seleção da população celular de interesse em gráficos de distribuição puntual de tamanho-FSC <i>versus</i> granulosidade-SSC (A). Após a seleção da região de interesse — R1, o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, pode ser identificado em gráficos bidimensionais de distribuição puntual da fluorescência 1 (FL1) <i>versus</i> fluorescência 2 (FL2) (B).....	24
FIGURA 6 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações de células NK: CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁻ e CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC <i>versus</i> SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 <i>versus</i> FL3/CD16 utilizado para selecionar a população celular CD3 ⁻ CD16 ⁺	

(R2). (C) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 utilizado para selecionar a população celular CD3⁻CD56⁺ (R3). (D) Após a combinação das regiões R1, R2 e R3 através das fórmulas “G2=R2 + R3 e G3=R1 and G2” um gráfico de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56 contendo as células em G3 foi utilizado para quantificar os percentuais das subpopulações de células NK..... 26

FIGURA 7 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações CD3⁻CD56^{dim}CD16^{-/+} e CD3⁻CD56^{bright}CD16^{-/+} por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 (R2) utilizado para selecionar a população celular CD3⁻CD56⁺ - R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um gráfico de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações CD3⁻CD56^{dim}CD16^{-/+} e CD3⁻CD56^{bright}CD16^{-/+} 28

FIGURA 8 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises da expressão de receptores de quimiocinas por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 *versus* FL2/CCR5 (R2) utilizado para selecionar a população de linfócitos expressando o receptor – R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um histograma unidimensional para quantificar a expressão do receptor, através de alterações na intensidade

média de fluorescência da população de distribuição unimodal.....	29
FIGURA 9 - Análises do percentual de células T CD4 ⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD4 ⁺ em 2006 e em 2009 para o grupo NT está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.....	
	35
FIGURA 10 - Análises do percentual de células T CD8 ⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD8 ⁺ em 2006 e em 2009 para o grupo NT está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/FITC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.....	
	37
FIGURA 11 - Análises do percentual de células T CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ /CD4 ⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não	

Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD4⁺HLA-DR⁺/CD4⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-HLA-DR/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 39

FIGURA 12 - Análises do percentual de células T CD4⁺CD38⁺/CD4⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD4⁺CD38⁺/CD4⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-CD38/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 41

FIGURA 13 - Análises do percentual de células T CD8⁺HLA-DR⁺/CD8⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD8⁺HLA-DR⁺/CD8⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/TC e anti-HLA-DR/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão

e média dos valores individuais obtidos.....	43
<p>FIGURA 14 - Análises do percentual de células T $CD8^+CD38^+/CD8^+$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T $CD8^+CD38^+/CD8^+$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/APC e anti-CD38/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.....</p>	
	45
<p>FIGURA 15 - Análises do percentual de células T $CD4^+HLA-DRCD38^+/CD4^+$ (A) e de células T $CD8^+HLA-DRCD38^+/CD8^+$ (B) no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC, anti-CD38/PE, anti-HLA-DR/TC e anti-CD8/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.....</p>	
	47
<p>FIGURA 16: Análise do percentual de células NK $CD3^+CD16^{-/+}CD56^{-/+}$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do</p>	

percentual de células NK CD3⁻CD16^{-/+}CD56^{-/+} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 49

FIGURA 17 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 51

FIGURA 18 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 53

FIGURA 19 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 55

FIGURA 20 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 57

FIGURA 21 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do

percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 59

FIGURA 22 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{bright} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{bright} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 61

FIGURA 23 - Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 63

- FIGURA 24 - Expressão do receptor de quimiocina CCR5 em linfócitos CD4⁺ circulantes no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-CCR5/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos..... 64
- FIGURA 25 - Perfil da PCR do sangue periférico dos pacientes infectados por HIV-1. Os iniciadores foram usados para gerar fragmento selvagem de 189 pb e fragmento com deleção de 157 pb e a corrida foi realizada em gel de agarose a 2%. A posição 6 representa o paciente heterozigoto, sendo um alelo do tipo selvagem (189pb) e um alelo com deleção de 32pb (157pb). Os demais pacientes apresentaram perfil normal com dois alelos do tipo selvagem (189pb)..... 65
- Figura 26 - Perfil da PCR do sangue periférico dos pacientes infectados por HIV-1. Os iniciadores foram usados para gerar fragmento selvagem de 189 pb e fragmento com deleção de 157 pb e a corrida foi realizada em gel de agarose a 2%. Todos os pacientes apresentaram perfil normal com dois alelos do tipo selvagem (189pb)..... 66

RESUMO

Objetivos: Os mecanismos envolvidos na progressão lenta da infecção pelo HIV-1, em crianças com controle natural da infecção, ainda não foram suficientemente caracterizados. Neste estudo, crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 apresentando padrões distintos de evolução foram acompanhadas longitudinalmente por três anos e avaliadas quanto ao perfil fenotípico de leucócitos circulantes e quanto à presença de mutação no gene codificador de CCR5. **Desenho:** Estudo longitudinal realizado em 28 crianças infectadas verticalmente pelo HIV, maiores de seis anos de idade, alocadas em 2 grupos: **Grupo NT** (*Não Tratado*: sem indicação de terapia antirretroviral; contagem de CD4 \geq a 20% e/ou \geq 500 células/mm³ e carga viral $<$ 25.000 cópias) e **Grupo T**: (*Tratado*: terapia antirretroviral iniciada antes de seis anos de idade). A imunofenotipagem celular foi feita por citometria de fluxo para avaliação da ativação celular, da expressão de CCR5 e das subpopulações de células NK; a determinação da carga viral pela técnica de b-DNA e a avaliação do gene codificador de CCR5 foi feita por PCR. **Resultados:** No período acompanhado, demonstrou-se que crianças de ambos os grupos mantiveram estáveis o nível de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e carga viral. O estado de ativação celular, medido através da análise da expressão de CD38 e HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi semelhante em ambos os grupos e manteve-se ao longo do seguimento, com exceção do aumento observado na expressão de HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ do grupo T. Em relação às subpopulações de células NK, observou-se que o grupo NT apresenta menor proporção de subpopulações de células NK com atividade citotóxica e essa diferença se manteve no período avaliado. No grupo T, observou-se aumento do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} entre os tempos avaliados, indicando boa evolução da infecção. Em relação à expressão de CCR5 nas células CD4⁺, verificou-se não haver diferença entre ambos os grupos e, na avaliação genética, observou-se perfil heterozigoto para deleção de CCR5 em apenas um indivíduo que apresentou piora da infecção no período estudado (excluído do grupo NT). **Conclusões:** O perfil de ativação celular não esteve relacionado ao perfil de evolução clínica, uma vez que se manteve semelhante em ambos os grupos. O predomínio de células NK associadas à menor capacidade citotóxica mostrou ser um parâmetro estável, que permitiu a distinção entre os dois grupos de pacientes ao longo do período analisado. Ainda, a estabilidade verificada na evolução das crianças com progressão lenta não pôde ser atribuída à baixa expressão de CCR5 em células T CD4⁺, uma vez que não houve diferença na expressão desse receptor entre os grupos e nenhuma criança que permaneceu no grupo NT apresentou deleção de CCR5.

ABSTRACT

Objectives: The mechanisms involved in the slow progression of HIV-1 infection in children with natural control of infection, have not been sufficiently characterized. In this study, children vertically infected by HIV-1 showing distinct patterns of evolution were longitudinally followed for three years and assessed for phenotypic profile of circulating leukocytes and the presence of mutations in the gene encoding CCR5.

Design: A longitudinal study conducted in 28 children vertically infected with HIV, over six years of age, distributed into two groups: **Group NT** (untreated: no indication for antiretroviral therapy, CD4 count $\geq 20\%$ and / or ≥ 500 cells/mm³ and viral load $<25,000$ copies) and **Group T**: (Treated: antiretroviral therapy initiated before six years of age). Cellular immunophenotyping was performed by flow cytometry to assess cell activation, the expression of CCR5 and subpopulations of NK cells, the viral load determination by b-DNA technique and evaluation of the gene encoding CCR5 was made by PCR.

Results: In follow-up period, it was shown that children of both groups remained with stable levels of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, as well as viral load. Cellular activation status, measured by analyzing the expression of CD38 and HLA-DR on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, was similar in both groups and remained throughout the follow-up, except for the observed increase in expression of HLA-DR on CD4⁺ in T group. Regarding the subpopulations of NK cells, we observed that children from NT group had a lower proportion of NK cells subpopulation with cytotoxic activity and this difference was maintained during the study. In group T, an increase in the percentage of NK cells CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} among the evaluated times was noted, showing good evolution of the infection. In relation to CCR5 expression in CD4⁺ cells, there was no difference between both groups. In the genetic evaluation, only one individual presented heterozygous profile for deletion of CCR5. Surprisingly this child had worsening of infection during the study period and was excluded from the NT group.

Conclusions: The profile of cell activation was not related to the clinical profile, since it remained similar in both groups. The predominance of NK cells associated with lower cytotoxic capacity proved to be a stable parameter, allowing the distinction between the two groups of patients throughout the study period. Still, the stability observed in the evolution of children with slow progression could not be attributed to low expression of CCR5 on CD4⁺ T cells, since there was no difference in the expression of this receptor between groups and no child who remained in the NT group showed deletion of CCR5.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana

(HIV)

Há cerca de três décadas, surgiram os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), e as características da infecção pelo HIV observadas em crianças refletem as mudanças na epidemiologia da doença ao longo de três décadas de pandemia (DAYTON & MERSON, 2000). As primeiras crianças infectadas foram descritas em 1982, nos Estados Unidos e no Brasil, em 1983 (OLESKE *et al.*, 1983; SCARLATTI, 1996; LINDENGREN *et al.*, 2000; CN-DST/AIDS, 2001).

Até meados da década de 80, adolescentes hemofílicos, contaminados via hemotransfusão, representavam a maioria dos casos pediátricos de HIV. Em 1985, foi estabelecida a obrigatoriedade da sorologia anti-HIV em bancos de sangue, reduzindo significativamente a transmissão por essa via (SCARLATTI *et al.*, 1996; LINDENGREN *et al.*, 2000). Na década de 90, observou-se a expansão da epidemia para outros grupos populacionais e aumentaram os casos de mulheres infectadas através de contato heterossexual. Como consequência imediata da feminização da epidemia, cresceu rapidamente o número de crianças expostas verticalmente ao HIV (ROGERS *et al.*, 1998; KOVACS *et al.*, 1998; LINDENGREN *et al.*, 2000; UNAIDS, 2001).

A transmissão vertical passou a ser a principal forma de exposição das crianças na segunda década da epidemia, correspondendo a mais de 90% dos casos. As taxas de transmissão por essa via, na ausência de intervenções, variam de 13% a 43%, de acordo com determinantes socioeconômicos de cada população. Características maternas, virais, fetais e das condições do parto também interferem nas taxas de transmissão materno-fetal (FLOWLER *et al.*, 2000).

Sabe-se que a transmissão materno-fetal do HIV ocorre em três momentos diferentes, podendo acontecer intra-útero (pré-parto), no período de tempo compreendido entre o início do trabalho de parto até o nascimento (peri-parto) e via aleitamento materno (pós-parto). Dentre essas vias de transmissão vertical do HIV, cerca de 65% ocorrem no período do peri-parto. Um dos maiores avanços na redução da transmissão perinatal do HIV foi o ensaio clínico do PACTG 076 (*Pediatrics AIDS*

Clinical Trials Group), que evidenciou que a terapia antirretroviral com zidovudina administrada à mãe no pré-natal, a partir de 14 semanas de gestação e no peri-parto, e ao recém-nascido, desde o nascimento até seis semanas de vida, reduziu a transmissão vertical do HIV de 25% no grupo placebo para menos de 8% no grupo tratado (CONNOR, 1994). Estudos posteriores comprovaram ainda, que a associação entre as recomendações do protocolo PACTG 076 e outras medidas, como cesárea eletiva e/ou introdução de outros antirretrovirais nas últimas semanas de gestação, pode reduzir o índice para menos de 2% (MANDELBROT *et al*, 2001; IOANNIDIS *et al*, 2001; MANDELBROT *et al*, 1998; OPS, 2001).

Como a exposição perinatal é principal via de aquisição do HIV em crianças, o curso da infecção em mulheres em idade reprodutiva influencia decisivamente a epidemia na infância. As estimativas do Programa Global para AIDS da Organização Mundial de Saúde (UNAIDS) indicavam que até 2009, havia cerca de 33 milhões de pessoas no mundo infectadas pelo HIV; dessas pessoas, aproximadamente 15,9 milhões eram mulheres (Tabela 1). Cerca de 2,5 milhões de crianças no mundo estavam infectadas pelo HIV no fim de 2009 (UNAIDS, 2010).

TABELA 1 - Epidemia mundial de AIDS no ano de 2009: número total de infectados, novas infecções e óbitos (UNAIDS, 2010).

Número de pessoas vivendo com HIV em 2009		
Total		33,3 M
Adultos		30,8 M
Mulheres		15,9 M
Crianças menores de 15 anos		2,5 M
Novas infecções pelo HIV em 2009		
Total		2,6 M
Adultos		2,2 M
Crianças menores de 15 anos		370 mil
Mortes por AIDS em 2009		
Total		1,8 M
Adultos		1,6 M
Crianças menores de 15 anos		260 mil

***Fonte: OMS/UNAIDS, 2009. M=milhões**

No mundo, as taxas de transmissão vertical do vírus variam conforme a região geográfica considerada. Estudos observacionais detectaram que as taxas cumulativas de transmissão variavam de 25% a 45%, na África, e de 10% a 30%, na Europa e nos Estados Unidos, na ausência de intervenção.

Entre 1980 e junho de 2010 foram notificados, no Brasil, cerca de 590 mil casos da doença. Do número total de casos identificados 207 mil são mulheres. Mais recentemente, a taxa de incidência da doença mantém-se, ainda, em patamares elevados – 20,1 casos por 100 mil habitantes - basicamente devido à persistência da tendência de crescimento entre as mulheres. Houve conseqüentemente um aumento da doença na população pediátrica, uma vez que grande parte da transmissão nesta camada se dá pela via vertical. Foram notificados ao Ministério da Saúde, de janeiro de 1983 a junho de

2008, 11.796 casos de AIDS em menores de 13 anos de idade (Boletim Epidemiológico VII/MS, 2010).

Em Belo Horizonte, MG, um estudo detectou taxa de transmissão de 18,1%, durante os anos de 1994 a 1998 (PINTO, 1999). Outro estudo, na mesma cidade, em que foram acompanhadas 210 gestantes infectadas pelo HIV, entre 1996 e 2000, mostrou claramente o impacto dos programas de detecção da infecção na gestante no período pré-natal e prevenção da transmissão materna infantil, já que as taxas de transmissão vertical foram de 26,3% para 7,1%, respectivamente (KAKEHASI, 2001). O mesmo grupo estendeu o estudo até 2004. A taxa de transmissão permaneceu decrescente: 10,0% em 2001 para 1,9% em 2004 (KAKEHASI, 2005).

Diante de uma prevalência de 0,41% de infecção pelo HIV em gestantes, estima-se que 12.456 recém-nascidos sejam expostos ao HIV anualmente, no Brasil (Estudo Sentinela Parturiente, 2004). Em estudo multicêntrico do Ministério da Saúde, conduzido pela Sociedade Brasileira de Pediatria, observou-se que, em locais onde as medidas profiláticas preconizadas pelo Ministério da Saúde foram implantadas na rotina do pré-natal, as taxas de transmissão vertical foram reduzidas a menos de 2%. Foram notificados no Brasil, entre os anos de 2000 e 2009, 54.218 casos de infecção pelo HIV em gestantes, dos quais 40.999 (75,6%) se concentram nas Regiões Sul e Sudeste. Em 2009, o número de casos no país foi de 6.104 e a taxa de detecção correspondeu a 2,1 casos por 1.000 nascidos vivos. As maiores proporções de gestantes infectadas pelo HIV estão concentradas na faixa etária de 20 a 29 anos, entre 4 e 11 anos de estudo (Boletim Epidemiológico VII/MS, 2010).

A profilaxia da transmissão materno-fetal do HIV-1 tem reduzido à transmissão vertical e o uso de terapia antirretroviral altamente ativa (HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*) tem prolongado a sobrevivência, aumentando o número de crianças infectadas sem o desenvolvimento do quadro clássico de AIDS (KOVACS *et al.*, 1998). Mas, o sucesso da prevenção da transmissão vertical depende da identificação da totalidade das gestantes infectadas e de que essa detecção seja a mais precoce possível. Assim, o Ministério da Saúde, desde 1997, recomenda a realização do teste anti-HIV (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV) em todas as gestantes, acompanhada do pré e pós-aconselhamento, independentemente de referirem ou não comportamento de risco.

1.2 Características evolutivas da infecção pelo HIV na infância

Em contraste com a infecção pelo HIV em adultos, a infecção da criança ocorre no contexto de um sistema imune imaturo e em desenvolvimento. Em consequência disto, existem diferenças na evolução clínica das crianças quando comparadas aos adultos. Múltiplos são os fatores que contribuem para os diferentes padrões de progressão da doença em crianças, incluindo época da infecção, fenótipo e carga viral, integridade do sistema imune e a constituição genética individual. Inicialmente, acreditava-se que todas as crianças apresentavam pequena sobrevida e curso de progressão rápida. Com o tempo, observou-se que há diferentes padrões de progressão e que as crianças com sintomatologia mais precoce, principalmente abaixo de um ano, têm evolução mais grave (KOVACS *et al.*, 1998; KALISH *et al.*, 1999; GALLI *et al.*, 2000). As crianças que progridem rapidamente, ou seja, manifestam a doença logo nos primeiros meses de vida e evoluem para óbito antes de quatro a cinco anos, representam de 10 a 25% do total da população infantil infectada verticalmente. Os progressores usuais (75 a 90%) iniciam nos dois primeiros anos de vida com sintomas linfoproliferativos, manifestando sintomas mais avançados após quatro a cinco anos de vida. Já os progressores lentos (*Long-term nonprogressor* – LTNP) (10 a 15%), são crianças que apresentam um período de latência relativamente longo, como os adultos, permanecendo assintomáticos por aproximadamente dez anos (*The Europe Collaborative Study*, 1994; *Italian Register for HIV Infection in Children*, 1994; ROGERS *et al.*, 1998; LINDENGREN *et al.*, 2000; LUZURIAGA & SULLIVAN, 2000).

Embora o fenômeno da progressão lenta da infecção pelo HIV seja bem reconhecido, a ausência de um perfil bem definido e a falta de consistência nos critérios usados para selecionar os grupos considerados progressores lentos tem limitado a comparabilidade entre os achados dos estudos (SCHRAGER *et al.*, 1994; EASTERBROOK, 1994; CAO *et al.*, 1995). Alguns autores têm colocado que a definição ideal para os “*Long-term non progressor (LNTP)*” pode incluir a ausência (ou relativa ausência) de evidências de progressão da doença após um longo período de infecção. Um limite de tempo normalmente usado, em adultos, é o período de dez anos, que representa o tempo médio em que se observa a progressão para AIDS antes da introdução do tratamento com antirretrovirais (VEUGELERS *et al.*, 1993).

Em geral, os pacientes pediátricos que progridem lentamente na infecção pelo HIV têm sido definidos como aqueles que estão assintomáticos após pelo menos oito anos de infecção, dado que a média de tempo para o desenvolvimento da AIDS, em crianças, é de cinco a sete anos, e a média de sobrevivência é de oito anos. Ao contrário dos adultos onde o uso de terapia antirretroviral é um critério de exclusão para progressão lenta da infecção, alguns autores consideram que nas crianças esse critério de exclusão não pode ser empregado, já que na maioria delas o início da terapia ocorre logo nos primeiros anos após a descoberta da infecção pelo HIV (SCOTT *et al*, 1989, TOVO *et al*, 1992). PAUL *et al*. definiram essas crianças como sendo aquelas infectadas verticalmente que sobrevivem por mais de cinco anos, sem ter feito uso de terapia antirretroviral altamente ativa (HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*) e apresentam CD4 maior que 25% ou maior que 500 cel/mm³ (categoria 1 CDC). Esses mesmos autores consideram que crianças que recebem terapia dupla também podem ser consideradas progressoras lentas (PAUL *et al.*, 2005).

São poucas as crianças infectadas pelo HIV que podem ser consideradas progressoras lentas. Em estudo de coorte, desenvolvido na Itália, em que foram acompanhadas 3.300 crianças infectadas pelo HIV por transmissão vertical 19% foram assintomáticas até um ano de idade e apenas 6% até cinco anos de idade, o que corroborou com achados de outras coortes desenvolvidas nos Estados Unidos. Já em outro estudo de coorte multicêntrico, patrocinado pela *Paediatric AIDS Foundation*, 107 crianças infectadas por transmissão vertical, com idade de oito anos ou mais, apenas nove (8%) apresentavam perfil de desenvolvimento lento da infecção (SCOTT *et al*, 1989, TOVO *et al*, 1992, GALLI *et al*, 1995).

1.3 Ciclo e dinâmica viral

A infecção pelo HIV-1 inicia-se através da ligação da proteína de superfície viral gp120 com a molécula CD4 expressa predominantemente na superfície de células dendríticas, macrófagos e células T CD4⁺. A ligação viral ao CD4⁺ é necessária, mas insuficiente para permitir a entrada do vírus nas células. A interação entre gp120 e CD4⁺ aumenta a afinidade do vírus por moléculas correceptoras, como CCR5 e CXCR4. A

formação do complexo gp120, CD4 e CCR5/CXCR4 expõe a proteína viral gp41 que promove a fusão do vírus com a membrana da célula (LUSTER, 1998).

Após entrar na célula, o RNA viral é convertido a DNA pelas enzimas transcriptase reversa e ribonuclease (Figura 1). Essa reação ocorre no citoplasma da célula nas primeiras seis horas de infecção. A dupla fita de DNA, assim formada, é integrada de forma randômica ao genoma do hospedeiro através da enzima integrase. Inicialmente, apenas as proteínas *tat*, *rev* e *nef* são sintetizadas, sendo a seguir sintetizadas as proteínas estruturais e o RNA genômico. A liberação do vírus é por brotamento; durante esta fase, a enzima protease processa as proteínas precursoras do *pol* e *gag*, tornando a partícula viral madura e capaz de infectar uma nova célula (GOODENOW *et al*, 1989; COFFIN, 1995).

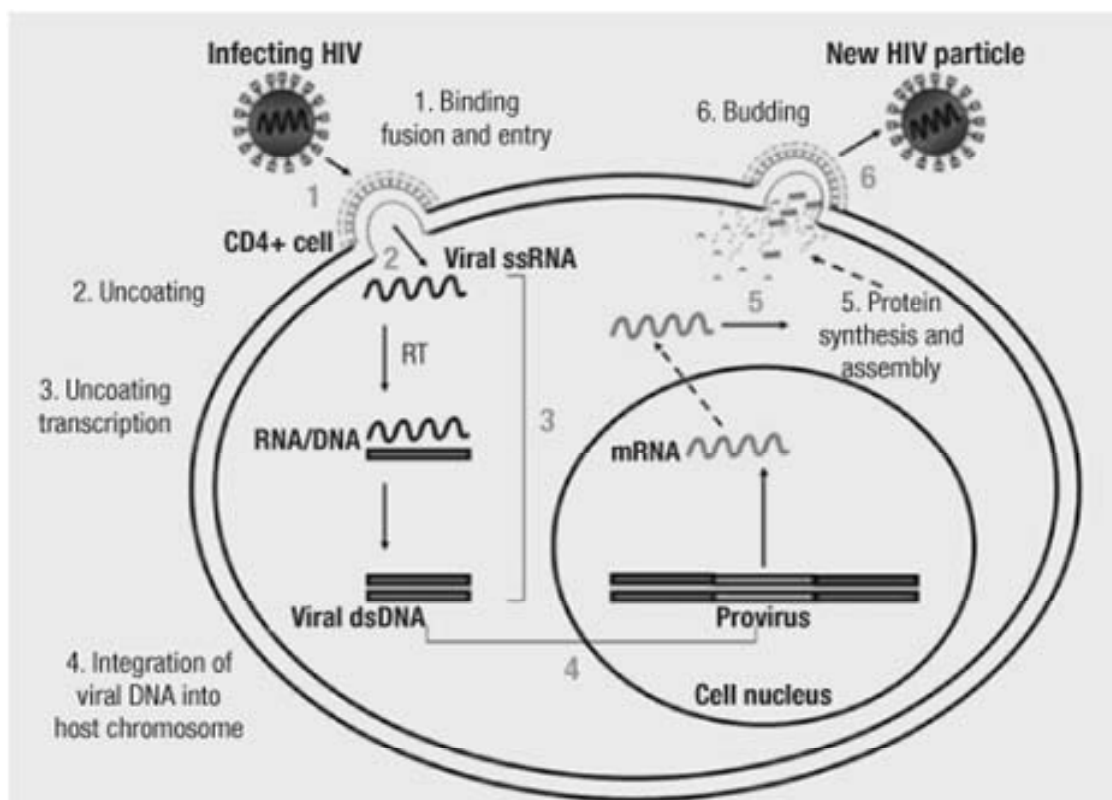


FIGURA 1 – Ciclo de replicação viral do HIV-1

1.4 Imunopatogênese

Desde o surgimento dos primeiros trabalhos que associavam um vírus então “recém-descoberto” com as alterações imunológicas notadas na AIDS (FAUCI, 1984), muito tem sido pesquisado na tentativa de explicar os mecanismos etiopatogênicos envolvidos na imunossupressão observada nesta síndrome.

