

ELIANE BORGES DE ALMEIDA

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PERFIL DE
CITOCINAS EM RECÉM-NASCIDOS EXPOSTOS AO HIV
DURANTE A GESTAÇÃO**

**CAMPINAS
2010**

ELIANE BORGES DE ALMEIDA

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PERFIL DE
CITOCINAS EM RECÉM-NASCIDOS EXPOSTOS AO HIV
DURANTE A GESTAÇÃO**

*Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
doutor em Fisiopatologia Médica, área de
concentração Medicina Experimental.*

**Orientadora: Profª Drª Irene Lorand-Metze
Co-orientadora: Profª Drª Maria Marluce Vilela**

**CAMPINAS
UNICAMP
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Al64e	<p>Almeida, Eliane Borges de Estudo das subpopulações linfocitárias em sangue de cordão umbilical e perfil de citocinas em recém-nascidos expostos ao HIV durante a gestação / Eliane Borges de Almeida. Campinas, SP : [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores : Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze; Maria Marluce Vilela Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Cordão umbilical. 2. Infecções por HIV. 3. Citometria de fluxo. 4. Citocinas. I. Lorand-Metze, Irene Gyongyver Heidemarie. II. Vilela, Maria Marluce. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Título em inglês : Lymphocyte subsets study in Cord blood profile of cytokines in neonatal exposed to HIV during pregnancy

Keywords: • Umbilical cord
• HIV infections
• Flow cytometry
• Cytokines

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Medicina experimental

Banca examinadora:

Profº. Drº. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze

Profª. Drª. Mihoko Yamamoto

Profª. Drª. Silvana Maria Quintana

Profº. Drº. Marcos Tadeu Nolasco da Silva

Profª. Drª. Sandra Cecília Botelho Costa

Data da defesa: 05-07-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado

Eliane Borges de Almeida

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze

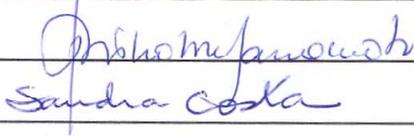
Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze



2. Prof(a). Dr(a). Marcos Tadeu Nolasco da Silva

3. Prof(a). Dr(a). Mihoko Yamamoto



4. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecilia Botelho Costa



5. Prof(a). Dr(a). Silvana Maria Quintana



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/07/2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Carlos e Diva pelo amor incondicional, dedicação e exemplo de luta;

À tia Cida pelo carinho e acolhida, sempre de braços abertos;

Ao meu esposo Lusanildo e aos nossos tesouros Luiza e Lucas, vocês são a expressão do amor de Deus em meu viver!

COLABORAÇÕES

Este trabalho de caráter multidisciplinar foi realizado em colaboração com os seguintes ambulatórios e laboratórios:

Ambulatório de pré-natal especializado de infecções e ambulatório de triagem de risco do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM)

- Profª Drª Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez
- Profª Drª Eliana Martorano Amaral

Ginecologistas do (CAISM)

Função: Médicas obstetras envolvidas no acompanhamento pré-natal, triagem das mães e realização dos partos.

Centro Obstétrico do CAISM

- Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba

Neonatalogista do CAISM

Função: cuidados do RN

Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)

- Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco Silva

Departamento de Pediatria – Área de Imunologia

Função: responsável pelo laboratório de Imunologia Pediátrica

Apoio técnico na realização dos ensaios de cultura de células e ELISA:
Simone Corte B. S. Lima, Taís Nitsch Mazzola, Yara F. Moreno, Vanessa Oya e Beatriz Abramczuk.

HEMOCENTRO/UNICAMP

- Profª Drª Irene Lorand-Metze

Laboratório de Marcadores Celulares

Função: orientadora e responsável pelo laboratório de Marcadores Celulares

Apoio técnico na aquisição e análise de células por citometria de fluxo:
Fernada G. Pereira-Cunha e Suiellen C. Reis-Alves.

Apoio técnico na realização dos ensaios de citocinas: Maira H. C. Favarelli.

A todos meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu tudo! Não há palavras que possam expressar minha gratidão, por todos os momentos que eu O senti presente, nas alegrias e nas horas de muita dor. O Senhor foi e será sempre o meu bálsamo e Consolador fiel.

À Prof^a Dr^a Irene Lorand-Metze, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela espera e paciência e pelo investimento na minha formação, jamais esquecerei seu voto de confiança!

À Prof^a Dr^a Marluce Vilela, pela valorosa oportunidade de trabalhar em seu laboratório de Imunologia-CIPED, onde aprendi muito e vivenciei a importância do trabalho em equipe.

À Prof^a Dr^a Helaine Milanez, a quem carinhosamente sempre chamei de a “terceira orientadora”, por toda ajuda e aprendizado que recebi durante o período de triagem no CAISM.

Ao Prof. Dr. Konradin Metzke, pelos ensinamentos em Metodologia Científica e pelas análises estatísticas.

Às amigas do laboratório de Imunologia-CIPED, Simone, Yara, Taís, Tati, “Vanessas” e Flávia pelo companheirismo e ajuda.

À Bia (Beatriz Abramczuk), pela companhia nos finais de semana e feriados no laboratório do CIPED, por todo auxílio que me ofereceu, você é parte deste trabalho.

À Maira pelo auxílio nos ensaios de ELISA, quanto trabalho, hein!

À Nicete, pelas palavras de ânimo e por estar sempre pronta a ajudar.

À Salete, por toda compreensão, ajuda e orientações.

Aos técnicos Alan e Rosângela e a todos os estagiários que vi chegar, sair e agora retornar (Felipe) ao Laboratório de Marcadores Celulares, pelo auxílio amigável e muitas risadas.

À Fernanda e ao Carlos, à Mari e ao Marcos pela amizade preciosa, vocês são muito especiais para mim!

Aos meus queridos amigos Suiellen e Paulo, por toda ajuda e apoio que me deram na fase final de conclusão desta tese.

A todos os funcionários do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela ajuda, amizade e muitas alegrias.

À tia Cida, minha incansável incentivadora, por toda ajuda e carinho que sempre dedicou à minha família.

Aos meus pais, que sem hesitar deixaram tudo em Campo Grande para cuidar de mim e principalmente da Luiza, enquanto estivemos em Campinas, e que agora cuidam também do Lucas com tanto amor e carinho. Obrigada!

À minha querida filha Luiza que por dois anos e sete meses foi uma grande companheira neste desafio. Esteve ao meu lado nos laboratórios em feriados, finais de semana, à noite, durante o dia, por horas, com sono, com fome...obrigada filha! Te Amo.

Ao meu amado esposo Lusanildo, por ter me apoiado nesta jornada, por ser meu porto seguro, amparo, amigo e cúmplice. Você é um presente de Deus!

Ao meu filho Lucas, tão pequeno e tão lutador! Com apenas um ano e oito meses, mesmo sem poder ouvir, falar ou se expressar, tem nos dado lições preciosas sobre o valor de uma vida e mais, ensina que o amor nos dá poder para lutar e nunca desistir da nossa missão. Você me dá forças.

Aos Pastores Sandra e Aminadab, e a todos os meus irmãos em Cristo pelos cuidados e orações.

A todos os meus amigos do Hospital Regional, Mônica, Flávia, Cléo, Isafas, Rosania e Marcelo, Elisangela, Renata e Daniella.

Ao Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, à Secretaria de Estado de Saúde e ao Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, pelo interesse, apoio e investimento para que este título fosse obtido.

Às agências financiadoras FAPESP e CAPES.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*

(Martin Luther King)

RESUMO

Recém-nascidos de mulheres portadoras do vírus HIV, durante a gestação são expostos a algumas drogas e citocinas que podem alterar o desenvolvimento de seu sistema imunológico e influenciar a resposta imune dessas crianças às infecções e vacinas. Nós analisamos as subpopulações dos linfócitos, a maturação dos linfócitos B e o perfil de citocinas em recém-nascidos (RNs) a termo de mães HIV⁺ que foram tratadas com antirretroviral (ARV) e comparamos os resultados com um grupo controle de recém-nascidos não expostos ao HIV.

Em estudo prospectivo, analisamos 36 mulheres HIV⁺ e seus RNs expostos e 15 mulheres não infectadas com seus RNs saudáveis. As características hematológicas e o perfil de citocinas das mães foram obtidos quando elas estavam na 35^a semana de gestação. Os linfócitos foram analisados por citometria de fluxo. As dosagens de IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α das mães e dos RNs foram realizadas por ELISA, em sobrenadantes de cultura de células mononucleares, sem estímulo e estimuladas por BCG e PHA.

Após um ano de acompanhamento nenhuma das crianças expostas que participou deste estudo foi infectada pelo HIV. Os linfócitos B do sangue de cordão umbilical estavam aumentados nos RNs expostos, com aumento da subpopulação CD19⁺/CD5⁺. Em RNs expostos de mães usuárias de drogas ilícitas, este aumento foi ainda mais significativo. O tabagismo materno estava associado à diminuição de células T CD4⁺ do sangue de cordão. Os linfócitos B dos RNs expostos apresentaram correlação inversa com níveis de IL-7 e IL-4 do sangue de cordão. A produção de citocinas dos RNs e de suas mães foi similar, com exceção do IFN- γ e do TNF- α que estavam elevados nas mães HIV⁺, especialmente nas usuárias de drogas ilícitas.

Portanto, a ontogenia do sistema imune dos RNs foi influenciada pela infecção materna pelo HIV e o tratamento com ARV, assim como, o uso de drogas ilícitas e o tabagismo. Todos estes fatores podem influenciar a eficácia da vacinação durante o período neonatal.

ABSTRACT

Children born to HIV⁺ mothers are exposed intra-utero to several drugs and cytokines that can modify the developing immune system, and influence the newborn's immune response to infections and vaccines. We analyzed cord blood lymphocyte subsets, B lymphocyte maturation and cytokine profile in term newborns of HIV⁺ mothers using ARV and compared them to normal newborns.

In a prospective study, 36 mother-child pairs from HIV⁺ mothers and 15 HIV-uninfected mother-pairs were studied. Hematological features and cytokine profiles of mothers at 35 weeks of pregnancy were also examined. Lymphocytes were analyzed by flow cytometry. The non-stimulated, as well as BCG and PHA stimulated production of IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α , from mothers and infants were quantified using ELISA.

After a year of monitoring revealed that none of the exposed children who participated in the study were infected with HIV. In cord blood, B lymphocytes were increased in HIV-exposed newborns, with increase of CD19⁺/CD5⁺ lymphocytes. In children of HIV⁺ hard drug using mothers, also immature B-cells were increased. Maternal smoking was associated with a decrease of cord T CD4⁺ cells. Cord blood B lymphocytes showed an inverse correlation with cord blood IL-7 and IL-4 levels. Cytokine levels were similar in infants and their mothers except for IFN- γ and TNF- α that were higher in HIV⁺ mothers, especially in drug abusing ones.

The immune system ontogeny of term newborns is influenced by mother's HIV infection, ARV treatment as well as drug abuse and smoking. All these factors may influence effectiveness of neonatal vaccination.

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	lamivudina
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	aloficocianina
ARV	antirretroviral
AZT	azidotimidina
BAFF	<i>B cell-activating factor belonging to the TNF family</i>
bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
BSAP	<i>B cell specific activator protein (Pax5)</i>
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CCR5	receptor de quimiocina, co-receptor para o HIV
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLS	cadeia leve substituta
CTH	célula tronco hematopoiética
CXCR4	receptor de quimiocina, co-receptor para o HIV
d4T	estavudina
ddIEC	didanosina entérica
DST	doença sexualmente transmissível
EBF	<i>early B-cell factor</i>
ELISA	ensaio imunossorbente ligado à enzima
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fik/Flt3	tirosina quinase 3 do fígado fetal
FSC	<i>forward side scatter</i>
gp120	glicoproteína do envelope viral
gp41	glicoproteína do envelope viral
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	vírus linfotrópico de células T humanas
IFN	interferon

Ig	imunoglobulina
IMAT	imaturas/intermediárias
IP	inibidores da protease
ITRN	inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos
ITRNN	inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos
LPV	lopinavir
MHC	moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MO	medula óssea
NFV	nelfinavir
NK	<i>natural killer</i>
NVP	nevirapina
PACTG	<i>Pediatrics Aids Clinical Trial Group</i>
PIBF1	<i>progesterone immunomodulatory binding factor 1</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PE	ficoeritrina
PerCP	proteína clorofila de peridina
PHA	fitohemaglutinina
RAG	<i>recombinase-activating gene</i>
RN	recém-nascido
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RNs	recém-nascidos
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCU	sangue de cordão umbilical
SSC	<i>side scatter</i>
TACI	<i>transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TARV	terapia antirretroviral
TdT	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>

TNF	fator de necrose tumoral
TR	transcriptase reversa
TV	transmissão vertical
VCM	volume corpuscular médio
ZDV	zidovudina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de maturação das células B	41
Figura 2. Controle transcricional do desenvolvimento das células B	43
Figura 3. Consequências da replicação do HIV sobre as células B	50
Figura 4. Painel de anticorpos monoclonais usados no estudo.....	67
Figura 5. Estratégia de localização das células CD19 ⁺ no plot SSC/CD19	69
Figura 6. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU do grupo controle, na combinação CD45/CD34/CD19/CD22.	69
Figura 7. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU do grupo controle, na combinação cCD79a/cIgM /CD19/CD10.	70
Figura 8. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU do grupo controle, na combinação sIgM/CD34/CD19/CD10.....	70
Figura 9. População de células B CD19 ⁺ /CD5 ⁺ em SCU do grupo controle.....	71
Figura 10. População de células T em SCU do grupo controle.	71
Figura 11. Esquema das condições do ensaio de proliferação em cultura.....	72
Figura 12. Representação da análise de proliferação.	74
Figura 13. Representação gráfica dos dados hematológicos maternos.....	81
Figura 14. Representação gráfica dos dados dos recém-nascidos.....	83
Figura 15. Representação gráfica dos dados dos recém-nascidos.....	85
Figura 16. Representação gráfica da subpopulação T dos RNs expostos, mães HIV ⁺ tabagistas e não tabagistas.....	86
Figura 17. Representação gráfica da população de células B.....	87
Figura 18. Representação gráfica da subpopulação B CD19 ⁺ /CD5 ⁺ dos RNs expostos, mães HIV ⁺ usuárias e não usuárias de drogas.	88
Figura 19. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação CD45/CD34/CD19/CD22.....	90
Figura 20. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19 ⁺ através da combinação CD45/CD34/CD19/CD22.	90

Figura 21. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação cCD79a/cIgM /CD19/CD10.	91
Figura 22. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19 ⁺ através da combinação cIgM/cCD79a/CD19/CD10.	92
Figura 23. Maturação das células B CD19 ⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação sIgM/CD34/CD19/CD10.	93
Figura 24. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19 ⁺ através da combinação sIgM/CD34/CD19/CD10.....	93
Figura 25. Representação gráfica da produção diminuída de IL-4 nas mães HIV ⁺	97
Figura 26. Representação gráfica da produção diminuída de IL-7 nas mães HIV ⁺	97
Figura 27. Concentrações de IL-4 e IL-7 determinadas por ELISA das gestantes.....	97
Figura 28. Representação gráfica da produção diminuída de IL-4 nos RNs expostos.	98
Figura 29. Representação gráfica da produção diminuída de IL-7 nos RNs expostos.....	98
Figura 30. Concentrações de IL-4 e IL-7 determinadas por ELISA dos RNs expostos.....	98
Figura 31. Representação gráfica da produção de IFN- γ materno.	99
Figura 32. Representação gráfica da produção de TNF- α materno.	99
Figura 33. Concentrações de IFN- γ e TNF- α determinadas por ELISA das gestantes.....	100
Figura 34. Representação gráfica da produção de IFN- γ nos RNs expostos.....	100
Figura 35. Representação gráfica da produção de TNF- α nos RNs expostos.....	101
Figura 36. Concentrações de IFN- γ (A) e TNF- α (B) determinadas por ELISA dos RNs expostos.....	101

LISTA TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas das gestantes	79
Tabela 2: características hematológicas das gestantes com 35 semanas.	80
Tabela 3: Dados dos Recém-nascidos	82
Tabela 4: Populações linfocitárias do SCU	84
Tabela 5: Proliferação de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ sem estímulo e estimuladas com PHA.	87
Tabela 6: Subpopulações de células B CD5 ⁺	88
Tabela 7. Estudo da maturação no SCU na combinação CD45/CD34/CD19/CD22.....	93
Tabela 8: Estudo da maturação de linfócitos B no SCU na combinação clgM/cCD79a/CD19/CD10.	91
Tabela 9: Estudo da maturação de linfócitos B no SCU na combinação slgM/CD34/CD19/CD10.	92
Tabela 10: Níveis de citocinas sem estímulo e após estímulo com BCG e PHA no sobrenadante da cultura de células mononucleares das gestantes na 35 ^a semana.	95
Tabela 11: Níveis de citocinas sem estímulo e após estímulo com BCG e PHA no sobrenadante da cultura de células do SCU.....	96

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
COLABORAÇÕES	ix
AGRADECIMENTOS	xiii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxix
LISTA TABELAS	xxxiii
INTRODUÇÃO	39
Maturação das células B.....	41
Células B e fatores de transcrição	42
Citocinas envolvidas na maturação das células B	43
Citocinas e as células B CD5 ⁺	45
Maturação das células T.....	45
Imunidade humoral neonatal	46
Imunidade celular neonatal.....	46
Perfil de citocinas neonatal	47
Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	48
Transmissão vertical do HIV	51
Terapia Antirretroviral	53
Implicações da exposição do feto ao ambiente uterino infectado pelo HIV	55
OBJETIVOS	61
HIPÓTESES.....	61
MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
Pacientes	65
Critérios de inclusão das gestantes HIV positivas:	65
Critérios de exclusão:	65
Critérios de inclusão do grupo controle:	65
Critérios de exclusão grupo controle:	66

Coleta das amostras de sangue	66
Análises laboratoriais.....	66
Aspectos éticos.....	75
Análise estatística.....	75
RESULTADOS	79
Dados maternos	79
Dados dos recém-nascidos	82
Análise dos linfócitos B no sangue de cordão umbilical	87
Análise da maturação dos linfócitos B no sangue de cordão umbilical.....	89
Dosagem de citocinas maternas e nos recém-nascidos.....	95
DISCUSSÃO	105
CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
Anexos	135
Parecer Comitê de ética	135
Apêndices.....	137
Apendice I.....	139
Apendice II.....	142
Apendice III.....	149
Apendice IV	150

Introdução

INTRODUÇÃO

Maturação das células B

Os linfócitos pré-B são inicialmente detectados no fígado fetal humano por volta da 9ª semana de gestação e na medula óssea (MO) a partir da 12ª semana (1). Os estágios iniciais do desenvolvimento das células B descritos em MO de jovens e adultos, indicam que há desenvolvimento contínuo das células B ao longo da vida (2). Também foi demonstrada a presença dos precursores iniciais de células B em outros sítios além da MO, como no sangue de cordão umbilical (SCU) e no sangue periférico logo após o nascimento. Notavelmente, durante o período inicial da infância, o timo pode apresentar células B iniciais e B maduras (3, 4).

Em medula óssea de seres humanos, a seqüência de maturação das células B, envolve a expressão progressiva de vários antígenos (Figura 1), e seu desenvolvimento pode ser dividido em alguns estágios de acordo com os rearranjos das cadeias de imunoglobulinas (5, 6).

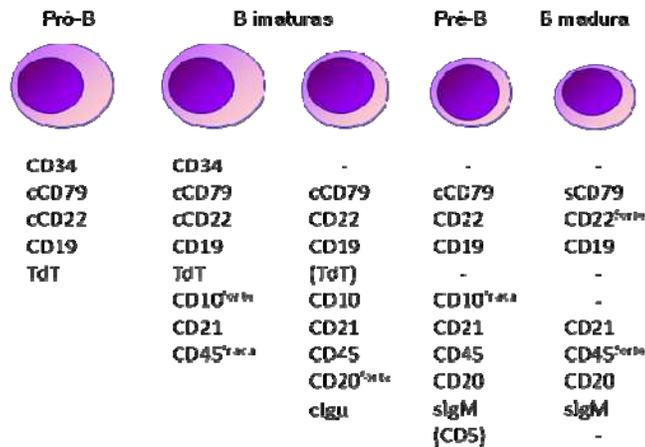


Figura 1. Sequência de maturação das células B (adaptada de Béné (5) e van Lochem et al (7)).

A expressão intracelular das cadeias α (CD79a) e β (CD79b) do receptor de células B (BCR), marca uma linhagem comprometida de progenitores linfóides comuns CD34/TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), até a diferenciação da linhagem B (5; 8). Neste estágio do desenvolvimento, as células B progenitoras imaturas CD79a⁺, apresentam rearranjo VDJ dos genes de Ig, expressão citoplasmática de cadeias leves substitutas (CLS), junção do VpreB (CD179a⁺) e as proteínas λ 5, expressão de CD10, CD127 (cadeia α do receptor de IL-7) e um nível baixo do marcador de superfície CD45 (8). Além disso, o desenvolvimento das células B progenitoras imaturas em células pró-B, é caracterizado pela expressão do marcador de diferenciação celular pan-B (CD19) e pelo aumento gradativo da expressão do CD45 (8).

A transição das células B progenitoras imaturas para pró-B CD19⁺ está associada ao início do rearranjo do gene VDJ e à perda da plasticidade das células progenitoras, ou seja, elas não terão mais a habilidade de dar origem aos macrófagos, células NK e T (6).

Outros antígenos de superfície de membrana, como CD22, CD20, CD21 e CD5, também aparecem durante a diferenciação das células B e se mantêm ou desaparecem em estágios posteriores (1).

O CD5 aparece em cerca de 10-15% dos linfócitos B de adultos, porém, se expressa em até 80% dos linfócitos B de fetos e de recém-nascidos (RNs), este valor tende a diminuir progressivamente com a idade (9, 10, 11). As células B CD5⁺ detectadas no SCU são resistentes a apoptose e promovem a produção espontânea de auto-anticorpos IgM polireativos de baixa afinidade (12, 13). Estas células são compostas de duas populações: células B CD5⁺ que surgem durante a ontogenia e células B CD5⁺ que são induzidas por vários estímulos (10).