Há muito é sabido que, embora o HIV possa infectar outros tipos celulares, seu maior reservatório são as células T CD4⁺ (SCHNITTMAN *et al.*, 1989; CHUN *et al.*, 1997). Um grande número de partículas virais é produzido no interior dessas células (WEI, *et al.*, 1995; HO *et al.*, 1995) e esta replicação ocorre predominantemente no interior de células T CD4⁺ ativadas (LEDERMAN, 1998).

Acredita-se que o evento chave no curso da infecção pelo HIV-1 seja a destruição progressiva da população de células T CD4⁺ juntamente com o desenvolvimento de anormalidades funcionais (MIEDEMA *et al.*, 1988). A alteração na função dos linfócitos auxiliares é aparentemente progressiva e independente do seu número, já tendo sido descritos três padrões distintos de progressão da disfunção dessas células em pacientes infectados. Esses três estágios de disfunção seriam: Primeiro estágio: Perda da seletividade da função das células T auxiliares a antígenos como o da influenza e tétano (“*recall antigens*”), mas manutenção da função T auxiliar em relação a estímulos mitogênicos. Segundo estágio: Ausência da função das células T a antígenos e aloantígenos, mas manutenção da resposta a mitógenos. Terceiro estágio: Ausência de resposta a todos os estímulos (CLEIRICI *et al.*, 1989).

1.5 Particularidades da resposta imune na infecção pediátrica

Considerando a resposta imune humoral, a infecção pelo HIV induz intensa resposta de anticorpos frente a praticamente todas as proteínas reguladoras e estruturais do HIV. Alguns destes anticorpos, especialmente os dirigidos à gp41 e aos domínios variáveis 3 (V3) e de interação com CD4⁺ da proteína gp120, têm capacidade neutralizante *in vitro* e em experimentos de imunoterapia passiva *in vivo*. Entretanto, a produção de anticorpos com capacidade neutralizante é escassa e muito rapidamente se observa um escape viral aos mesmos. Isso provavelmente se deve ao fato de que as

partes expostas e mais imunogênicas da proteína gp120 em sua forma "compacta" são regiões altamente variáveis que levam ao escape viral mediante a mutação dos epítomos reconhecidos. Por outro lado, nos modelos de imunização já descritos, não se obteve de forma consistente níveis elevados de anticorpos neutralizantes e nem sua presença se associou, de forma sistemática, com proteção. Estes dados fazem com que alguns investigadores questionem o papel da resposta humoral no controle da infecção pelo HIV, tanto na infecção pediátrica quanto na infecção de adultos (BANDA *et al.*, 1992; CORREA & MUNOZ-FERNANDEZ, 2002).

Em contraste com a maioria dos adultos infectados, a depleção de linfócitos CD4⁺ em crianças infectadas verticalmente desenvolve-se muito rapidamente. Ainda, a viremia plasmática encontra-se frequentemente elevada (>10⁵ cópias/ml) no primeiro ano de vida e geralmente não ocorre redução importante até o terceiro ano de vida. Essa prolongada persistência de níveis elevados de viremia parece refletir o grande reservatório de células permissíveis à replicação viral devida à ativa timopoiese verificada nessa faixa etária. Entretanto, diferente do adulto, ainda não está claro se diferentes "set points" virais estejam correlacionados com progressão clínica em crianças. Alguns autores sugerem que a elevada ativação imune contribua mais para a depleção de linfócitos CD4⁺ que a taxa de replicação viral, uma vez que o *status* imune da criança está diretamente associado à ativação imune e não à viremia em crianças fazendo uso de terapia antirretroviral altamente ativa (HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*) (RESINO *et al.*, 2006).

Vários fatores parecem contribuir para essa rápida progressão da doença observada em crianças e incluem a relativa imaturidade imunológica e a destruição tímica mediada pelo HIV, em uma fase de vida de importante timopoiese. Essa involução acelerada do timo foi evidenciada, em adultos e crianças, através da demonstração da redução de TRECs ("TCR excision circles"- que estimam a contribuição do timo na manutenção do compartimento de células virgens), durante a infecção pelo HIV e seu aumento posterior à introdução de terapia antirretroviral altamente ativa (HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*), sugerindo recuperação da função tímica mediante supressão viral. Em crianças, a repopulação de células T CD4⁺ após terapia antirretroviral altamente ativa (HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*) envolve preferencialmente células virgens com apenas um pequeno aumento

nas células de memória, refletindo sua maior capacidade de regeneração tímica em crianças (RESINO *et al.*, 2003).

Assim como na progressão rápida da infecção pelo HIV-1, em crianças, os mecanismos envolvidos na progressão lenta da infecção também são heterogêneos e podem incluir infecção por vírus defeituoso ou atenuado, fatores genéticos e fatores imunológicos (CHAKRABORTY *et al.*, 2005). Entretanto, não há um consenso entre os principais mecanismos responsáveis por esse perfil de evolução, em parte porque as pessoas infectadas pelo HIV e que progredem lentamente na infecção formam uma população bastante heterogênea (STRATHDEE *et al.*, 1996; LEFRERE *et al.*, 1997).

Embora a proporção de adultos e crianças infectados pelo HIV com progressão lenta seja pequena, esses indivíduos podem fornecer informações valiosas sobre a evolução natural da infecção. Há numerosos fatores que são considerados como capazes de prevenir a progressão da infecção. Mas os dados da literatura, principalmente em crianças, ainda são bastante escassos.

1.6 Fatores imunes associados com diferentes perfis de progressão da infecção pediátrica

Evidências acumuladas durante 25 anos de infecção indicam que a patogênese da infecção pelo HIV-1 está diretamente relacionada com a capacidade do vírus de induzir hiperativação crônica do sistema imune (ASCHER & SHEPPARD, 1988; HAZENBERG *et al.*, 2000; LAWN *et al.*, 2001; GROSSMAN *et al.*, 2002). A ativação de células T é requerida para replicação viral eficaz, pois as células TCD4⁺ em repouso são menos susceptíveis ao vírus do HIV (LEDERMAN *et al.*, 1998). A ativação celular parece estar aumentada também em células T CD8⁺. O aumento na expressão de marcadores de ativação nesses linfócitos foi posteriormente associado ao maior potencial citolítico anti HIV (FAUCI *et al.*, 1991, LEVY *et al.*, 1996). Nesse sentido, diversos marcadores podem ser utilizados com intuito de avaliar a ativação celular.

O HLA-DR, antígeno MHC de classe II, age como elemento requerido para mediar ativação de células T. Sua expressão encontra-se acentuada em células T após eventos de ativação imune, sejam induzidos por processos patológicos ou por imunização.

Alguns estudos relatam baixa expressão, ou níveis inalterados, de HLA-DR em células T CD4⁺ de pacientes infectados pelo HIV quando comparados com controles negativos. Contudo a grande maioria dos relatos mostra aumento significativo na sua expressão tanto em células T CD4⁺ quanto em células T CD8⁺. O aumento na expressão de HLA-DR nas células T tem sido proposto, em alguns estudos, como marcador de progressão da infecção por HIV-1, tanto em adultos quanto em crianças (ROSENBLATT *et al.*, 2005).

Tendo em vista que o controle imunológico da infecção pelo HIV é feito predominantemente pelas células T citotóxicas, aventou-se a hipótese de que as células HLA-DR⁺ seriam as mais ativas no combate ao vírus (STITES *et al.*, 1986; GIORGI & DETELS, 1989; LANDAY *et al.*, 1993). De fato, Fauci e col demonstraram que essas células apresentam maior potencial citolítico contra HIV que as células HLA-DR⁻ (FAUCI *et al.*, 1991).

Outro marcador muito utilizado na avaliação da ativação celular em pacientes soropositivos é a expressão de CD38. A molécula CD38, glicoproteína transmembrana tipo II com atividade enzimática (ecto-NADase), está expressa em linfócitos, macrófagos, células endoteliais, células dendríticas e diversos outros tipos celulares. É também expressa em células hematopoiéticas precoces, sendo perdida durante a maturação celular e re-expressa durante a ativação celular. Assim, recém-nascidos expressam altos níveis de CD38 em suas células T que decaem com a idade. Em crianças, cerca de 75% das células T CD4⁺ e 50% das células T CD8⁺ expressam CD38 normalmente. Redução de células T imaturas ao longo dos anos é acompanhada por diminuição no percentual de células CD38 até atingir valores normais no adulto, em torno de 30% (McCLOSKEY *et al.*, 1997). Desta forma, pode-se considerar que a expressão de CD38 em células T, em crianças, seja tanto marcador de imaturidade linfocitária, quanto de ativação celular.

Em adultos, a ativação imune correlaciona-se com aumento na expressão do marcador CD38 em células T CD4⁺ e T CD8⁺. Na infecção pelo HIV, o aumento de células T CD8⁺CD38⁺ é considerado forte preditivo de progressão para AIDS e morte, de modo semelhante à percentagem de linfócitos CD4⁺, e de poder de predição maior que a carga viral (LIU *et al.*, 1997).

O significado prognóstico de tais células na infecção pediátrica, quando diferenças na expressão de CD38 ocorrem devido à questão etária, ainda é controverso. Alguns autores relatam que o aumento de células CD8⁺CD38⁺ é preditor de sobrevivência (DE MARTINO *et al.*, 1998), enquanto outros relatam associação com doença avançada (PLAEGER-MARSHALL *et al.*, 1993).

Considerando que a presença de CD38 na superfície de células T, em crianças, pode causar dupla interpretação alguns autores consideram que a utilização de dupla marcação em células T, como HLA-DR⁺CD38⁺, além de esclarecer a imaturidade celular, também estaria associado com progressão mais rápida da infecção, em crianças infectadas pelo HIV (ALDHOUS *et al.*, 1996; THAN *et al.*, 1999; PAUL *et al.*, 2001; McCLOSKEY *et al.*, 2001; SHERMAN *et al.*, 2002; RESINO *et al.*, 2003).

Apesar das extensas pesquisas existentes nessa área, ainda não está claro como a ativação imune é induzida durante a infecção pelo HIV-1 e como o sistema imune responde a esse estado de hiperativação.

Outro fator imunológico que tem sido associado ao perfil de progressão da infecção, em adultos, é o comportamento das células Natural Killer (NK). As células NK podem atuar tanto na resposta imune natural quanto na resposta imune adaptativa. Já está bem estabelecido o importante papel dessas células nos estágios iniciais de resposta contra as infecções virais e sua participação nos estágios posteriores da resposta imune, principalmente pela produção e liberação de citocinas (LODOEN & LANIER, 2006). Além disso, foi demonstrado que as células NK respondem aos antígenos da influenza e do tétano de maneira dependente de células T, indicando que essas células têm um importante papel após o início da resposta imune adaptativa (FEHNIGER *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2004).

Embora o número de células NK e sua capacidade citolítica sejam profundamente destruídos na infecção pelo HIV-1, a natureza dessa disfunção ainda não está totalmente clara (BRENNER *et al.*, 1993; GEERTSMA *et al.*, 1999; De SOUZA *et al.*, 2000; VILLANEUVA *et al.*, 2000; LEVY, 2001). Baixas concentrações de células NK no sangue periférico de adultos infectados pelo HIV-1 têm sido associadas com progressão rápida da infecção, enquanto que preservação da capacidade funcional das células NK pode ser relacionada com melhor prognóstico (SZELC *et al.*, 1992; SIRIANNI *et al.*, 1994; HU *et al.*, 1995; BRUUNSGAARD *et al.*, 1997; ULLUM *et al.*, 1999).

Em adultos, há fortes evidências da participação das células NK no controle da infecção crônica pelo HIV-1. Entretanto, estudos sobre a função dessas células em crianças ainda são bastante limitados. Azzoni *et al* pesquisando as células NK, em crianças infectadas pelo HIV-1, encontraram percentual reduzido dessas células no sangue periférico de crianças com viremia alta. Também foi constatado aumento do percentual das células NK após o início de terapia antirretroviral e controle da carga viral nessas crianças (AZZONI *et al*, 2005). Já Ballan *et al* verificaram que as crianças infectadas pelo HIV apresentavam quantidade normal de células NK, mas com atividade reduzida, quando comparada às crianças não infectadas (BALLAN *et al*, 2007).

1.7 Fatores genéticos associados com diferentes perfis de progressão da infecção pediátrica

A função primária da ligação entre proteína do envelope viral do HIV-1 com os receptores de quimiocinas, presentes na superfície das células hospedeiras, é mediar a fusão e conseqüente entrada do vírus nas células. Entretanto, essa interação também tem sido associada à ocorrência de uma série de sinais que facilitam a infecção viral. (WU, 2009)

Como é típico para outros patógenos intracelulares bem-sucedidos, o HIV-1 usa elementos do hospedeiro altamente conservados para entrada nas células, neste caso CD4 e CCR5 ou CXCR4. Estão sendo progressivamente elucidados os mecanismos pelos quais o HIV-1 usa esses elementos para entrada nas células. Depois que a glicoproteína 120 se liga ao CD4 celular, induz-se uma alteração de conformação na glicoproteína do envelope que expõe domínios previamente inacessíveis, permitindo a ligação ao correceptor CCR5 ou CXCR4 (Figura 2). Essa ligação permite nova alteração no envelope viral expondo a proteína GP41. Isto liga a membrana viral à membrana da célula do hospedeiro promovendo fusão e conseqüente entrada do vírus na célula (CHOE *et al.*, 1996; TRKOLA *et al.*, 1996; KWONG *et al.*, 1998).

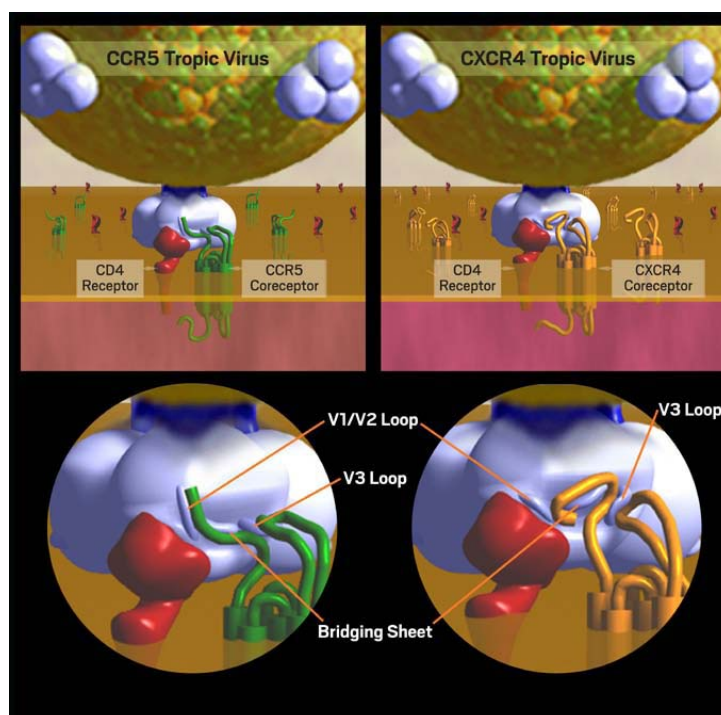


FIGURA 2. Receptor e Correceptores celulares e envelope viral. O tropismo do HIV define a célula CD4 que o vírus será capaz de infectar. Os co-receptores celulares reconhecidos pela gp120 do HIV são: CCR5 (tropismo ao CCR5 ou R5); CXCR4 (tropismo ao CXCR4 ou X4).

Publicado online em www.prn.org:The PRN Notebook®| Volume 15, January 2010

O receptor de quimiocina CCR5 é codificado pelo gene CMKBR5 localizado na região p21.3 do cromossomo 3 dentro de um grupo de genes que codificam múltiplos receptores de quimiocinas (SAMSON *et al.*, 1996). Polimorfismos de certas quimiocinas e de genes receptores de quimiocinas têm sido correlacionados com a resistência a infecção pelo HIV-1, ou aumento no período de progressão para AIDS. A mutação CCR5 Δ 32 é uma deleção de 32 nucleotídeos no gene CCR5 que resulta numa proteína disfuncional removendo o receptor da superfície celular. Indivíduos homocigotos para a deleção (CCR5 Δ 32^{-/-} CCR5 Δ 32^{-/-}) não expressam o receptor CCR5 na superfície das células (Figura 3). A infecção pelo HIV-1 em pessoas homocigóticas para CCR5 Δ 32 é extremamente rara e, quando ocorre, é causada por vírus que podem usar CXCR4 para entrada na célula (GORRY *et al.*, 2002; MICHAEL *et al.*, 1998). A ausência congênita

de CCR5 protege contra a aquisição da infecção pelo HIV-1. Por outro lado, indivíduos heterozigotos ($CCR5/CCR5\Delta32^+$) que têm um alelo $CCR5\Delta32$ e um alelo do tipo selvagem podem apresentar risco um pouco mais baixo para infecção pelo HIV-1, mas quando infectados possuem nível reduzido da expressão de CCR5 na superfície das células e estão correlacionados com progressão mais lenta para a doença (SAMSON *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1996; KAWAMURA *et al.*, 2003; HLADILK *et al.*, 2005).

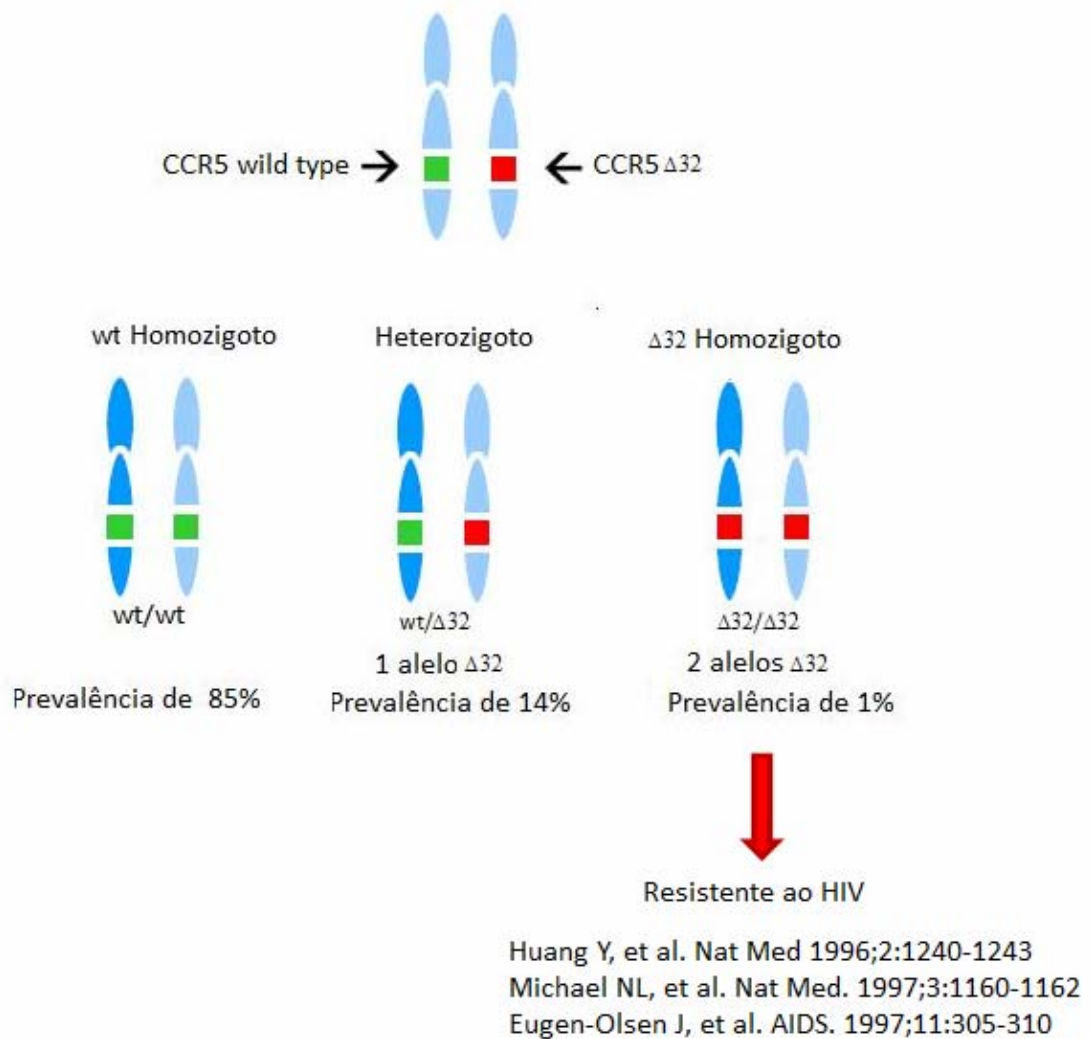


FIGURA 3 - Representação esquemática de polimorfismo no gene CCR5

Pesquisadores investigando polimorfismo de receptores de quimiocinas, em uma coorte de adultos LTNP, encontraram maior frequência de heterozigotos CCR5 Δ 32 no grupo LTNP que nos demais grupos avaliados (STEWART, 1997). Já em estudo realizado com crianças brasileiras infectadas pelo HIV, pesquisadores não verificaram correlação entre a frequência de heterozigotos CCR5 Δ 32 e o perfil de progressão da infecção pelo HIV-1 (De ANGELIS *et al.*, 2007).

Tendo em vista os dados expostos acima o perfil de progressão da infecção pelo HIV-1, tanto em crianças quanto em adultos, pode ser influenciado por fatores imunes e genéticos do hospedeiro. Entretanto pouco se sabe sobre a relação desses fatores com a capacidade de controlar naturalmente a infecção pelo HIV-1, principalmente em crianças.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a decisão de início ou troca de terapia antirretroviral, nas crianças infectadas pelo HIV-1, depende da contagem de células T CD4⁺, carga viral, além de dados clínicos. Entretanto, esses parâmetros apresentam limitações e a utilização de marcadores imunológicos e genéticos poderiam contribuir para melhorar a avaliação quanto ao início ou troca de terapia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Os mecanismos envolvidos na progressão lenta da infecção pelo HIV-1, em crianças virgens de tratamento com antirretroviral ainda não foram suficientemente caracterizados. Com o intuito de contribuir para um maior entendimento sobre o significado prognóstico da resposta imune e genética das crianças na evolução natural da infecção pelo HIV-1 e oferecer suporte para estudos futuros no campo da pesquisa sobre acompanhamento e tratamento de crianças infectadas pelo HIV-1, este trabalho teve como objetivo geral:

Acompanhar longitudinalmente o perfil fenotípico de leucócitos circulantes e avaliar mutações específicas no gene codificador de CCR5 em crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 virgens de tratamento antirretroviral e crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 em uso de TARV.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estudar longitudinalmente o perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1, em dois momentos distintos, através dos seguintes parâmetros:

- a) Distribuição das populações linfocitárias;
- b) Distribuição percentual das populações de células T expressando moléculas de ativação ($CD38^+$ e $HLA-DR^+$);
- c) Distribuição das populações e subpopulações de células NK;
- d) Distribuição percentual das populações de células T $CD4^+$ expressando receptor CCR5 ($CD4^+CCR5^+$);

3.2.2. Avaliar a frequência de variante polimórfica delta32 do receptor de quimiocinas pró inflamatória CCR5 (alelo CCR5delta32) em crianças infectadas pelo HIV-1 por transmissão vertical em uso de tratamento antirretroviral e com evolução natural da infecção;

4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Crianças

Desde a implantação do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTR/DIP) em 1989, até 31 de dezembro de 2008, foram atendidas 2715 crianças expostas ao HIV, sendo a infecção pelo HIV confirmada em 506 destas crianças. Destas, foram identificadas nove crianças, com idade maior ou igual a oito anos, que nunca haviam feito uso de terapia antirretroviral.

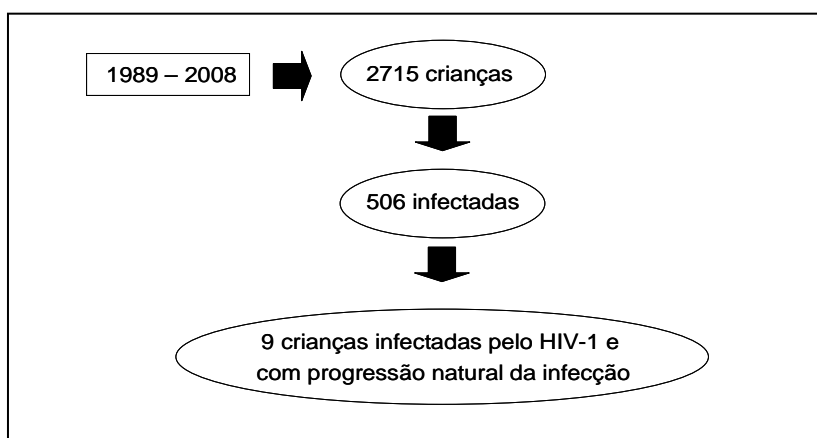


FIGURA 4 – Organograma população atendida CTR/DIP

4.1.1 Período de estudo

Cada paciente foi acompanhado desde a data de admissão até sua última consulta no período do estudo (de 2006 a 2009). As avaliações clínicas e laboratoriais foram padronizadas conforme a rotina do serviço, com consultas trimestrais, ou a intervalos maiores ou menores a critério médico, dependendo da evolução do paciente. Na primeira consulta clínica é preenchido um formulário padronizado com todo histórico da criança e a cada consulta de retorno é preenchido um novo formulário, também padronizado, com dados de evolução clínica, o exame físico e proposta de tratamento.

A primeira coleta de sangue para avaliação imunofenotípica, proposta neste trabalho, ocorreu em 2006 e a segunda em 2009. Neste último ano também foi realizada a pesquisa genética para CCR5 Δ 32. Os dados da história dos pacientes foram obtidos através da revisão dos registros médicos.

4.1.2 Critérios de Inclusão

Foram selecionadas crianças comprovadamente infectadas pelo HIV-1 através da transmissão vertical, com idade maior ou igual a seis anos e menor de dezesseis anos. Os pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo Não Tratado (NT) – virgens de tratamento com antirretroviral e Grupo Tratado (T) – em uso de tratamento com antirretroviral.

Os critérios de alocação em cada grupo foram:

- **Grupo NT:** 1) Nunca ter feito uso de terapia antirretroviral; 2) Contagem de CD4 \geq a 20% e/ou \geq 500 células/mm³; 3) Carga Viral < 25.000 cópias;
- **Grupo T:** 1) Em uso de terapia antirretroviral; 2) Início do tratamento antes dos seis anos de idade.

Em 2009, as crianças foram reavaliadas e os critérios de alocação nos grupos foram mantidos.

Dez crianças sadias de idades comparáveis àquelas das crianças infectadas pelo HIV-1 foram incluídas no estudo como grupo controle, e avaliadas na primeira etapa desse trabalho, em 2006.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico

Para o estudo longitudinal, foram feitas duas coletas, sendo a primeira realizada em 2006 e a segunda em 2009. Foram coletados 15mL de sangue periférico em tubos Vacutainer®, contendo EDTA ou heparina sódica como anticoagulantes.

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram feitos segundo o protocolo proposto pelo fabricante, com pequenas modificações conforme descrito a seguir.

Em tubos de poliestireno 12x75mm foram adicionados 5µl do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse marcado com fluorocromo (Tabela 2). Combinações específicas de anticorpos monoclonais, adquiridos da empresa Becton Dickinson, marcados com fluorocromos distintos foram utilizados para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse (Tabela 3). Para cada combinação de anticorpos monoclonais foram adicionadas alíquotas de 100µl de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, procedeu-se a lise dos eritrócitos, utilizando-se 2ml de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution - Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vortex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (400g, 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2ml de PBS (0,015M pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final, os leucócitos foram fixados com 300µl de solução fixadora – MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo, incluindo-se aspectos morfométricos e de arquitetura molecular, foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson). O programa CELLQuest™ foi utilizado para a aquisição de dados em “Listmode” e para a análise dos resultados empregou-se diferentes estratégias, como descrito em Material e Métodos.

TABELA 2 - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

ANTICORPOS	FENÓTIPO ALVO NO ESTUDO
Anti-CD3	Células T
Anti-CD4	Células T auxiliares
Anti-CD8	Células T citotóxicas
Anti-CD16	Células NK
Anti-CD38	Células T ativadas
Anti-CD56	Células NK
Anti-CCR5	Receptor de Quimiocina
Anti-HLA-DR	Células T ativadas

TABELA 3 – Combinação de anticorpos utilizados para realização de imunofenotipagem

TUBOS	FITC	PE	TC	APC
1	Controle	Controle	Controle	Controle
2	CD8	CD3	CD4	
3	CD4	CD38	CD8	HLA-DR
4	CD3	CD16	CD56	
5	CD4	CCR5		

4.2.1.1 Análise convencional

A análise convencional foi feita segundo terminologia proposta por SATHLER-AVELAR (2003). A figura 5 ilustra a seqüência de passos para a análise convencional. Esse tipo de análise consiste na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Fig. 5A). Após a seleção da região de interesse (R1), a frequência de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, incluindo as modalidades *FL1 versus FL2*, *FL2 versus FL3* ou *FL1 versus FL3* (Fig. 5).

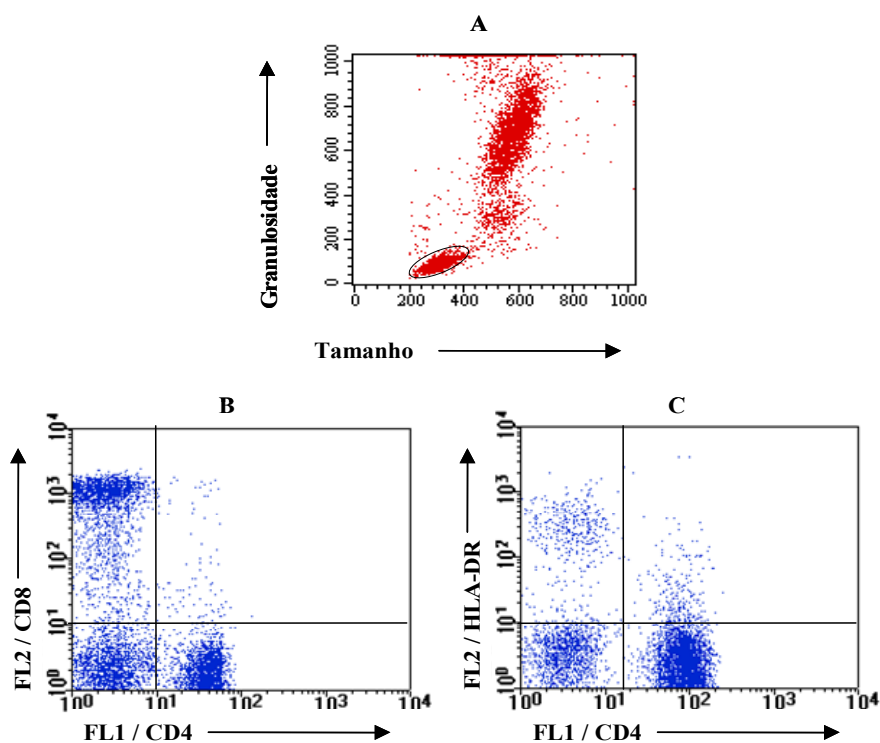


FIGURA 5 - Avaliação do percentual das subpopulações de células T e o percentual de células CD4⁺HLA-DR⁺ em células do sangue periférico utilizando a estratégia de análise convencional. O primeiro passo constitui na seleção da população celular de interesse em gráficos de distribuição pontual de tamanho-FSC *versus* granulosidade-SSC (A). Após a seleção da região de interesse – R1, o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, pode ser identificado em gráficos bidimensionais de distribuição pontual da fluorescência 1 (FL1) *versus* fluorescência 2 (FL2) (B).

Além da análise convencional, também foi realizada estratégia adicional de confirmação de seleção de população. Essa análise consistiu na seleção da população celular em que há presença ou ausência do marcador em questão. Após a seleção da região de interesse, a frequência de subpopulações celulares fluorescentes ou a ausência dela, dentro da população selecionada, foi obtida nos mesmos gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, já delimitados com a estratégia de análise convencional.

4.2.1.2 Análise do marcador CD56 em subpopulações de células CD3⁻CD16⁺

A análise de subpopulações de células CD3⁻CD16⁺ foi feita segundo protocolo proposto por GADDY *et al.* (1997). A figura 6 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise das subpopulações de células CD3⁻CD16⁺CD56⁻ e CD3⁻CD16⁺CD56⁺. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos (Fig.6A), foram construídos gráficos de FL1/CD3 *versus* FL3/CD16, onde uma nova região R2 foi determinada para a população CD3⁻CD16⁺ (Fig.6B). Posteriormente, gráficos de FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 foram empregados, onde uma nova região (R3) foi determinada para a população CD3⁻CD56⁺ (Fig.6C). Em seguida, após a combinação das regiões R1, R2 e R3 através das fórmulas “G2=R2+R3 e G3=R1 *and* G2” onde “+” representa o somatório de células confinadas nas regiões R1 e R2 e “*and*” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em G2 e R1. Em seguida gráficos de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56, contendo as células em G3, foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações CD3⁻CD16⁺CD56⁻ e CD3⁻CD16⁺CD56⁺ (Fig.6D).

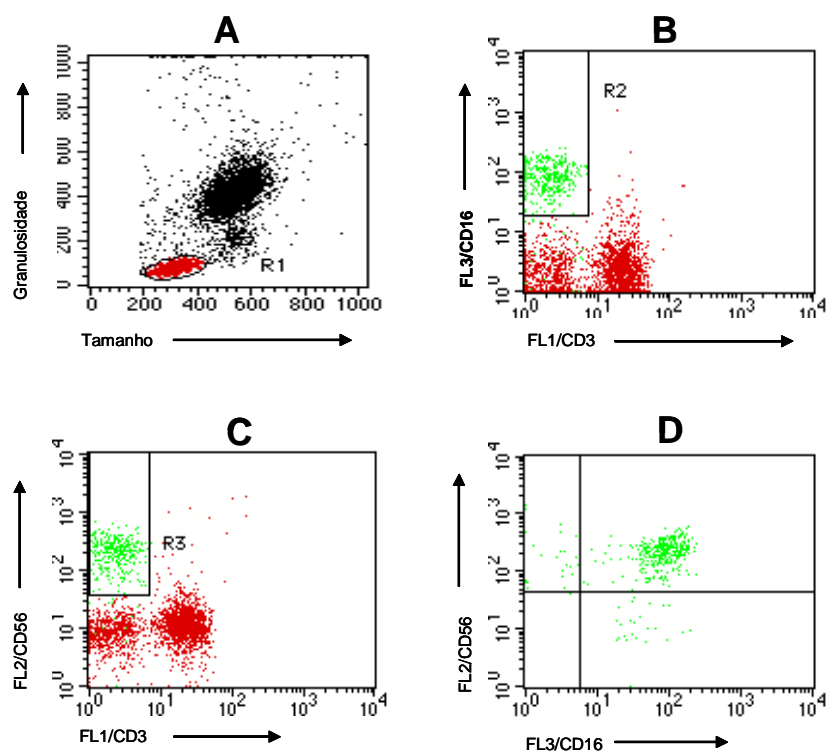


FIGURA 6 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações de células NK: $CD3^-CD16^+CD56^-$ e $CD3^-CD16^+CD56^+$ por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL3/CD16 utilizado para selecionar a população celular $CD3^-CD16^+$ (R2). (C) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 utilizado para selecionar a população celular $CD3^-CD56^+$ (R3). (D) Após a combinação das regiões R1, R2 e R3 através das fórmulas “G2=R2 + R3 e G3=R1 and G2” um gráfico de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56 contendo as células em G3 foi utilizado para quantificar os percentuais das subpopulações de células NK.

4.2.1.3 Análise de subpopulações de células CD3⁻CD56⁺

A análise de células CD3⁻CD56⁺ foi realizada segundo protocolo proposto por COOPER *et al.* (2001). A figura 7 ilustra a sequência de procedimentos para a análise de células CD3⁻CD56^{dim}CD16^{-/+} e CD3⁻CD56^{bright}CD16^{-/+}. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Fig.7A), foram construídos gráficos de FL1/CD3 versus FL2/CD56, onde uma região (R2) selecionou a população CD3⁻CD56⁺ (Fig.7B). O próximo passo consistiu na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “G2=R1 and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida, gráficos de FL3/CD16 versus FL2/CD56, contendo as células confinadas em G2, foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações CD3⁻CD56^{dim}CD16^{-/+} e CD3⁻CD56^{bright}CD16^{-/+} (Fig.7C).

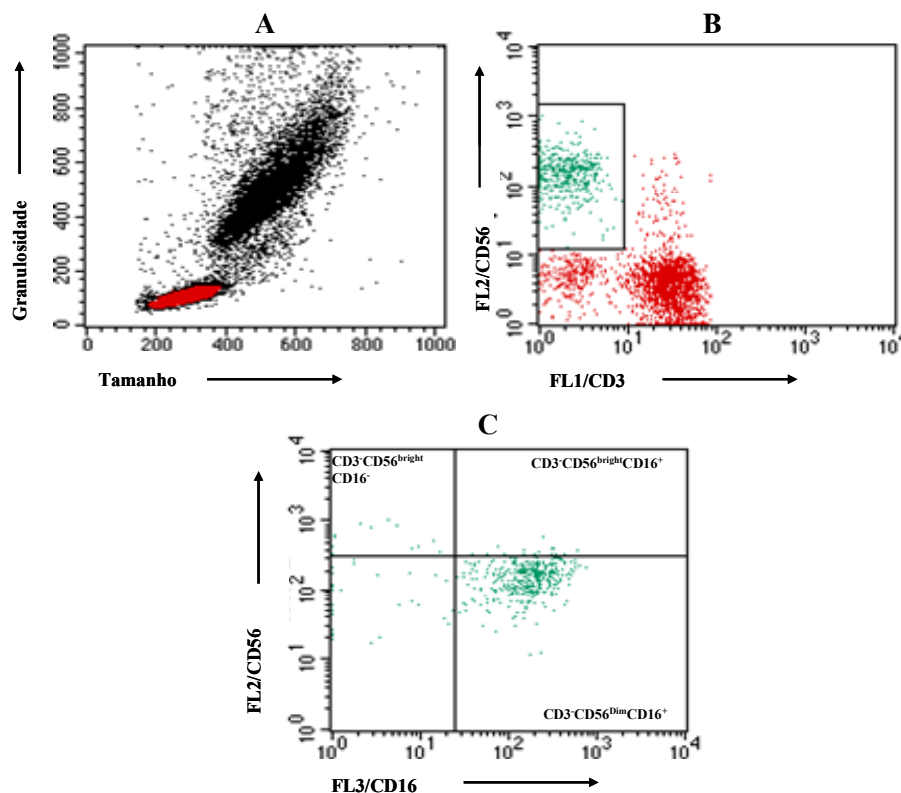


FIGURA 7 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações $CD3^+CD56^{dim}CD16^{-/+}$ e $CD3^+CD56^{bright}CD16^{-/+}$ por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 versus FL2/CD56 (R2) utilizado para selecionar a população celular $CD3^+CD56^+$ - R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um gráfico de FL3/CD16 versus FL2/CD56, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações $CD3^+CD56^{dim}CD16^{-/+}$ e $CD3^+CD56^{bright}CD16^{-/+}$.

4.2.1.4 Análise da expressão do receptor de quimiocina CCR5

A figura 8 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise dos receptores de quimiocinas. Após a seleção da região de interesse, baseada em aspectos morfométricos obtidos através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Fig.8A), foram construídos gráficos de distribuição puntual de FL1 versus FL2, onde foi construída a região R2, delimitando a população em estudo (Fig.8B). O próximo passo consistiu na construção de histogramas unidimensionais de FL1 versus FL2 combinando as regiões R1 e R2 para quantificar a intensidade média de fluorescência do receptor na população celular de interesse (Fig.8C).

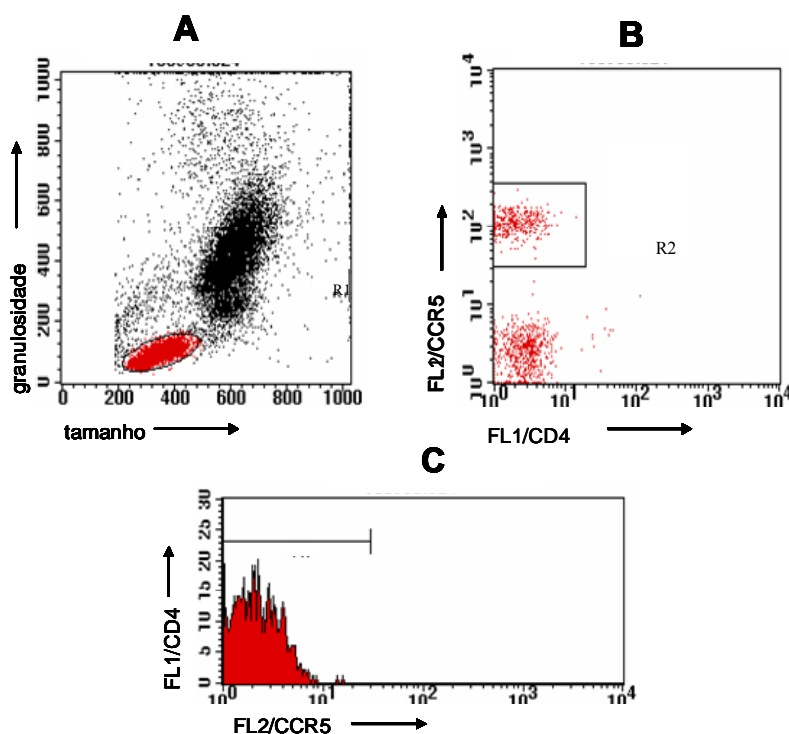


FIGURA 8 – Sequência de procedimentos utilizados para as análises da expressão de receptores de quimiocinas por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/CCR5 (R2) utilizado para selecionar a população de linfócitos expressando o receptor – R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um histograma unidimensional para quantificar a expressão do receptor, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal.

4.2.2 Extração do DNA, Amplificação de CCR5 Δ 32

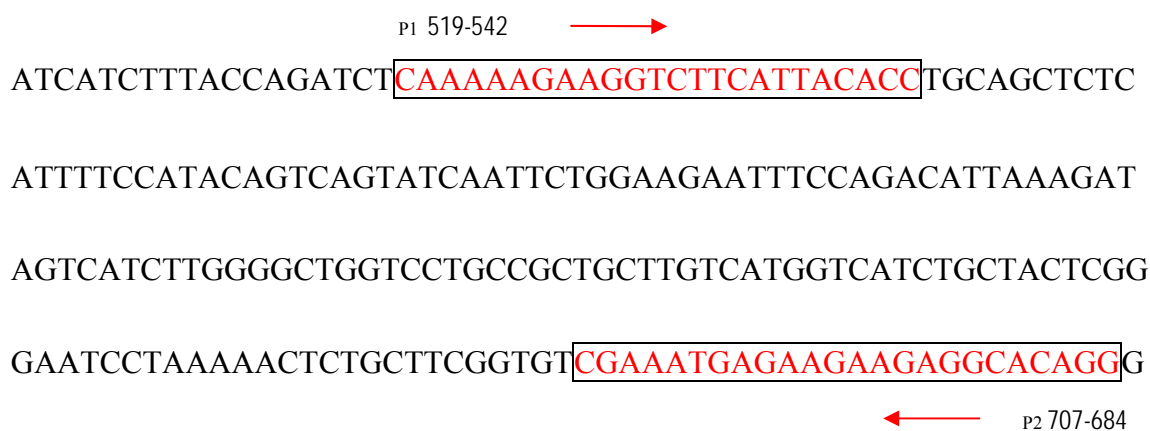
4.2.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi isolado a partir de 200 μ L de sangue total através do Kit de extração QIAamp Blood Kit (QIAGEN Inc, Santa Clarita, CA) conforme indicado pelo fabricante.

4.2.2.2 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A CCR5 (189 aminoácidos) foi amplificada por PCR do DNA viral utilizando-se a enzima TaqGold® em uma reação com 40 ciclos. Os iniciadores utilizados na reação foram: senso CAAAAGAAGGTCTTCATTACACC (P1) e anti-senso CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTCG (P2), conforme mapa abaixo. A PCR foi preparada para um volume final de 50 μ L como se segue: 5 μ L de DNA, 10 μ L de tampão [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 0,3 μ L de 25mM dNTP, 1 μ L de *primer mix*, 0,2 μ L de *TAQ* e 33,5 μ L de água. A mistura foi colocada a 5 ciclos em 94°C, 1 min para desnaturação, 56°C, 1 min para anelagem em 72°C, 1 min e 30 seg para extensão e depois 40 ciclos em 94°C, 30 seg para desnaturação, 61°C, 30 seg para anelagem em 72°C, 45 seg para extensão. O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% com GELRED® e visualizado sob luz ultravioleta. A distribuição genotípica foi determinada por contagem direta. O resultado da amplificação da PCR foi um fragmento de 189pb, quando um alelo normal do CCR5 estava presente, ou 157 pb para a variante com deleção CCR5 Δ 32. Posteriormente foi realizado sequenciamento para confirmar deleção CCR5 Δ 32.

Mapa CCR5



4.2.3 Quantificação da Viremia Plasmática

A quantificação do RNA viral foi realizada através da tecnologia b-DNA – Bayer/ metodologia Versant HIV-1 RNA 3.0 – segundo indicações do fabricante. O limite de detecção é de 50 ($<1,69\log_{10}$) cópias/mL.

4.3 Análise Estatística

A fase exploratória dos dados foi realizada por meio da Análise gráfica e da obtenção de medidas-resumo. Para as variáveis contínuas foram calculadas as médias e medianas. Testes de normalidade foram realizados para cada variável, permitindo a escolha do procedimento estatístico mais adequado. A comparação entre os grupos foi realizada por meio das médias, utilizando-se o test t de Student e através das medianas, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Para todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Stata 9.0 (StataCorp, 2005).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos indivíduos do estudo

Foram incluídos 28 pacientes comprovadamente infectados pelo HIV-1, por transmissão vertical, divididos em dois grupos diferentes de acordo com os critérios de alocação descritos em Material e Métodos. As características clínicas, imunológicas e virológicas que os pacientes infectados pelo HIV-1 apresentavam no momento da inclusão no estudo (2006) e na segunda análise (2009) estão descritas na tabela 4 e foram obtidas através da revisão do prontuário médico de cada paciente.

TABELA 4 – Características demográficas, clínicas, imunológicas e virológicas das crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1

	Crianças Infectadas pelo HIV-1			
	Não tratadas		Tratadas	
	2006	2009	2006	2009
n	9	8	19	19
Idade (mediana - meses)	100.64	143.17	121.21	157.91
Sexo (Masculino/Feminino)	5/4	5/3	11/8	11/8
Classificação CDC				
N	3 (33.33%)	-	2 (10.53)	-
A	4 (44.44%)	6 (75%)	3 (15.79)	2 (10.53)
B	2 (22.22%)	2 (25%)	7 (36.84)	3 (15.79)
C	-	-	7 (36.84)	14 (73.68)
Uso de TARV				
Durante a Gravidez	0		3 (15.79%)	
No momento do Parto	0		2 (10.53%)	
Até seis semanas	0		0	
Aleitamento materno				
Não amentado	0		3	
0 a 3 meses	1		8	
3 a 6 meses	1		3	
> 6 meses	7		5	
Perfil Imunológico				
CD4 mediana(%)	30.00	26.1	23.42	25.24
(IQR 25%-75%)	24.56 – 32.49	20.75 – 36.75	11.2 – 33.24	16.76 – 36.28
CD8 mediana (%)	39.79	48.35	41.5	41.30
(IQR 25%-75%)	38.57 – 6.75	36.9 – 53.6	31.34 – 49.58	35.4 – 49.6
Perfil Viroológico				
Mediana Carga Viral (log)	4.00	3.53	4.04	1.9 ^{a,b,c}
(IQR 25%-75%)	(3.99 – 4.17)	(2.66 – 3.83)	(2.23 – 4.54)	(1.9 – 5.01)
Terapia Antirretroviral				
Não Tratados	9	8	0	0
Em Tratamento	0	1	19	19

^a - diferença de significativa entre grupo não tratado e tratado entre 2006 e 2009; ^b - diferença de significativa entre grupo não tratado e tratado em 2009; ^c - diferença de significativa entre as crianças tratadas em 2006 e 2009; IQR: Intervalo interquartil.

5.2 Análise longitudinal da frequência de subpopulações linfocitárias do sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV

5.2.1 Subpopulações de células T

Para avaliar o percentual de subpopulações de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) na população de células totais do sangue periférico foram realizados ensaios de tripla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

A Figura 9 mostra os resultados do percentual de linfócitos $CD4^+$ na população de células Totais do sangue periférico das crianças. A análise dos resultados não demonstrou nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) na população de células T $CD4^+$, em 2006, ao comparamos os grupos NT e T (média em %: NT=30,48, T=22,69, $p=0,05$). Esse mesmo comportamento foi observado no ano de 2009 (média em %: NT=20,75, T=25,47, $p=0,63$). Ao analisarmos percentual de linfócitos $CD4^+$ das crianças não tratadas em 2006 e compararmos com esse mesmo grupo de crianças em 2009 não encontramos diferença significativa ($p=0,14$). Desse mesmo modo não verificamos diferença significativa ($p=0,21$) ao compararmos as crianças tratadas em 2006 e 2009.