Células B e fatores de transcrição

Os fatores de transcrição (figura 2) Ikaros e PU.1 atuam controlando a transição da célula tronco hematopoiética (CTH) em precursores linfóides, já os fatores E2A e o EBF (fator inicial de célula B) são importantes para o desenvolvimento das células pró-B e induz a expressão de CD45, eles cooperativamente regulam a expressão das cadeias leves substitutas e os

componentes sinalizadores ($Ig\alpha$ e $Ig\beta$) do pré-BCR, assim como, a transcrição de RAG1, RAG2 e as subunidades da recombinase V(D)J. O Pax-5 é conhecido como BSAP (proteína ativadora específica de célula B) ele induz a expressão de CD19, sendo indispensável para a elaboração do processo de maturação dos linfócitos B. Além disso, ele suprime as opções alternativas de desenvolvimento celular, sendo o responsável pelo comprometimento e manutenção da identidade das células B (4; 6;14-16).

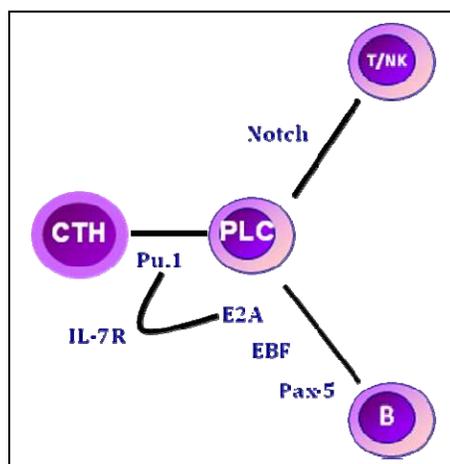


Figura 2. Controle transcricional do desenvolvimento das células B (adaptada de Blom & Spits(4)). A expressão balanceada de Pu.1 e a sinalização de IL-7R e E2A, induzem o aparecimento do primeiro elemento específico da linhagem B, o EBF (fator inicial de célula B). A transcrição de E2A e EBF colabora na diferenciação das células pró-B e induz a expressão do CD45. O Pax5 regula a formação de células pré-B e induz a expressão do CD19.

Citocinas envolvidas na maturação das células B

Além da participação essencial dos fatores de transcrição, para o desenvolvimento das células B, o microambiente do estroma, do fígado fetal ou da MO no adulto, apresenta várias citocinas, importantes para as células tronco e progenitoras (17).

Em humanos, o papel da IL-7 é controverso, estudos demonstram que é desnecessária para o desenvolvimento das células B *in vitro* ou *in vivo* (18), porém ela traduz sinais responsáveis pela mudança específica na expressão gênica. Células pró-B *in vitro* aumentam a sua capacidade de proliferar pela adição de IL-7 exógena. Esta citocina induz o aumento da expressão de CD19 sobre as células humanas pró-B e diminui os níveis de RAG-1, RAG-2 e o nível de RNAm do TdT (19). Dados obtidos de pacientes com **SCID** (imunodeficiência combinada grave) que são deficientes quanto à expressão dos componentes envolvidos na via sinalizadora do receptor da IL-7 ($R\alpha IL-7$, γc ou **Jak3**), apresentam nível normal ou aumentado de células B circulantes (4; 18; 20, 21).

Alguns estudos *in vitro* sugerem a participação da **Fik/Flt3** (tirosina quinase 3 do fígado fetal), que promove o desenvolvimento das células B CD19⁺, precursoras de células CD34⁺, e das células tronco hematopoiéticas CD19⁻, além de participar da proliferação e sobrevivência das células CD34⁺ e das células pró-B iniciais. Outra citocina importante é o fator de célula tronco (**SCF**), o ligante para o receptor c-kit da tirosina quinase, que dá suporte ao crescimento, proliferação e sobrevivência das células pró-B iniciais (2; 4; 21).

Crooks et al. (22) cultivaram células de cordão umbilical CD34⁺CD38⁻ e MO de crianças sobre uma linhagem celular de estroma de murino (**S17**) e observaram a linfopoiese B após 3 dias de exposição à IL-3. Esta citocina atuou diretamente sobre as células progenitoras e aumentou a produção das células B, induzindo a proliferação e, ainda, manteve a sobrevivência de células progenitoras humanas primitivas que possuíam potencial para se diferenciar em célula linfóide B.

Tem sido descrito um fator de ativação de células B, o **BAFF**, pertencente à família **TNF** (fator de necrose tumoral), este atua promovendo a formação e sobrevivência das células B maduras. O BAFF ligante não é detectável em células B iniciais, mas sua expressão aumenta durante a maturação e pode ser identificada por três receptores: o **R-BAFF**, ativador transmembrana e modulador do cálcio, o **TACI** (*cyclophilin ligand interactor*) e o **BCMA** (Ag de maturação de células B); todos eles são proteínas que interagem com o BAFF, expressadas

pelas células B de maneira variável, embora o R-BAFF e o TACI tenham sido detectados também em algumas populações de células T (10; 23).

Citocinas e as células B CD5⁺

Investigando o papel das células B CD5⁺ em humanos, alguns pesquisadores relataram a possibilidade da expressão do CD5 estar envolvida na sobrevivência das células B possivelmente por induzir a produção de IL-10 que exerce *feedback* negativo sobre eventos de sinalização que promovem morte celular (24). Trabalhos recentes têm demonstrado que não só as células B CD5⁺, mas, as células B CD5⁻ também expressam CD5 intracelular, com capacidade de produzir a IL-10 (25).

Alguns experimentos *in vitro* demonstraram que a IL-1 e a IL-2 podem inibir a modulação de CD5 sobre as células B, no entanto, em SCU as células B CD5⁺ proliferam na presença de IL-2 (Dalloul, 2009). As células B CD5⁺ de RNs, produtoras de IL-10, são inibidoras da resposta **Th1**, como consequência, a resposta imune tende a mudar o seu perfil para **Th2** (11, 12; 26).

Maturação das células T

O timo é o mais importante sítio de amadurecimento das células T que iniciam a colonização desse órgão no período fetal a partir da 8^a semana de gestação. As células T em desenvolvimento no timo são chamadas timócitos, devido a sua imaturidade, estas células ainda não expressam o receptor de célula T (**TCR**) ou os co-receptores CD4 e CD8 (27, 28). Inicialmente os timócitos são encontrados nos seios subcapsulares e na região da cortical mais externa do timo, posteriormente eles migram através do córtex, nesse momento os timócitos expressam pela primeira vez os TCRs e iniciam a maturação em células CD4⁺ restritas ao complexo principal de histocompatibilidade (**MHC**) da classe II e CD8⁺ restritas ao MHC de classe I (28, 29). Por volta da 12^a semana, observam-se todos os estágios evolutivos de maturação dos timócitos, e na 20^a semana os linfócitos T maduros podem ser identificados no sangue de cordão umbilical (27; 30).

Imunidade humoral neonatal

A imunidade humoral se desenvolve durante a gestação, mas não é totalmente madura ao nascimento. Nos RNs, cerca de 15% dos linfócitos possuem imunoglobulinas em sua superfície. Uma porcentagem dessas células é B CD5⁺. Esta subpopulação é maior em fetos quando comparada aos adultos. Os linfócitos fetais sintetizam pouca Ig, provavelmente por causa da proteção do ambiente uterino. Os níveis de **IgG** do **RN** são similares aos níveis maternos devido à transferência transplacentária. A **IgM**, a **IgD** e a IgE são indetectáveis ao nascimento, pois não podem atravessar a placenta. A amamentação provê a transferência de anticorpos, particularmente a IgA secretora. Vale ressaltar que os fetos possuem habilidade em produzir IgM e IgA quando estimulados, comprovado pela presença de anticorpos em muitos RNs que tiveram infecção perinatal, também chamada de materno-infantil ou transmissão vertical a diferentes patógenos, entre eles o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (1; 31, 32).

Imunidade celular neonatal

Em relação aos adultos, recém nascidos a termo apresentam uma contagem de CD4⁺ aumentada, e a relação CD4/CD8 também é alta chegando a 3:1 no período neonatal. Porém, estas células ainda são imaturas. Praticamente todos os linfócitos neonatais expressam CD38, que é um marcador de timócitos e inexistente em linfócitos maduros. Quase todos os linfócitos neonatais expressam CD45RA (não exposto a antígeno) e o CD45RO (memória) é praticamente inexistente. A função dos linfócitos T citotóxicos é deficiente. A quantidade e a função das células NK encontram-se reduzidas durante o período fetal e na ocasião do nascimento. Porém, nos primeiros meses de vida as células NK aumentam significativamente, sugerindo que este seja um mecanismo de defesa importante antes do desenvolvimento completo da resposta imune específica. Os polimorfonucleares em conjunto com os macrófagos, promovem a primeira linha de defesa do organismo. Entretanto, em recém-nascidos a fagocitose é mais lenta, predispondo a septicemias e infecções bacterianas graves (27; 30; 32).

Perfil de citocinas neonatal

Durante o período fetal e em RNs saudáveis predomina a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10). Esta tendência, durante o período fetal, parece estar relacionada a uma adaptação evolutiva, que na verdade é um mecanismo fundamental de proteção contra as citocinas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) derivadas da placenta (26).

A IL-4 e a IL-10, a prostaglandina E2 e a progesterona fazem parte das moléculas que regulam e suprimem a produção de citocinas Th1 (33). Estudos com células mononucleares de SCU demonstraram níveis altos na produção da IL-4 acompanhado pela produção baixa de IFN- γ . Esta produção diminuída de IFN- γ , após o nascimento, poderia contribuir para uma resposta antiviral ineficiente do RN. Já a produção de IL-4 elevada estaria relacionada à atopia antes das manifestações clínicas e o agravamento do estado atópico, com um desequilíbrio na produção de IL-4 versus IFN- γ (26; 34).

Células T de RNs estimuladas por mitógenos ou expostas a bactérias tem uma produção deficiente de IFN- γ , e tal fato, pode estar ligado também a uma produção diminuída de IL-12 (26).

A capacidade das células T de RNs de responder às citocinas difere totalmente dos adultos. Elas proliferam na presença de IL-4. Tem sido demonstrado que a IL-7 pode ser um potente indutor de proliferação neonatal, mas não em células T de adultos. Esta citocina atua também como um fator de sobrevivência para as células T virgens, mantendo sua viabilidade e expansão por muito mais tempo do que nos adultos (35).

O aumento da produção de IL-10 no SCU de RNs saudáveis tem sido correlacionado à grande proporção de células B CD5⁺. Esta citocina é multifuncional, com forte propriedade imunomodulatória. Neste contexto, ela atua prevenindo a morte das células B do centro germinativo, por sua capacidade de induzir a expressão da proteína bcl-2 (12; 24).

Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

A síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) foi detectada pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos. O agente causador da AIDS só foi descoberto em 1983, sendo classificado como um retrovírus e denominado vírus da imunodeficiência humana (HIV). No Brasil, os primeiros casos surgiram e foram diagnosticados no início da década de oitenta (36).

O HIV é um lentivírus da família dos retrovírus que caracteristicamente possui duas fitas idênticas de RNA genômico, armazenadas em um núcleo de proteínas estruturais (p24, p16 e p9) e envolta pelo envelope lipídico originado da célula hospedeira, que por sua vez, apresenta proteínas de membrana codificadas pelo vírus (gp41 e gp120). Foram relatados dois tipos diferentes deste vírus, o HIV-1 e o HIV-2 (28; 37 - 39).

A infecção das células do sistema imune (linfócitos T, macrófagos e células dendríticas) tem início quando a proteína gp120 do virion HIV se liga tanto ao seu receptor CD4, quanto ao co-receptor membro da família das quimiocinas (CXCR4 ou CCR5) (28; 38, 39).

Ocorrida a fusão da membrana do HIV com a membrana da célula, por ação da transcriptase reversa (TR), o RNA viral é transcrito em DNA complementar (cDNA) e passa a ser chamado de pró-vírus. O próximo passo é adentrar o núcleo celular, onde a integrase viral promove a integração do pró-vírus ao genoma da célula hospedeira. Subseqüentemente há transcrição do RNAm do HIV, que é transportado e traduzido em proteínas precursoras no citoplasma. Estas migram para a membrana celular e são clivadas durante a formação do vírion dando origem as proteínas regulatórias (Vpr, Vpu e Vif) e do envelope viral, gp41 e gp120 (28; 38; 40).

O HIV pode induzir uma resposta imune celular forte e eficiente, mas não elimina a infecção. Isto pode ser explicado pelo fato do vírus possuir alguns mecanismos de evasão imune ou estratégias para continuar replicando (38).

A diminuição do número de células T CD4⁺ indica a progressão da doença em adultos e crianças. Embora o HIV infecte preferencialmente células T de memória CD4⁺ (CD45RO⁺), a depleção de células T virgens CD4⁺

(CD45RA⁺CD62L⁺) é mais acentuada. Esta infecção induz as células T CD4⁺ a apoptose. Em pacientes HIV⁺ a destruição das células T CD4⁺ é acelerada, tanto para células infectadas como para não infectadas (38, 39; 41).

Células T citotóxicas específicas CD8⁺ tem o papel de destruir células infectadas pelo HIV com a ajuda das T CD4⁺ e manter tanto a memória imune quanto a resposta citolítica. Durante a fase aguda da infecção, a quantidade de células T CD8⁺ pode aumentar até vinte vezes. Elas contribuem para a atividade antiviral, devido a sua ação citotóxica específica ao HIV e por secretar fatores solúveis que inibem a replicação viral (38).

O HIV pode causar desequilíbrio na produção de citocinas, a hipótese consensual é que no estágio avançado da infecção há um declínio na produção de citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ) e aumento da síntese das citocinas Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (38; 42).

É pouco provável que o HIV replique em células B *in vivo* (Figura 3); no entanto, há fortes evidências de que o HIV se ligue à célula B madura através da interação entre o receptor de complemento CD21 (CR2) e o vírion que está circulando *in vivo* (43, 44).

Então, pacientes infectados pelo HIV apresentam ativação das células B (*turnover*) induzida pela replicação viral em andamento, demonstrada pela hipergamaglobulinemia policlonal, além da produção elevada de autoanticorpos e pouca produção de anticorpos contra antígenos naturais ou às vacinas (42; 45 - 47).

Sinais adicionais de anormalidades nas células B envolvem ainda a incidência alta de linfomas de linhagem B e a expressão anômala de algumas moléculas de superfície como Fas, Fas-ligante (pró-apoptóticas), CD5, CD21, CD25 e CD27 (42; 47, 48).

O porquê da expressão do CD5 nas células B de paciente HIV⁺, ou exposto ao vírus, sendo adulto ou criança, ainda é controverso. No entanto, estudos relacionam a sua expressão à progressão da doença (48 - 52).

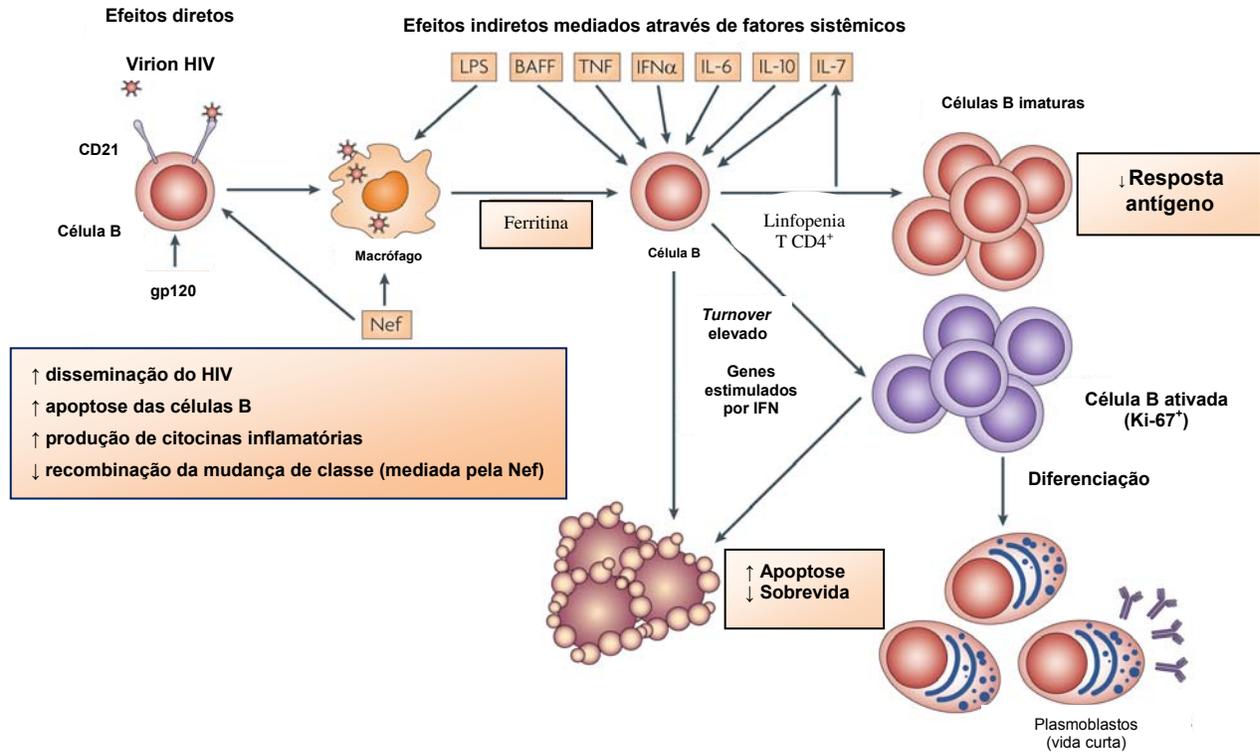


Figura 3. Consequências da replicação do HIV sobre as células B. Os efeitos diretos do HIV e das proteínas virais sobre as células B envolvem a interação do receptor de complemento CR2 (CD21) com os vírions circulantes, que pode aumentar a replicação viral e a depleção de células B por apoptose, além de induzir as células B a secretar citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-6, que induzem a ativação, diferenciação e produção elevada de anticorpos que caracteriza o quadro de hipergamaglobulinemia policlonal em indivíduos infectados. Os efeitos indiretos são mediados por fatores sistêmicos associados à replicação viral em andamento que promove o aumento das células B imaturas, depleção das células B de memória e dos linfócitos T CD4⁺, acarretando diminuição da resposta imune a antígenos e vacinas. (44).

Durante o período de replicação observa-se ainda uma frequência aumentada de células B maduras expressando níveis baixos de CD21. Ocorre também uma diminuição das células B de memória (CD27⁺) que não pode ser revertida pela terapia antirretroviral (TARV). Há ainda um aumento de células B

imaturas e CD10⁺ parcialmente diferenciadas, que está relacionada à diminuição das células T CD4⁺ (44 – 46; 53).

A infecção pelo HIV, está associada ao aumento da apoptose em todas as populações de linfócitos, além das células T CD4⁺, as células B, NK e T CD8⁺, como resultado direto e indireto do início da replicação viral, incluindo a geração de uma nova subpopulação de linfócitos com tempo de vida mais curto (53).

Transmissão vertical do HIV

A transmissão vertical (TV) do HIV foi reduzida a menos de 1% nos Estados Unidos da América e Europa, com o uso de drogas antirretrovirais na gravidez e no recém-nascido (54). Porém, em muitas regiões menos desenvolvidas do mundo, este índice permanece alto, em torno de 10%. Conseqüentemente, mais de 500.000 crianças adquirem anualmente o HIV. A vasta maioria delas pertence à região subsaariana da África (55;56).

A transmissão intra-útero do HIV é uma das vias pela qual um RN adquire esta retrovirose. Vários mecanismos têm sido propostos para esclarecer a proteção do feto contra o HIV materno durante a gestação, como a produção de anticorpos, a quantidade de linfócitos T CD4⁺ materno, a presença de vários fatores solúveis (entre eles o RANTES e o MIP-1 β , secretado pelas células T CD8⁺), quimiocinas, citocinas e hormônios (57, 58, 59).

Geralmente, a transmissão intra-útero ocorre durante o terceiro trimestre da gestação. Porém, há relatos da presença do HIV em fetos abortados por volta da 8^a semana de gestação, indicando que a transmissão intra-útero também pode ocorrer precocemente (56). Tem sido proposto que a infecção ocorre quando o fluido amniótico contendo HIV atravessa a superfície da mucosa orofaríngea ou do trato gastrointestinal do feto. Estudos recentes têm detectado o HIV em fluido amniótico de mulheres infectadas cuja carga viral plasmática estava acima de 10⁵ cópias/mL (60, 61).

Uma hipótese defendida por estudos *in vitro* e *in vivo*, afirma que a passagem do HIV através dos trofoblastos placentários é restrita. Portanto, a transmissão pode depender do rompimento da barreira placentária ou do “trânsito” de células infectadas pelo vírus (55; 58; 62).

A elevada carga viral plasmática do HIV materno e a depleção das células T CD4⁺ estão associadas ao aumento da transmissão durante a gestação (35%), principalmente nas últimas semanas. Alguns estudos demonstram que a redução da carga viral pelo uso de TARV diminui o nível da transmissão intra-útero (63, 64).

Há poucos estudos sobre o efeito da tuberculose, da malária e outras co-infecções sobre a carga viral antes e durante a gestação. Porém, medidas profiláticas na prevenção de infecções bacterianas na gravidez de mulheres infectadas pelo HIV mostraram bons resultados (56).

As infecções bacterianas recorrentes podem causar a inflamação da placenta ou das membranas fetais, permitindo assim a migração de células maternas infectadas pelo HIV para a cavidade amniótica, predispondo a criança à aquisição do HIV. Neste caso, há de se levar em consideração que as doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis e a gonorréia aumentam o risco de transmissão vertical (56; 64).

Há uma proporção considerável, cerca de 65%, de transmissão vertical durante o parto, que ocorre quando o RN passa através do canal vaginal durante o nascimento e se expõe ao sangue materno e às secreções genitais (64). Os fatores que influenciam o risco de infecção intraparto incluem a presença do HIV no trato genital, doença ulcerativa genital, complicações no parto e rompimento da barreira placentária (microtransfusões materno-infantis). Nível detectável de RNA do HIV no trato genital pode ser encontrado em aproximadamente 15% das mulheres que fazem uso de TARV e com carga viral indetectável. Isto reforça a idéia de compartimentalização da replicação viral e sugere ainda que o processo local esteja associado à persistência do vírus em secreções da mucosa (56; 62).