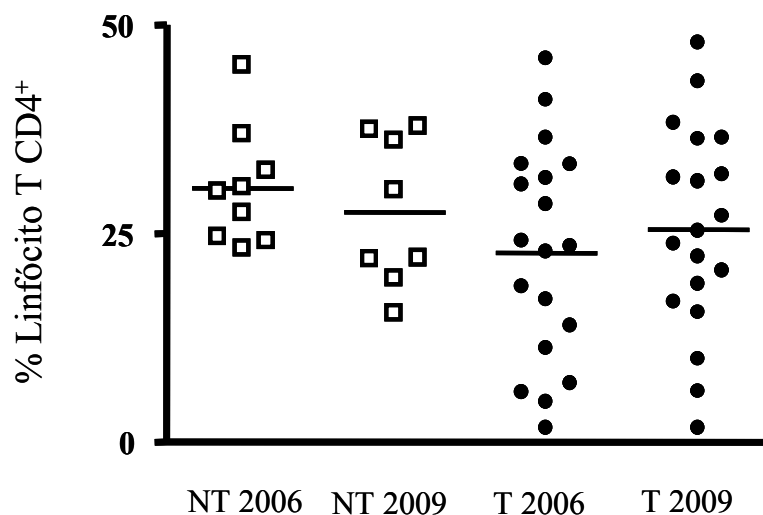


FIGURA 9: Análises do percentual de células T CD4⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD4⁺ em 2006 e em 2009 para o grupo NT está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

A análise dos resultados não demonstrou nenhuma diferença significativa na população de células T CD8⁺, em 2006, ao comparamos os grupos NT e T (média em %: NT=42,61, T=43,31, p=0,86) (Figura 10). Esse mesmo comportamento foi observado no ano de 2009 (média em %: NT=44,64, T=43,16, p=0,78). Ao analisarmos percentual de linfócitos CD8⁺ das crianças não tratadas em 2006 e compararmos com esse mesmo grupo de crianças em 2009 também não encontramos diferença significativa (p=0,48). Desse mesmo modo não verificamos diferença significativa (p=0,63) ao compararmos as crianças tratadas em 2006 e 2009.

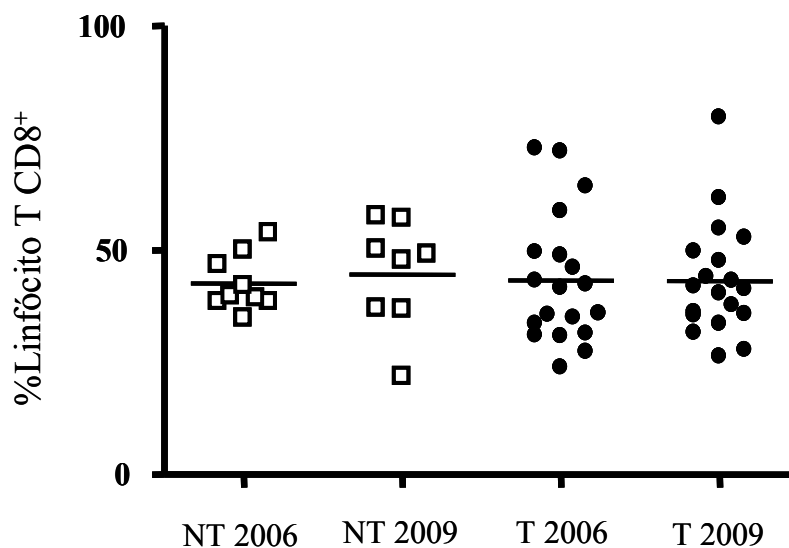


FIGURA 10: Análises do percentual de células T CD8⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD8⁺ em 2006 e em 2009 para o grupo NT está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/FITC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.3 Análise longitudinal da frequência de expressão de moléculas de ativação em linfócitos do sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV

5.3.1 Análise da frequência de células T CD4⁺HLA-DR⁺

Para avaliar a frequência de células CD4⁺HLA-DR⁺ do sangue periférico foi realizado ensaio de dupla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

Os percentuais de células CD4⁺HLA-DR⁺ na população de linfócitos CD4⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 11. A análise dos resultados não demonstrou nenhuma diferença significativa ($p=0,79$) na população de células T CD4⁺HLA-DR⁺, em 2006, ao comparamos os grupos NT e T (média em %: NT=5,90, T=7,63). Esse mesmo comportamento foi observado no ano de 2009 (média em %: NT=5,97, T=11,74, $p=0,07$). Na análise dos resultados não verificamos diferença significativa ($p=0,89$) ao compararmos as crianças não tratadas em 2006 e 2009. Entretanto, a análise dos dados revelou aumento significativo (representado no gráfico) no percentual de células CD4⁺HLA-DR⁺ circulantes no sangue periférico das crianças do grupo T, em 2009 ($p=0,001$), em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2006.

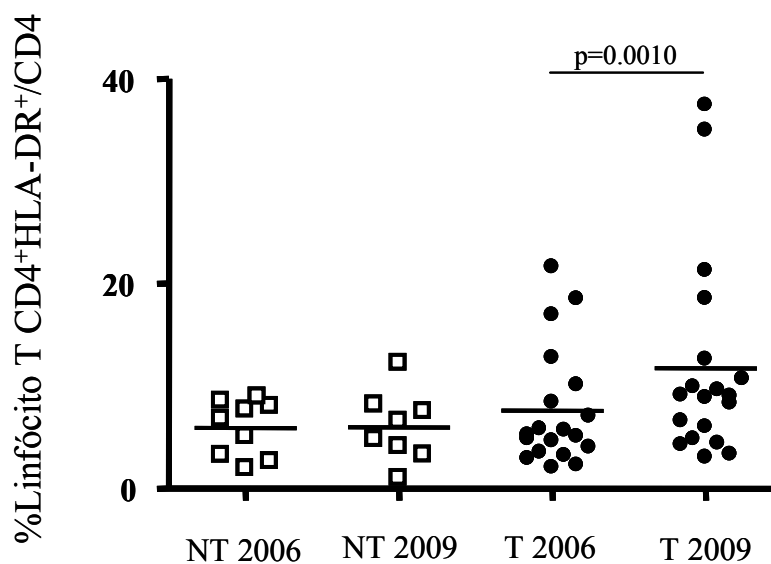


FIGURA 11: Análises do percentual de células T $CD4^+HLA-DR^+/CD4^+$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n=19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n=19). A análise comparativa do percentual de células T $CD4^+HLA-DR^+/CD4^+$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-HLA-DR/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.3.2 Análise da frequência de células T CD4⁺CD38⁺

Para avaliar a frequência de células CD4⁺CD38⁺ do sangue periférico foi realizado ensaios de dupla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

Os percentuais de células CD4⁺CD38⁺ na população de linfócitos CD4⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 12. A análise dos resultados não revelou diferença significativa no percentual de células CD4⁺CD38⁺ circulantes no sangue periférico das crianças do grupo NT e T, em 2006 (média em %: NT=77,90; T=66,61, p=0,23), e nem na análise realizada em 2009 (média em %: NT=73,76; T=74,72; p=0,16). Ao analisarmos percentual de linfócitos CD4⁺CD38⁺ das crianças não tratadas em 2006 e compararmos com esse mesmo grupo de crianças em 2009 (p=0,08) também não encontramos diferença significativa. Desse mesmo modo não verificamos diferença significativa ao compararmos as crianças tratadas em 2006 e 2009 (p=0,80).

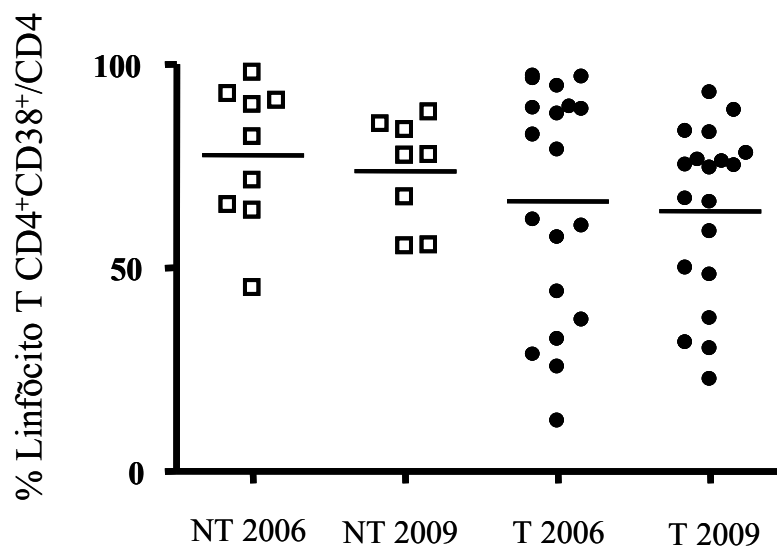


FIGURA 12: Análises do percentual de células T CD4⁺CD38⁺/CD4⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD4⁺CD38⁺/CD4⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-CD38/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.3.1 Análise da frequência de células T CD8⁺HLA-DR⁺

Para avaliar a frequência de células CD8⁺HLA-DR⁺ do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

Os resultados relativos aos percentuais de células CD8⁺HLA-DR⁺ na população de linfócitos CD8⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 13. A análise dos dados não mostrou diferença significativa no percentual de células CD8⁺HLA-DR⁺ circulantes no sangue periférico de crianças do grupo NT em relação ao grupo T em 2006 (média em %: NT=22,62 ; T =17,46, p=0,28) e em 2009 (média em %: NT=24,61; T=19,73, p=0,37). Ao analisarmos percentual de linfócitos CD8⁺HLA-DR⁺ das crianças não tratadas em 2006 e compararmos com esse mesmo grupo de crianças em 2009 também não encontramos diferença significativa (p=0,36). Desse mesmo modo não verificamos diferença significativa (p=0,17) ao compararmos as crianças tratadas em 2006 e 2009.

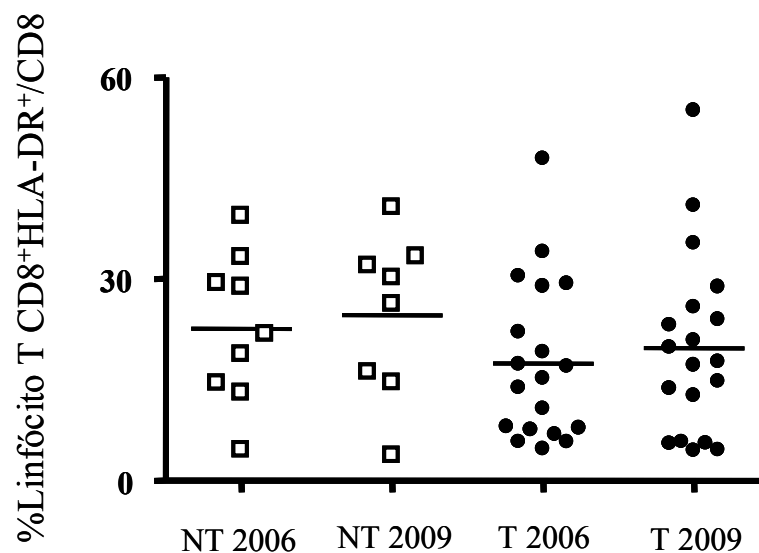


FIGURA 13: Análises do percentual de células T $CD8^{+}HLA-DR^{+}/CD8^{+}$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T $CD8^{+}HLA-DR^{+}/CD8^{+}$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/TC e anti-HLA-DR/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.3.2 Análise da frequência de células T CD8⁺CD38⁺

Para avaliar a frequência de células CD8⁺CD38⁺ do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

Os resultados relativos aos percentuais de células CD8⁺CD38⁺ na população de linfócitos CD8⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 14. A análise dos dados não mostrou diferença significativa no percentual de células CD8⁺CD38⁺ circulantes no sangue periférico de crianças do grupo NT em relação ao grupo T (média em %: NT=74,04; T=55,84; p=0,09), em 2006. Em 2009, nova análise do percentual de células CD8⁺CD38⁺ foi realizada e os resultados também não revelaram diferença significativa entre os grupos NT e T (média em %: NT=74,46; T=56,73; p=0,05). Ao analisarmos percentual de linfócitos CD8⁺CD38⁺ das crianças não tratadas em 2006 e compararmos com esse mesmo grupo de crianças em 2009 também não encontramos diferença significativa (p=0,59). Desse mesmo modo não verificamos diferença significativa (p=,047) ao compararmos as crianças tratadas em 2006 e 2009.

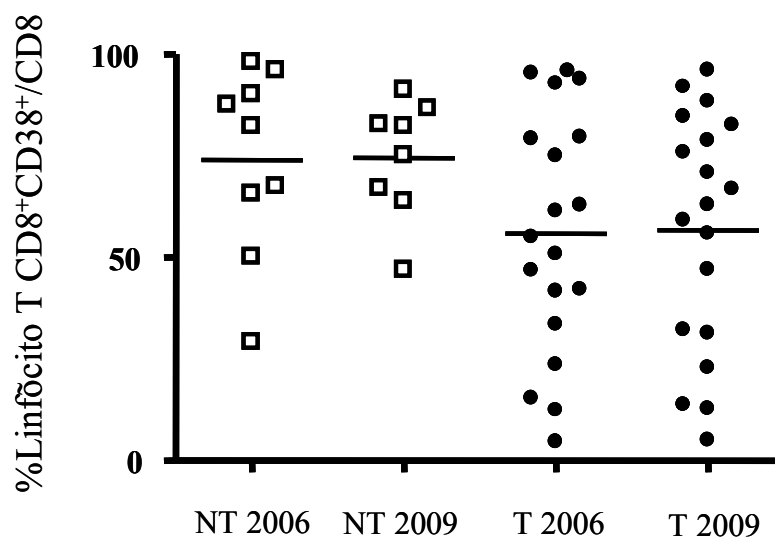


FIGURA 14: Análises do percentual de células T CD8⁺CD38⁺/CD8⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células T CD8⁺CD38⁺/CD8⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8/APC e anti-CD38/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.3.3 Análise da frequência de células T HLA-DR⁺CD38⁺

Para avaliar a frequência de células CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺ e células CD8⁺ HLA-DR⁺CD38⁺ do sangue periférico foram realizados ensaios de tripla marcação e utilizada a estratégia de análise convencional como descrito em Material e Métodos.

Os resultados relativos aos percentuais de células CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺ na população de linfócitos CD4⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 15A. A análise dos resultados não revelou diferença significativa no percentual de células CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺ circulantes no sangue periférico de crianças do grupo NT em relação ao grupo T (média em %: NT=8,96; T=16,54; p=0,43).

Os resultados relativos aos percentuais de células CD8⁺HLA-DR⁺CD38⁺ na população de linfócitos CD8⁺ do sangue periférico das crianças estão mostrados na Figura 15B. A análise do percentual de linfócitos CD8⁺HLA-DR⁺CD38⁺ no sangue periférico das crianças avaliadas não revelou diferença significativa entre os grupos NT e T (média em %: NT=4,38; T=3,38; p=0,96).

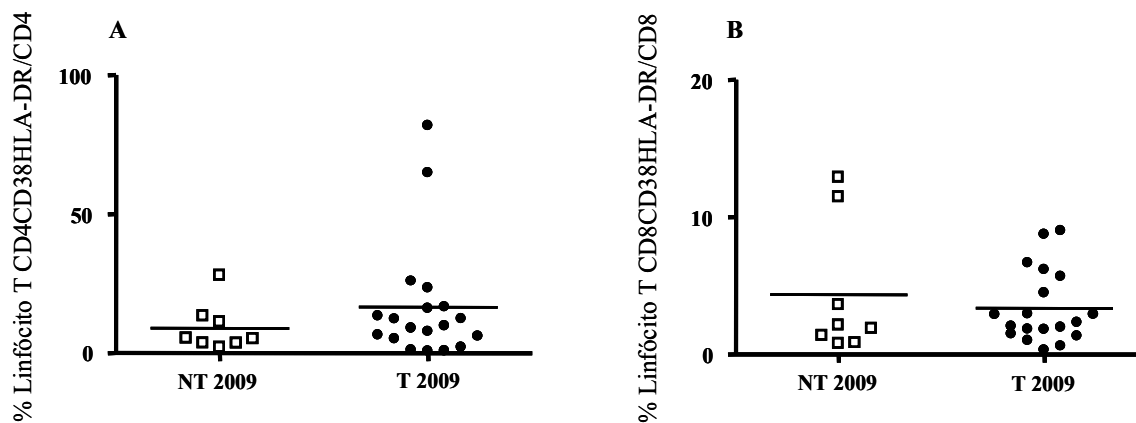


FIGURA 15: Análises do percentual de células T CD4⁺HLA-DR/CD38⁺/CD4⁺ (A) e de células T CD8⁺HLA-DR/CD38⁺/CD8⁺ (B) no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC, anti-CD38/PE, anti-HLA-DR/TC e anti-CD8/APC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.4 Análise longitudinal da frequência de populações e subpopulações de células NK no sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV

5.4.1 Distribuição percentual da população de células NK

A Figura 16 mostra o resultado do percentual de células NK totais (CD3⁻CD16⁺CD56^{+/+}) na população de células totais circulantes. A análise dos resultados não revelou diferença significativa no percentual de células NK totais nas crianças do grupo NT e T, em 2006 (média em %: NT=9,57; T=14,22; p=0,23). Em 2009, nova análise foi realizada e os resultados também não revelaram diferença significativa (média em %: NT=9,85; T=13,5; p=0,60) entre os grupos NT e T. Na análise comparativa dos resultados do percentual de células NK totais em 2006 em relação a 2009 para o grupo de crianças não tratadas não foi encontrada diferença significativa (p=0,58). A análise comparativa dos resultados do percentual de células NK totais, em 2006 e 2009, não revelou diferença significativa entre as crianças tratadas (p=0,87).

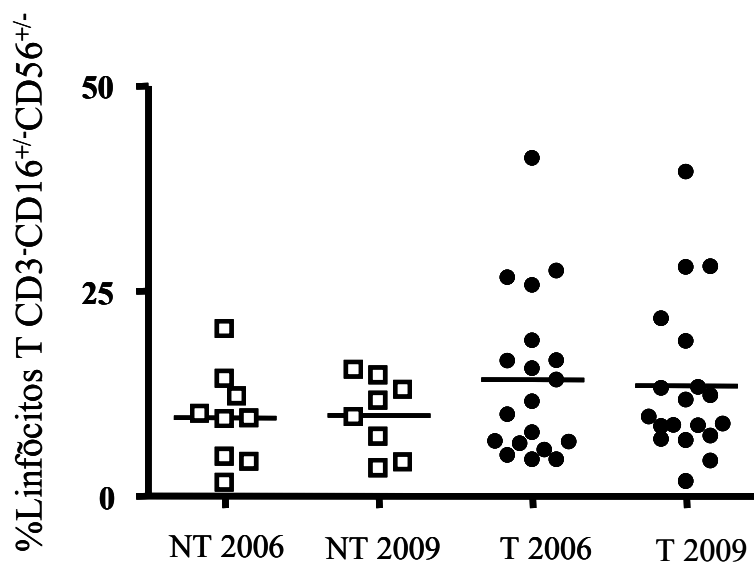


FIGURA 16: Análise do percentual de células NK $CD3^-CD16^{+/+}CD56^{+/+}$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK $CD3^-CD16^{+/+}CD56^{+/+}$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.4.2 Distribuição percentual de subpopulações de células NK

Para quantificar os percentuais das subpopulações de células NK ($CD3^-CD16^+CD56^-$, $CD3^-CD16^+CD56^+$ e $CD3^-CD16^-CD56^+$) do sangue periférico foram realizados ensaios de tripla marcação e utilizada a estratégia de análise para as células NK, segundo proposto por Gaddy *et al.* (1997), como descrito em Material e Métodos.

A análise do percentual das células $CD3^-CD16^+CD56^-$ (FIG.17) revelou frequência significativamente maior ($p=0,002$) nas crianças infectadas não tratadas com antirretroviral quando comparadas com as crianças infectadas tratadas, em 2006 (média em %: NT=47,65; T=17,52). Da mesma maneira, em 2009, a análise do percentual das células $CD3^-CD16^+CD56^-$ também revelou frequência significativamente maior ($p=0,001$) nas crianças infectadas não tratadas com antirretroviral quando comparadas com as crianças infectadas tratadas (média em %: NT=52,28; T=20,47). Já na análise do percentual das células $CD3^-CD16^+CD56^-$ das crianças infectadas não tratadas em 2006 não revelou diferença significativa em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009 ($p=0,81$). Esse mesmo comportamento foi observado ao compararmos as crianças infectadas tratadas em 2006 e 2009 ($p=0,05$).

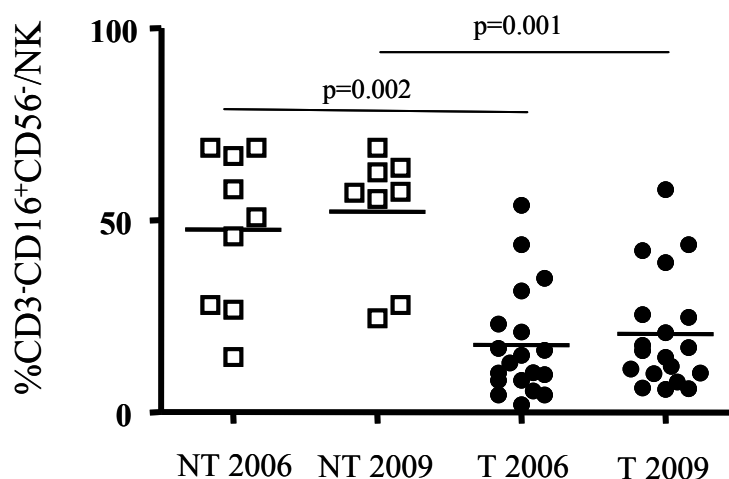


FIGURA 17: Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

A análise do percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^+$ (FIG 18) não revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados NT e T, em 2006 (média em %: NT=23,20; T=37,24; $p=0,05$). Entretanto, no ano de 2009, as crianças não tratadas com antirretroviral revelaram percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^+$ significativamente menor que as crianças tratadas (média em %: NT=26,64; T=40,66; $p=0,03$). A análise do percentual das células $CD3^+CD16^+CD56^+$ das crianças infectadas não tratadas em 2006 não revelou diferença significativa em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009 ($p=0,05$). A análise do percentual das células $CD3^+CD16^+CD56^+$ das crianças infectadas tratadas em 2006 também não revelou diferença significativa em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009 ($p=0,05$).

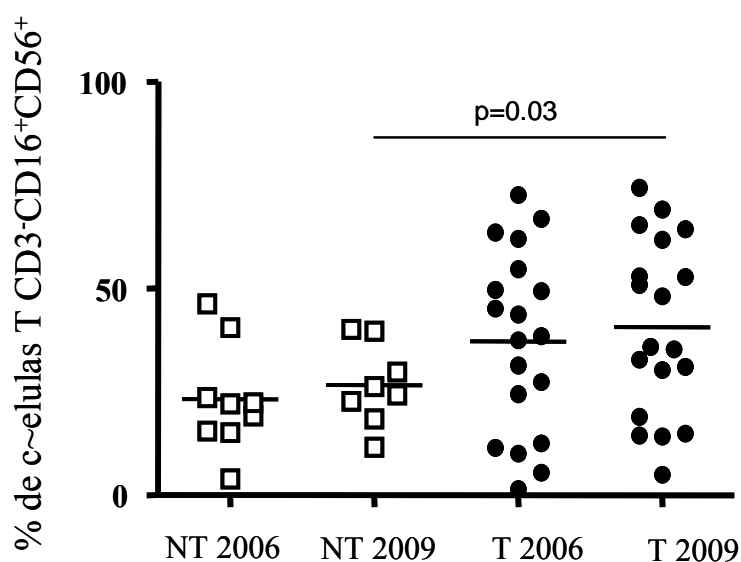


FIGURA 18: Análise do percentual de células NK $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

Com relação à fração de células $CD3^-CD16^-CD56^+$ (FIG 19), a análise não revelou diferenças significativas entre os grupos NT e T, em 2006 (média em %: NT=29,15; T=45,24; $p=0,08$). Entretanto, no ano de 2009, foi observado percentual significativamente menor de células $CD3^-CD16^-CD56^+$ no grupo de crianças não tratadas em relação ao grupo de crianças tratadas (média em %: NT=21,33; T=38,82; $p=0,02$). Na análise do percentual das células $CD3^-CD16^-CD56^+$ das crianças infectadas não tratadas em 2006 não revelou diferença significativa ($p=0,11$) em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009. A análise do percentual de células $CD3^-CD16^-CD56^+$ revelou queda significativa dessa população celular no grupo T no ano de 2009 em relação a 2006 ($p=0,001$).

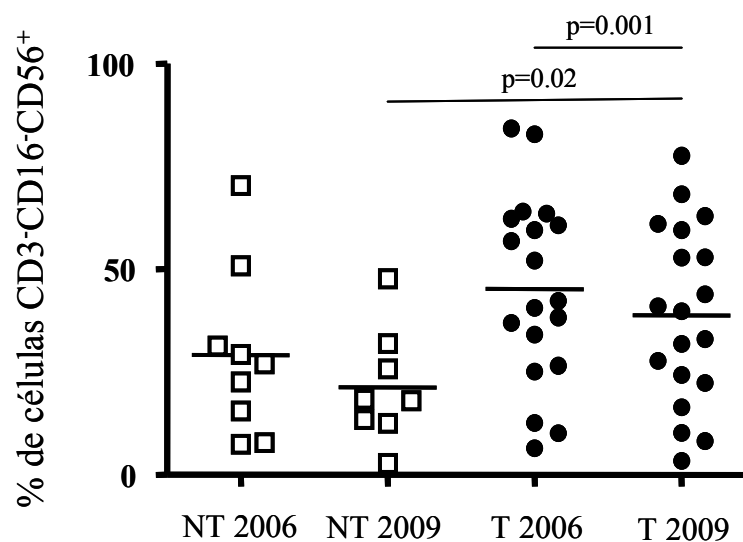


FIGURA 19: Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

As células NK também podem ser categorizadas em quatro outras subpopulações baseadas na intensidade de expressão de CD56. Para quantificar os percentuais das subpopulações de células NK ($CD3^-CD16^+CD56^{dim}$, $CD3^-CD16^-CD56^{dim}$, $CD3^-CD16^+CD56^{bright}$ e $CD3^-CD16^-CD56^{bright}$) do sangue periférico foram realizados ensaios de tripla marcação e utilizada a estratégia de análise para as células NK, segundo proposto por Cooper *et al.* (2001), como descrito em Material e Métodos.

A análise do percentual das células $CD3^-CD16^+CD56^{dim}$ (FIG. 20) revelou percentual significativamente menor ($p=0,0004$) nas crianças infectadas não tratadas com antirretroviral quando comparadas com as crianças infectadas tratadas, tanto na análise realizada em 2006 (média em %: NT=45,97; T=77,74; $p=0,0004$), quanto na análise feita em 2009 (média em %: NT=43,43; T=76,02; $p=0,001$). Já na análise do percentual das células $CD3^-CD16^+CD56^{dim}$ das crianças infectadas não tratadas em 2006 não revelou diferença significativa ($p=0,64$) em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009. Esse mesmo comportamento foi observado ao compararmos as crianças infectadas tratadas em 2006 e 2009 ($p=0,56$).

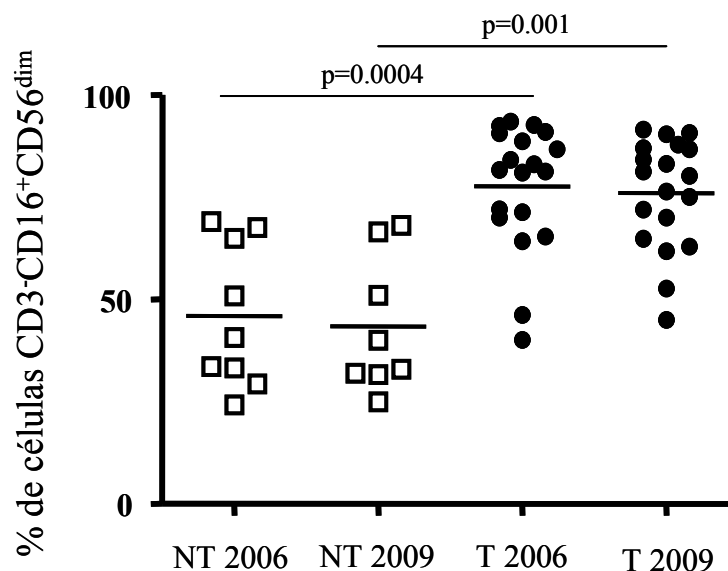


FIGURA 20: Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

A análise do percentual das células CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} (FIG. 21) não revelou diferença significativa nas crianças infectadas não tratadas com antirretroviral quando comparadas com as crianças infectadas tratadas, em 2006 (média em %: NT=2,30; T=3,18; p=0,39), Em 2009, a análise dos resultados também não revelou diferença significativa no percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} no grupo NT em relação ao grupo T (média em %: NT=2,04; T=3,56; p=0,40). Já na análise dos resultados do percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} nas crianças infectadas não tratadas revelou queda significativa do percentual em 2009 em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2006 (p=0,04). Entretanto, a análise do percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} das crianças infectadas tratadas em 2006 não revelou diferença significativa em relação a esse mesmo grupo de crianças avaliadas em 2009 (p=0,15).

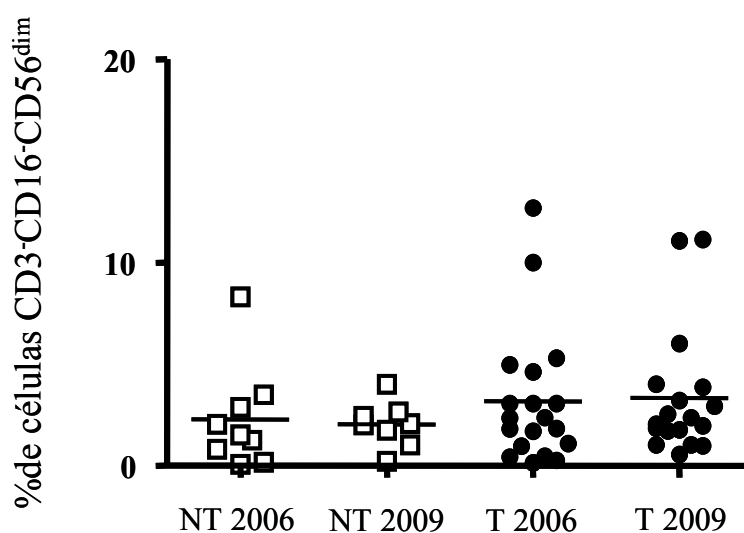


FIGURA 21: Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{dim} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

A Figura 22 mostra o resultado do percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^{bright}$ no sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1. A análise dos resultados não revelou diferença significativa no percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^{bright}$ nas crianças do grupo NT e T, em 2006 (média em %: NT=7,62; T=5,83; $p=0,27$). Diferença significativa também não foi observada na análise dos resultados realizada em 2009 (média em %: NT=6,94; T=6,11; $p=0,64$). A análise dos resultados do percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^{bright}$ nas crianças infectadas não tratadas não revelou diferença significativa ao compararmos os dados da análise realizada em 2006 em relação a 2009 ($p=0,19$). Dessa mesma forma, a análise dos resultados do percentual de células $CD3^+CD16^+CD56^{bright}$ nas crianças infectadas tratadas não revelou diferença significativa ao compararmos os dados da análise realizada em 2006 em relação a 2009 ($p=0,82$).

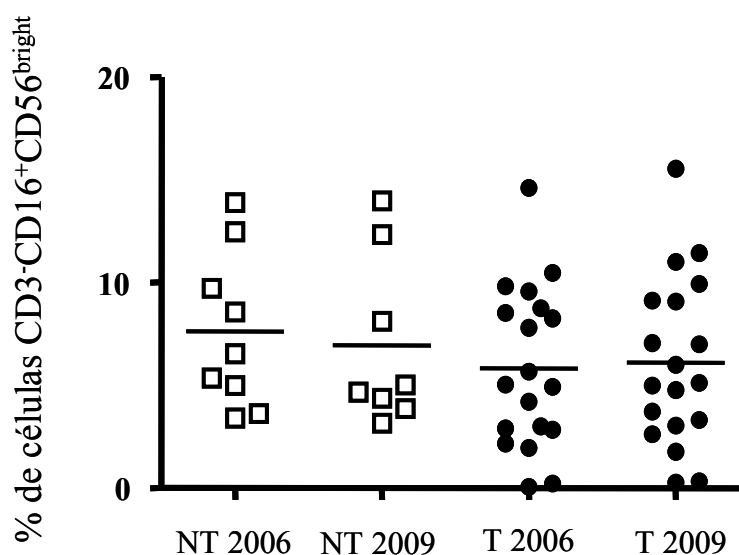


FIGURA 22: Análise do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{bright} no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{bright} em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

A Figura 23 mostra o resultado do percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} no sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1. A análise dos resultados não revelou diferença significativa no percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} nas crianças do grupo NT e T, em 2006 (média em %: NT=0,66; T=0,71; p=0,82). Diferença significativa também não foi observada na análise dos resultados realizada em 2009 (média em %: NT=0,56; T=1,09; p=0,23). A análise dos resultados do percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} nas crianças infectadas não tratadas não revelou diferença significativa ao comparamos os dados da análise realizada em 2006 em relação a 2009 (p=0,12). Entretanto, a análise dos resultados do percentual de células CD3⁻CD16⁻CD56^{bright} nas crianças infectadas tratadas revelou aumento significativo ao comparamos os dados da análise realizada em 2009 em relação a 2006 (p=0,01).

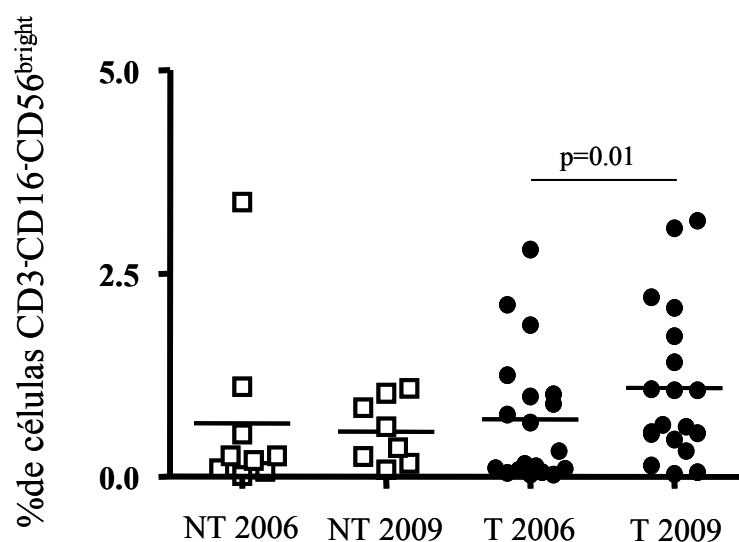


FIGURA 23: Análise do percentual de células NK $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{bright}$ no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2006, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=9) e em Tratamento - T (n= 19) e em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). A análise comparativa do percentual de células NK $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{bright}$ em 2006 e em 2009 está representada no gráfico. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3/FITC, anti-CD16/PE e anti-CD56/TC, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.5 Expressão de receptor de quimiocina CCR5 no sangue periférico de crianças verticalmente infectadas pelo HIV

Para avaliar a expressão do receptor de quimiocina CCR5 em linfócitos CD4⁺ do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e utilizada estratégia de análise específica como descrito em Material e Métodos.

A expressão de CCR5 em linfócitos CD4⁺ no sangue periférico das crianças infectadas pelo HIV-1 está mostrada na Figura 24. A análise dos dados não revelou diferença significativa na expressão de CCR5 em linfócitos CD4⁺ circulantes no sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV-1 não tratadas em relação às crianças infectadas pelo HIV-1 tratadas com antirretroviral (média em %: NT=28,54 ; T=19,10; p=0,34).

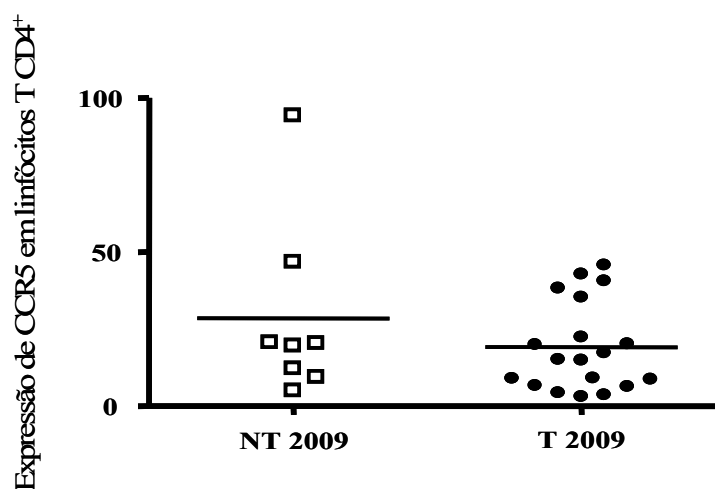


FIGURA 24 - Expressão do receptor de quimiocina CCR5 em linfócitos CD4⁺ circulantes no sangue periférico de crianças infectadas verticalmente por HIV-1. A análise dos dados foi realizada, em 2009, incluindo os grupos Não Tratados - NT (n=8) e em Tratamento - T (n= 19). As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/FITC e anti-CCR5/PE, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos em dispersão e média dos valores individuais obtidos.

5.6 Análise da variante polimórfica delta32 do receptor de quimiocinas próinflamatória CCR5

A análise dos alelos do receptor de quimiocinas próinflamatórias CCR5 no sangue periférico das crianças infectadas pelo HIV-1 está mostrada nas Figuras 25 e 26. A análise do gel mostrou que, na nossa população estudada, não há nenhum paciente homozigótico para deleção de 32 pares de base nos alelos da CCR5. Nossos dados ainda revelaram que o paciente seis apresentou perfil heterozigótico (CCR5/ CCR5 Δ 32⁺), ou seja apresentou um alelo com deleção de 32 pares de base (CCR5 Δ 32) e um alelo do tipo selvagem. Os demais pacientes demonstraram perfil compatível com o normal, ou seja, sem deleção de genes da CCR5.

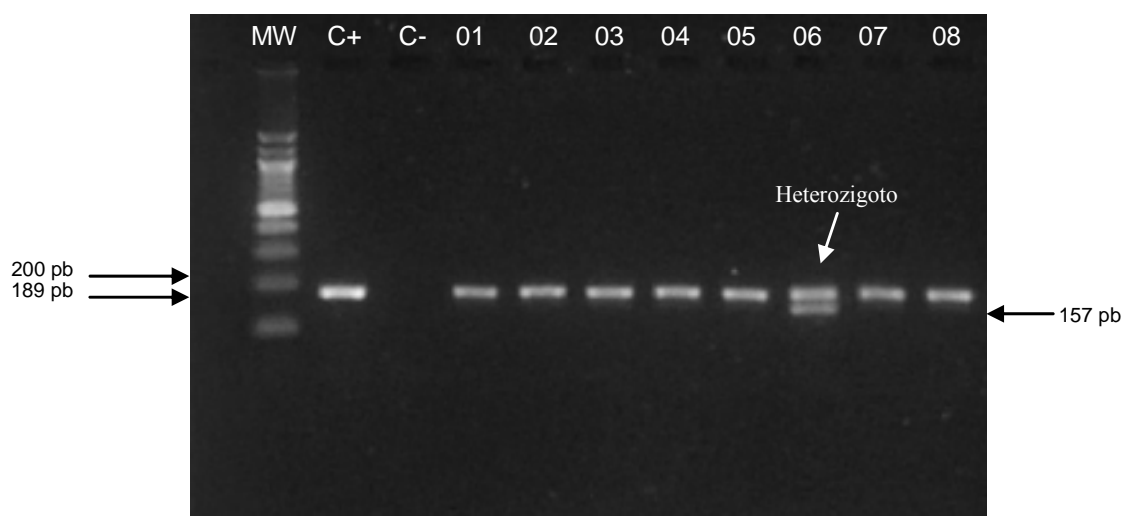


FIGURA 25 – Perfil da PCR do sangue periférico dos pacientes infectados por HIV-1. Os iniciadores foram usados para gerar fragmento selvagem de 189 pb e fragmento com deleção de 157 pb e a corrida foi realizada em gel de agarose a 2%. A posição 6 representa o paciente heterozigoto, sendo um alelo do tipo selvagem (189pb) e um alelo com deleção de 32pb (157pb). Os demais pacientes apresentaram perfil normal com dois alelos do tipo selvagem (189pb).

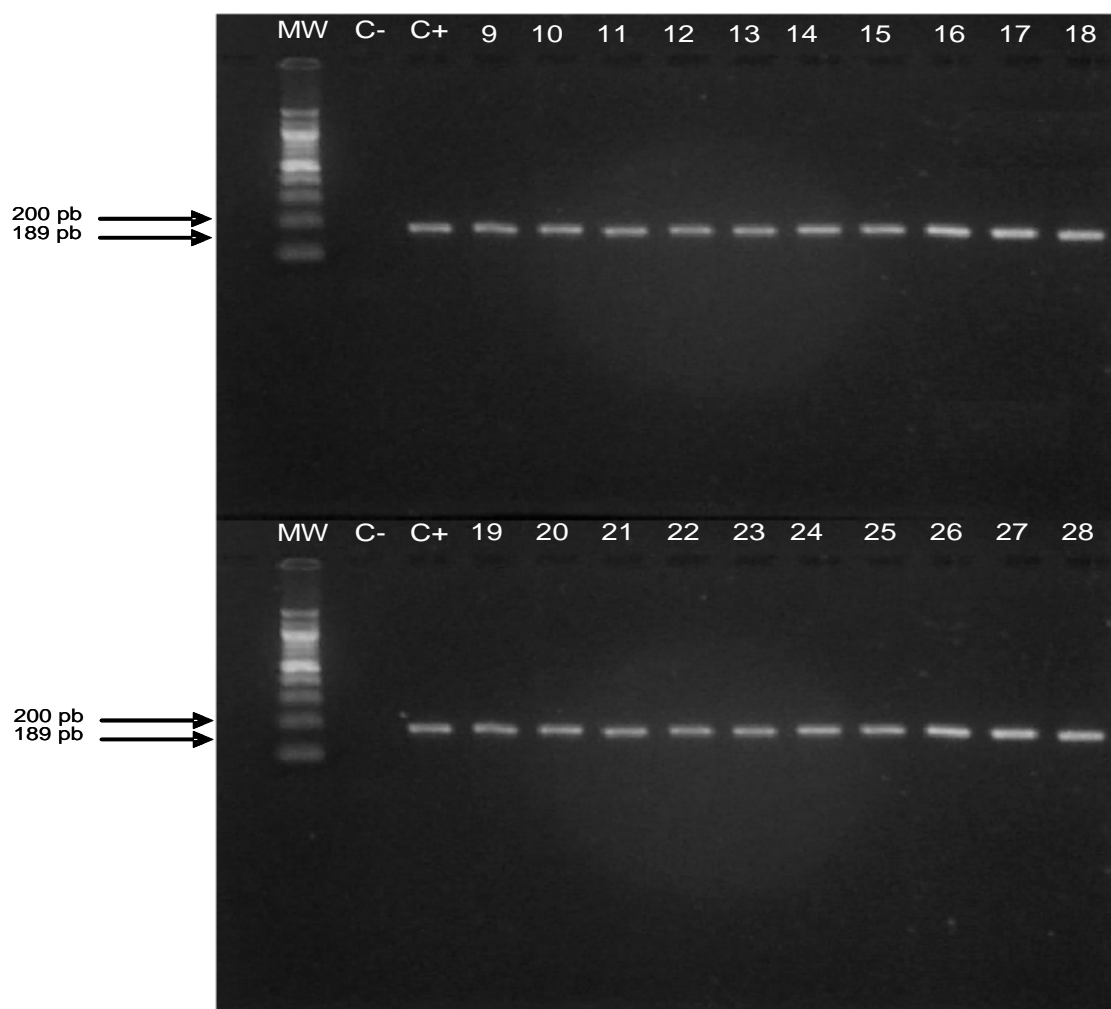


Figura 26 – Perfil da PCR do sangue periférico dos pacientes infectados por HIV-1. Os iniciadores foram usados para gerar fragmento selvagem de 189 pb e fragmento com deleção de 157 pb e a corrida foi realizada em gel de agarose a 2%. Todos os pacientes apresentaram perfil normal com dois alelos do tipo selvagem (189pb).

6 DISCUSSÃO

Os perfis de progressão para AIDS entre os pacientes infectados pelo HIV-1 variam e dependem de uma complexa interação entre fatores do hospedeiro e o potencial patogênico do vírus. Crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 têm períodos de latência até o desenvolvimento da AIDS menores que os adultos. Crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 e assintomáticas por mais de sete anos são pouco usuais, representando apenas 2% da população infectada pelo HIV-1. Essas crianças são de grande interesse, já que representam a chance de se estudar a evolução natural da infecção pelo HIV-1.

O presente estudo objetivou uma análise longitudinal, por citometria de fluxo, dos linfócitos T do sangue periférico de crianças infectadas pelo HIV, a fim de detalhar o perfil fenotípico da resposta imune desencadeada pela infecção pelo HIV. A infecção pelo HIV tem sido bastante estudada nos seus mais diversos detalhes. Um aspecto dessa infecção que se tornou importante neste período foi que, apesar de causar significativas alterações imunológicas e virológicas na maioria das crianças infectadas, há um subgrupo que mantém boa evolução imunológica e virológica sem uso de terapia (OFORI-MANTE *et al.*, 2007).

Esses pacientes têm sido definidos de modos diferentes pelos autores, sendo: crianças infectadas verticalmente que sobreviveram por mais de oito anos, em uso de um ou no máximo dois antirretrovirais (PAUL *et al.*, 2005) ou crianças que na ausência de tratamento permaneciam assintomáticas, com contagem de CD4⁺ normal e carga viral relativamente baixa ou indetectável (HOGAN *et al.*, 2001.). Em nosso estudo, utilizamos a segunda definição.

Desde 1994, depois da divulgação do protocolo 076 do *Aids Clinical Trial Group* (PACTG 076), sabe-se que o uso da zidovudina (AZT) pela gestante infectada e pelo recém-nascido, durante as primeiras semanas de vida, pode reduzir em cerca de 70% o risco de a criança ser infectada, sendo considerado um dos principais avanços no conhecimento sobre a AIDS (CONNOR *et al.*, 1994). Desde então vários fatores de risco foram identificados e medidas foram adotadas com o mesmo objetivo. O uso combinado dos anti-retrovirais (ARV) (WATTS, 2002; MINKOFF, 2003), a via de parto de acordo com a carga viral materna (GARCIA *et al.*, 1999), e a substituição do aleitamento

materno por fórmula láctea (ABRAMS *et al.*, 2004; MAGDER *et al.*, 2005) são considerados determinantes na redução da transmissão vertical do vírus.

De acordo com o Ministério da Saúde, a terapia antirretroviral combinada está indicada para as mulheres grávidas que preenchem os critérios para início de tratamento, visando o controle de sua infecção e a redução da transmissão vertical do HIV. Estudos clínicos e observacionais indicam que a transmissão vertical do HIV é muito pequena, quando utilizados esquemas antirretrovirais potentes, que reduzem drasticamente a carga viral materna do HIV. Além disso, o aleitamento materno representa risco adicional de transmissão de 7% a 22% (BOBAT *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1992; GRAY *et al.*, 1997; NDUATI *et al.*, 2000; Tess *et al.*, 1998). Em nosso estudo, todas as mães de crianças não tratadas não fizeram uso de terapia antirretroviral durante a gestação e nem no momento do parto, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Ainda em nosso estudo todas as crianças não tratadas tiveram aleitamento materno, o que nos faz acreditar que o aleitamento materno não influenciou no tipo de evolução da infecção. Esse resultado pode ser indicativo de que essas crianças, provavelmente, podem ter sido contaminadas por vírus menos patogênico além de possivelmente contarem com uma resposta imunológica diferenciada e por isso desenvolveram período de latência mais prolongado.

Diversos componentes do compartimento celular são recrutados durante a infecção pelo HIV-1. Considerando a estimulação do sistema imune induzido durante a infecção pelo HIV-1, pode-se sugerir que eventos imunológicos estejam relacionados tanto com processos imunopatológicos, quanto com mecanismos para a eliminação do agente etiológico e controle da infecção (CLERICI *et al.*, 1989; SLEASMAN *et al.*, 1996).

A caracterização do perfil imunológico predominante durante o estabelecimento da infecção é de fundamental importância para se determinar o papel da resposta imune e sua associação com o perfil de desenvolvimento da infecção pelo HIV (SCHLESINGER *et al.*, 1995; De MARTINO *et al.*, 1998).