A transmissão vertical do HIV através do aleitamento materno também é outro fator a ser considerado. Os dois fatores de maior importância na transmissão através do aleitamento materno são: o tempo de duração da amamentação (7% a 22% de risco de transmissão) e a presença do vírus no leite materno. Vale observar que, se a mãe for infectada durante o período em que está

amamentando, o índice de transmissão pode chegar a aproximadamente 30%. (56; 62; 64).

A evolução clínica de crianças infectadas pelo HIV tem mostrado que de 10 a 30% delas iniciam os sintomas nos primeiros meses de vida, de modo semelhante a outras infecções adquiridas intra-útero (65).

Terapia Antirretroviral

Sabe-se que o uso de TARV na gestação pode reduzir a carga viral do HIV para níveis indetectáveis, e mulheres que recebem TARV apresentam índice muito baixo de transmissão. A eficácia desta terapia foi demonstrada inicialmente em 1994, por Connor e colaboradores (66). Esta pesquisa mostrou uma queda da taxa de transmissão vertical de 25,5% para 8,3% (36; 64; 67).

Um dos principais objetivos da TARV, em adultos, é a negatificação da carga viral plasmática num período de seis meses após o início da terapia. Entretanto, considera-se como resposta positiva a redução substancial, isto é, queda maior que um log ou 90% da carga viral nas primeiras quatro semanas, ou acima de dois logs (99%), após 12 a 16 semanas (68).

Os antirretrovirais são drogas desenvolvidas para atuar nas diferentes fases da replicação viral. Eles se classificam em: inibidores da protease (IP), inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) e inibidores da fusão e da integrase (36; 69).

Em março de 1987 foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para comercialização a primeira droga com atividade antirretroviral: a azidotimidina (AZT) ou zidovudina (ZDV). Ela inibe os vírus HIV-1, HIV-2, o vírus 1 da leucemia T/linfoma (HTLV-1) em humanos e outros retrovírus de mamíferos. Seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a incorporação, pela transcriptase reversa, da timidina ao DNA viral. Em 1995, a lamivudina (3TC) também foi aprovada pelo FDA; ela atua inibindo a replicação do HIV e há relatos de sua atividade contra o vírus da hepatite B (36).

Em 1994, os resultados do Protocolo 076 do *Pediatric Aids Clinical Trial Group* (PACTG 076) demonstraram redução de 67,5% na TV com o uso de AZT

durante a gestação, no trabalho de parto e no parto propriamente dito. Os RNs que foram alimentados exclusivamente por fórmula infantil (64; 66).

Desde 1995, no Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o uso profilático de AZT, a partir da 14^a semana de gestação, durante o parto e no RN por seis semanas (64; 70). Dados de 1998 e de 2002 mostraram que 19,5% e 33%, respectivamente, das gestantes HIV positivas receberam AZT de acordo com o protocolo (71). Após estas medidas, a taxa de transmissão vertical do HIV nas gestantes soropositivas, que estava entre 13 e 20% em 1999 (72), caiu para 3,7% em 2002 (73).

A monoterapia com AZT foi logo seguida pela associação de drogas (terapia dupla) com os novos ITRN. Os inibidores da protease deram novas perspectivas ao tratamento, pois ofereceram uma resposta terapêutica prolongada, maior recuperação do número de linfócitos CD4⁺ e redução significativa da carga viral. Com a introdução dos ITRNN, iniciou-se a terapia tripla, formada por dois ITRN e um IP ou dois ITRN e um ITRNN. Esta última estratégia aumentou a expectativa de vida de crianças de adultos (74).

No Brasil, a TARV combinada é recomendada pelo MS às gestantes que preenchem critérios para início de tratamento, visando controlar sua infecção (TARV - tratamento) e/ou a redução da transmissão vertical do HIV (profilaxia com TARV), para gestantes assintomáticas com dano imunológico discreto ou ausente (linfócitos CD4⁺ \geq 350 células/mm³). É recomendado o tratamento com TARV em gestantes sintomáticas ou assintomáticas, independente da idade gestacional (70).

Toda gestante infectada pelo HIV deverá receber terapia ou profilaxia antirretroviral potente, independente de sua situação imunológica ou virológica (70).

Em gestantes impossibilitadas de usar o AZT, pode-se substituí-lo pela didanosina entérica (ddl EC) ou estavudina (d4T) combinados com a lamivudina. Foi relatada acidose láctica fatal em gestantes que receberam a associação ddl/d4T. Sendo assim, esta deve ser excluída dos esquemas (70).

Esquemas com IP devem ser combinados com ritonavir como adjuvante farmacológico. O Lopinavir (LPV/r) é o IP de escolha para terapia inicial, pois é um potente supressor viral e pode ser usado com segurança na gestação (70).

Parturientes devem receber AZT por via intravenosa durante todo o trabalho de parto, e no parto. Para o RN é recomendado utilizar o AZT ainda na sala de parto, ou nas primeiras duas horas de nascimento e durante seis semanas.

Implicações da exposição do feto ao ambiente uterino infectado pelo HIV

Durante a gestação, as crianças expostas, mas não infectadas pelo vírus HIV, entram em contato com proteínas do vírus HIV. Ao nascer, as células T CD4⁺ desta criança exposta e não infectada, são capazes de proliferar *in vitro* quando estimuladas com antígenos do HIV-1 (75).

O estudo de Clerici et al. (65) demonstrou uma frequência alta de células CD4⁺ HIV-específicas e uma frequência baixa de células CD8⁺ HIV-específicas, indicando difusão transplacentária de proteínas solúveis do HIV. É sabido que tanto as partículas, como as proteínas HIV, podem inibir a função da célula progenitora, conduzindo esta a apoptose, causando anormalidades hematológicas e imunológicas nos RNs (Nielsen et al., 2001). Além disso, a produção desequilibrada de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL10) em gestantes infectadas pelo HIV, de certa maneira, desregulam as citocinas do feto resultando em deficiência imune (75,76).

Outro fator que contribui para estas deficiências é o tratamento da gestante e do RN com AZT, que é potencialmente mielosupressor (71; 77 -79). Sua toxicidade é caracterizada pela presença de anemia macrocítica, leucopenia e neutropenia (79, 80). Os efeitos biológicos desta droga sugerem tanto alterações no estroma medular, como também uma ação sobre as células tronco hematopoiéticas. Tem sido demonstrado tanto em modelo celular animal, como em RNs expostos ao HIV, a interação do AZT com o DNA nuclear (76).

Na transmissão vertical do HIV, a hipergamaglobulinemia policlonal geralmente ocorre antes das alterações da imunidade celular (diminuição de CD4⁺). A deficiência humoral é mais importante em crianças do que em adultos, caracterizada pela ausência de resposta secundária a antígenos comuns, por

exemplo, as bactérias. Sendo assim, crianças infectadas pelo HIV apresentam apenas resposta primária tipo IgM. A resposta secundária e específica, caracterizada pela mudança de IgM para IgG, nestas crianças é deficitária, isto leva a freqüentes e graves infecções bacterianas (27; 67; 81).

A disfunção humoral pode estar relacionada à diminuição dos linfócitos T CD4⁺, o que impede que a síntese de imunoglobulinas por parte das células B, contra aloantígenos e antígenos solúveis (65; 75). Em crianças saudáveis, a maturação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas ocorrem em resposta as citocinas da imunidade específica (linfocinas) que são produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ da criança. As linfocinas maternas que atravessam a barreira placentária desempenham papel importante neste processo. Dessa maneira a imunodeficiência materna poderia prejudicar a maturação normal dos linfócitos B neonatais (27; 65; 75). No entanto, a relação entre todos estes fatores não é bem conhecida.

Tendo em vista todos estes dados, supõe-se que o RN filho de mãe HIV⁺, mesmo que sororeversor, tenha uma deficiência (numérica ou funcional) dos linfócitos B devido à exposição ao perfil anormal de citocinas maternas. É possível que, a exemplo do que já foi descrito para os linfócitos T (65) esta deficiência persista por um tempo razoável, comprometendo todo o programa de vacinação habitual, e propiciando o aparecimento de infecções neste RN.

Estudos sobre crianças expostas sem infecção concentram-se no seu crescimento e desenvolvimento (82 - 84), alterações hematológicas (66; 76), proporção de linfócitos e sub-populações T (82; 85, 86), além da concentração de imunoglobulinas (82; 87). Eles têm mostrado uma tendência das crianças expostas ao HIV e não infectadas, a apresentarem uma resposta humoral melhor ao toxóide diftérico quando comparadas a crianças infectadas, na faixa etária entre dois e quatro anos. Já a resposta humoral à vacina de hepatite B após três doses, foi significativamente menor nos bebês infectados pelo HIV do que em crianças expostas, mas não infectadas (88). Não há dados comparativos destas crianças com crianças saudáveis, ou seja, não expostas e não infectadas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a vacinação dos RNS expostos ao HIV (89). Deve-se considerar que, na análise da resposta humoral e celular à imunização destas crianças, a transferência materna de IgG anti-HIV em altas concentrações, o não aleitamento materno, uso profilático de drogas mielotóxicas como o AZT, as baixas condições de vida das famílias, associados à imaturidade do sistema imune próprio da criança, interferem na resposta imune durante o primeiro ano de vida. Deste modo, é necessário separar os fatores internos da criança ao nascer, dos externos durante o seu primeiro ano de vida, para uma análise da resposta imune antígeno-específico.

Objetivos e Hipóteses

OBJETIVOS

- **Gerais:** avaliar a maturação das células B em sangue de cordão umbilical dos RNs expostos ao HIV, filhos de mulheres que usaram ARV na gestação.
- **Específicos:**
 - ✓ Comparar os linfócitos T e B do cordão umbilical de RNs expostos ao HIV e à TARV com os não expostos;
 - ✓ Analisar o perfil de citocinas maternas e dos RNs e sua associação com a proporção de células T e a maturação das células B.
 - ✓ Estudar a associação do ARV, tabagismo e drogas ilícitas utilizadas pelas mães HIV⁺ durante a gestação sobre as subpopulações de linfócitos dos seus RNs.

HIPÓTESES

- O padrão de maturação das células B em RNs expostos ao HIV durante a gestação apresenta anormalidades quando comparado a RNs não expostos;
- O padrão de interleucinas produzido durante a gestação pelas mães infectadas pelo HIV podem interferir na linfopoiese B dos RNs;
- O uso de drogas ilícitas e o tabagismo durante a gestação podem estar associados a alterações imunes nos RNs.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

O estudo foi observacional, analítico, prospectivo do tipo corte transversal, conduzido entre maio de 2006 a novembro de 2007, analisou-se 51 díades compostas de 36 gestantes infectadas pelo HIV e 15 gestantes não infectadas (controles saudáveis) e seus RNs, que cumpriram plenamente os critérios para inclusão nesse estudo. Todas as gestantes HIV⁺ foram acompanhadas pelo Serviço de Obstetrícia do Centro de Assistência Integral a Saúde da Mulher (CAISM/UNICAMP), estavam utilizando ARV e mantinham carga viral baixa ou indetectável. As gestantes do grupo controle também foram selecionadas no serviço de pré-natal do CAISM para mulheres com baixo risco gestacional.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, fez-se a inclusão no estudo, colheram-se as amostras de sangue periférico das gestantes HIV⁺ e do grupo controle, que estavam entre a 32^a e a 35^a semana de gestação. Na ocasião do parto, foi colhido o sangue do cordão umbilical.

Critérios de inclusão das gestantes HIV positivas:

- Maiores de 18 anos;
- Recém-nascido a termo sem intercorrências no parto;
- Aceitação da mãe em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

- Mães diabéticas, hipertensas, obesas, portadoras de doença autoimune ou co-infecções;
- Recém-nascido portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave;
- Não concordância materna com os termos da pesquisa.

Critérios de inclusão do grupo controle:

- Gestantes hípidas, maiores de 18 anos;
- Recém-nascido a termo sem intercorrências no parto;
- Aceitação da mãe em participar do estudo.

Critérios de exclusão grupo controle:

- Mães diabéticas, hipertensas, obesas, portadoras de doença autoimune ou infecções;
- Idade gestacional acima da 36^a semana;
- Recém-nascido portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave;
- Não concordância materna com os termos da pesquisa.

Coleta das amostras de sangue

A coleta do sangue de cordão umbilical (SCU) foi efetuada imediatamente após a dequitação da placenta (ex-útero) e os exames realizados em até 24 horas. No Centro Obstétrico do CAISM, o cordão foi devidamente limpo com solução anti-séptica. Em seguida, procedeu-se a coleta da veia umbilical com seringa e agulhas descartáveis e o sangue foi colocado em tubos estéreis, sendo dois heparinizados, para cultura de células do SCU e um com EDTA, para a citometria de fluxo e obtenção dos dados hematológicos dos RNs, na quantidade mínima de 15 mL e máxima de 20 mL.

O sangue periférico das mães HIV⁺ e do grupo controle normal foi coletado em tubos estéreis contendo os mesmos anticoagulantes para cultura de células e dados hematológicos, na mesma quantidade supra citado entre a 32^a e a 35^a semana de gestação.

Análises laboratoriais

Dados hematimétricos materno e dos RNs

Os índices de células de todas as amostras, sangue periférico materno e do cordão umbilical, foram determinados eletronicamente através do contador hematológico Advia 120 (Bayer, Dublin – Ireland), no Laboratório de Hematologia do HEMOCENTRO/UNICAMP.

Eletroforese de hemoglobinas do sangue de cordão umbilical

Obteve-se o padrão eletroforético em acetato de celulose (pH 8,6) para checar contaminação do material coletado com o sangue materno. Foi utilizado o método rápido de lise dos eritrócitos dos RNs com uma solução de Saponina a 0,5%. Em seguida os hemolisados foram submetidos a eletroforese de hemoglobinas que permitiu identificar a presença marcante da Hemoglobina Fetal.

Marcação dos linfócitos B e T em sangue de cordão umbilical

A imunofenotipagem foi realizada pela técnica de marcação direta, com um painel de 3 ou 4 cores diretamente conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila de peridina (PerCP) e alofocianina (APC). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente.

Para o estudo da maturação das células B e quantificação dos subtipos das células B e T foram utilizadas as seguintes combinações de anticorpos (Figura 4):

Marcadores	Fluorocromos	Clones	Fabricantes
CD45	FITC	T29/33	Dako
CD34	PE	8G12	Becton Dickinson
CD19	PE-Cy5	HD37	Dako
CD22	APC	S-HCL-1	Becton Dickinson
CD79a	PE	2ST8.5H7	Pharmingen
IgM	FITC	G20-127	Pharmingen
CD10	APC	MEM-78	Caltag
CD5/CD19	FITC/PE	L17F12,SJ25C1	Becton Dickinson
CD45	PE-Cy5	T29/33	Dako
CD4/CD8/CD3	FITC/PE/PE-Cy5	MT310, DK25,UCHT1	Dako
Combinações de anticorpos monoclonais			
1 ^a) CD45FITC/CD34PE/CD19 PE-Cy5/CD22APC			
2 ^a) cIgMFITC / cCD79a PE /CD19 PE-Cy5 /CD10 APC			
3 ^a) sIgM FITC /CD34 PE /CD19 PE-Cy5 /CD10 APC			
4 ^a) CD5 FITC /CD19 PE /CD45 PerCP			
5 ^a) CD4 FITC /CD8 PE /CD3 PE-Cy5			

Figura 4. Anticorpos monoclonais para a imunofenotipagem do SCU e combinações utilizadas no estudo.

O estudo da maturação nos três primeiros tubos foi realizado dentro da população de célula B CD19⁺ com baixo SSC, este foi o marcador pan-B de escolha por causa de sua expressão heterogênea. Na primeira combinação, pretendeu-se através da expressão de CD34⁺ identificar as células B imaturas, enquanto que, pela a expressão heterogênea dos CD22 e CD45, que aumentam durante a maturação, seria possível identificar as células B maduras.

Com a segunda combinação, utilizando o CD79a intracelular, pretendeu-se identificar as células B no início da sua maturação (pró-B), o estágio intermediário ou de transição (*early B-cell*) seria identificado pela expressão de CD10 que tende a diminuir na fase seguinte (pré-B), caracterizada pela presença da cadeia μ intracitoplasmática, que nesta combinação seria identificada pela expressão de IgM pós permeabilização (90).

A escolha da terceira combinação foi realizada com a finalidade de identificar a população imatura CD34⁺ e IgM de superfície negativa, aqui novamente o CD10 permitiria identificar as células B de transição e as maduras caracterizadas pela presença da IgM de superfície (5; 7, 8).

Na ontogenia das células B a expressão de CD5, um antígeno marcador de linfócitos T, pode ser identificado nos linfócitos B de fetos e RNs, já mencionado, na fase pré-B da maturação (9). Porém, neste estudo a escolha deste marcador teve como objetivo avaliar sua expressão em sangue de cordão umbilical de RNs que durante a gestação tiveram seu sistema imunológico constantemente desafiado ou estimulado pela exposição ao HIV.

A marcação de superfície foi realizada lavando-se o SCU com meio de cultura RPMI 1680 e diluindo a uma concentração de 5×10^6 de leucócitos. Incubou-se 100 μ L desse material com 10 μ L de anticorpo conjugado com fluorocromo por 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, lisou-se as hemácias com solução lisante por 10 minutos e centrifugou-se 5 minutos a 1500 RPM. Lavou-se duas vezes com tampão PBS e ressuspendeu-se em 1 mL do mesmo.

A imunofenotipagem foi realizada no citômetro FACS *Calibur* (*Beckton Dickinson*) no laboratório de marcadores celulares do HEMOCENTRO/UNICAMP.

Adquiriu-se 50.000 células. Para análise e quantificação utilizou-se o programa *Paint-a-Gate*.

A identificação das células B foi realizada através da *gate* CD19 positiva com SSC baixo (Figura 5).

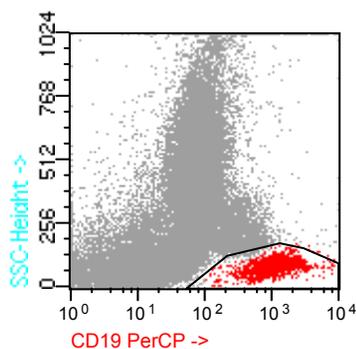


Figura 5. Estratégia de localização das células CD19⁺ no plot SSC/CD19 (SCU do grupo controle).

As combinações CD45/CD34/CD19/CD22; cIgM/cCD79a/CD19/CD10, sIgM/CD34/CD19/CD10 utilizadas neste estudo, permitiram dividir a população de células B de acordo com o seu grau de maturação em três grupos: madura, intermediária e imatura (Figuras 6 - 8). Estas 3 subpopulações foram analisadas a partir da *gate* de células CD19⁺ totais.

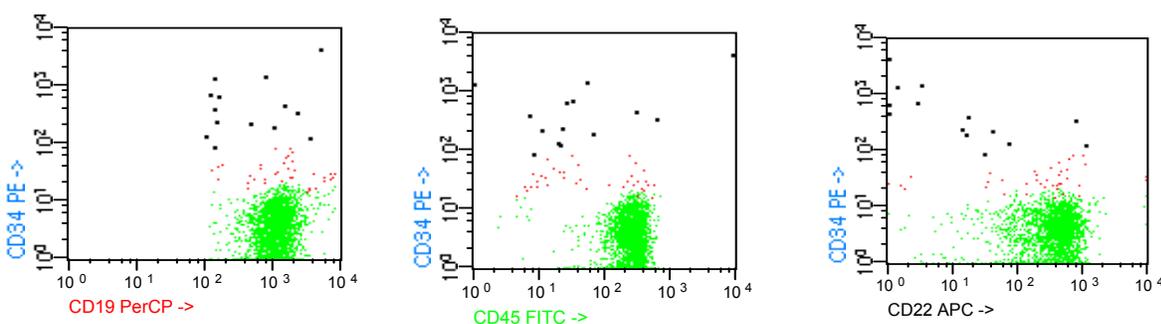


Figura 6. Maturação das células B CD19⁺ em SCU do grupo controle, na combinação CD45/CD34/CD19/CD22. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas

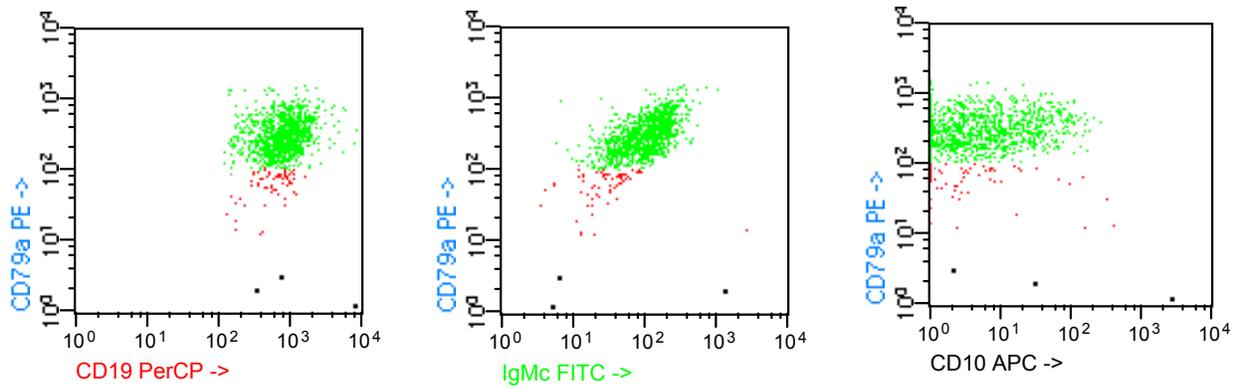


Figura 7. Maturação das células B CD19⁺ em SCU do grupo controle, na combinação clgM/ cCD79a /CD19/CD10. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas.