A contagem de CD4 e a carga viral são os principais parâmetros utilizados, mundialmente, para avaliar o desenvolvimento da infecção em crianças infectadas pelo vírus HIV. A discordância na resposta viral e imunológica ocorre de forma mais freqüente em crianças que em adultos. Fatores que contribuem para essa discordância são ainda pouco conhecidos e podem incluir causas virais e do hospedeiro (GHAFFARI

et al., 2004). O uso da terapia antirretroviral melhorou consideravelmente o prognóstico das crianças infectadas pelo HIV-1 tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (PUTHANAKIT *et al.*, 2007). Tendo em vista o exposto nesse presente estudo, a população de pacientes infectados foi subclassificada em dois grupos distintos NT, T.

Um importante achado do presente trabalho foi a capacidade das crianças infectadas pelo HIV-1 manterem a contagem de células T CD4⁺, após três anos de seguimento, mesmo na ausência de qualquer tratamento antirretroviral. Estudos mostram que crianças progressoras lentas geralmente não experimentam depleção de células T CD4⁺, normalmente, observada na progressão da infecção pelo HIV-1, embora alguns casos de declínio já tenham sido descritos (HUNT *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2008). Em nossa população de estudo, observou-se estabilidade na contagem de CD4, indicando preservação da competência imune no período avaliado.

A terapia antirretroviral tem demonstrado ter um profundo impacto no aspecto imunológico do desenvolvimento da infecção pelo HIV-1 (RESINO *et al.*, 2003). A recuperação dos valores de CD4⁺ após o tratamento, também, tem sido descrita desde os primeiros estudos com monoterapia (BOGNER & GOEBEL, 1991; MELLORS *et al.*, 1996). Mas diferentemente desses achados, nas crianças analisadas nesse estudo o uso da terapia antirretroviral não provocou modificação na contagem de células T CD4⁺ em relação ao grupo de crianças tratadas analisadas 2006 e 2009. O grupo de crianças tratadas foi composto por crianças com falha e sucesso imunológico, o que, provavelmente, contribuiu para esse resultado.

Talvez a resposta mais efetiva às células infectadas pelo vírus HIV-1 seja a resposta das células T CD8⁺. Embora estudos de depleção dessas células não sejam definitivos, a depleção de células T CD8⁺ em modelos experimentais da infecção pelo HIV-1 correlaciona-se com aumento na carga viral e declínio na contagem de células T CD4⁺ (FRIEDRICH *et al.*, 2007). No presente estudo, todas as crianças, independente do grupo, apresentaram altos valores de linfócitos T CD8⁺ e assim como observado com a população de linfócitos T CD4⁺, também houve manutenção na contagem de linfócitos T CD8⁺. Esse resultado pode indicar que, nos nossos grupos, a presença de células T CD8⁺ pôde contribuir para o controle da replicação viral e conseqüentemente conter o desenvolvimento da infecção pelo vírus HIV-1, já que tanto as crianças não tratadas

quanto as tratadas mantiveram contagens estáveis de linfócitos T CD4⁺ e bom controle da carga viral com níveis baixos ou indetectáveis de replicação viral. A qualidade da resposta dos linfócitos T CD8⁺ também é de grande relevância e pode estar contribuindo para manutenção do bom controle da infecção pelo HIV-1. Com isso, é importante ressaltar que com boa condução clínica dos pacientes infectados pelo HIV-1, em uso ou não de antirretrovirais, o status imunológico se mantém estável, resultando em boa evolução como observado nesse estudo.

As crianças do grupo Não Tratado foram caracterizadas por apresentar manutenção nos valores da carga viral nas análises realizadas em 2006 e 2009, mesmo na ausência de tratamento com antirretroviral. Esse achado pode corroborar com nossa hipótese inicial de que essas crianças podem ter sido infectadas por vírus menos patogênico além de provavelmente possuírem resposta imunológica capaz de manter a replicação viral sob controle. Em crianças em uso de HAART, a carga viral foi reduzida para limites indetectáveis em 2009. Esse achado é similar ao que geralmente é observado em estudos na Europa e nos Estados Unidos. (van ROSSUM *et al.*,2002), que mostram que antirretrovirais, geralmente, induzem uma redução na carga viral a níveis indetectáveis (PRENDERGAST *et al.*,2008). Na comparação entre grupos Não Tratados e Tratados houve diferença significativa tanto em 2006 quanto em 2009, ou seja, nesse presente trabalho o uso da terapia antirretroviral contribuiu de forma significativa para o controle da replicação viral.

Sabe-se que múltiplos fatores podem estar associados ao perfil de desenvolvimento lento da infecção pelo HIV-1, em crianças e adultos, na ausência de qualquer tratamento com antirretroviral (BLANKSON & SILICIANO,2008). A ativação imune tem recebido o maior foco de atenção nos últimos tempos em pacientes adultos progressores lentos (LIU *et al.*,1998; CHOUDHARY *et al.*, 2007). Alguns marcadores de superfície tais como HLA-DR e CD38 são normalmente utilizados como indicadores de ativação de células T. Esses marcadores se alteram em paralelo com a progressão da infecção pelo HIV (SCHLESINGER *et al.*, 1995; De MARTINO *et al.*, 1998).

Atualmente, já está muito bem estabelecido na literatura que marcadores de ativação celular também são capazes de predizer a forma de progressão da doença em adultos (STITES *et al.*, 1986; LEVACHER *et al.*, 1992; GIORGI *et al.*,1993; LIU *et al.*, 1997). Com exceção de alguns estudos que demonstraram aumento (ARNO *et al.*, 1998)

ou estabilidade (SCOTT *et al.*, 1989) na ativação celular após a terapia, a grande maioria dos trabalhos tem evidenciado quedas significativas na expressão de HLA-DR na vigência do tratamento (AUTRAN *et al.*, 1997; BORKOWSKY *et al.*, 2000).

LIU *et al.*, 1997 mostraram que a expressão de CD38⁺ em células T foi o melhor preditor de progressão da doença que outros marcadores de ativação em adultos. Diferentes estudos foram conduzidos durante a década de 90 avaliando o valor prognóstico da molécula CD38. A maioria deles mostrou que a expressão de CD38 em células T CD8⁺ pode ser considerada bom marcador de progressão da doença, em adultos, independente da contagem de CD4⁺ e carga viral (GIORGI & DETELS, 1989; GIORGI *et al.*, 1993; MOCROFT *et al.*, 1997; CARBONE *et al.*, 2000). Ocasionalmente, a presença da subpopulação linfocitária CD8⁺CD38⁺ teve maior valor preditivo para progressão da doença que a contagem de linfócitos CD4⁺ e carga viral (GIORGI *et al.*, 1993). Estudos em crianças concluíram que subpopulações de linfócitos CD8, incluindo CD8⁺CD38⁺, têm sido associadas com maior progressão da doença (ALDHOUS *et al.*, 1996; SHERMAN *et al.*, 2002; RESINO *et al.*, 2003).

As crianças não tratadas apresentaram manutenção da ativação de células T CD4⁺, mediada pelos marcadores de superfície celular HLA-DR e CD38, entre 2006 e 2009. Apesar de essas crianças manterem células T CD4⁺ ativadas na circulação, essas células parecem estar sob controle, impedindo que a ativação proporcione maior replicação viral e contribuindo para o controle natural da infecção. Zhang *et al.* hipotetizaram que baixos níveis de replicação viral nas células T CD4⁺ em repouso sustentariam a infecção, mas que apenas altos níveis de replicação viral em células T CD4⁺ ativadas são capazes de disseminar a infecção para os tecidos linfóides e o desenvolvimento da infecção (ZHANG *et al.*, 2004). Isso nos leva a acreditar que apesar da existência de células T CD4⁺ ativadas na circulação, essa ativação pode não ser suficiente para proporcionar altos índices de replicação viral que é fundamental para o desenvolvimento da infecção. Além disso, sugere-se que outros fatores, que não só a replicação viral, podem estar envolvidas na ativação de células T CD4⁺.

As crianças tratadas demonstram diferença significativa no perfil de ativação, apenas em relação ao marcador de superfície celular HLA-DR, quando comparadas entre os anos de 2006 e 2009. Verificamos aumento significativo de ativação de linfócitos T CD4⁺ nas crianças tratadas após três anos de infecção, ou seja, a terapia antirretroviral

permitiu ao organismo aumentar a ativação de linfócitos T CD4⁺, em relação ao marcador HLA-DR, mas manteve a carga viral em níveis indetectáveis. Nesse caso, provavelmente, o controle da replicação viral está sendo feito pela ação dos antirretrovirais, pela ação das células T CD8⁺ e pelo conjunto de atividades das demais células do sistema imune.

Ao verificarmos a expressão das moléculas de ativação HLA-DR e ou CD38 nas células CD8⁺, percebemos que não houve diferenças significativas entre os grupos de crianças analisados e também observamos manutenção no percentual de células T CD8⁺ ativadas, nos dois grupos, após três anos de seguimento. O grupo de crianças com progressão lenta (NT) apresentou o mesmo perfil ativado das células CD8⁺ que o grupo tratado (T). Sendo assim, nosso estudo pode indicar que as crianças não tratadas mantêm quantidade suficiente de células T CD8⁺ ativadas para manter o controle natural da infecção pelo HIV-1, mas insuficiente para induzir perda da capacidade imune. Já nas crianças tratadas, acreditamos que a redução da viremia induzida pela terapia antirretroviral tenha modulado a resposta celular, evitando a ativação de células T CD8⁺. Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados em diversos estudos do perfil de ativação linfocitária em crianças infectadas por HIV-1 em uso de terapia antirretroviral (RESINO *et al.*, 2001; RESINO *et al.*, 2003; PAUL *et al.*, 2005; RESINO *et al.*, 2006). Além disso, acreditamos que as células T CD8⁺ ativadas estejam auxiliando no controle da replicação viral, não somente pela atividade citotóxica dessas células, mas também pela liberação de citocinas. Streeck e colaboradores verificaram que a estimulação de resposta polifuncional das células T CD8⁺ pelo vírus do HIV-1 caracteriza-se pela degranulação e liberação de múltiplas citocinas incluindo interferon- γ (INF- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e proteína inflamatória de macrófago-1 β (MIP-1 β). Essas respostas são perdidas em pacientes que progridem rapidamente na infecção (STREECK *et al.*, 2008).

Estudos sugerem que a molécula de superfície CD38 também possa ser marcador de imaturidade celular (PLAEGER MARSHALL, 1994; de MARTINO, 1998; PAUL *et al.*, 2005) e que a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ deva ser avaliada associando-se dois marcadores de ativação celular, como CD38 e HLA-DR (Paul *et al.*, 2005). Uma limitação da primeira análise fenotípica realizada nesse estudo, em 2006, foi a impossibilidade metodológica de se realizar ensaios de tripla marcação com CD38 e

HLA-DR, mas para a análise em 2009 foram feitos ensaios de tripla marcação para essas duas proteínas.

As crianças avaliadas no presente estudo, independente do grupo de alocação, não demonstraram diferença significativa no perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ao analisarmos CD38 e HLA-DR simultaneamente. Esse resultado pode indicar que a terapia antirretroviral esteja mantendo níveis controlados de ativação celular nas crianças infectadas pelo HIV-1 fazendo com que essas apresentem o mesmo perfil de ativação das crianças que mantêm controle natural da infecção. Subpopulações de linfócitos T CD8⁺CD38⁺HLA-DR têm sido associado com evolução mais rápida da infecção pelo HIV-1, em adultos (BORTHWICK *et al.*,1994; BOUSCARAT *et al.*, 1996; McCLOSKEY *et al.*,1998; LEWIS *et al.*,1999; CLERICI *et al.*, 2000; CHAMBERLAIN *et al.*, 2000). Nossos achados contradizem esses estudos, provavelmente em função da nossa população estudada e em função do nosso número de pacientes avaliados.

Em adultos há fortes evidências da participação de células natural killer (NK) no controle da infecção crônica pelo HIV-1 (FEHNIGER. *et al.*,1998; ALTER *et al.*,2007) Entretanto estudos de células NK em crianças infectadas pelo HIV-1 ainda são escassos e controversos. Alguns autores têm mostrado que o percentual de células NK está reduzido em crianças infectadas pelo HIV-1 e que há reconstituição parcial dessas células após supressão da replicação viral (AZZONI *et al.*, 2005; FU *et al.*, 2010). Outros pesquisadores verificaram que crianças infectadas pelo HIV-1 apresentam quantidades normais de células NK, mas com atividade reduzida quando comparadas a crianças não infectadas (BALLAN *et al.*, 2007). Nossas observações sugerem que, ao contrário dos adultos, as crianças infectadas pelo HIV-1 têm a capacidade de sustentar o percentual total de células NK, independentemente do uso de antirretrovirais.

Embora nossos dados sugiram que crianças infectadas pelo HIV-1 preservem o percentual total de células NK, esta condição parece ocorrer de forma diferente nas subpopulações de células NK. Quando analisamos as subpopulações de células NK, nossos dados mostraram que as crianças do grupo NT apresentaram maior percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ quando comparadas com as crianças do grupo tratado, tanto nas análises realizadas em 2006 quanto em 2009. Sendo assim, as células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ podem contribuir para estabelecimento ou manutenção do status clínico

assintomático na infecção pelo HIV-1. Essa subpopulação de célula NK tem baixa atividade citolítica e é responsável por produzir e liberar citocinas (GADDY *et al.*, 1995; GADDY *et al.*, 1997). É possível que a produção de citocinas por essas células NK, CD3⁻CD16⁺CD56⁻, esteja contribuindo para o mecanismo de controle natural da infecção em nosso grupo de crianças NT.

Além disso, as crianças do grupo de NT mostraram percentual reduzido de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ quando comparadas a crianças tratadas, em 2009. Já essa subpopulação de célula NK, CD3⁻CD16⁺CD56⁺, tem boa atividade citolítica principalmente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (GADDY *et al.*, 1995; GADDY *et al.*, 1997). Sendo assim, essa redução no percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ pode estar envolvido no perfil favorável de evolução da infecção, já que teríamos menor lise de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, maior controle da infecção pelo HIV-1 na ausência de tratamento. Corroborando com esse achado, nosso grupo de crianças com progressão lenta também apresentou percentual reduzido de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ em relação as crianças tratadas, em 2009. As células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ também apresentam boa atividade citotóxica, mas independente de anticorpo. Assim as crianças com progressão lenta do nosso estudo apresentam menor percentual de células NK com atividade citotóxica podendo apresentar maior preservação principalmente das células T CD4⁺, o que pode auxiliá-las a manter o controle natural da infecção.

Além disso, as crianças tratadas com antirretroviral apresentaram percentual reduzido das células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ quando comparamos os anos de 2006 e 2009. Este achado sugere que a redução da viremia induzida pela terapia antirretroviral auxilia na redução da atividade citotóxica, provavelmente auxiliando na preservação as células T CD4⁺ o que conseqüentemente poderia ajudar no melhor controle da infecção pelo vírus HIV-1.

Cooper *et al.* verificaram que as células NK humanas também podem ser classificadas em duas outras subpopulações com base na intensidade da expressão de CD56 que está diretamente relacionado às suas características funcionais (COOPER *et al.*, 2001). A maioria dos humanos apresenta no sangue periférico células NK com baixa densidade do antígeno CD56 na superfície celular (CD56^{dim}) e também expressam CD16 de baixa afinidade, que é responsável por citotoxicidade celular anticorpo-dependente

(CHALIFOUR *et al.*, 2004). Por outro lado, um pequeno subconjunto de células NK (5-10%) no sangue periférico expressa o antígeno CD56 em maior intensidade e a maioria deles geralmente não têm CD16 na superfície. As células NK CD56^{bright} diferem das células CD56^{dim} uma vez que são mais eficientes para na produção de citocinas e apresentam baixa citotoxicidade natural (COOPER *et al.*, 2001; THOREN *et al.*, 2007).

Numerosas anormalidades nas células NK têm sido reportadas na infecção pelo HIV-1 (FAUCI *et al.* 2005), incluindo status de ativação (ALTER *et al.*, 2004; FOGLI *et al.*, 2004), turnover aumentado (KOTTILIL *et al.*,2007), expressão diferenciada de marcadores de ativação/inibição (MAVILIO *et al.*,2003), inibição da interação com células dendríticas (HONG *et al.*, 2009) e perda de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} (TARAZONA *et al.*, 2002; HONG *et al.*,2009). Diferentemente da evolução natural relatada na literatura, nossos achados sugerem que, em crianças tratadas e crianças com progressão lenta, o percentual de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} se mantém constante ao longo dos anos. Tais células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} apresentam maior potencial citotóxico, principalmente citotoxicidade anticorpo-dependente, ou seja, sua redução em crianças com progressão lenta pode contribuir na manutenção do controle natural da infecção pelo HIV-1, através da preservação de células T CD4⁺.

Está bem descrito na literatura que as células CD56^{bright} são células produtoras de citocinas mais eficientes que as células CD56^{dim} (COOPER *et al.*,2001). Devido a essa capacidade de secretar diversas citocinas, elas são capazes de promover a diferenciação de células T CD4⁺ e iniciar ou manter a resposta efetora anti HIV-1 (SCHARTON & SCOTT, 1993; ORANGE *et al.*, 1995). Nossos achados são concordantes com essa hipótese, por demonstrar que crianças com progressão lenta preservam células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{bright}. Interessantemente, verificou-se que na vigência de terapia antirretroviral, observa-se elevação significativa no percentual das células CD3⁻CD16⁻CD56^{bright}. Este achado sugere que a redução da viremia induzida pela terapia antirretroviral auxilia na elevação de célula NK produtora de citocinas, provavelmente contribuindo com os diversos mecanismos de resposta imune ao vírus HIV-1.

Também fundamentais na definição do perfil de evolução, estão fatores relacionados à infecção celular e replicação viral.

Após a descoberta de CCR5 como correceptor fundamental para entrada do HIV-1 na célula, constatou-se que indivíduos com alto risco de infecção que permaneciam

livres da infecção apresentavam deleção homocigota de 32 pares de bases na estrutura de leitura aberta do gene CCR5 (LIU *et al.*,1996). Sabe-se também que indivíduos heterocigotos, que apresentam um alelo CCR5delta32 e um alelo do tipo selvagem, podem apresentar risco menor para infecção pelo HIV-1 (SAMSON *et al.*, 1996; MARMOR *et al.* 2001). Ainda, quando esses indivíduos adquirem a infecção, apresentam evolução atenuada (IOANNIDIS *et al.*,2001; ZIMMERMAN *et al.* 1997). Ao longo da progressão da infecção, aproximadamente metade das pessoas infectadas pode desenvolver vírus capazes de também utilizar o co-receptor CXCR4 para entrada na célula. Isto se associa a uma aceleração da evolução da doença (KOOT *et al.*, 1993).

Nosso estudo identificou apenas um paciente com perfil heterocigoto para deleção CCR5delta32. Surpreendentemente, essa criança pertencia ao grupo não tratado, em 2006, mas em 2008 foi iniciada terapia antirretroviral. Esse resultado pode ser indicativo de que esse paciente possa ter desenvolvido vírus com tropismo por CXCR4, acelerando a evolução da infecção, o que gerou a necessidade do uso de antirretrovirais. Associado a isso, houve alterações nas recomendações para tratamento de crianças infectadas pelo HIV-1, o que pode ter gerado a necessidade de se tratar esse paciente.

O fato das crianças com progressão lenta com antirretrovirais apresentarem o mesmo perfil de expressão de CCR5 na superfície de células T CD4⁺ que as crianças tratadas sugere que na nossa população estudada a expressão de CCR5 não influenciou o perfil de evolução da infecção pelo HIV-1. Ou seja, a estabilidade verificada na evolução das crianças com progressão lenta não pode ser atribuída à expressão diferenciada de CCR5 em células T CD4⁺.

7 CONCLUSÕES

- Em crianças infectadas pelo HIV, a distribuição das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não varia, independente do uso ou não de antirretrovirais .
- Em crianças infectadas pelo HIV, o *status* de ativação linfocitária, medido pela expressão de moléculas de ativação celular, não varia independente da subpopulação de linfócitos T e do marcador avaliado.
- Em crianças infectadas pelo HIV virgens de tratamento, a menor proporção de subpopulações de células NK com atividade citotóxica e o maior percentual de subpopulações de células NK com capacidade de liberar citocinas podem representar elemento fundamental para o bom controle da infecção pelo HIV-1 na ausência de tratamento com antirretroviral. Nas crianças infectadas pelo HIV em uso de antirretroviral, a baixa da viremia induzida pela medicação possibilita a presença de maior percentual de células NK com atividade citolítica auxiliando no controle da infecção.
- A estabilidade verificada na evolução das crianças com progressão lenta não pode ser atribuída à baixa expressão de CCR5 em células T CD4⁺, já que não há diferença na expressão desse receptor, independente do grupo avaliado.

Diante da similaridade verificada entre grupos com evoluções distintas, nossos dados indicam que o status de ativação imune, bem como as subpopulações de células NK e o receptor de quimicina CCR5 não devem ser empregados na avaliação prognóstica das crianças infectadas pelo HIV-1 por transmissão vertical.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMS EJ. Prevention of mother-to-child transmission of HIV: successes, controversies and critical questions. *AIDS Rev.* 6:131-43, 2004.
2. ALDHOUS MC, RAAB GM, MOK JY, *et al.* CD4 and CD8 lymphocytes in diagnosis and disease progression of pediatric HIV infection. *Pediatr AIDS HIV Infect.* 7:20-30, 1996.
3. ALTER G, MALENFANT JM, DELABRE RM, *et al.* Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J. Immunol.* 173:5305-5311, 2004.
4. ALTER G, MARTIN M, TEIGEN N, *et al.* Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med.* 204:3027-36, 2007.
5. ANDRADE A, BAILEY JR, XU J, *et al.* CD4+ T cell depletion in an untreated HIV type 1-infected human leukocyte antigen-B5801-positive patient with an undetectable viral load. *Clin Infect Dis.* 46, e78-82, 2008.
6. ARNO A, RUIZ L, JUAN M, *et al.* Impact of the immune system of undetectable plasma HIV-RNA for more than 2 years. *AIDS.* 12:697-704, 1998.
7. ASCHER MS AND SHEPPARD HW. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clin. Exp. Immunol.* 73:165-167, 1988.
8. AUTRAN B, CARCELAIN G, LI TS, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4 T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *J Med Chem.* 14:2164-76, 1997.
9. AZZONI L, RUTSTEIN RM, CHEHIMI J, *et al.* Dendritic and natural killer cell subsets associated with stable or declining CD4+ cell counts in treated HIV-1-infected children. *J Infect Dis.* 191:1451-9, 2005.
10. BALLAN WM, VU BA, LONG BR, *et al.* Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J Immunol.* 179:3362-70, 2007.

11. BANDA NK, BERNIER J, KURAHARA DK, *et al.* Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp 120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med.* 176:1099-1106, 1992.
12. BLANKSON J AND SILICIANO R. Elite suppression of HIV-1 replication. *Immunity.* 29:845-847, 2008.
13. BOBAT R, MOODLEY D, COUTSOUDIS A, COOVADIA H. Breastfeeding by HIV-1 infected women and outcome in their infants: a cohort study from Durban, South Africa. *AIDS.* 11:1627-1633, 1997.
14. BOGNER JR & GOEBEL FD. Lymphocyte subsets as surrogate markers in antiretroviral therapy. *Infection.* 19:S103-8, 1991.
15. BORKOWSKY W, STANLEY K, DOUGLAS SD, *et al.* Immunologic response to combination nucleoside analogue plus protease inhibitor therapy in stable antiretroviral therapy-experienced human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis.* 182:96-103, 2000.
16. BORTHWICK NJ, BOFILL M, GOMBERT WM, *et al.* Lymphocyte activation in HIV-1 infection. I. Functional defect of CD28- T cells. *AIDS.* 8:431-41, 1994.
17. BOUSCARAT F, LEVACHER-CLERGEOT M, DAZZA MC, *et al.* Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA level in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12:17-24, 1996.
18. BRENNER BG, GRYLLIS C, GORNITSKY M, *et al.* Changes in natural immunity during the course of HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 93:142-148, 1993.
19. BRUUNSGAARD H, PEDERSEN C, SKINHOJ P, *et al.* Role of NK cells. *Scand J Immunol.* 46:91-95, 1997.
20. CAO Y, CIN I, ZHANG L. *et al.* Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 332:201-208, 1995.
21. CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC). HIV and AIDS – United States. *MMWR.* 50:430-4, 1981-2001.
22. CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC). Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *MMWR.* 30:250-2, 1981.