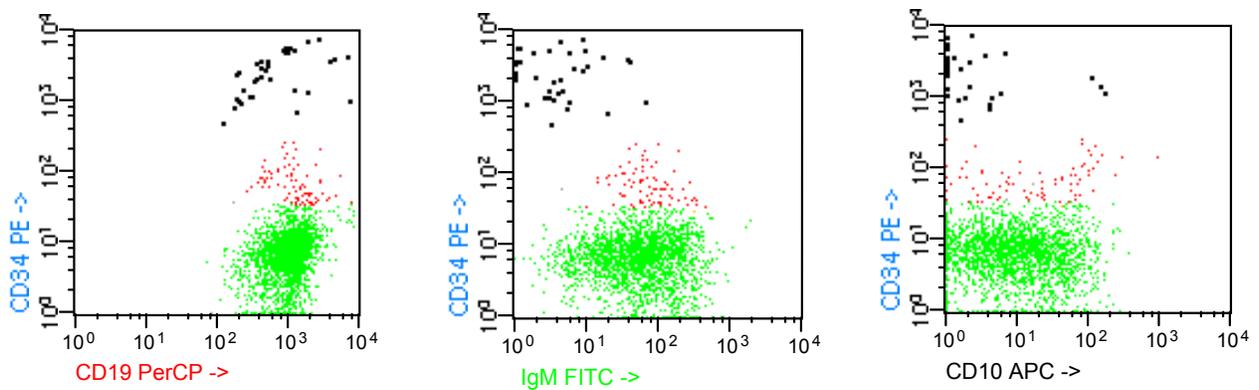


Figura 8. Maturação das células B CD19⁺ em SCU do grupo controle, na combinação slgM/CD34/CD19/CD10. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas.

Na combinação CD5/CD19/CD45 foi realizada a análise da população de células B CD19⁺/CD5⁺ utilizando o número absoluto e o percentual (Figura 9).

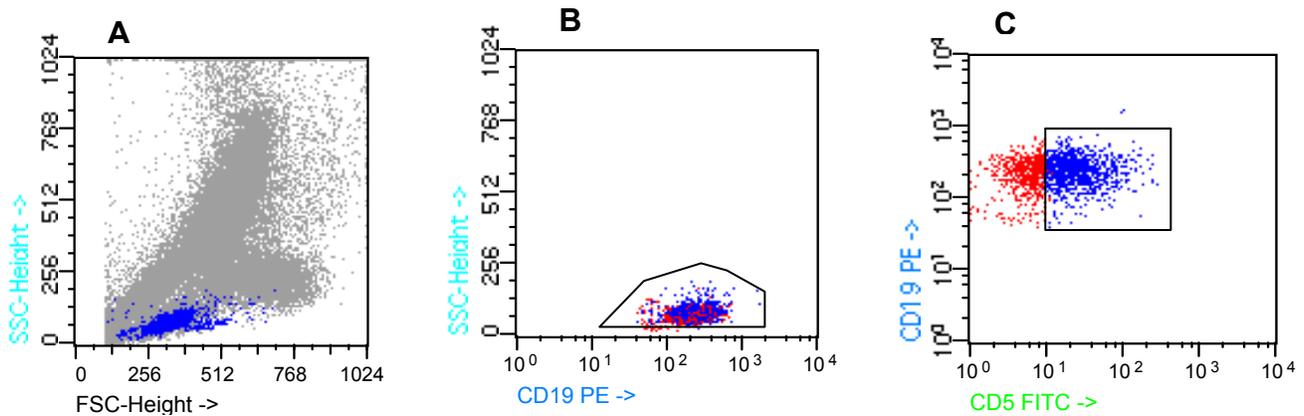


Figura 9. População de células B CD19⁺/CD5⁺ em SCU do grupo controle. **A:** plot SSC/FSC; **B:** plot CD19/SSC; **C:** plot de células CD19⁺/CD5⁺ (Azul).

A população de células T foi analisada observando-se também o número absoluto e percentual para as subpopulações CD3/CD8 (Figura 10B) e CD3/CD4 (Figura 10C).

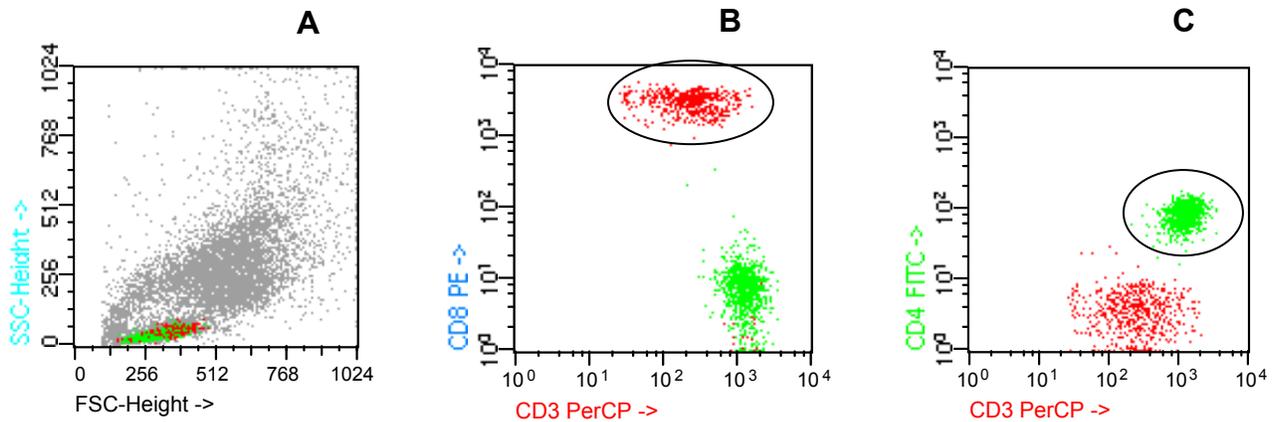


Figura 10. População de células T em SCU do grupo controle. **A:** plot SSC/FSC; **B:** subpopulação CD3/CD8 e **C:** subpopulação CD3/CD4.

Ensaio de proliferação em cultura do sangue periférico materno e do SCU

Para o ensaio de proliferação foram necessários 4,5 mL de SCU (filhos de mães HIV⁺ e filhos de mães HIV⁻) e do sangue periférico materno (mães HIV⁺ e mães HIV⁻). Seguiu-se o protocolo modificado de Hoft *et al.* (91) por Mazzola *et al* (92):

- A fitohemaglutinina (PHA), concentração de 7,5 µg/mL (Sigma, EUA), foi o controle positivo (Figura 11: A) e o meio RPMI 1640, acrescido de glutamina, gentamicina e 10% de soro AB humano ativado foi o controle negativo (Figura 11: B); o antígeno estudado foi o BCG (Instituto Butantan, SP), 5X10⁵ UFC/mL (Figura 11: C);
- Células mononucleadas do sangue periférico e do cordão umbilical foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de RPMI completo (Sigma, EUA) na concentração de 1X10⁶ células/mL;
- As células foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços fundo arredondado (Nunc, Dinamarca) em incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante 48 horas (produção de citocinas) e 5 dias (proliferação linfocitária), conforme figura 11.

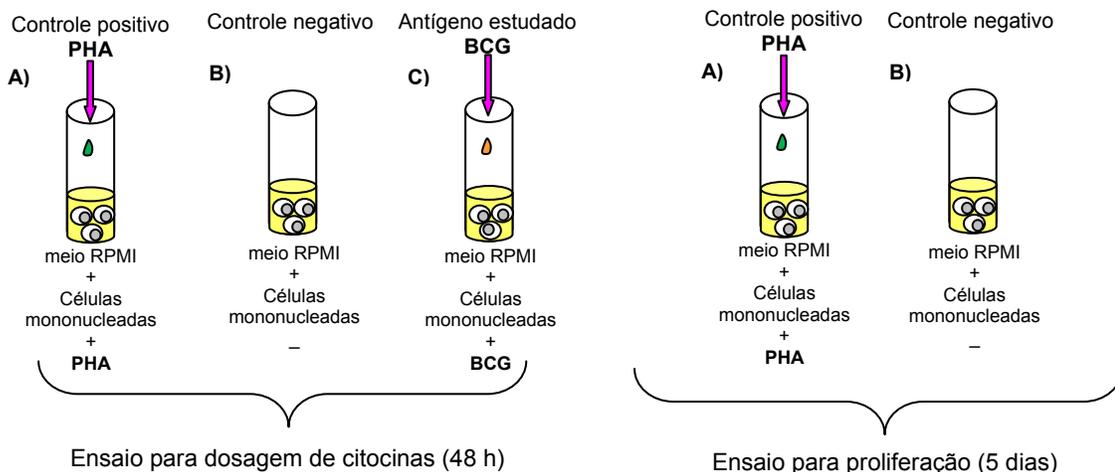


Figura 11. Esquema das condições do ensaio de proliferação em cultura. A) cultura estimulada com PHA; B) cultura sem estímulo; C) cultura estimulada com BCG.

Marcação linfócitos T da cultura do SCU

Foi realizada a marcação dos linfócitos T obtidos da cultura com PHA (7,5 µg/mL, Sigma, EUA) de acordo os seguintes procedimentos:

- Incubação das células coletadas com 50µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20mM por 15 minutos, para desfazer possíveis agregados celulares;
- Em seguida, as células foram lavadas com tampão (PBS), acrescida de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma, EUA) e 0,1% de azida sódica, centrifugou-se a 2200rpm à temperatura ambiente;
- Ressuspendeu-se as células em PBS e incubou-se por 5 minutos com 20µL de Imunoglobulina Humana para bloquear os sítios Fc;
- A marcação foi feita com anticorpos CD3/CD4/CD8 (Beckman Coulter, EUA);
- Para análise desse material, utilizou-se o citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA), no laboratório de imunopediatria CIPED/UNICAMP;
- A leitura das amostras foi realizada com aquisição de 30.000 a 50.000 eventos;
- Os resultados foram armazenados em arquivos FCS II e analisados com o auxílio do programa computacional *EXPO* (EUA). Após estabelecer a *gate* de células CD3⁺, linfócitos em repouso e ativados (blásticos) foram identificados por observação do FSC e SSC (Figura 12).

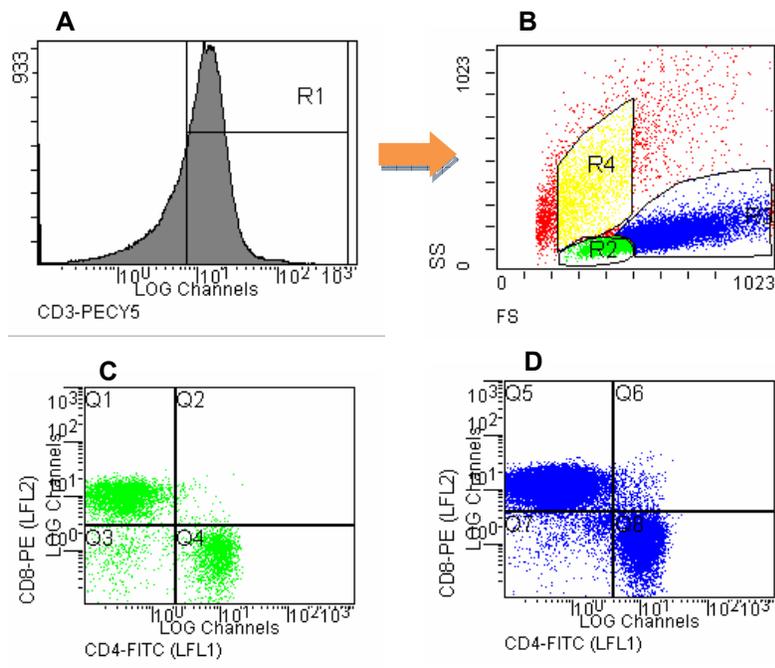


Figura12. Representação da análise de proliferação. A) histograma das células CD3⁺ (R1); B) distribuição por FS x SS das células CD3⁺: linfócitos pequenos (R2), blastos (R3) e células não viáveis (R4); C) linfócitos pequenos; D) blastos.

- A proliferação linfocitária foi medida pelo percentual de células blásticas CD3⁺. O percentual foi calculado por:

Percentual de células na gate de blastos x 100

Percentual de blastos + Percentual de linfócitos pequenos

Blastos de PHA = percentual de blastos de PHA - percentual de blastos do controle

Dosagem de citocinas maternas e dos RNs

Foram realizadas através dos ensaios de ELISA, de acordo com as especificações do fabricante (Duo Set, R & D Systems, EUA), em amostras obtidas dos sobrenadantes da cultura que foram congelados e armazenados a -80° C, até o momento de análise. Foram dosadas as concentrações de IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , em amostras não estimuladas e estimuladas com PHA e BCG.

Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM e pelo Comitê de Ética em Pesquisa FCM/UNICAMP.

Foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido, que continha a descrição geral do estudo, seus objetivos, procedimentos, riscos e benefícios aos participantes, bem como o nome dos responsáveis pelo projeto. Realizou-se leitura e discussão em conjunto, ou seja, entre o executor do projeto e a mãe do RN, na confirmação da participação o termo foi assinado por ambos em duas vias, uma das quais foi entregue à mãe.

A criança participante desta pesquisa representada por seu responsável legal teve direito a privacidade e toda informação obtida em relação a este estudo permaneceu confidencial nos âmbitos possíveis da lei, assegurando proteção de sua imagem, sigilo e respeitando valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação fosse exigida por ação legal regulatória, todos os esforços foram feitos para protegê-lo de ser identificado pessoalmente. Como condição de sua participação nesta pesquisa, o responsável pela criança participante permitiu acesso aos dados obtidos aos pesquisadores envolvidos neste estudo e aos membros da Comissão de ética pela análise do projeto. Os resultados deste estudo puderam ser apresentados em congressos ou em publicações, porém, a identidade da criança não foi divulgada nessas apresentações. Ao participar, o responsável pela criança concordou em cooperar com os procedimentos que executados e descritos neste estudo, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo. Sua participação neste estudo foi voluntária podendo recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico Winstat versão 3.1. Utilizaram-se os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Spearman (nível de significância, $p < 0,05$). Para verificar a influência das variáveis obtidas sobre a maturação das células B, fez-se um teste de regressão linear múltipla, utilizando-

se as variáveis que apresentaram diferença significativa ou correlação na análise univariada.

A estabilidade do modelo foi testada por *Bootstrap Resampling*, que consiste na criação de novos conjuntos de dados de tamanho igual por amostragem aleatória dos dados originais e substituição. Em cada amostra nova, o paciente pode ser representado uma vez ou várias vezes. Um novo modelo de regressão linear (nas mesmas condições que as realizadas no conjunto de dados original) foi calculado para cada um desses conjuntos de dados novos. Este procedimento é capaz de testar a estabilidade de um modelo matemático, detecta as variáveis mais importantes e, além disso, permite calcular intervalos de confiança (93,94).

Resultados

RESULTADOS

Dados maternos

As características clínicas das gestantes que participaram deste estudo estão demonstrados na tabela 1. Das gestantes saudáveis que fizeram parte do grupo controle, apenas uma era tabagista. Entre as portadoras do HIV a maioria era tabagista e/ou consumiram drogas ilícitas (maconha, cocaína e *crack*) durante a gestação. Não houve diferença de idade materna ($p=11$), mas houve diferença significativa ($p<0,05$) no tempo de gestação entre os dois grupos.

Tabela 1. Características epidemiológicas das gestantes (mediana e variação)

	Gestantes HIV ⁻ n=15	Gestantes HIV ⁺ n=36
Idade materna (anos)	29 (18 – 41)	32 (20 – 39)
Semanas de gestação no parto	39,7 (36 – 42)	38,2 (36 – 42)
Tabagistas	1	5
Usuárias de drogas	0	3
Tabagistas e usuárias de drogas	0	6
Não tabagistas nem usuárias de drogas	14	22
Dias de uso de antirretroviral	-	154 (49 – 273)
Carga viral detectável cópias/mL*	-	1371 (496 – 36586)

* 7 gestantes com carga viral detectável. Teste de Mann-Whitney

As portadoras do HIV tiveram seus filhos por cesárias entre a 36^a e 42^a semana de gestação. No grupo controle foram realizados 11 partos normais e 4 cesarianos, e todas estas mulheres entraram em trabalho de parto. Não houve diferença significativa entre a idade gestacional ao parto nos dois grupos.

Das 36 gestantes HIV⁺, apenas 7 tinham carga viral detectável (tabela 1). O tempo médio de tratamento com o ARV foi de 5 meses. Oito mães já usavam ARV quando engravidaram.

Quanto aos dados hematológicos (tabela 2), as gestantes HIV⁺ apresentaram VCM (volume corpuscular médio) elevado e número de leucócitos e neutrófilos menor em comparação às gestantes controles. O valor da hemoglobina, porém foi similar ao grupo controle (Figura 13:C).

Tabela 2. Características hematológicas das gestantes com 35 semanas.

	Gestantes HIV ⁻ n=15	Gestantes HIV ⁺ n=36	Valor de p
Células vermelhas (M/ μ L)	3,9 (3,7 – 4,7)	3,3 (2,5 – 4,7)	<0,005
HB (g/dL)	11,7 (9,6 – 13,9)	10,7 (9,0 – 13,7)	0,09
VCM (fL)	88 (72 - 94)	104 (75 - 118)	<0,005
Leucócitos (K/ μ L)	8,2 (3,2 – 12,2)	7,2 (3,0 – 15,0)	0,04
Neutrófilos totais (K/ μ L)	5,7 (2,3 – 8,8)	4,86 (2,2 – 10,9)	0,07
Linfócitos totais (K/ μ L)	1,8 (0,6 – 2,7)	1,6 (0,5 – 4,8)	0,94
CD4 ⁺ (células/mm ³)	n.d.	511 (57 – 1189)	
CD8 ⁺ (células/mm ³)	n.d.	676 (321 – 1979)	
Relação CD4/CD8	n.d.	0,73 (0,06 – 1,97)	
Plaquetas (K/ μ L)	200 (102 – 392)	217 (99 - 360)	0,96

Teste de Mann-Whitney

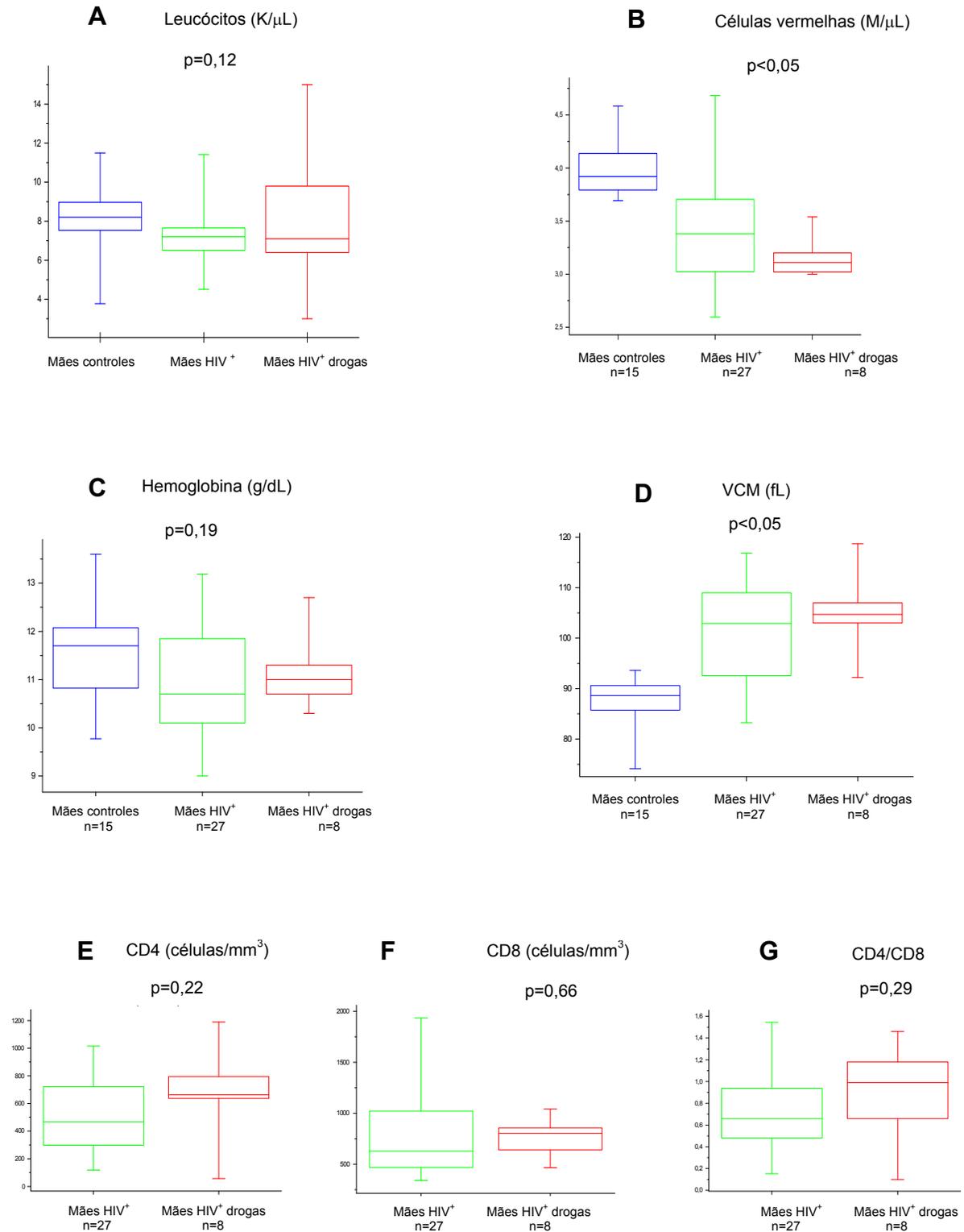


Figura 13. Representação gráfica dos dados hematológicos maternos ao separar as mães portadoras do HIV em usuárias e não usuárias de drogas. (testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney)

Ao separar as mulheres HIV⁺ em tabagistas, não tabagistas e usuárias de drogas pode-se perceber que a proporção de linfócitos CD4⁺ (Figura 13:E) e CD8⁺ (Figura 13:F) foi semelhante em todas.

Dados dos recém-nascidos

Houve diferença entre os RNs expostos e não expostos ao HIV com relação ao peso e ao capurro (Figura 14:A e B) , que estavam diminuídos nos RNs de mães HIV⁺ (tabela 3). Do mesmo modo que nas mães, os RNs expostos também tiveram hemoglobina menor e VCM maior que os normais (Figura 14: D e E). O número de plaquetas foi semelhante nos 2 grupos.

Tabela 3: Dados do nascimento e do hemograma dos recém-nascidos.