23. CHAKRABORTY, R., MOREL, A.S., SUTTON, J.K., *et al.* Correlates of delayed disease progression in HIV-1-infected Kenyan children. *J Immunol.* 174:8191-9, 2005.
24. CHALIFOUR A, JEANNIN P, GAUCHAT J, *et al.* Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers α -defensin production. *Blood.* 104:1778–84, 2004.
25. CHAMBERLAIN WD, FALTA MT, KOTZIN BL. Functional subsets within clonally expanded CD8(+) memory T cells in elderly humans. *Clin Immunol.* 94:160-72, 2000.
26. CHOE H, FARZAN M, SUN Y, *et al.* The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 85:1135-1148, 1996.
27. CHOUDHARY S, VRISEKOOOP N, JANSEN C, *et al.*: Low immune activation despite high levels of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 results in long-term asymptomatic disease. *J Virol.* 81:8838-42, 2007.
28. CHUN TW, CARRUTH L, FINZI D, *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 387:183-188, 1997.
29. CLERICI M, SARESELLA M, COLOMBO F, *et al.* T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood.* 96:3866-71, 2000.
30. CLERICI M, STOCKS NI, ZAJAC RA, *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients independence of CD4⁺ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest.* 84:1892-99, 1989.
31. COFFIN JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 267:483-9, 1995.
32. CONNOR EM, SPERLING RS, GELBER R, *et al.* Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med.* 331:1173-80, 1994.
33. COOPER MA, FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633–40, 2001.

34. COOPER MA, FEHNIGER TA, TURNER SC, *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood*. 97:3146–51, 2001.
35. COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST-AIDS. Boletim Epidemiológico Ano XIV; n.2. Abril a Junho de 2001.
36. COOREA R & MUNOZ-FERNANDEZ MA. Production of new T cells by thymus in children. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy. *Pediatr Res*. 52:207-12, 2002.
37. DAYTON JM, MERSON MH. Global dimensions of the AIDS epidemic. *Infect Dis North Am*. 14:791-808, 2000.
38. De ANGELIS DS, FREIRE WS, PANNUTI CS, *et al.* CCR5 genotypes and progression to HIV disease in perinatally infected children. *Braz J Infect Dis*. 11:196-8, 2007.
39. De MARTINO M, ROSSI ME, AZZARI C, *et al.* A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type-1 infection surviving more than five years. *Pediatr Res*. 43:752-58, 1998.
40. De SOUZA MS, KARNASUTA C, BROWN AE, *et al.* A comparative study of the impact of HIV infection on natural killer cell number and function in Thais and North Americans. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1061–1066, 2000.
41. DUNN DT, NEWELL ML, ADES AE, PECKHAM CS. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet*. 340:585-588, 1992.
42. EASTERBROOK PJ. Non-progression in HIV infection. *AIDS*. 8:1179-1182, 1994
43. FAUCI AS, MAVILIO D AND KOTTILIL S. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat. Rev. Immunol*. 5:835-843, 2005.
44. FAUCI AS, SCHNITTMAN SM, POLI, *et al.* Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine*. 114:678-93, 1991.

45. FAUCI AS. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Research*. 491-99, 1984.
46. FEHNIGER TA, COOPER MA, NUOVO GJ, *et al*. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: A potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 101:3052-7, 2003.
47. FEHNIGER TA, HERBEIN G, YU H, *et al*. Natural killer cells from HIV-1⁺ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol*. 161:6433-8, 1998.
48. FLOWER MG, SIMONDS RJ, ROONGPISUTHIPONG A. Update on perinatal transmission. In: *HIV/AIDS in infants, children and adolescents*. *Pediatr Clin North Am*. 47:21-38, 2000.
49. FOGLI M, COSTA P, MURDACA G, *et al*. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur. J. Immunol*. 34:2313-21, 2004.
50. FRIEDRICH TC, VALENTINE LE, YANT LJ, *et al*. Subdominant CD8⁺ T cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J. Virol*. 81,3465-76, 2007.
51. FU GF, CHEN X, HAO S, *et al*. Differences in natural killer cell quantification and receptor profile expression in HIV-1 infected Chinese children. *Cell Immunol*. 265:37-43, 2010.
52. GADDY J, BROXMEYER HE. Cord Blood CD16⁺56⁻ cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. *Cell Immunol*. 180:132-42, 1997.
53. GADDY J, RISDON G, BROXMEYER HE. Cord Blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res*. 15:527-36, 1995.
54. GALLI L, De MARTINO M, GABIANO C *et al*. Onset of clinical signs in children with HIV-1 perinatal infection. *Italian Register for HIV infection in children*. *AIDS*. 9:455-461, 1995

55. GALLI L, De MARTINO M, TOVO PA, *et al.* Predictive value of the HIV paediatric classification system for the long-term course of perinatally infected children. *International Journal of Epidemiology*. 29:573-8, 2000.
56. GARCIA PM, KALISH LA, PITT J, *et al.* Maternal levels of plasma immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med*. 341:394-402, 1999.
57. GEERTSMA MF, STEVENHAGEN A, VAN DAM EM, *et al.* Expression of zeta molecules is decreased in NK cells from HIV-infected patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 26:249–257, 1999.
58. GHAFFARI G, PASSALACQUA DJ, CAICEDO JL, *et al.* Two-Year clinical and immune outcomes in human immunodeficiency virus-infected children who reconstitute CD4 T cells without control of viral replication after combination antiretroviral therapy. *Pediatrics*. 114:604-11, 2004.
59. GIORGI JV, DETELS R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID multicenter AIDS cohort study *Clin Immunol and Immunopath*. 52:10-18, 1989.
60. GIORGI JV, LIU Z, HULTIN LE, *et al.* Elevated levels of CD38⁺CD8⁺T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4 T cells levels; results of 6 years of follow up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J AIDS*. 6:904-12, 1993.
61. GOODENOW M, HUET T, SAURIN W, *et al.* HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2:344-52, 1989.
62. GORRY PR, ZHANG C, WU S, *et al.* Persistence of dual-tropic HIV-1 in individual homozygous for the CCR5 32 allele. *Lancet*. 359:1832-34, 2002.
63. GRAY GE, MCINTYRE JA, LYONS SF. The effect of breastfeeding on vertical transmission of HIV-1 in Soweto, South Africa. XI International Conference on AIDS, Vancouver, Abstract ThC415, 1997.
64. GROSSMAN Z, MEIER-SHELLERSHEIM M, SOUSA AE, *et al.* CD4⁺ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med*. 8:319–23, 2002.

65. HAZENBERG MD, HAMANN D, SCHUITEMAKER H, *et al.* T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4⁺ T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* 1:285–89, 2000.
66. HE XS, DRAGHI M, MAHMOOD K, *et al.* T cell-dependent production of IFN-g by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest.* 114:1812–9, 2004.
67. HLADIK F, LIU H, SPEELMON E, *et al.* Combined effect of CCR5-Delta32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol.* 79:11677-84, 2005.
68. HO DD, NEUMANN AU, PERELSON AS, *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 373:123-126, 1995.
69. HONG HS, BHATNAGAR N, BALLMAIER M, *et al.* Exogenous HIV-1 Vpr disrupts IFN-alpha response by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and subsequent pDC/NK interplay. *Immunol. Lett.* 125:100-104, 2009.
70. HONG HS, EBERHARD JM, KEUDEL P, *et al.* HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56^{dim}CD16⁺ NK cells. *J Virol.* 84:1183-8, 2010.
71. HU PF, HULTIN LE, HULTIN P, *et al.* Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 10:331–340, 1995.
72. HUNT PW, BRENCHLEY J, SINCLAIR E, *et al.* Relationship between T cell activation and CD4⁺ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 197:126-33, 2008.
73. IOANNIDIS JP, ROSENBERG OS, GOEDERT JJ, *et al.* Effects of CCR5-D32, CCR2-64I and SDF-13'A alleles on HIV-1 disease progression: na international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Méd.* 135:782-95, 2001.
74. IOANNIDIS JPA, ABRAMS EJ, AMMANN A, *et al.* Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus load <1000 copies/ml. *J Infect Dis.* 183:539-45, 2001.

75. ITALIAN REGISTER FOR HIV INFECTION IN CHILDREN. Features of children perinatally infected with HIV-1 surviving longer than 5 years. *Lancet*. 343:191-5, 1994.
76. KAKEHASI FM. Determinantes e tendências da transmissão vertical do HIV na região metropolitana de Belo Horizonte, período 1996-2000. Departamento de Pediatria – Faculdade de Medicina. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001:75. Dissertação de Mestrado em Medicina (área de concentração: Pediatria).
77. KALISH LA, McINTOSH K, READ 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. *JID*. 180:1514-20, 1999.
78. KAWAMURA T, GULDEN FO, SUGAYA M, *et al.* R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8401-6, 2003.
79. KOOT M, KEET IP, VOS AH, *et al.* Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4⁺ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med*. 118:681-8, 1993.
80. KOTTILIL S, JACKSON JO, REITANO KN, *et al.* Innate immunity in HIV infection: enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 46:151-159, 2007.
81. KOVACS, A., SCOTT, G. B. Advances in the management, and care of HIV-positive newborns and infants. In: Pizzo, P.A., Wilfert, C.M. *Pediatrics AIDS: The challenge of HIV infection in infants, children and adolescents*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 567-92, 1998.
82. KWONG PD, WYATT R, ROBINSON J, *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393:648-59, 1998.
83. LANDAY AL, MACKEWIEZ CE, LÉVY JA. An activated CD8 T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol*. 69:106-16, 1993.

84. LAWN SD, BUTERA ST, FOLKS TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:753–77, 2001.
85. LEDERMAN, M. Immunologic Parameters of HIV. Conference on the Laboratory Science of HIV. 1998.
86. LEFRÈRE JJ, MORAND-JOUBERT L, MARIOTTI M, *et al.* Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 90:1133–40, 1997.
87. LEVACHER M, HULSTAERT F, TALLET S, *et al.* The significance of activation markers on CD8 Lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin and Experimental Immunol.* 90:376-382, 1992.
88. LEVY JA, MACKEWICZ CE, BARKER E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8⁺ T cells. *Immunology Today.* 17:217-24, 1996.
89. LEVY JA. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol.* 22:312–16, 2001.
90. LEWIS DE, YANG L, LUO W, WANG X-P, RODGERS JR. HIV-specific CTL precursors exist in a CD28⁻CD8⁺ T cell subset and increase with loss of CD4⁺ T cells. *AIDS.* 13:1029-33, 1999.
91. LINDENGREN ML, STEINBERGS, BYERS RH. Epidemiology of HIV/AIDS in children, In: HIV/AIDS in infants, children and adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 47:1-20, 2000.
92. LIU R, PAXTON WA, CHOE S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individual to HIV-infection. *Cell.* 86:367-77, 1996.
93. LIU Z, CUMBERLAND W, HULTIN L, *et al.* CD8 T lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 18:332-40, 1998.
94. LIU Z, CUMBERLAND WG, HUTLIN LE, *et al.* Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter for AIDS Cohort Study than

- CD4 cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 16:83-92, 1997.
95. LODOEN MB AND LANIER LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol*. 18:391-98, 2006.
 96. LUSTER AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 338:436-45, 1998.
 97. LUZURIAGA K, SULLIVAN JL. Viral and immunopathogenesis of vertical HIV-1 infection. *Pediatr Clin N Am*. 47:65-78, 2000.
 98. MAGDER LS, MOFENSON L, PAUL ME, *et al*. Risk factors for in utero and intrapartum transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 38:87-95, 2005.
 99. MANDELROT L, CHENADEC J, BERREBI A, *et al*. Perinatal HIV-1 transmission. Interaction between Zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French perinatal cohort. *JAMA*. 280:55-60, 1998.
 100. MANDELROT L, LANDREAU-MASCARO A, REKACEWICZ C, *et al*. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA*. 285:2083-93, 2001.
 101. MARMOR M, SHEPPARD HW, DONNELL D, *et al*. Homozygous and heterozygous CCR5-32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 27:472-81, 2001.
 102. MAVILIO D, BENJAMIN J, DAUCHER M, *et al*. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15011-16, 2003.
 103. McCLOSKEY T, BAKSHI S, THAN S, *et al*. Immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells undergoing in vitro apoptosis after isolation from human immunodeficiency virus-infected children. *Blood*. 92:4230-7, 1998.
 104. McCLOSKEY TW, CAVALIERE T, BAKSHI S, *et al*. Immunophenotyping of T lymphocytes by three-color flow cytometry in healthy newborns, children, and adults. *Clin Immunol Immunopathol*. 84:46-55, 1997.
 105. McCLOSKEY TW, KOHN N, LESSER M, *et al*. Immunophenotypic analysis of HIV-infected children: alterations within the first year of life, changes with disease

- progression, and longitudinal analyses of lymphocyte subsets. *Cytometry*. 46:157–65, 2001.
106. MELLORS JW, RINALDO CR, GUPTA P, *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus plasma. *Science*. 272:1167-70, 1996.
 107. MICHAEL NL, NELSON JA, KEWAL RAMANI VN, *et al.* Exclusive and persistent use the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type1 from a subject homozygous for CCR5D32. *J Viral*. 72:6040-7, 1998.
 108. MIEDEMA F, PETIT AJ, TERPSTRA FG, *et al.* Immunologic abnormalities in Human Immunodeficiency virus (HIV) infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4⁺ T helper cell depletion occurs. *Journal of Clinical Investigation*. 82:1908-14, 1988.
 109. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Nacional de DST AIDS. Boletim Epidemiológico Ano VII; n.01. Janeiro a junho de 2010.
 110. MINKOFF H. Human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 101:797-810, 2003.
 111. MOCROFT A, BOFILL M, LIPMAN M, *et al.* CD8⁺CD38⁺ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol*. 14:158-62, 1997.
 112. NDUATI R, JOHN G, MBORI-NGACHA D, *et al.* Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. *JAMA*. 283:1167-74, 2000.
 113. OFORI-MANTE JA, KAUL A, RIGAUD M, *et al.* Natural history of HIV infected pediatric long-term or slow progressor population after the first decade of life. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 26:217-20, 2007.
 114. OLESKE J, MINNEFOR A, COOPER R, *et al.* Immune deficiency syndrome in children. *JAMA*. 249:2346-9, 1983.
 115. OPS (Organización Panamericana de la Salud). Recommendations on the use of antiretroviral agents in pregnant women infected with HIV-1. *Rev Panam Salud Publica*. 9:345-54, 2001.
 116. ORANGE JS, WANG B, TERHORST C, *et al.* Requirement for natural killer cell-produced interferon- γ in defense against murine cytomegalovirus infection and

- enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med.* 182:1045-1056, 1995.
117. OSWALD-RICHTER K, GRILL SM, SHARIAT N, *et al.* HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol.* 2:E198, 2004.
 118. PAUL ME, MAO CM, CHARURAT M, *et al.* Predictors of immunologic long-term nonprogression in HIV-infected children: Implications for initiating therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 115:848-54, 2005.
 119. PAUL ME, SHEARER WT, KOZINETZ CA AND LEWIS DE. Comparison of CD8⁽⁺⁾ T-cell subsets in HIV-infected rapid progressor children versus non-rapid progressor children. *J Allergy Clin Immunol.* 108:258–264, 2001.
 120. PINTO JA. Marcadores prognósticos e diagnóstico precoce em uma coorte de crianças infectadas verticalmente pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Belo Horizonte: UFMG, 1999. 92p. Tese de doutorado em Medicina (área de concentração: Pediatria).
 121. PLAEGER-MARSHALL S, HULTIN P, BERTOLLI J, *et al.* Activation and differentiation antigens on T cells of healthy, at-risk, and HIV-infected children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 6:984–93, 1993.
 122. PLAEGER-MARSHALL S, HULTIN P, BERTOLLI J, *et al.* Activation and differentiation antigens on T cells of healthy, at-risk, and HIV-infected children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 6:984–93, 1993.
 123. PRENDERGAST A, MPHATSWE W, TUDOR-WILLIAMS G, *et al.* Early virological suppression with three-class antiretroviral therapy in HIV-infected African infants. *AIDS.* 22:1333-43, 2008.
 124. PUTHANAKIT T, AURPIBUL L, OBERDORFER P, *et al.* Hospitalization and mortality among HIV-infected children after receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 44:599-604, 2007.
 125. RESINO S, BELLON JM, GURBINDO D, *et al.* Recovery of T-cell subsets after antiretroviral therapy in HIV-infected children. *Europ J Clin Investig.* 33:619-27, 2001.

126. RESINO S, CORREA R, BELLON JM, *et al.* Preserved immune system in long-term asymptomatic vertically HIV-1 infected children. *Clin Exp Immunol.* 132:105-12, 2003.
127. RESINO S, GALAN I, BELLON JM, *et al.* Characterizing the immune system after long-term undetectable viral load in HIV-infected children. *J Clin Immunol.* 23:279-89, 2003.
128. RESINO S, SEOANE E, GUTIERREZ, *et al.* CD4⁺T cell immunodeficiency is more dependent on Immune Activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42:269-76, 2006.
129. RODES B, TORO C, JIMENES V. Viral response to antiretroviral therapy in a patient coinfecting with HIV type 1 and type 2. *Clin Infect Dis.* 41:19-21, 2005.
130. ROGERS MF, LINDEGREN ML, SMONDS RJ, *et al.* Pediatric HIV infection in the United States. In: Pizzo PA, Wilfert CM. *Pediatrics AIDS: The challenge of HIV infection in infants, children and adolescents.* 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 3-11, 1998.
131. ROSENBLATT HM, STANLEY KE, SONG LY, *et al.* Pediatric AIDS Clinical Trials Group 377 Study Team. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 192:445-55, 2005.
132. SAMSON M, LIBERT F, DORANZ BJ, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-25, 1996.
133. SATHLER-AVELAR R, LEMOS EM, REIS DD, *et al.* Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 58:655-63, 2003.
134. SCARLATTI G. Pediatric HIV infection. *Lancet.* 348:863-8, 1996.
135. SCHARTON TM, SCOTT P. Natural Killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD T cell subsets and induces early resistance to leishmania major in mice. *J Exp. Méd.* 178:567-577, 1993.

136. SCHLESINGER M, PETERS V, JIANG JD, *et al.* Increased expression of activation markers on CD8 lymphocytes of children with human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatr. Res.* 38:390-96, 1995.
137. SCHNITTMAN SM, PSALLIDOPOULOS MC, LANE HC, *et al.* The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science.* 245:305-308, 1989.
138. SCHRAGER IK, YOUNG JM, FOWLER MG, *et al.* Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. *AIDS.* 8:895-108, 1994.
139. SCOTT GB, HUTTO C, MAKUCH RW. Survival of children with perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 321:1791-1796, 1989.
140. SHERMAN GG, SCOTT LE, GALPIN JS, *et al.* CD38 expression on CD8+ T cells as prognostic marker in vertically HIV-infected pediatric patients. *Pediatr Res.* 51:740-5, 2002.
141. SIRIANNI MC, MEZZAROMA I, AIUTI F, MORETTA A. Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* 24:1874–1878, 1994.
142. SLEASMAN JW, ALEIXO LF, MORTON A, *et al.* CD4⁺ memory T cells are the predominant population of HIV-1-infected lymphocytes in neonates and children. *AIDS.* 10:1477-84, 1996.
143. STATA CORP. *Stata Statistical Software: Release 9.0.* College Station, Texas, Corporation, 2005.
144. STEWART GJ, ASHTON LJ, BITI RA, *et al.* Increased frequency of CCR5D32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. *AIDS.* 11:1833–1838, 1997.
145. STITES DP, CASAVANT CH, McHUGH TM, *et al.* Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clinical Immunol and Immunopathol.* 38:161-77, 1986.
146. STREECK H, BRUMME ZL, ANASTARIO M, *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1 specific CD8 T cells. *PLoS Med.* 5, e100, 2008.

147. SZELC CM, MITCHELTREE C, ROBERTS RL, STIEHM ER. Deficient polymorphonuclear cell and mononuclear cell antibody-dependent cellular cytotoxicity in pediatric and adult human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 166:486–493,1992.
148. TARAZONA R, CASADO JG, DELAROSA O, *et al.* Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *J. Clin. Immunol.* 22:176-183, 2002.
149. TESS BH, RODRIGUES LC, NEWELL ML, *et al.* Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to child transmission of HIV-1 in São Paulo State, Brasil. *AIDS.* 12(5):513-520, 1998.
150. THAN S, KHARBANDA M, CHITNIS V, *et al.* Clonal dominance patterns of CD8 T cells in relation to disease progression in HIV-infected children. *J Immunol.* 162:3680–3686,1999.
151. THE EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatrics.* 94(6):815-9, 1994
152. THORE'N FB, ROMERO AI, HERMODSSON S, *et al.* The CD16-CD56bright subset of NK cells is resistant to oxidantinduced cell death. *J Immunol.* 179:781–5, 2007.
153. TOVO PA, DE MARTINO M, GABIANO C, *et al.* Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-infection. The Italian Register for HIV infection in children. *Lancet.* 339(18804):1249-1253,1992.
154. TRKOLA A, DRAGIC T, ARTHOS J, *et al.* CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR5. *Nature.*384:184-187,1996.
155. ULLUM H, COZZI LA, ALADDIN H, *et al.* Natural immunity and HIV disease progression. *AIDS.*13:557–563,1999.
156. UNAIDS. AIDS epidemic update. December, 2001.
157. UNAIDS. AIDS epidemic update. December, 2010.
158. VAN ROSSUM AM, FRAAIJ PL, DE GROOT R. Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected children. *Lancet Infect Dis.*2:93-102, 2002.

159. VEUGELERS PJ, SCHECHTER M, TINDALL B, *et al.* Differences in time from HIV seroconversion to CD4 lymphocyte end-points and AIDS in cohorts of homosexual men. *AIDS*.7:1328-1329,1993.
160. VILLANUEVA JL, CABALLERO J, DEL NOZAL M, *et al.* Peripheral blood natural killer cell reconstitution after highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 14:473–474, 2000.
161. WATTS DH. Management of human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *N Engl J Med*. 346:1879-91, 2002.
162. WEI X, GHOSH SK, TAYLOR ME, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 373:117-122,1995.
163. WU Y. Chemokine Receptor Signaling and HIV Infection. *Methods Mol Biol*. 571:309-19, 2009.
164. ZHANG ZQ, WIETGREFE SW, LI Q, *et al.* Roles of substrate availability and infection of resting and activated CD4⁺ T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.101:5640-45, 2004.
165. ZIMMERMAN PA, BUCKLER-WHITE A, ALKHATIB G, *et al.* inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med*. 3:23-36, 1997.

9 ANEXO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Informações para consentimento para participar em um estudo de pesquisa clínica

Título: Avaliação longitudinal do perfil fenotípico de leucócitos e análise do gene codificador de CCR5 do sangue periférico de crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1 que progridem lentamente na infecção

Pesquisadores (ordem alfabética): Jorge Andrade Pinto, Juliana Ribeiro Romeiro, Maria Luíza Silva, Silvana Maria Elói Santos.

Introdução:

Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis ao seu filho e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

Objetivo:

O objetivo deste estudo é avaliar as populações e subpopulações de leucócitos circulantes de crianças infectadas pelo HIV de diferentes grupos subclínicos:

- a) Não Tratados;
- b) Tratados

Pretendemos ainda melhorar o modelo de atendimento e tratamento precoce para as crianças que nascerem de mães infectadas.

Resumo:

Mães infectadas pelo vírus HIV podem transmitir a infecção para seus filhos por três vias: (1) no útero, por contágio transplacentário; (2) durante o parto, pelo canal de parto infectado; (3) após o nascimento, pela ingestão do leite materno. Dessas três vias,

a transmissão durante o nascimento (intraparto) e no período imediatamente subsequente (periparto) são consideradas as formas mais comuns de contágio.

Diversos avanços no entendimento da patogenia da infecção perinatal, nos últimos anos, têm elevado à capacidade de prevenção deste modo de transmissão.

As crianças infectadas pelo HIV podem ser divididas em 2 grupos de acordo com o tipo de evolução da doença: a) progressores lentos, que apresentam período sem doença relativamente longo, permanecendo sem sintomas por aproximadamente dez anos e, b) progressores usuais, que apresentam sintomas após 4 ou 5 anos de vida.

Diferentes parâmetros imunológicos e virológicos estão sendo avaliados, nos últimos tempos, na tentativa de prever a evolução clínica das crianças infectadas.

A resposta imune em crianças infectadas pelo HIV tem sido pouco estudada. Além disso, estudos de valor prognóstico de marcadores imunológicos na evolução da infecção pelo HIV ainda são bastante controversos.

Marcadores fenotípicos precoces podem prever a condição de progressão da doença em crianças com transmissão vertical.

Com isso, torna-se importante o estudo comparativo do perfil fenotípico das populações e subpopulações de leucócitos periféricos nos diferentes grupos progressores, em crianças, para determinar os marcadores precoces de evolução e garantir a conduta clínica mais eficaz.

Procedimentos:

Os pacientes incluídos no estudo serão os pacientes portadores de HIV sendo caracterizados como: progressores lentos, progressores usuais com resposta terapêutica e progressores usuais sem resposta terapêutica eficaz, cadastrados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto Parasitárias (CTR-DIP) da UFMG.

A participação de seu filho neste estudo constará apenas da coleta de amostra de sangue, por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacuntainer, BD) em um frasco de 3ml, contendo o anticoagulante EDTA. O sangue coletado em EDTA será utilizado para a realização de hemograma e estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos periféricos.

Os registros de participação de seu filho neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. No entanto, o Comitê de Ética em

Pesquisa/UFMG poderá verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar esse formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer os registros médicos do seu filho para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Desligamento/Afastamento Médico:

A participação de seu filho neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais seu filho tem direito. Você poderá cessar a participação de seu filho a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Novas Descobertas:

Todos os novos achados descobertos durante a realização desta pesquisa que possam influenciar razoavelmente seu desejo de continuar a permitir participação de seu filho neste estudo serão fornecidos a você assim que tais informações se tornarem disponíveis.

Compensação:

Você não receberá qualquer compensação financeira pela participação do seu filho no estudo.

Emergência/Contato com a Comissão Ética:

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo ou se seu filho apresentar qualquer problema médico, por favor, contate o Comitê de Ética em Pesquisa-COEP/UFMG (31) 3409-4592, cujo presidente é a Profa. Maria Elena de Lima Perez Garcia. O responsável por este estudo é Juliana Ribeiro Romeiro. Você pode encontrá-la no telefone (31) 3248-9116 ou (31) 3248-9822.

Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou assinando voluntariamente minha participação neste estudo.

Data: ____/____/____

Nome do Responsável: _____

Assinatura Responsável: _____

Assinatura do Investigador: _____

Data: ____/____/____

Artigo relacionado com a tese

Further Evidence That the Expression of CD38 and HLA-DR⁺ in CD8⁺ Lymphocytes Does Not Correlate to Disease Progression in HIV-1 Vertically Infected Children

Juliana Ribeiro Romeiro, MSc¹, Jorge Andrade Pinto, MD, PhD², Maria Luiza Silva, PhD³, and Silvana Maria Eloi-Santos, MD, PhD^{1,2,3}

Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care
00(0) 1-5
© The Author(s) 2011
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1545109711421642
http://jiaac.sagepub.com



Abstract

Background: In adults, an increase in CD8⁺CD38⁺ T cell levels is a strong indicator of disease progression in HIV infection. However, in children, data are conflicting. Slow-progressing children (SPC) provide an exceptional resource for the investigation and clarification of the immunological and virological mechanisms of natural control of HIV infection and can be used to investigate prognostic indicators of disease progression. **Objectives:** To investigate the immune activation status and T regulatory (Treg) cell levels in SPC. **Study design:** A cross-sectional study was carried out on 28 children 8 years old and older who were vertically infected with HIV. The children were stratified into 3 groups according to their clinical outcome: SPC (anti-retroviral-therapy-naïve; ≥8 years-old; CD4 ≥20%; viral load <25,000 copies), IF/VF (anti-retroviral-therapy but with no therapeutic response), and IS/VS (anti-retroviral therapy with good therapeutic response). Uninfected children (NI) were assessed as healthy control group. **Results:** A higher percentage of activated CD8⁺ T cells were found in all HIV infected children, regardless of the evolution of disease. The activation of CD8⁺ T cells was not associated with either viral load or the percentage of CD4⁺ T cells. In addition, Treg cell levels did not show any correlation with the clinical outcome or the activation status of CD8⁺ T cells. **Conclusions:** HIV-1-infected children presented an increased percentage of activated CD8⁺ T cells and an unaltered percentage of Treg cells, regardless of their clinical evolution. Thus, these immunological parameters should not be used for prognostic evaluation.

Keywords

HIV, slow-progressing children, CD38, Treg, HLA-DR

Background

Slow-progressing children (SPC) provide an exceptional resource for the investigation and clarification of the immunological and virological characteristics of HIV infection. In addition, they can aid in clarifying the underlying mechanisms of natural infection control and can be used to investigate prognostic indicators of disease progression.¹

CD8⁺ T lymphocytes, which have a role in the in vitro control of HIV replication, are known to influence the process that underlies slow progression.² HIV infection induces lymphocyte activation, which results in the increased expression of surface T lymphocyte activation markers such as CD38 and HLA-DR.^{3,4} In adults, an increase in CD8⁺CD38⁺ T cell levels is a strong indicator of disease progression.³ However, in children, increased CD8⁺CD38⁺ T cell levels has been described as a survival indicator by some authors and has been associated with advanced stages of infection by others.^{5,6} Likewise, in some studies, the increase in HLA-DR expression in

CD8⁺CD38⁺ T cells has been proposed as an HIV-1 infection progression marker in both adults and children.⁷

It is still not clear how the immune system responds to this hyperactivation state. As explored in a review by Terzieva, several recent studies have defined regulatory T cells (Treg cells) as a key population in the regulation of immune activation

¹ Postgraduate Pathology Program, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Flow Cytometry Laboratory, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Corresponding Author:

Silvana Maria Eloi-Santos, Department of Propedeutics, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Alfredo Balena, 190, Room 403, 30130-100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Email: eloisil@medicina.ufmg.br

Table 1. Demographic, Clinical, Immunological, and Virological Characteristics of the Children Included in This Study

	Noninfected Group		HIV-Infected Children	
	NI	SPC	IF/VF	IS/VS
n	11	9	10	9
Median age, years	9.6 ± 2.5	10.9 ± 2.7	12.4 ± 2.8	8.4 ± 2.3
Sex, male/female	5/6	5/4	8/2	4/5
CDC classification				
N	N/A	0	0	0
A	N/A	7	0	1
B	N/A	2	2	1
C	N/A	0	8	7
Immunological profile				
Median CD4, % (IQR 25%-75%)	37.33 (34.29-42.87)	30.00 (23.63-34.69)	15.69 ^{a,b} (4.24-26.81)	33.24 (29.62-38.69)
Median CD4 count, cells/mm ³ (IQR 25%-75%)	898 (834-1224)	910 (365-1102)	303 ^{a,c} (149-427)	777 (584-1131)
Median CD8, % (IQR 25%-75%)	24.90 (21.96-29.21)	39.79 ^{a,b} (38.56-48.36)	47.79 ^{a,b} (42.09-60.01)	33.57 (29.13-35.73)
Median CD8 count, cells/mm ³ (IQR 25%-75%)	674 (555-760)	1177 (836-1446)	966 (568-1372)	681 (584-1131)
Virological profile				
Viral load <50 copies/mL (%)	N/A	1 (11%)	0	4 (44%)
Median plasma viral load, log (IQR 25%-75%)	N/A	4.14 (3.86-4.37)	4.40 (4.03-4.56)	2.23 ^d (1.90-2.23)
Antiretroviral therapy				
Antiretroviral therapy naive	N/A	9	0	0
On treated	N/A	0	10	9

Abbreviations: NI, noninfected children; SPC, slow-progressing children; HAART, highly active antiretroviral therapy; IF/VF, children on HAART with immunological and virological failure; IS/VS, children on HAART with immunological and virological success; IQR: interquartile range; N/A: not applicable.

^a Significant differences between NI ($P < .05$).

^b Significant differences between IS/VS ($P < .05$).

^c Significant differences between SPC ($P < .05$).

^d Significant differences between IF/VF ($P < .05$).

during HIV-1 infection.⁸ Initially the Treg cells were characterized as CD4CD25⁺, but lately it was demonstrated that their regulatory function depends on the expression of the transcription factor FoxP3. However, longitudinal studies of Treg cell frequencies during the course of HIV-1 infection have provided divergent results.⁹⁻¹³

Objectives

The aim of this study was to assess the relationship between immune activation, Treg cells, and the infection progression profile of children vertically infected with HIV-1.

Study Design

All works were approved by the Ethical Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (COEP). A cross-sectional study was performed on 28 children vertically infected with HIV stratified into 3 groups according to their clinical outcome: SPC (n = 9, age >8 years old, antiviral-treatment naive, CD4 ≥ 20% and/or ≥ 500 cells/mm³; viral load <25 000 copies/mL), immunological failure/virological failure ([IF/VF]; n = 10, age >6 years old, children on highly active antiretroviral therapy (HAART) but with IF and VF) and immunological success/virological success ([IS/VS]; n = 9; age >6 years old, children on HAART but with IS and VS). Noninfected children ([NI] n = 9) were also studied as healthy controls. Viral load was measured by b-DNA assay, and T cell subsets were evaluated by 3-color flow cytometry. Cytofluorimetric data

acquisition was performed with a FACS Calibur instrument (BD Biosciences, Mountain View, California). CELLQUEST TM software provided by the manufacturer was used for data acquisition and analysis. Statistical analysis was performed using Prism 5.01. As all data sets were nonparametric in nature, statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis variance analysis followed by Dunn test for comparison between groups. Spearman's tests were used for correlation. Significant differences at $P < .05$ are identified in the figure and in the table.

Results

The immunological and clinical characteristics of all patients are shown in Table 1. As shown in Figure 1A, the infected children presented significantly higher percentages of CD8⁺CD38⁺ cells in the peripheral blood when compared to the NI, regardless of the disease evolution profile. The infected children also presented significantly higher percentages of CD8⁺HLA-DR⁺ cells in the population of CD8⁺ lymphocytes, as shown in Figure 1B. Among the groups of infected patients, no relevant difference was observed in relation to either marker used above. In addition, we examined whether there was any correlation between CD8⁺CD38⁺, CD8⁺HLA-DR⁺ cells, and the percentage of CD4 count. As shown in Figure 1C and D, no significant correlation was observed between the percentages of CD4 count and activated CD8⁺ T lymphocytes in any of the assessed infected patient groups.

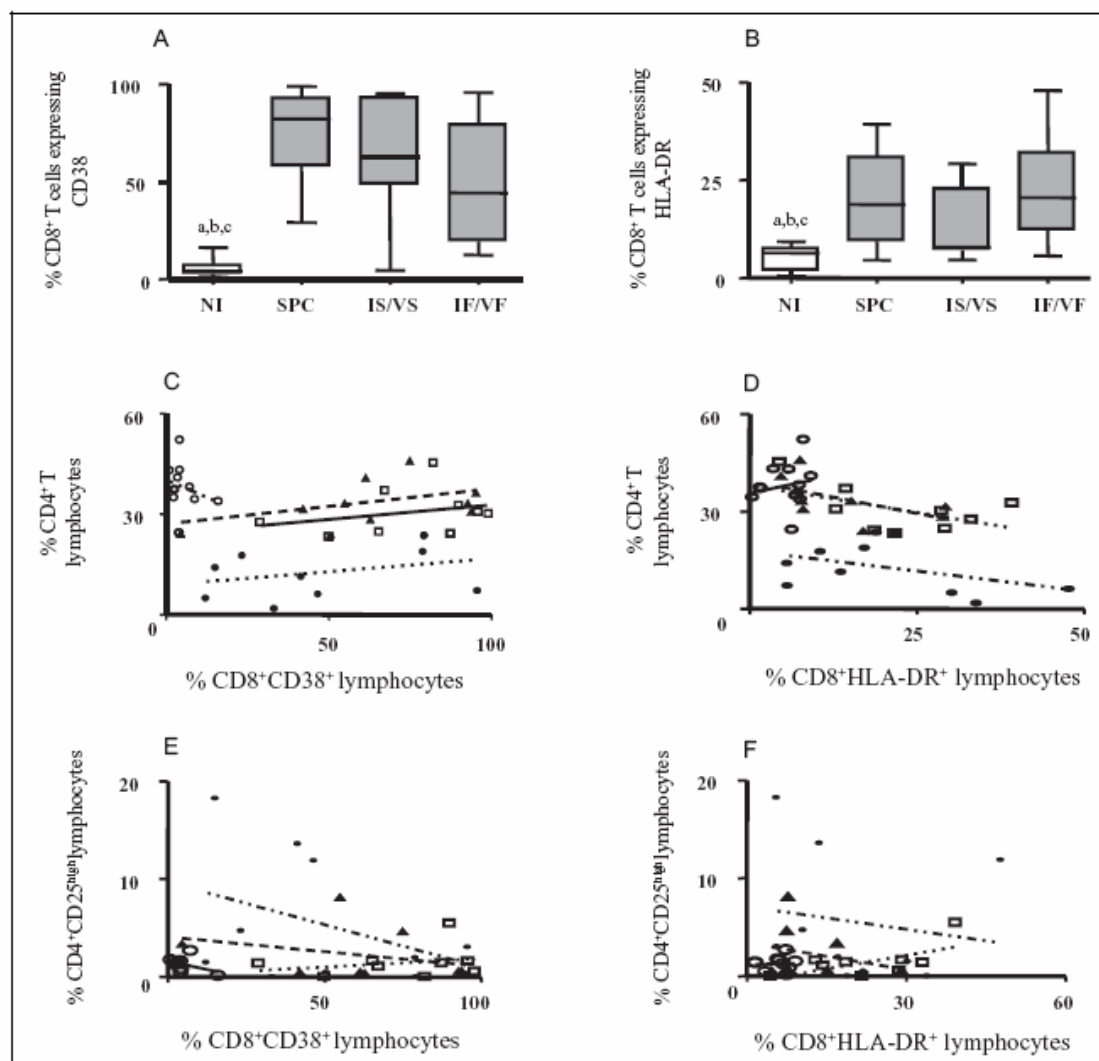


Figure 1. A and B, Percentage of CD8⁺ T cells expressing CD38 (A) or HLA-DR⁺ (B) in noninfected children (NI), slow progressing children (SPC), children on highly active antiretroviral therapy (HAART) with immunological and virological success (IS and VS) and children on HAART with immunological and virological failure (IF and VF). Significant differences at $P < .05$ are identified by letters a, b, and c when compared NI with SPC, IS/VS, and IF/VF, respectively. C and D, Correlation between the percentage of CD4 lymphocyte and (C) CD8⁺CD38⁺ T cells (SPC [□] $r = .285$, $P = .457$; IF/VF [●] $r = .289$, $P = .417$; IS/VS [▲] $r = .475$, $P = .197$; NI [◇] $r = .252$, $P = .455$) and (D) CD8⁺HLA-DR⁺ T cells (SPC [□] $r = .327$, $P = .145$; IF/VF [●] $r = .429$, $P = .216$; IS/VS [▲] $r = .375$, $P = .105$; NI [◇] $r = .186$, $P = .585$). E and F, Correlation between the percentage of CD4CD25^{high} lymphocytes and the percentage of (E) CD8⁺CD38⁺ T cells (SPC [□], $P = .527$; IF/VF [●] $r = .381$, $P = .277$; IS/VS [▲] $r = .321$, $P = .399$; NI [◇] $r = .413$, $P = .236$) and (F) CD8⁺HLA-DR⁺ T cells (SPC [□] $r = .429$, $P = .07$; IF/VF [●] $r = .159$, $P = .660$; IS/VS [▲] $r = 0.312$, $P = .414$; NI [◇] $r = .056$, $P = .878$).

Next, we assessed whether the activation of CD8⁺ T cells was associated with virological evolution in HIV-infected children by examining the possible correlation of CD8⁺CD38⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺ cells with viral load. In our patients, no significant correlation between the viral load and CD8⁺CD38⁺

and CD8⁺HLA-DR⁺ lymphocyte percentages was observed in any of the groups of infected patients assessed (data not shown).

Our results also showed that the percentage of CD4CD25^{high} cells, a potential T regulatory cell subset, was similar in all

groups of children (data not shown). In order to verify whether Treg cells were associated with immunological activation in HIV-infected children, we assessed the correlation between CD4CD25^{high} cells and CD8⁺CD38⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺ lymphocytes. As shown in Figure 1E and F, no significant correlation between the percentage values of CD4CD25^{high} cells and the percentage values of CD8⁺CD38⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺ lymphocytes was observed in any infected patient group.

Discussion

HIV infection is known to cause significant immunological impairment, including the increased expression of activation markers, such as CD38 and HLA-DR on CD8⁺ T lymphocytes, and this increased expression has been associated with particular clinical outcomes.^{4,14,15} The T cell activation has been related to the immune system's attempt to control viral replication in HIV-1-infected children.¹⁶ But it has also been proposed as one of the main mechanisms responsible for the depletion of CD4 count and the subsequent development of the disease.^{16,17}

In our study, high activation of CD8⁺ T cells was found in all groups of HIV-1-infected children, regardless of their profile of clinical evolution. In fact, we did not observe any association between CD8⁺ T cell activation and CD4 count percentage or viral load. This high expression of activation marker can be explained by immune repopulation that is known to occur in children despite persistent viremia.¹⁸ It has been reported that CD38 is expressed early in hematopoietic cells, with downregulation during the cell maturation process and reexpression upon cell activation. This cyclic nature of CD38 expression during lymphopoietic ontogeny may explain the presence of high expression of CD38 in HIV-infected children.

Another explanation for these divergent results can be attributed to the differences among the characteristics of studied patients and differences in the stage of HIV infection at which these cells were examined. In many other studies, the classification of children with slow progression includes children under a treatment either with or without protease inhibitors.^{17,19} In the present study, we only assessed in SPC group, children that were therapy naive, and thus free of treatment pressure.

Considering the important regulatory role of Treg cells in the immune system, it is possible that this cell population also influences the immunopathology of HIV-1 chronic infection.^{8,9} Longitudinal studies on the frequencies of Treg cells in the adult HIV-1-infected population have provided divergent results. Eggena et al observed that Treg depletion was strongly associated with the activation and depletion of CD4 count. They suggested that Treg depletion contributes to the chronic immune activation observed in HIV infection during disease progression, corroborating data from the other studies.^{9,10} Thus, the loss of immunoregulatory mechanisms in the more serious clinical forms of disease would contribute to immune response unbalance, triggering powerful inflammatory activity and the subsequent greater reduction in CD4 count.

Nevertheless, Cao et al verified that Treg proportions are high during the course of HIV-1 infection in adults and that the magnitude of this rise is associated with the progression of the disease.²⁰ Recently, Freguja and colleagues reported an elegant study that evaluated the relationship between viral load, immune activation, and Treg cells in HIV-1-infected children. The study showed a strong relationship between viral load, immune activation, and expansion of Tregs, suggesting that viral load induces a rise in immune activation that leads to an expansion of Tregs.²¹ Contrary to these findings, in our study, we did not observe any correlation between Treg cells and the status of the immunological activation of CD8⁺ T cells in infected children in any analyzed groups. It is possible that these divergent results may be partially attributed to the differences in the definitions of Treg cells, since we did not evaluate FoxP3 expression.

In conclusion, based on our data, the percentage of activated T cells and the percentage of CD4CD25^{high} cells may not be a good prognostic biomarker in HIV-infected children, since in our population, children with distinguished clinical outcome present similar profiles.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

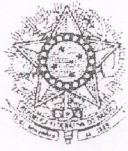
Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Ofori-Mante JA, Kaul A, Rigaud M, et al. Natural history of HIV infected pediatric long-term or slow progressor population after the first decade of life. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(3):217-220.
- Resino S, Bellón JM, Pérez A, Gurbindo Gutiérrez MD, Muñoz-Fernández MA. Subsets of CD8⁺ T cells in longterm asymptomatic vertically HIV-1 infected children [in Spanish]. *Med Clin (Barc)*. 2004;122(1):6-11.
- Resino S, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. CD38 expression in CD8⁺ T cells predicts virological failure in HIV type 1-infected children receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(3):412-417.
- Ssewanyana I, Baker CA, Ruel T, et al. The distribution and immune profile of T Cell subsets in HIV-infected children from Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(1):65-71.
- de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4⁺ and CD8⁺ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res*. 1998;43(6):752-758.
- Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, Stiehm ER. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;71(1):19-26.

7. Rosenblatt HM, Stanley KE, Song LY, et al. Pediatric AIDS clinical trials group 377 study team. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2005;192(3):445-455.
8. Terzieva V. Regulatory T cells and HIV-1 infection. *Viral Immunol.* 2008;21(3):285-291.
9. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol.* 2005;174(7):4407-4414.
10. Apoil PA, Puissant B, Roubinet F, Abbal M, Massip P, Blancher A. FOXP3 mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4⁺ lymphocytes from HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39(4):381-385.
11. Zaunders JJ, Ip S, Munier ML, et al. Infection of CD127⁺ (interleukin-7 receptor+) CD4⁺ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2006;80(20):10162-10172.
12. Montes M, Lewis DE, Sanchez C, et al. Foxp3 regulatory T cells in antiretroviral-naïve HIV patients. *AIDS.* 2006;20(12):1669-1671.
13. Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3 regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood.* 2006;108(9):3072-3078.
14. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, et al. HIV-1 induced activation of CD4⁺ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood.* 2008;111(2):699-704.
15. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998;396(6712):690-695.
16. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood.* 2004;104(4):942-947.
17. Paul ME, Shearer WT, Kozinetz CA, Lewis DE. Comparison of CD8⁺ T-cell subsets in HIV-infected rapid progressor children versus non-rapid progressor children. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(2):258-264.
18. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, et al. HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood.* 2011;117(19):5142-5151.
19. Alexander L, Cuchura L, Simpson BJ, Andiman WA. Virologic and host characteristics of human immunodeficiency virus type 1-infected pediatric long term survivors. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(2):135-141.
20. Cao W, Jamieson BD, Hultin LE, Hultin PM, Detels R. Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009;25(2):183-191.
21. Freguja R, Gianesin K, Mosconi I, et al. Regulatory T cells and chronic immune activation in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected children. *Clin Exp Immunol.* 2011;164(3):373-380.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30 130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
www.medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de JULIANA RIBEIRO ROMEIRO, nº de registro 2007659381. Às quatorze horas do dia 18 de novembro de dois mil e onze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: “AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DO PERFIL FENOTÍPICO E ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DE CCR5 DO SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS INFECTADAS VERTICALMENTE PELO HIV-1 QUE PROGRIDEM LENTAMENTE NA INFECÇÃO”, requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Silvana Maria Elói Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Silvana Maria Elói Santos/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Jorge Andrade Pinto/Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Profa Fabiana Maria kakehasi	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Taciana de Figueiredo Soares	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Mariléia Chaves Andrade	Instituição: UNIMONTES	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Flávia Gomes Faleiro Ferreira	Instituição: UFOP	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de novembro de 2011.

Profa. Silvana Maria Elói Santos Silvana Maria Elói Santos

Prof. Jorge Andrade Pinto Jorge Andrade Pinto

Profa Fabiana Maria kakehasi Fabiana Maria Kakehasi

Profa. Taciana de Figueiredo Soares Taciana de Figueiredo Soares

Profa. Mariléia Chaves Andrade Mariléia Chaves Andrade

Profa. Flávia Gomes Faleiro Ferreira Flávia Gomes Faleiro Ferreira

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

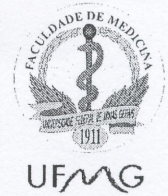
Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia - Faculdade de Medicina UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG



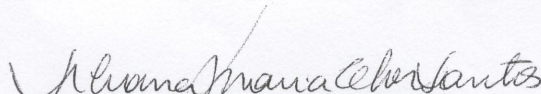
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

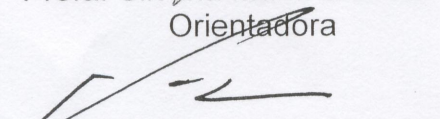
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

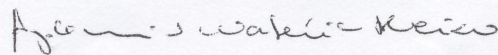


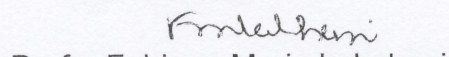
DECLARAÇÃO

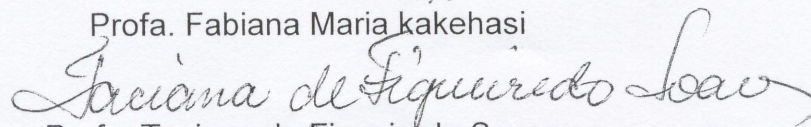
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Silvana Maria Elói Santos, Jorge Andrade Pinto, Agdemir Valéria Aleixo, Fabiana Maria Kakehasi, Taciana de Figueiredo Soares, Mariléia Chaves Andrade e Flávia Gomes Faleiro Ferreira, aprovou a defesa da tese intitulada: **“AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DO PERFIL FENOTÍPICO E ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DE CCR5 DO SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS INFECTADAS VERTICALMENTE PELO HIV-1 QUE PROGRIDEM LENTAMENTE NA INFECÇÃO**, apresentada pela doutoranda **JULIANA RIBEIRO ROMEIRO**, para obtenção do título de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Propedêutica Complementar da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 18 de novembro de 2011.

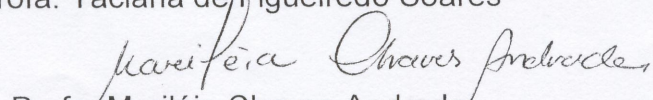

Profa. Silvana Maria Elói Santos
Orientadora

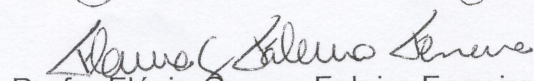

Prof. Jorge Andrade Pinto
Coorientador


Profa. Agdemir Valéria Aleixo
Coorientadora


Profa. Fabiana Maria Kakehasi


Profa. Taciana de Figueiredo Soares


Profa. Mariléia Chaves Andrade


Profa. Flávia Gomes Faleiro Ferreira