	RNs não expostos n=15	RNs expostos n=36	Valor de p
Peso (gramas)	3100 (2988 - 3915)	2962 (1885 - 3885)	<0,005
Tamanho (cm)	48 (40 - 53)	48 (33 - 53)	0,87
Capurro (dias)	278 (256 - 294)	267 (255 - 293)	<0,005
Células vermelhas (M/ μ L)	4,6 (4,1 – 5,0)	3,5 (2,7 – 4,7)	<0,005
HB (g/dL)	15,7 (13,2 – 18,0)	13,7 (9,1 – 16,4)	<0,005
VCM (fL)	104 (99 - 124)	117 (88 - 150)	<0,005
Leucócitos (K/ μ L)	11,1 (4,4 – 19,5)	9,1 (4,0 – 22,0)	0,08
Neutrófilos totais (K/ μ L)	4,2 (0,8 – 9,4)	3,5 (1,0 – 8,8)	0,32
Linfócitos totais (K/ μ L)	5,7 (3,0 - 9,1)	5.1 (1,5 – 10,5)	0,16
Plaquetas (K/ μ L)	202 (119 - 328)	242 (103 - 455)	0,12

Teste de Mann- Whitney

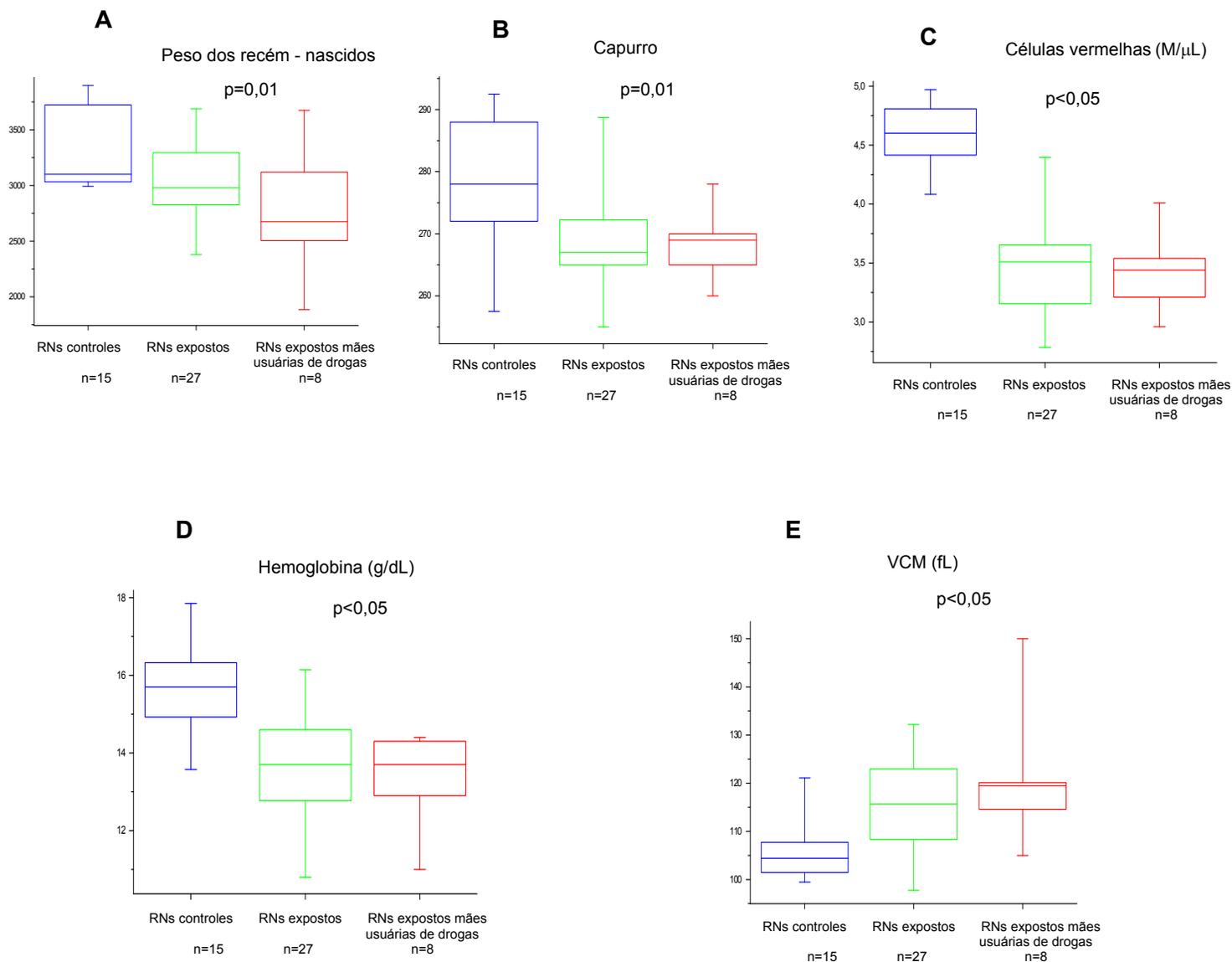


Figura 14. Representação gráfica dos dados dos recém-nascidos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas.(teste de Kruskal-Wallis)

Esta diferença no peso dos RNs expostos esteve associada a duração do tratamento com TARV durante a gravidez e a produção de TNF- α detectada no sobrenadante da cultura de células mononucleares do sangue periférico materno (veja TNF- α materno: tabela 10, figura33: B).

No teste de regressão múltipla obteve-se a seguinte fórmula:

$$\text{Peso} = 3327 - 1,48 \times \text{dias de ARV} - 5 \times \text{TNF-}\alpha \text{ sem estímulo}$$

$$p = 0,006, R^2 = 0,216 \text{ (IC 95\% : } 0,215 - 0,383\text{)}$$

A idade materna, o tabagismo, as semanas de gestação e o sexo dos RNs não fizeram parte deste modelo. Este resultado foi confirmado por *bootstrap resampling*: “dias de tratamento com TARV” apareceu em 77% e “TNF- α materno não estimulado na 35^a semana de gestação” esteve presente em 70% dos novos conjuntos de dados.

Nos RNs expostos ao HIV, a percentagem de linfócitos CD3⁺ estava aumentada quando comparada aos RNs não expostos devido ao número maior de linfócitos CD3/CD8 (tabela 4 e figura 15).

Tabela 4: Dados das subpopulações linfocitárias T e B determinadas em no sangue de cordão umbilical.

	RNs não expostos n=15	RNs expostos n=36	Valor de p
% CD3 ⁺	18,3 (13,8 – 32,3)	24,8 (12,0 – 41,5)	0,03
% CD3 ⁺ /CD4 ⁺	12,6 (8,9 – 23,3)	17,2 (3,0 – 28,2)	0,32
% CD3 ⁺ /CD8 ⁺	4,6 (1,8 – 10,7)	6,4 (2,3 – 15,5)	0,002
Relação CD4/CD8	3,5 (1,6 – 8,3)	2,3 (0,2 – 6,5)	0,04
% CD19 ⁺	3,6 (2,0 – 5,9)	5,7 (1,7 – 16,2)	0,01
% CD19 ⁺ /CD5 ⁺ *	59,5 (42,8 – 91,1)	75,8 (47,7 – 97,0)	0,006

*entre todas as células CD19⁺. Teste de Mann-Whitney

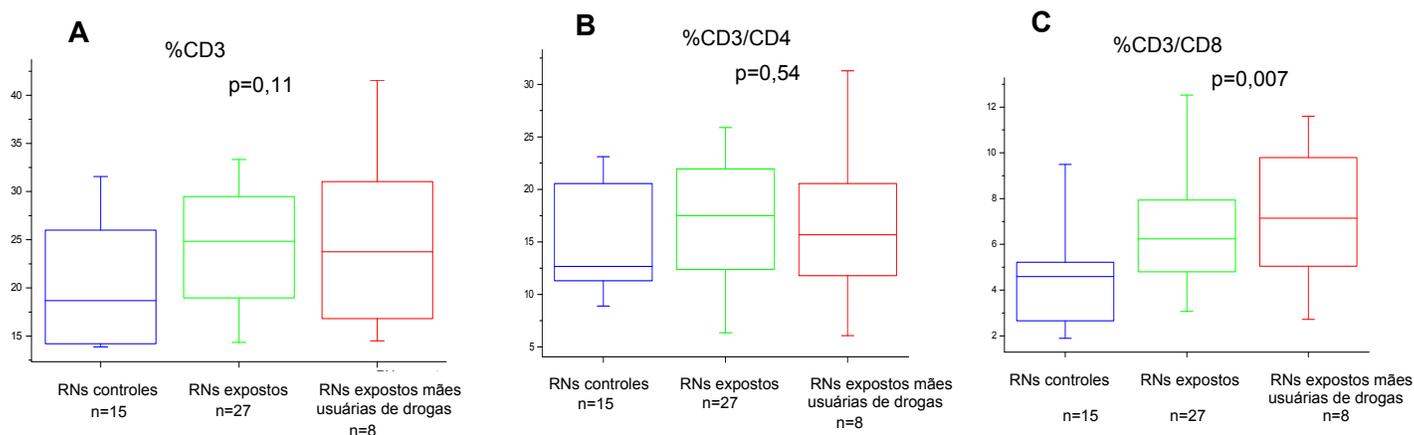


Figura 15. Representação gráfica dos dados dos recém-nascidos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas.(teste de Kruskal-Wallis)

A associação do tabagismo e o uso de drogas ilícitas ao número de linfócitos T no SCU foi analisada pelo teste de regressão múltipla. O número de linfócitos T CD4⁺ (Figura 16:B) foi menor nos filhos de mães mais velhas e fumantes. A porcentagem de células T CD4⁺ pode ser calculada pela fórmula:

$$\% \text{ célula T CD4}^+ = -0,428 \times \text{idade materna (anos)} - 4,1 (T) + 30,52;$$

T= 1 para tabagista e 0 para mães não tabagistas

$$R^2 = 0,242 \text{ (IC 95\%: 16,6 - 51,1)}$$

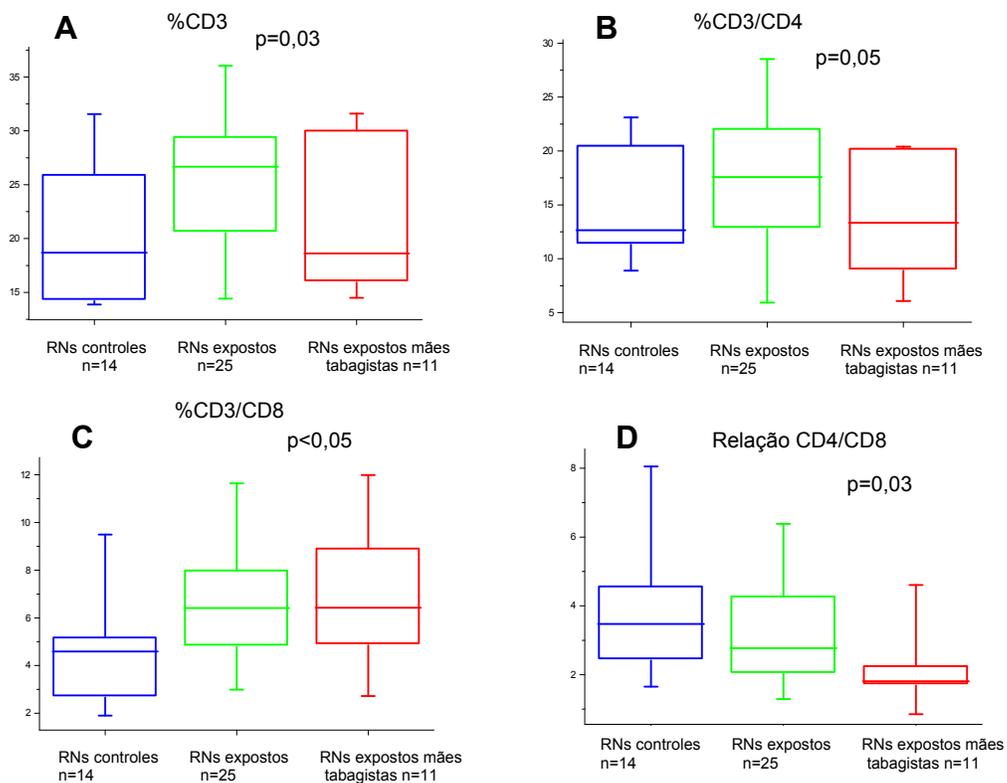


Figura 16. Representação gráfica da subpopulação T dos RNs com a subdivisão dos expostos em filhos de mães HIV⁺ tabagistas e não tabagistas. (teste de Kruskal-Wallis)

O uso de drogas, o tempo de gestação e a duração do tratamento materno com TARV não entraram neste modelo. Para as células T CD8⁺ nenhum modelo pode ser obtido.

A estabilidade do modelo para as células CD4⁺ foi confirmada por *bootstrap resampling*. Nos 100 modelos novos, a idade materna entrou em 77% e o tabagismo em 72%.

A quantificação das células CD3, CD4 e CD8 foi realizada nas culturas de SCU de 22 RNs expostos ao HIV e 10 não expostos. Estes resultados estão na tabela 5. Não houve diferença entre os grupos de RNs quanto a frequência de proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺ não estimuladas.

Tabela 5: Dados do ensaio de proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺ sem estímulo e estimuladas com PHA.

Estímulo	Células T	Mediana de células T (%)		Valor de p
		RNs não expostos n=10	RNs expostos n=22	
Sem estímulo	CD4 ⁺	91,7 (0,0 - 97,2)	71,9 (0,6 - 99,0)	0,255
	CD8 ⁺	2,6 (1,0 - 86,9)	15,3 (0,0 - 89,0)	0,080
PHA	CD4 ⁺	88,6 (3,4 - 97,2)	86,3 (1,7 - 98,3)	0,807
	CD8 ⁺	6,2 (1,4 - 79,5)	7,6 (0,3 - 92,7)	1,00

Teste de Mann-Wilhtney

A porcentagem de blastos (linfócitos com potencial de proliferação) na cultura estimulada com PHA apresentou mediana de 40,3% (1,5-71,6) para o grupo exposto e de 54,2% (11,7-74,8) para os não expostos. A frequência de células CD4 e CD8 que proliferaram com PHA não foi diferente entre os grupos.

Análise dos linfócitos B no sangue de cordão umbilical

O número de linfócitos CD19⁺ estava elevado nos RNs expostos ao HIV, devido ao aumento das células com fenótipo CD19⁺/CD5⁺ (Figura 17:B e 18). Nos RNs expostos, filhos de mães usuárias de drogas (Figura 17:A e 18), o aumento do número total de linfócitos B foi ainda maior (tabela 6).

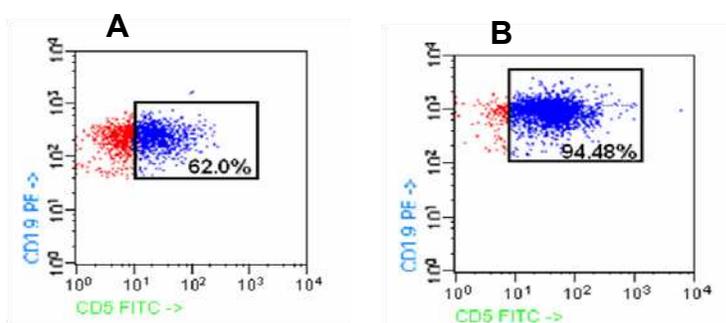


Figura 17. Representação gráfica da análise da subpopulação de células B CD19⁺/CD5⁺ realizada em SCU, comparação entre os 2 grupos de RNs. Vermelho: CD19⁺/CD5⁻; Azul: CD19⁺/CD5⁺; A) RNs não expostos e B) RNs expostos.

Tabela 6. Análise das subpopulações de células B CD5⁺ em sangue de cordão umbilical ao separar os RNs expostos em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas.

	RNs não expostos n=15	RNs expostos n=27	RNs expostos mães usuárias	Valor de p
% CD19 ⁺	3,6	5,2	7,0	0,01
% CD19 ⁺ /CD5 ⁺ *	59,4	77,8	67,6	0,007

* porcentagem no total de células CD19⁺. Teste de Kruskal- Wallis

O período de tratamento com ARV durante a gestação não demonstrou nenhuma correlação com o número total de células B ou com as células CD19⁺/CD5⁺.

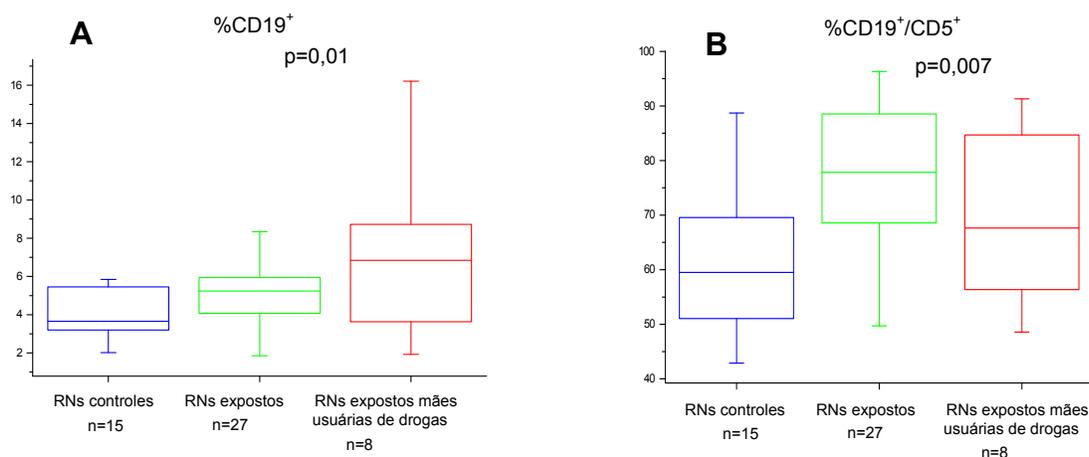


Figura 18. Representação gráfica da subpopulação B CD19⁺/CD5⁺ dos RNs com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

Análise da maturação dos linfócitos B no sangue de cordão umbilical

Na combinação CD45/CD34/CD19/CD22, notou-se que os RNs expostos de mães usuárias de drogas apresentaram diminuição significativa da células maduras e aumento significativo das células intermediárias e imatura (tabela 7 e figuras 19 e 20).

Tabela 7. Estudo da maturação no SCU na combinação CD45/CD34/CD19/CD22, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas.

	% células B maduras *	% células B intermediárias *	% células B imaturas *
RNs não expostos n= 15	96,7 (91 - 99)	2,62 (0,24 – 6,8)	0,73 (0,2 – 3,13)
RNs expostos n=27	96,7 (91,6 – 98,4)	2,94 (1,5 – 8,2)	0,42 (0,07 – 1,22)
RNs expostos mães usuárias de drogas n=8	86,3 (79 – 90)	13,0 (8,8 – 19,4)	1,1 (0,78 – 1,4)
Valor de p	0,02	0,01	0,01

* porcentagem no total de células CD19⁺. Teste de Kruskal-Wallis

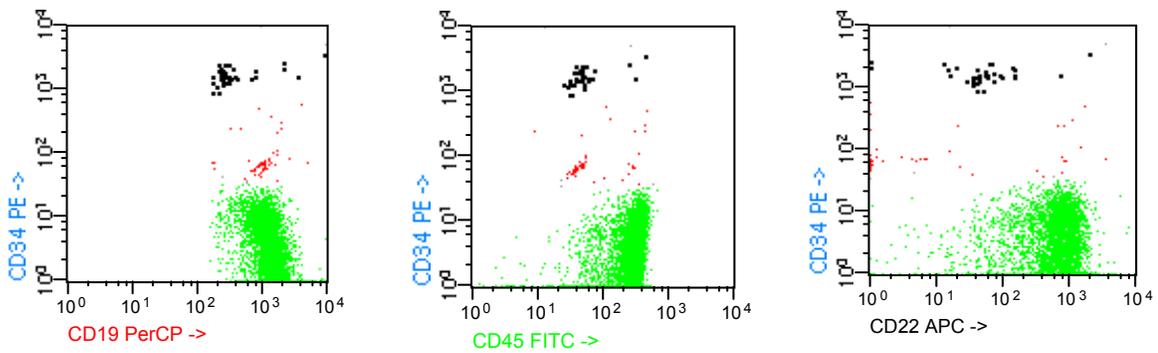


Figura 19. Maturação das células B CD19⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação CD45/CD34/CD19/CD22. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas

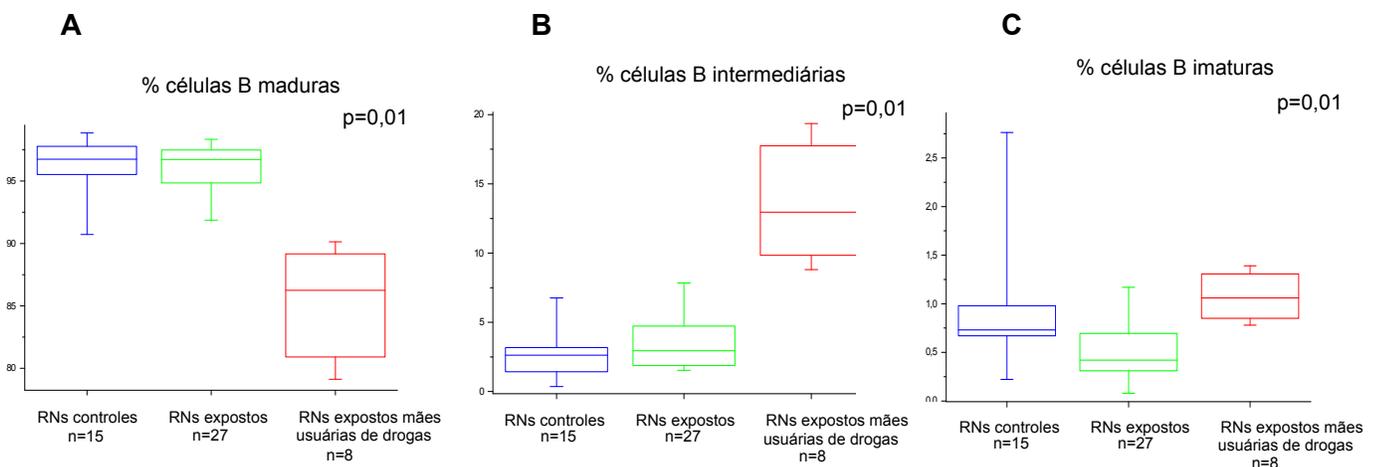


Figura 20. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19⁺ através da combinação CD45/CD34/CD19/CD22, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

Já a combinação cIgM/cCD79a /CD19/CD10 permitiu detectar apenas o aumento significativo das células intermediárias nos RNs expostos de mães usuárias de drogas (tabela 8 e figuras 21 e 22).

Tabela 8: Estudo da maturação de linfócitos B no SCU na combinação cIgM/cCD79a/CD19/CD10, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas.

	% células B maduras *	% células B intermediárias *	% células B imaturas *
RNs não expostos n=15	95,2 (88,1 - 98,9)	3,0 (0,9 – 10,5)	0,5 (0,10 – 2,2)
RNs expostos n=27	93,8 (83,0 – 97,2)	5,4 (1,3 – 16,6)	0,4 (0,06 – 2,1)
RNs expostos mães usuárias de drogas n=8	89,5 (85,7 – 97,1)	10,4 (2,6 – 13,7)	0,2 (0,07 – 0,5)
Valor de p	0,16	0,05	0,33

porcentagem no total de células CD19⁺. Teste de Kruskal-Wallis

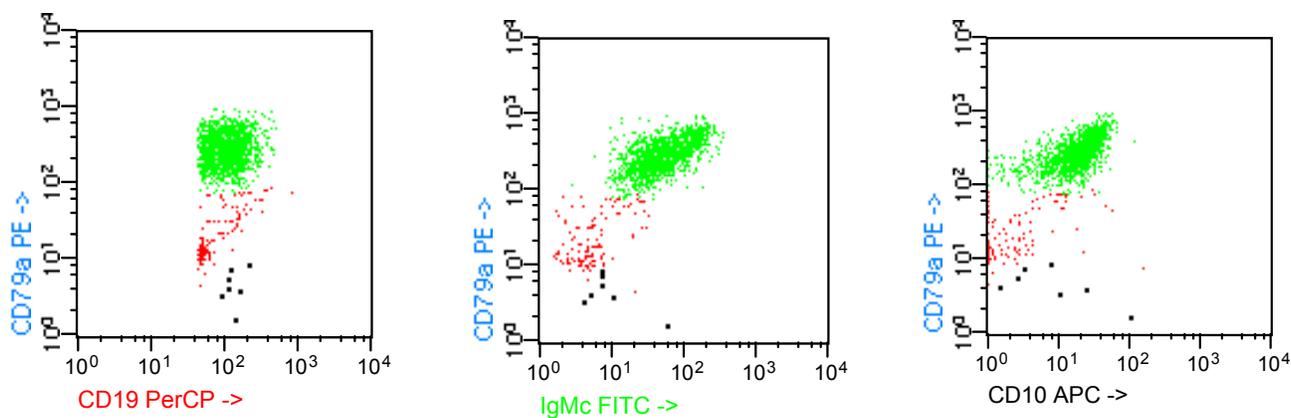


Figura 21. Maturação das células B CD19⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação cCD79a/cIgM /CD19/CD10. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas

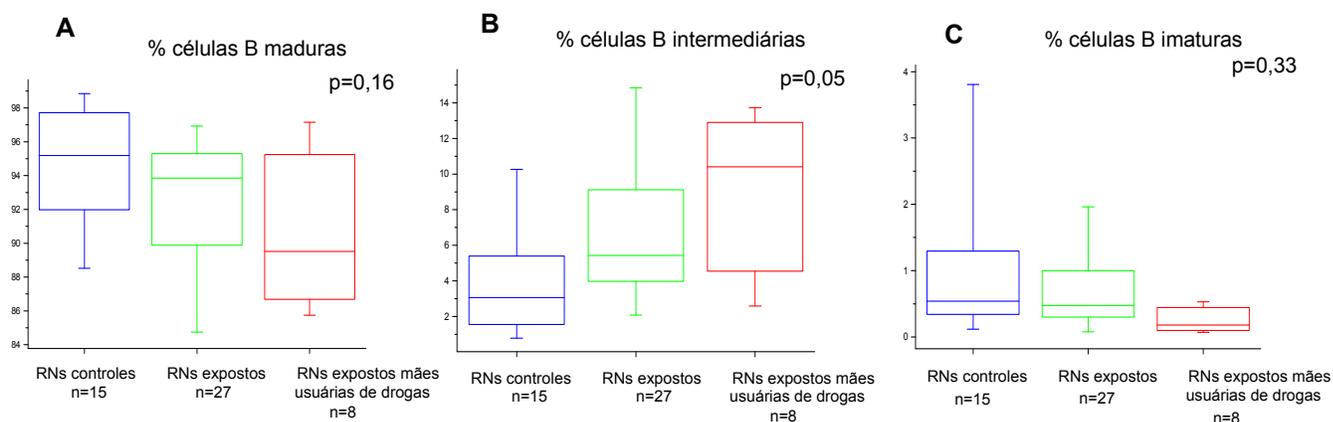


Figura 22. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19⁺ através da combinação clgM/cCD79a/CD19/CD10, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

Com a combinação slgM/CD34/CD19/CD10 foi observado a diminuição significativa das células maduras e o aumento das células intermediárias ($p=0,05$) nos RNs expostos de mães usuárias de drogas (tabela 9 e figuras 23 e 24).

Tabela 9: Estudo da maturação de linfócitos B no SCU na combinação slgM/CD34/CD19/CD10, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas.

	% células B maduras *	% células B intermediárias *	% células B imaturas *
RNs não expostos n=15	97,1 (91,3 – 98,9)	2,4 (0,87 – 7,1)	0,4 (0,10 – 2,2)
RNs expostos n=27	97,3 (94,6 – 99,3)	2,2 (0,6 – 4,5)	0,2 (0,05 – 0,95)
RNs expostos mães usuárias de drogas n=8	92,5 (92,0 – 95,0)	6,5 (2,1 – 7,1)	1,5 (0,4 – 2,7)
Valor de p	0,05	0,13	0,05

* porcentagem no total de células CD19⁺. Teste de Kruskal-Wallis

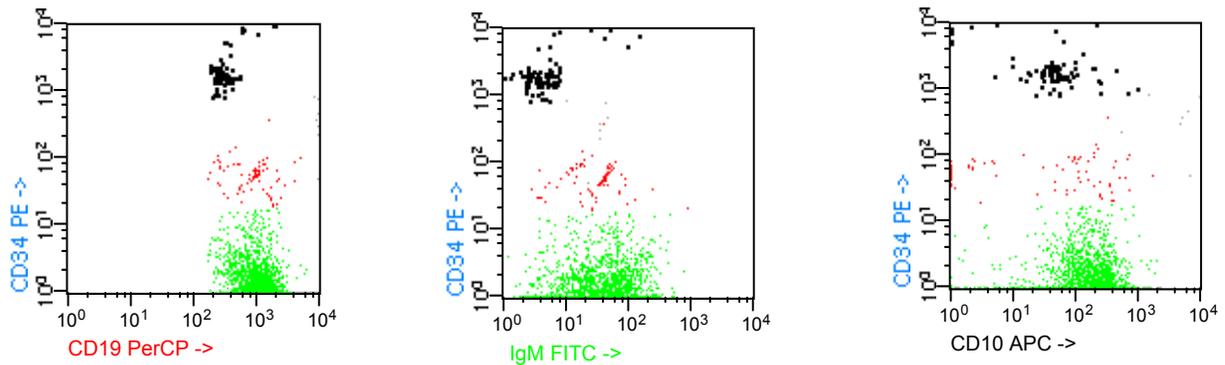


Figura 23. Maturação das células B CD19⁺ em SCU de RNs expostos ao HIV, na combinação sIgM/CD34/CD19/CD10. **Verde:** maduras; **Vermelho:** intermediárias; **Preto:** imaturas.

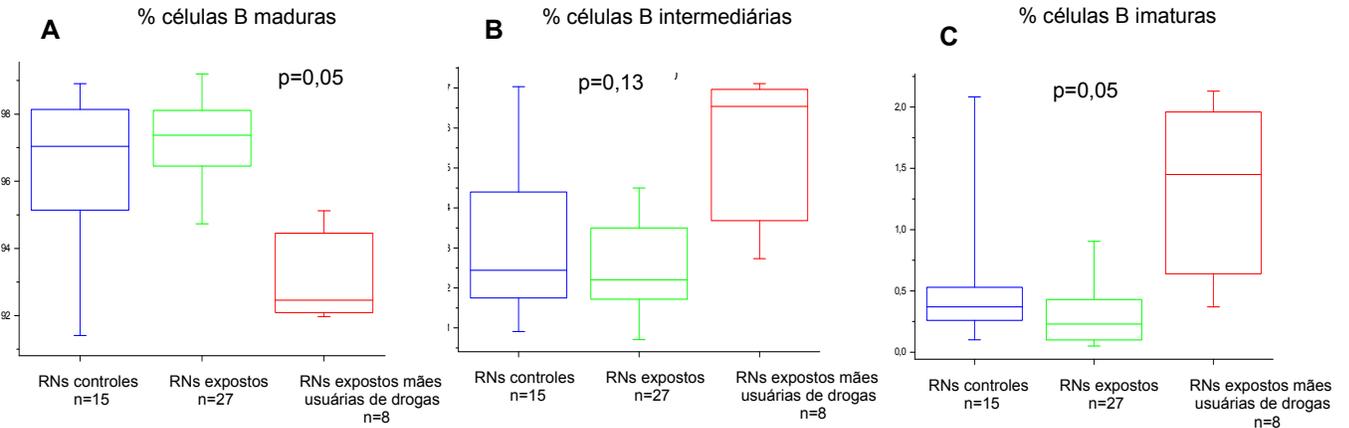


Figura 24. Representação gráfica da análise de maturação das células B CD19⁺ através da combinação sIgM/CD34/CD19/CD10, com a subdivisão do grupo dos RNs expostos ao HIV⁺ em filhos de mães usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

Assim, a combinação CD45/CD34/CD19/CD22 foi a que melhor permitiu observar o aumento dos precursores de células B intermediárias e imaturas nos RNs expostos ao HIV de mães usuárias de drogas abuso (tabela 7 e figura 19).

No teste de regressão múltipla a proporção de células B imaturas esteve associada ao tempo de exposição ao ARV e pelo uso drogas durante a gestação. O tabagismo materno não esteve associado a maturação das células B. A proporção de células B imaturas/intermediárias (IMAT) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células B IMAT SCU} = 0,02 \times \text{dias de ARV} + B + 0,72;$$

$$R^2 = 0,859 \text{ (IC} - 0,653 - 0,943)$$

Sendo B = 12,0 para usuárias de drogas de abuso e B = 0 para as outras mães.

A estabilidade deste modelo de regressão foi testada por *bootstrap resampling*, onde ambas variáveis ficaram 98% dentro dos novos conjuntos de dados.

Dosagem de citocinas maternas e nos recém-nascidos

Os valores de citocinas no sobrenadante das culturas de células mononucleares do SP não estimuladas e após estímulos com BCG e PHA, das mães com 35 semanas de gestação (tabela 10), apresentaram uma alta correlação com os valores das citocinas detectadas nos SCU de seus RNs (tabela 11) nas mesmas condições de cultura, exceto os valores do IFN- γ e TNF- α .

Tabela 10: Níveis de citocinas sem estímulo e após estímulo com BCG e PHA no sobrenadante da cultura de células mononucleares das gestantes na 35ª semana.

	Gestantes HIV ⁻ n=15	Gestantes HIV ⁺ n=36	Valor de p
IL-4 sem estímulo	41,0 (38 - 278)	22,2 (9,2 - 76)	<0,005
BCG	39,1 (37 - 216)	22,8 (9,5 - 76)	<0,005
PHA	52,0 (39 - 146)	30,14 (14 - 419)	<0,005
IL-7 sem estímulo	67,0 (0 - 88)	0,0 (0 - 90)	0,05
BCG	66,0 (0 - 89)	0,0 (0 - 86)	0,04
PHA	66,0 (0 - 85)	0,0 (0 - 87)	0,03
IL-10 sem estímulo	0,0 (0 - 490)	17 (0 - 18015)	0,14
BCG	736 (0 - 4910)	764 (0 - 43384)	0,49
PHA	498 (0 - 2925)	405 (0 - 58344)	0,56
IFN- γ sem estímulo	0,0 (0 - 94)	13,2 (0 - 131)	0,73
BCG	2,73 (0 - 1343)	29,2 (0 - 999)	0,42
PHA	110,2 (0 - 2528)	308,9 (0 - 5143)	0,16
TNF- α sem estímulo	245,4 (0 - 4826)	526,8 (0 - 7928)	<0.005
BCG	5374,0 (0 - 13852)	2072,7 (86 - 34130)	0,83
PHA	827,6 (261 - 20889)	1513,3 (244 - 14448)	0,22

Teste de Mann-Whitney

Tabela 11: Níveis de citocinas sem estímulo e após estímulo com BCG e PHA no sobrenadante da cultura de células do SCU.

	RNs não expostos n=15	RNs expostos n=36	Valor de p
IL-4 sem estímulo	39,2 (39 - 76)	25,5 (10 - 76)	<0,005
BCG	39,4 (40 - 76)	25,6 (9 - 76)	<0,005
PHA	39,2 (39 - 78)	26,7 (9,5 - 76)	<0,005
IL-7 sem estímulo	66,0 (0 - 87)	0,0 (0 - 87)	0,13
BCG	66,4 (0 - 87)	1,5 (0 - 93)	0,24
PHA	66,5 (0 - 87)	0,0 (0,0 - 88)	0,11
IL-10 sem estímulo	0,0 (0 - 88)	3,5 (0 - 1028)	0,13
BCG	199 (0 - 1522)	582 (0 - 7049)	0,06
PHA	224 (0 - 1934)	410 (0 - 36093)	0,19
IFN- γ sem estímulo	0,0 (0 - 66)	17,5 (0 - 194)	0,01
BCG	0,0 (0 - 1188)	19,4 (0 - 550)	0,02
PHA	24,3 (0 - 2445)	73,2 (0 - 2928)	0,28
TNF- α sem estímulo	136,4 (0 - 500)	181,6 (0 - 3381)	0,66
BCG	1458,1 (138 - 7026)	1069,0 (283 - 14724)	0,96
PHA	535,0 (298 - 5672)	658,4 (0 - 6313)	0,63

Teste de Mann-Whitney

Os níveis de IL-2, IL-10 e IL-12 foram semelhantes tanto em mães infectadas como nas não infectadas. O mesmo ocorreu com os valores obtidos para os RNs. A IL-4 e a IL-7 das mães HIV⁺ (Figuras 25-27) foram mais baixas assim como de seus filhos (Figuras 28-30).

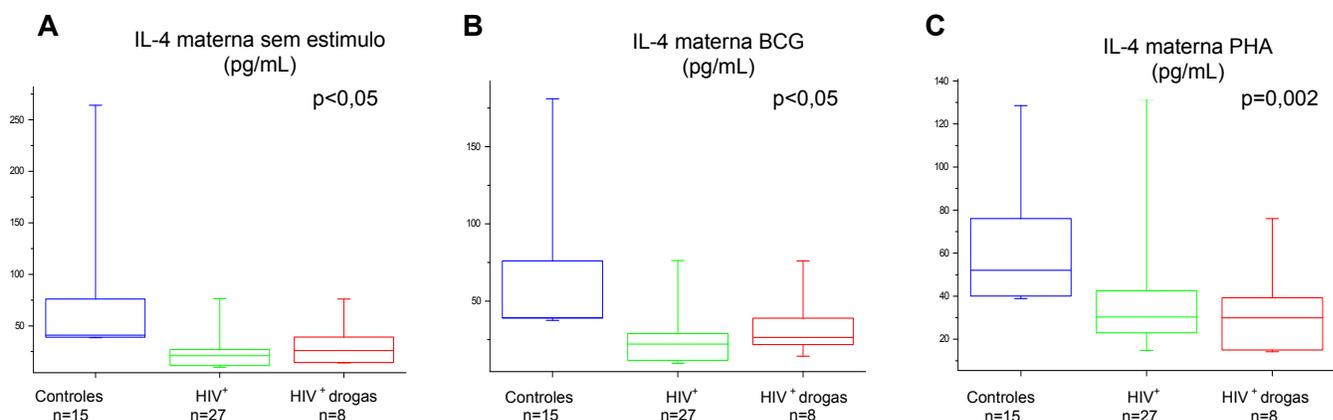


Figura 25. Representação gráfica da produção diminuída de IL-4 nas mães HIV⁺ com a subdivisão do grupo das mães HIV⁺ em usuárias e não usuárias de drogas.(teste de Kruskal-Wallis)

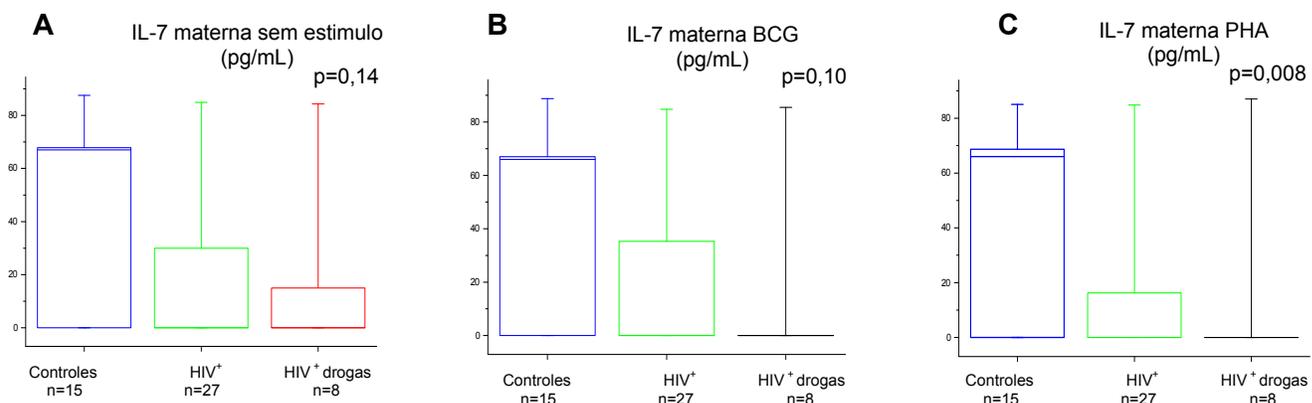


Figura 26. Representação gráfica da produção diminuída de IL-7 nas mães HIV⁺ com a subdivisão do grupo das mães HIV⁺ em usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

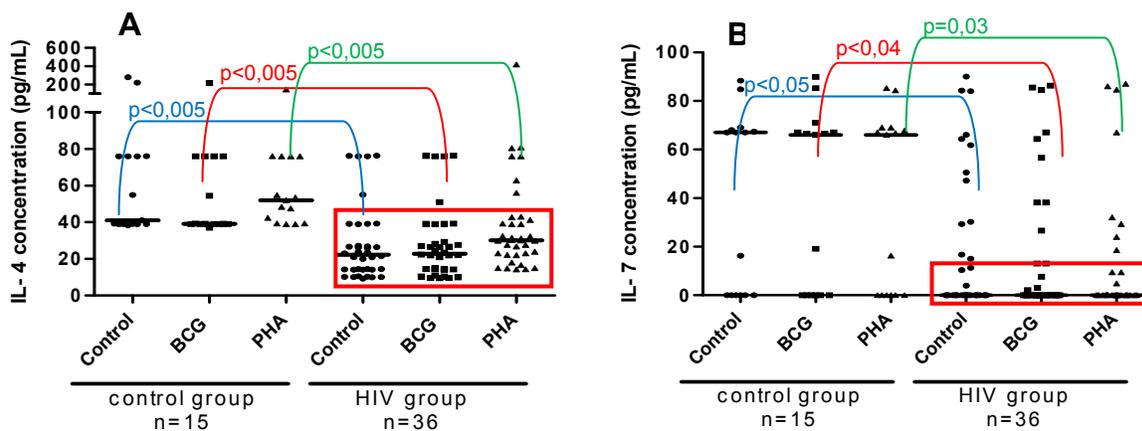


Figura 27. Concentrações de IL-4 (A) e IL-7 (B) determinadas por ELISA no sobrenadante de células mononucleares das gestantes sem estímulo (control: ●), estimulada com BCG (BCG:■) e com fitohemaglutinina (PHA: ▲) para gestantes HIV⁻ e HIV⁺. As barras indicam as medianas e o n= número de indivíduos. (teste de Mann-Whitney)

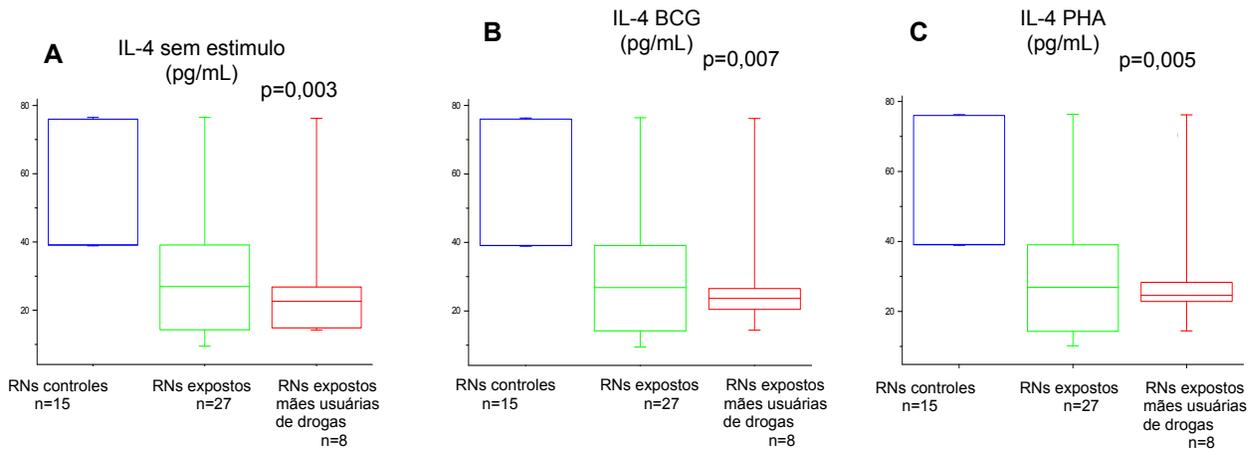


Figura 28. Representação gráfica da produção diminuída de IL-4 nos RNs expostos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

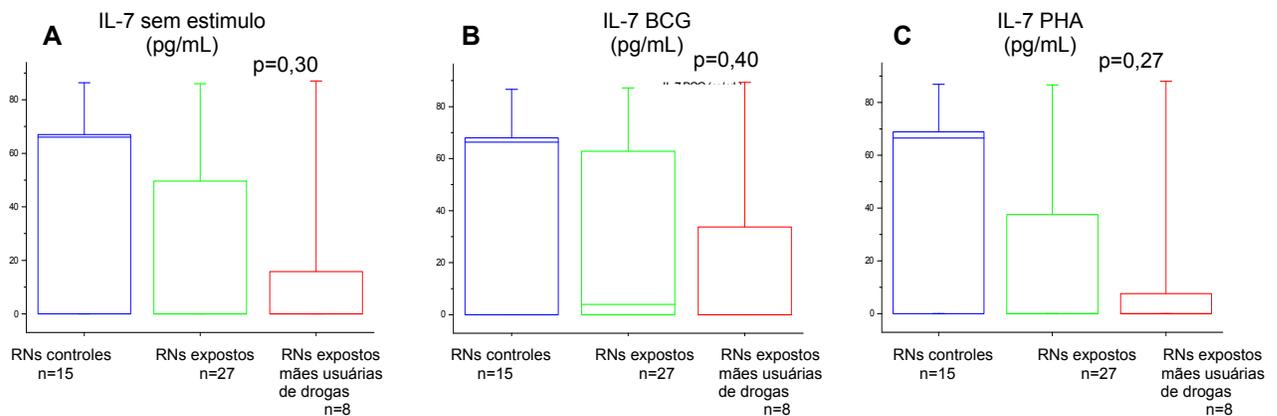


Figura 29. Representação gráfica da produção da IL-7 nos RNs expostos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

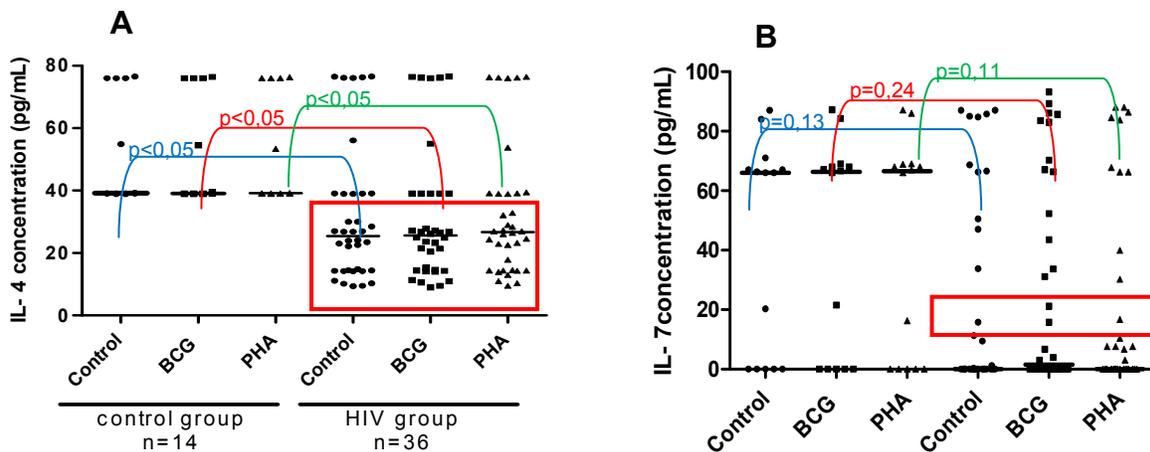


Figura 30. Concentrações de IL-4 (A) e IL-7 (B) determinadas por ELISA no sobrenadante de células mononucleares do SCU sem estímulo (control: ●), estimulada com BCG (BCG: ■) e com fitohemaglutinina (PHA: ▲) para os RNs não expostos e expostos ao HIV. As barras indicam as medianas e o n= número de indivíduos. (teste de Mann-Whitney)

O IFN- γ das mães HIV⁺ apresentou aumento não significativo em relação ao controle materno (Figuras 31 e 33: A), porém, nos RNs expostos o nível de IFN- γ sem estímulo e frente ao BCG estava significativamente elevados quando comparado aos RNs controles (Figuras 34 e 36: A). Com relação ao TNF- α , as mães HIV⁺ apresentaram nível elevado, especialmente as usuárias de drogas ($p=0,01$) (Figuras 35 e 36: B). Contudo, este evento não foi observado no SCU (Figuras 32 e 33:B). Não houve correlação entre o tempo de tratamento materno com ARV e as citocinas do SCU.

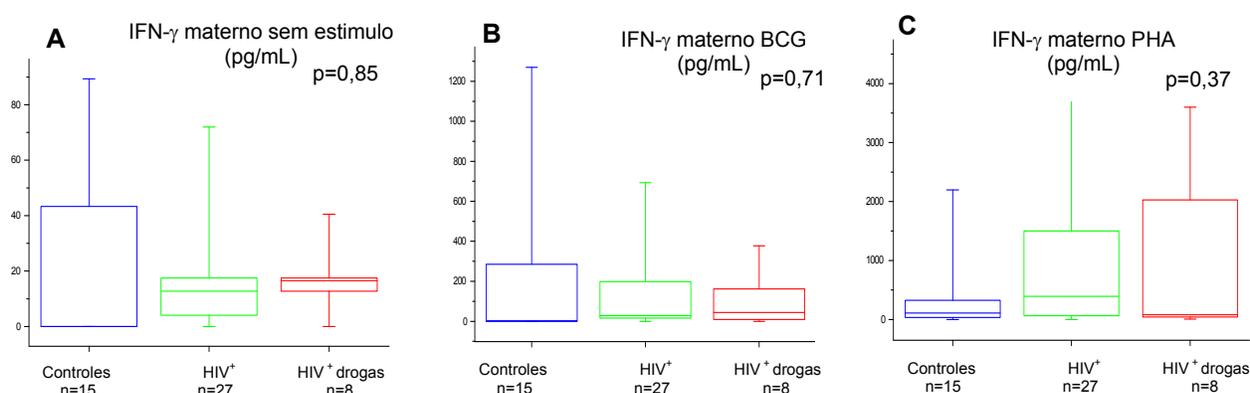


Figura 31. Representação gráfica da produção de IFN- γ materno com a subdivisão do grupo das mães HIV⁺ em usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

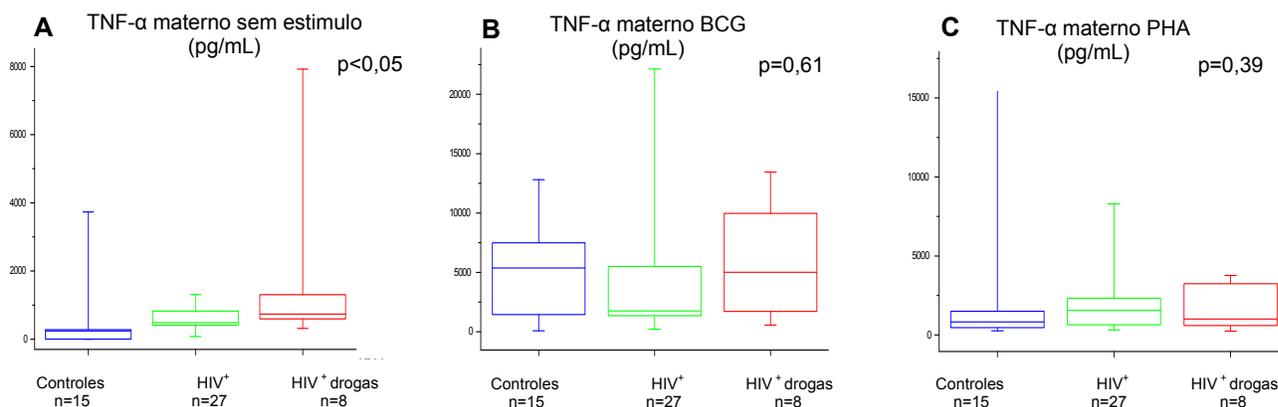


Figura 32. Representação gráfica da produção de TNF- α materno com a subdivisão do grupo das mães HIV⁺ em usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

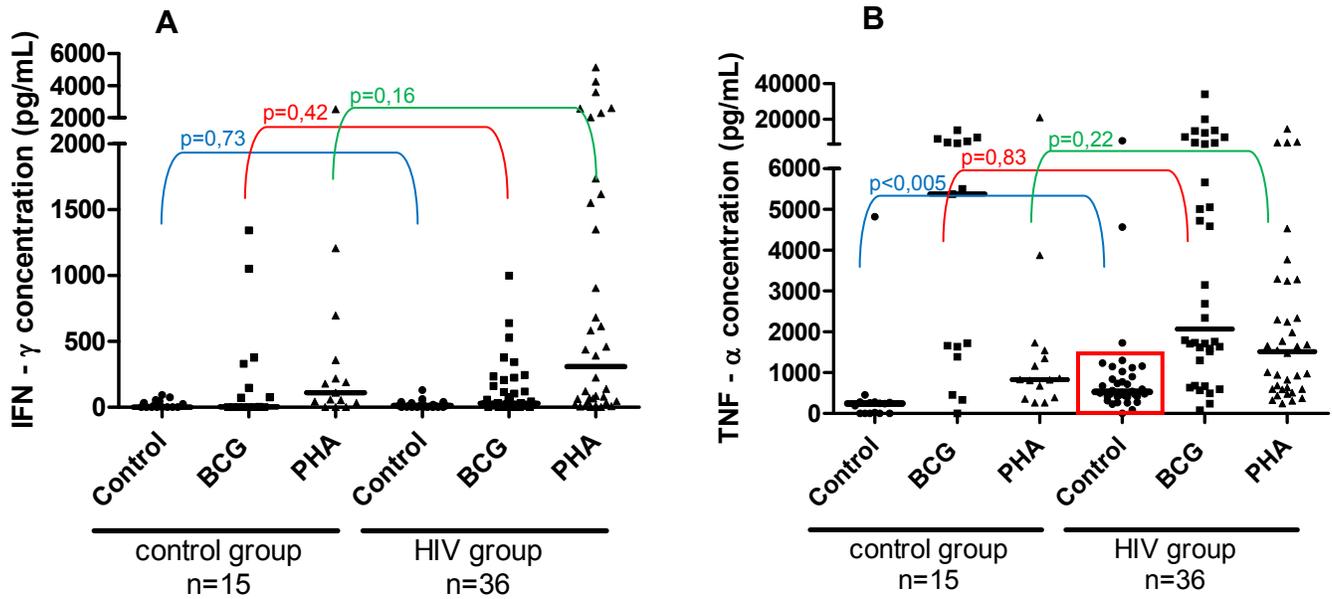


Figura 33. Concentrações de IFN- γ (A) e TNF- α (B) determinadas por ELISA no sobrenadante de células mononucleares das gestantes sem estímulo (control: ●), estimulada com BCG (BCG:■) e com fitohemaglutinina (PHA: ▲) para gestantes HIV⁻ e HIV⁺. As barras indicam as medianas e o n= número de indivíduos. (teste de Mann-Whitney)

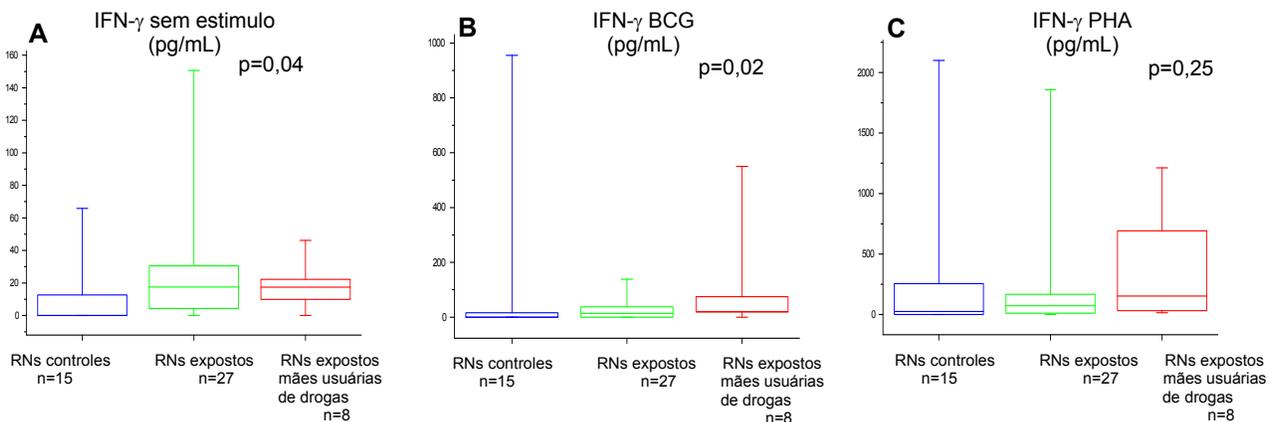


Figura 34. Representação gráfica da produção de IFN- γ nos RNs expostos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

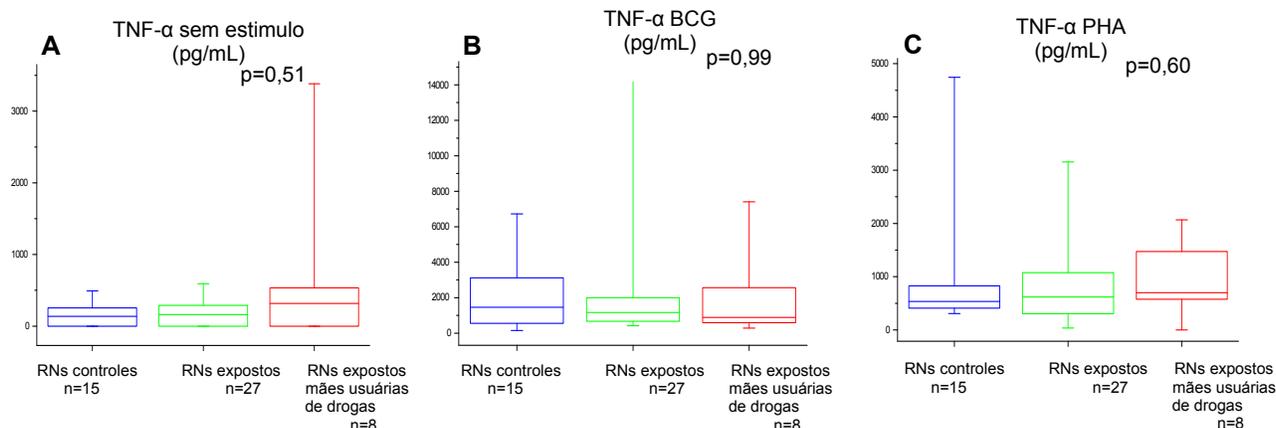


Figura 35. Representação gráfica da produção de TNF- α nos RNs expostos com a subdivisão do grupo dos expostos em filhos de mães HIV⁺ usuárias e não usuárias de drogas. (teste de Kruskal-Wallis)

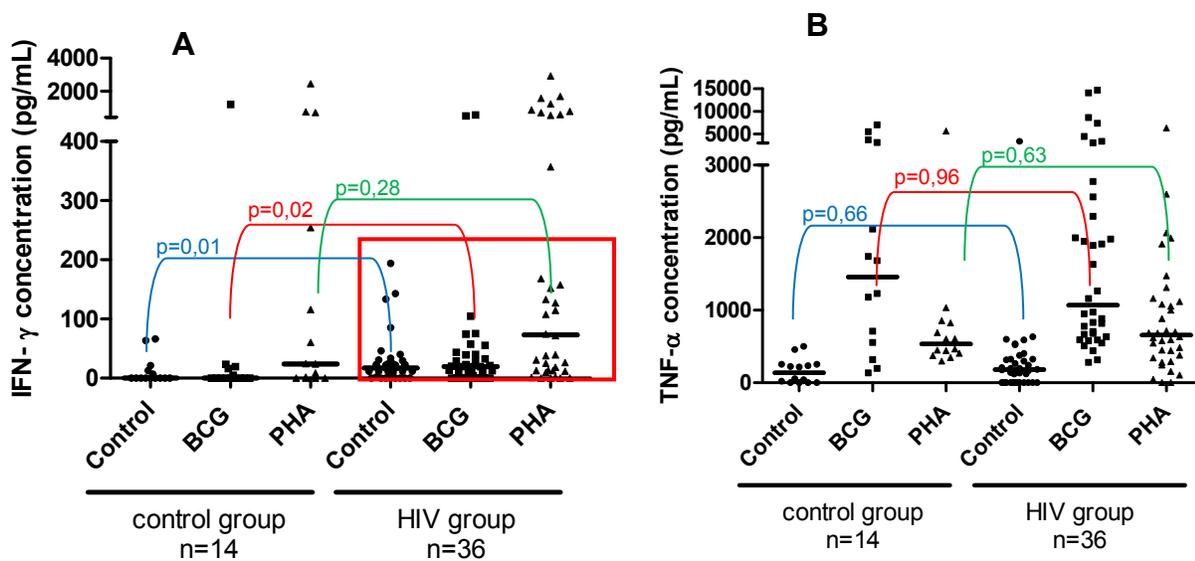


Figura 36. Concentrações de IFN- γ (A) e TNF- α (B) determinadas por ELISA no sobrenadante de células mononucleares do SCU sem estímulo (control: ●), estimulada com BCG (BCG: ■) e com fitohemaglutinina (PHA: ▲) para os RNs não expostos e expostos ao HIV. As barras indicam as medianas e o n= número de indivíduos. (teste de Mann-Whitney)

Nos RNs não expostos, nenhuma correlação foi encontrada entre a porcentagem das células CD19⁺, bem como as células CD19⁺/CD5⁺, com os valores de citocinas do SCU e com as citocinas maternas.

Contudo, nos RNs expostos uma correlação inversa foi encontrada entre as células CD19⁺ com o nível de IL-7 do SCU: $r=-0,46$; $p=0,002$ para não estimuladas, $r=-0,39$; $p=0,001$ para estimulada com BCG e $r=-0,48$ $p=0,001$ para estimuladas com PHA.

Correlações similares foram vistas com IL-4: $r=-0,49$; $p=0,001$; $r=-0,46$; $p=0,002$ e $r=-0,40$; $p=0,008$ respectivamente. Estas correlações também foram observadas nas células CD19⁺/CD5⁺ e na IL-7 do SCU: $r=-0,32$; $p=0,02$; $r=-0,41$; $p=0,006$ e $r=-0,45$; $p=0,003$ respectivamente.

Houve correlação entre as células CD19⁺/CD5⁺ e a IL-10 do SCU: $r=0,38$; $p=0,003$; $r=0,48$; $p=0,0002$ e $r=0,33$; $p=0,009$ respectivamente.

No entanto, não houve nenhuma correlação entre as células CD19⁺/CD5⁺ e os níveis de IL-4, IFN- γ e TNF- α do SCU.

Discussão

DISCUSSÃO

Os RNs expostos, mas não infectados pelo HIV apresentam uma variedade de alterações discretas, porém significativas, quando comparadas aos RNs não expostos a este vírus (65; 82; 84; 95-100). Eles apresentam baixo peso ao nascimento, que pode ser atribuído a um período de gestação mais curto e ao tratamento materno com TARV (96). No presente estudo, o peso dos RNs expostos esteve associado ao tempo de tratamento materno com ARV e principalmente pelo nível elevado de TNF- α materno no final da gestação; este perfil estava ainda mais acentuado nas mães usuárias de drogas, provavelmente devido à produção prolongada de TNF- α , que causa perdas musculares e adiposas, como resultado da perda do apetite e da síntese reduzida da lipoproteína lipase (28). Então, pode-se confirmar a associação do tratamento materno com ARV e da produção do TNF- α sobre o peso dos RNs.

Neste estudo prospectivo, foram comparadas as características hematológicas e imunológicas de RNs nascidos a termo, de mulheres infectadas pelo HIV, sob tratamento efetivo com TARV durante a gestação, em relação à RNs não expostos ao HIV. O índice de hemoglobina e as contagens de leucócitos e neutrófilos estavam baixos e o VCM estava elevado. Estas alterações estão de acordo com o descrito na literatura (65; 82; 95, 96) e podem ser atribuídas ao tratamento materno com TARV e a transferência das medicações maternas através da placenta (95). No sangue periférico das mães infectadas pelo HIV foram detectadas as mesmas alterações de quando elas estavam na 35ª semana de gestação.

No sangue de cordão umbilical dos RNs expostos ao HIV, os linfócitos B CD19⁺ estavam aumentados, devido ao aumento da subpopulação CD19⁺/CD5⁺. O número de linfócitos B CD5⁺ estava diretamente correlacionado ao nível de IL-10, confirmando que esta citocina é relevante para sobrevivência das células B. Além disso, a expressão do CD5 e a produção de IL-10 (Th2) estão relacionadas à inibição resposta Th1 (11). Houve correlação inversa entre as porcentagens de células B CD19⁺ e da subpopulação B CD5⁺ com a baixa produção de IL-7; a

produção reduzida de IL-4 correlacionou apenas com a porcentagem de B CD19⁺. Nos RNs expostos de mães usuárias de drogas, as células B mais imaturas e as intermediárias também estavam aumentadas. Assim, foi possível observar dois fatores associados ao aumento destas células imaturas: o uso de drogas ilícitas e o tempo de exposição materna à TARV durante a gestação.

As células B CD5⁺ são reguladoras negativas da sinalização do BCR, assim, a expressão do CD5 nesta população impede a apoptose e mantém a tolerância das células B anérgicas *in vivo*. Estas células têm participação importante e necessária na resposta imune efetiva a alguns patógenos, como por exemplo, a vírus (24).

Em RNs, as células B CD5⁺ parcialmente ativadas, freqüentemente produzem anticorpos polirreativos, geralmente a IgM, que reconhece uma variedade de antígenos próprios e estranhos (50). Ainda não se pode afirmar se as células B CD5⁺ presentes durante o período fetal ou quando ao nascimento, representam uma subpopulação distinta das células B CD5⁻ ou se elas fazem parte de uma subpopulação em fase diferente da maturação. A primeira hipótese é indiretamente apoiada pela distribuição bimodal da expressão do CD5 sobre as células de RNs (101). No entanto, um argumento sugere que a presença de células B CD5⁺ seja essencial durante a ontogênese, é a descrição desta subpopulação em pacientes que realizaram transplante de MO (11).

Existem algumas discrepâncias na literatura em relação ao número destas células em pacientes adultos infectados pelo HIV, que devem em parte ser atribuídas às diferenças na metodologia adotada pelos pesquisadores, envolvendo os critérios de seleção dos pacientes como: idade, estado imunológico, tempo de tratamento com ARV, combinações de antirretrovirais e técnicas empregadas para aquisição e análise da subpopulação da célula em questão (24; 48; 51; 97 - 100). Entretanto, em resposta ao tempo mais prolongado de tratamento com ARV, estas células parecem ter uma parte do seu número e função parcialmente restaurados, principalmente em adultos que iniciaram a terapia durante a infecção primária (52; 80; 96, 97). Em camundongos geneticamente modificados demonstrou-se que a gp120 solúvel foi capaz de diminuir a proporção de células B-1a/B-1b, diminuindo

os linfócitos B de memória (102). Entretanto, não é possível aplicar tal dedução às alterações ocorridas nas células B de indivíduos infectados pelo HIV, por causa das diferenças existentes entre o sistema imunológico de humanos e camundongos (43).

No caso de crianças infectadas pela via vertical, o HIV é adquirido no momento em que seu sistema imunológico está começando a se desenvolver, e na ausência da TARV, a infecção primária apresenta índices altos de viremia, levando mais tempo para declinar, em relação aos adultos. O tempo de supressão viral através do ARV pode ser crucial na definição da disfunção imune. Então, iniciar a terapia logo no primeiro ano de vida da criança pode preservar a porcentagem das células B de memória e beneficiar sua resposta a vacinação (47).

O aumento de linfócitos B CD5⁺ encontrado nos RNs expostos ao HIV no presente estudo, pode ser a expressão de uma alteração imune devido à transferência de proteínas virais e citocinas através da placenta. Por ser objeto de pesquisas, ainda não se sabe como essas alterações podem afetar o desenvolvimento do sistema imunológico de RNs expostos, mas alguns trabalhos descrevem uma resposta reduzida à vacinação nessas crianças (33; 92; 103).

Assim, as alterações encontradas nos RNs expostos ao HIV, deste trabalho, indicam que apesar da TARV ter controlado a infecção materna, mantendo a carga viral indetectável durante a gestação, seus filhos ainda apresentaram alterações nos linfócitos B, compatíveis com as anormalidades imunes remanescentes da infecção pelo HIV. À semelhança do que foi apresentado pela subpopulação CD19⁺/CD5⁺ aumentada nos RNs de mães usuárias de drogas, também foi descrito o aumento desta subpopulação (CD5⁺) em indivíduos viciados em drogas injetáveis, não infectados pelo HIV, sugerindo que não apenas a infecção pelo HIV, mas também a exposição crônica aos estímulos antigênicos múltiplos é responsável pelo aumento das células B CD5⁺ (48).

Outro ponto a ser destacado é o fato das células B do SCU serem susceptíveis à apoptose, o que poderia aumentar a vulnerabilidade do RN às

infecções (104). Como a IL-4 nos RNs expostos estava diminuída e levando em conta que sua participação é primordial na prevenção da apoptose (10), o aumento da subpopulação B CD5⁺ poderia ser um mecanismo compensatório do sistema imune visando manter principalmente a produção de IgM nessas crianças.

Neste estudo realizado em sangue de cordão umbilical, podemos observar que a ontogenia dos linfócitos B sofreu influência da exposição ao ambiente uterino com infecção controlada, além das medicações e drogas ilícitas utilizadas na gestação. As combinações de anticorpos escolhidas para o estudo da maturação das células B permitiram concluir que, em relação ao grupo de RNs controles, os expostos apresentaram valores medianos elevados de células B na fase intermediária e imatura.

Alguns estudos sobre a maturação das células B em crianças e adultos utilizaram MO e sangue periférico de pacientes com doenças hematológicas, infecciosas ou cardiopatas. Nesses, a citometria de fluxo foi a técnica empregada para detectar a presença células de B precursoras (hematogôneas), com o fenótipo CD10⁺/CD19⁺/CD22^{+/-} e expressão variável de CD34, TdT e CD45 (105 - 107). Neste sentido, um trabalho realizado com sangue periférico de 32 RNs hospitalizados (< de 30 dias) detectou a presença de células CD10⁺/CD19⁺ (mediana 2,2%) e presumiram que estas seriam as células B imaturas que poderiam representar as hematogôneas no periférico desses RNs (105). Em MO de dois RNs prematuros com alterações hematológicas, outro grupo, detectou 3,8% de hematogôneas no RN com menos de uma semana de nascido e 25,7% no outro, com dezenove semanas, utilizaram como critério o SSC baixo e a combinação CD45, CD34, CD10, CD19 e CD20, para saber se poderia existir hematogôneas circulando no sangue periférico, analisaram mais seis amostras de RNs prematuros normais, com o mesmo painel de anticorpos e não identificaram células B imaturas (106).

Outro fator relevante é que, a diminuição de células T virgens, o aumento das células T CD8⁺ de memória e ativadas têm sido observados em pacientes com HIV e RNs expostos a este vírus; além disso, há uma ativação imune que pode persistir por vários anos (65; 96). A fisiopatologia destas alterações ainda

não foi totalmente esclarecida, mas em RNs, ela tem sido atribuída principalmente à transferência de proteínas do HIV através da placenta, à alteração do perfil das citocinas maternas e ao uso de TARV na gestação (31; 52; 79, 80; 95; 97 - 99; 103; 108). Todos esses fatores, atuando por um longo período sobre o timo da criança, podem limitar a capacidade timopoiética, uma vez que o repertório de células T humanas é estabelecido durante o desenvolvimento fetal (109). Assim, tornam-se responsáveis pela depleção de células T e conseqüentemente pela alta freqüência de infecções e interferem na resposta à vacinação no período neonatal (65; 75; 100; 103).

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a hipótese de que no sangue de cordão umbilical de RNs expostos ao HIV, ocorrem alterações na resposta imune mediada por células e no desenvolvimento das células T, mesmo com a carga viral materna controlada (75; 96; 97). Estes RNs apresentaram número maior de células CD3⁺, devido ao aumento dos linfócitos CD8⁺. Uma proporção menor de células T CD4⁺, mas não de células T CD8⁺, estava associada à maior idade materna e ao tabagismo. A diminuição dos linfócitos T CD4⁺ é característica em indivíduos adultos tabagistas (110,111). Portanto, não apenas a presença da infecção materna pode alterar a função do timo de RNs expostos, mas também as substâncias inaladas no fumo por suas mães.

Quanto ao perfil de citocinas maternas, as mulheres infectadas diferiram das não infectadas por apresentarem níveis de IL-4 e IL-7 baixos, IFN- γ e TNF- α elevados, em especial nas mulheres usuárias de drogas. A produção reduzida de IL-7 observada nas mães infectadas está em concordância com a homeostase prejudicada dos linfócitos T observada nos seus RNs, uma vez que, a IL-7 está envolvida na expansão das células T de neonatos. É importante notar que, a responsividade das células T a IL-7 não é abruptamente encerrada após o período perinatal, mas ela diminui paulatinamente nas primeiras décadas de vida (109).

Diversos estudos demonstram que o padrão de citocinas é variável ao longo da gestação e que os efeitos observados dependem da concentração, da dose e do período da gestação (112). O modelo proposto por Wegmann et. al. (113) é muito restrito. Citocinas de perfil Th1 exerce efeito deletério, induzindo as

reações inflamatórias, podendo assim, comprometer o desenvolvimento de feto e ou da placenta. Por outro lado, as citocinas Th2 são benéficas para a gestação, promovendo a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação, além disso, desempenham um papel protetor sobre a unidade feto-placentária, inibindo a produção de citocinas Th1.

No presente trabalho, avaliamos o perfil imunológico da relação materno-fetal na 35ª semana de gestação e no SCU do RN ao nascer. O grupo das mães infectadas apresentou gestação a termo e sem intercorrências semelhante ao grupo de mães não infectadas. Neste contexto seria necessário incluir os efeitos moduladores sobre a gestação que é exercida por muitas outras citocinas e mediadores como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, LIF, TNF- α , TGF- β e IFN- γ . Além dessas citocinas, a progesterona, hormônio da gravidez, influencia a resposta imune induzindo a ativação preferencial de células Th2 e na presença dela, os linfócitos periféricos de gestantes saudáveis produzem um fator bloqueador (PIBF) que exerce funções imunomodulatórias, favorecendo a secreção de citocinas Th2, como IL-3, IL-4, e IL-10, e inibindo as citocinas Th1, como o IFN- γ (114). Portanto, as alterações vistas nas mães infectadas do nosso estudo, podem ser conseqüências de vários fatores e não somente do desequilíbrio Th1 versus Th2. O TNF- α produzido no aparelho reprodutor feminino parece ser importante para a manutenção e diferenciação placentária, para o desenvolvimento embrionário e para a parturição. Por outro lado, o TNF- α pode promover trombose impedindo a irrigação necessária para o desenvolvimento fetal, podendo causar até necrose do embrião (56).

Sendo assim, a diminuição de IL-4 e IL-7 e o aumento de IFN- γ e TNF- α nos RNs expostos ao HIV, podem ser a expressão da associação da infecção materna sobre a rede de interação materno-fetal. A diminuição do perfil de citocinas Th2, que tem sido descrita no final da gestação (115), é mais acentuada em RNs de mães HIV⁺ que estão sendo tratadas com TARV (52; 95; 97; 116). Este tratamento tem sido associado à recuperação pelo menos parcial das células T CD4⁺, que numa escala de tempo, varia de indivíduo para indivíduo, pois

diferente da carga viral, que num período de 12 a 16 semanas declina para níveis desejáveis, o tempo de recuperação do CD4⁺ varia de seis a vinte e quatro meses.

Estudos demonstram, que a TARV também está relacionada à diminuição da IL-4 e IL-7 e ao aumento de IFN- γ em crianças e adultos infectados pelo HIV (31; 33; 45; 98 - 100). Por outro lado, as drogas antirretrovirais, especialmente os inibidores da protease, têm sido associados à síndrome metabólica, devido a uma ativação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α (117).

Seria interessante analisar a efetividade da resposta à vacinação nessas crianças durante o período neonatal, assim como, a evolução das subpopulações de linfócitos no sangue periférico.

As crianças expostas ao HIV, que fizeram parte deste estudo, estão sendo acompanhadas para se observar a evolução de todas estas alterações ao longo do tempo.

Conclusões

CONCLUSÕES

- ✓ Nos RNs expostos ao HIV houve diminuição das células B maduras e aumento das células B intermediárias e imaturas.
- ✓ A porcentagem de linfócitos T e B dos RNs expostos ao HIV foram maiores do que no grupo controle, devido ao aumento do número de linfócitos T CD8⁺ e das células B CD5⁺, respectivamente.
- ✓ A produção de citocinas dos RNs expostos foi similar ao perfil materno. A diminuição de IL-4 em RNs expostos ao HIV esteve associada ao aumento das porcentagens de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B CD19⁺, enquanto que a produção elevada de IL-10 associou-se à porcentagem de células B CD19⁺/CD5⁺. A produção reduzida de IL-7 esteve envolvida na expansão das células T dos RNs expostos ao HIV.
- ✓ Nos RNs expostos ao HIV:
 - O tempo de exposição ao ARV durante a gestação associou-se a proporção de células B imaturas ;
 - O tabagismo materno exerceu maior influência sobre as subpopulações de células T;
 - As drogas ilícitas usadas pelas mães associaram-se a maturação das células B.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- Barlogie B, Shaughnessy J, Munshi N, Epstein J. Neonatal Hematology. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Hematology. 6th ed. New York, McGraw-Hill. 2001. 77-91.
- 02- Rossi MI, Yokota T, Medina KL, Garrett KP, Comp PC, Schipul AHJR, Kincade PWB. lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. Blood. 2003. 101(2):576-84.
- 03- Weerkamp F, De Haas EF, Naber BA, Comans-Bitter WM, Bogers J, Van Dongen JJ, Staal FJ. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. J Allergy Clin Immunol. 2005.115(4):834-40.
- 04- Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. Annu Rev Immunol. 2006. 24:287-320.
- 05- Béné MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. Immunol Lett. 2005. 15;98 (1):9-21.
- 06- Roessler S, Grosschedl R. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. Semin Immunol. 2006. 18 (1): 12-9.
- 07- van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom. 2004. 60(1):1-13.
- 08- Israel E, Kapelushnik J, Yermiahu T, Levi I, Yaniv I, Shpilberg O, Shubinsky G. Expression of CD24 on CD19- CD79a+ early B-cell progenitors in human bone marrow. Cell Immunol. 2005.236(1-2):171-8.
- 09- Zago AM, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia. 6^a ed. São Paulo, Atheneu, 2005. 677-88.

- 10- Kessel A, Yehudai D, Peri R, Pavlotzky E, Bamberger E, Tov N, Toubi E. Increased susceptibility of Cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 2006.145:563-70.
- 11- Dalloul A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmunity Reviews*. 2009. 8:349-53.
- 12- Villaseñor-Bustamante S, Alvrado-de La Barrera C, Richaud-Patin Y, Marinez-Ayala H, Llorente L. Possible role of interleukin-10 in autoantibody production and in the fate of human Cord blood CD5+ B lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1999. 49:629-32.
- 13- Vries E, Bruin-Versteeg S, Commans-Bitter WE, Groot R, Hop WCJ, Boerma GJM, Lotgering FK, Van Dongen JJM. Longitudinal survey of lymphocytes subpopulations in the first year life. *Ped Research*. 2000. 47: 528-37.
- 14- Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol*. 2004. 22:55-79.
- 15- Singh H, Medina KL, Pongubala JM. Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. 102(14):4949-53.
- 16- Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol*. 2005. 5(6):497-508.
- 17- Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*. 2004. 20(6):707-18.
- 18- Milne CD, Paige CJ. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol*. 2006.18(1):20-30.
- 19- LeBien, TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood*. 2000. 96(1):9-23.
- 20- Johnson SE, Shah N, Panoskaltzis-Mortari A, Lebien TW. Murine and human IL-7 activate STAT5 and induce proliferation of normal human pro-B cells. *J Immunol*. 2005. 175(11):7325-31.

- 21- Schaumann DH, Tuischer J, Ebell W, Manz RA, Lauster R. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. *Mol Immunol.* 2007.44(7):1606-12.
- 22- Crooks GM, Hao QL, Petersen D, Barsky L W, Bockstoce D. IL-3 increases production of B lymphoid progenitors from human CD34+CD38- cells. *J Immunol.* 2000. 1;165(5):2382-9.
- 23- Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, Mackay F, Rao SP, Kalled SL. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol.* 2004. 15;173(4):2331-41.
- 24- Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood.* 2002.100: 4537-43.
- 25- Garaud S, Le Dantec C, Mendonza AR, Mageed RA, Youinou P, Renauduneau Y. IL-10 production by B cells expressing CD5 with the alternative exon 1B. *Ann N Y Acad Sci.* 2009. 1173: 280-5.
- 26- Maròdi, L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol.* 2006. 118:137-44.
- 27- Ortigão-de-Sampaio MB. Imaturidade imunológica fetal e neonatal: implicações na evolução clínica da infecção pelo HIV-1 em crianças. *Rev Ass Méd Bras.* 1997. 43(1):29-34.
- 28- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular.* 5ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda. 2005. 133-165.
- 29- Miosge LA, Goodnow CC. Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol Cell Bio.* 2005..83(4):318-35.
- 30- Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uttenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34C stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not

- into pre-DC1: Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med*. 2000.192:1775–84.
- 31- Faye A, Pornprasert S, Mary JY, Dolcini G, Derrien M, Barré-Sinoussi F, et al. Characterization of the main placental cytokine profiles from HIV-1-infected pregnant women treated with anti-retroviral drugs in France. *Clin Exper Immunol*. 2007.49: 430-9.
- 32- Vilela MMS. Desenvolvimento do sistema imune na criança. In: Grumach A.S. *Alergia e imunologia na infância e na adolescência*. São Paulo: Atheneu, 2009. 335-8.
- 33- Viganò A, Zuccotti GV, Pacci M, Erba P, Castelletti E, Giacomet V, et al. Humoral and cellular response to influenza vaccine in HIV-infected children with full viroimmunologic response to antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008. 48:289-96.
- 34- Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Papagianni B, Moira E, Sarandakou A, Botsis D. Age-related differentiations of Th1/Th2 cytokines in newborn infants. *Mediators Inflammation*. 2004. 13(2): 89-92.
- 35- Marshall-Clarke S, Tasker L, Parkhouse RME. Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and fail to show B7.2 induction. *Immunol*. 2000. 100:141-51.
- 36- Souza J, Storpirtis S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Rev Bras Ciên Farm*. 2004. 40:10-18.
- 37- Duarte G, Gonçalves CV, Marcolin AC, Paschoini MC, Quintana SM, Mussi-Pinhata MM. Teste rápido para detecção da infecção pelo HIV-1 em gestantes. *Rev. Bras. Ginecol Obstetr*. 2001. 23(2): 107-11.
- 38- Chinen J, Shearer WT. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(2): 189-98.

- 39- Fenales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenic mechanism of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*. 2010. 46(1): 5-14.
- 40- Colin L, Van Lint C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implication for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology*. 2009. 111(6):1-29.
- 41- Douek DC, Roederer M, Koup R. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Méd*. 2009. 60:471-84.
- 42- De Millito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, Grutzmeier S, Sonnerborg A, Chiodi F. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*. 2004. 15;103(6):2180-6.
- 43- Viau M, Veas F, Zouali M. Direct impact of inactivated HIV-1 virions on B lymphocyte subsets. *Mol Immunol*. 2007.44: 2124 -34.
- 44- Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009. 9(4):235-45.
- 45- Malaspina A, Moir S, Ho J, Wang W, Howell ML, O'Shea MA, et al. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. *PNAS*. 2006.103:2262-7.
- 46- Peruchon S, Chaoul N, Burelout C, Delache B, Brochard P, Laurent P, Cognasse F, Prévot S, Garraud O, Le Grand R, Richard Y. Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acute SIV infection. *PLoS ONE*. 2009. 4(6): e5966.
- 47- Pensiero S, Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Capponi C, Freda E, Bernardi S, Thortensson R, Chiodi F, Rossi P. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infect children. *PNAS Immunol*. 2009. 106(19): 7939-44.

- 48- Sampalo A, López-Gómez M, Jimenez-Alonso J, Ortiz F, Samaniego F, Garrido F. CD5+ B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993. 66: 260-8.
- 49- Vuillier F, Scott-Algara D, Tortevoeye P, Pialoux G, Dighiero G. Serial study of CD5 + and CD5 B cell subpopulations in 335 HIV seropositive patients. *Clin Exp Immunol.* 1991. 85:476-80.
- 50- Ibegbu C, Spira JT, Nesheim S, Mendez H, Lee F, Polliotti B, Caba J, Nahmias A. Subpopulations of T and B cells in perinatally HIV-infected and noninfected children compared with those in adults. *Clin Immunol and Immunipathol.* 1994. 71(1):27-32.
- 51- Redgrave BE, Stone SF, French MAH, Krueger R, James IR, Price P. The effect of combination antiretroviral therapy on CD5 B-cells, B-cell activation and hypergammaglobulinaemia in HIV-1-infected patients. *HIV Med.* 2005. 6:307-12.
- 52- Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RCM, Salomão R, et al. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. *Cytometry B.* 2007. 72:14-21.
- 53- Moir S, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008. 122(1): 12-21.
- 54- Thorne C, Semenenko I, Pilipenko T, Malyuta R. Ukraine European Collaborative Study Group: Progress in prevention of mother-to-child transmission of HIV infection in Ukraine: results from a birth cohort study. *BMC Infect Dis.* 2009. 9:40.
- 55- Parry S, Zhang J, Koi H, Arechavaleta-Velasco F, Elovitz MA. Transcytosis of human immunodeficiency virus 1 across the placenta is enhanced by treatment with tumor necrosis factor alpha. *J of General Virol.* 2006. 87: 2269-78.
- 56- Lehman D, Farquhar C. Biological mechanism of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol.* 2007.17(6):381-403.

- 57- Kuhn L, Coutsooudis A, Moodley D, Mngqundaniso N, Trabattoni D, Shearer GM, Clerici M, Coovadia HM. Interferon-gamma and interleukin-10 production among HIV-1-infected and uninfected infants of HIV-1-infected mothers. *Pediatr Res.* 2001.50(3):412-6.
- 58- Derrien M, Faye A, Dolcini G, Chaouat G, Barré-Sinoussi F, Menu E. Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro. *J Virol.* 2005.79(19):12304-10.
- 59- Kfutwah AK, MARY JY, Nicola MA, Blaise-Boisseau S, Barré-Sinoussi F, AYOUBA A, MENU E. Tumour necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependent manner. *Retrovirology.* 2006. 23;3-36.
- 60- Tess BH, Rodrigues LC, Newell ML, Dunn DT, Lago TD. G and the São Paulo collaborative study for vertical transmission of HIV-1. *AIDS.* 1998. 12:513-20.
- 61- Menu E, Mbopi-Keou FX, Lagaye S, et al. Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Infect Dis.* 1999.179:44–51.
- 62- Vidricaire G, Tremblay MJ. Vers une compréhension Du mécanisme de transmission du VIH in utero. *Med Sci.* 2004. 20(8-9): 784-7.
- 63- Mofenson LM, Harris DR, Rich K, Meyer WA, Read JS, Moye JJR. Serum HIV-1 24 antibody, HIV-1 RNA copy number and CD4 lymphocyte percentage are independently associated with risk of mortality in HIV-1 infected children. *AIDS.* 1999.13:31-9.
- 64- Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Em Saúde e Programa Nacional de DST e AIDS. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em pediatria. 2007.
- 65- Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, Bricalli D, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood.* 2000. 96:3866-71.

- 66- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan M, Vandyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL, Jimenez E, O'Neill E, Bazin B, Delfraissy J, Culnana M, Coombs R, Elkins M, Moya J, Stratton J, Balsley J. Reduction of maternal-infant Transmission of human immunodeficiency virus type 1 with Zidovudine treatment. *New Engl J Med*. 1994. 331:1173-80.
- 67- Mofenson LM, Moya JJR, Korelitz J, Bethel J, Hirschhorn R, Nugent R. Crossover of placebo patients to intravenous immunoglobulin confirms efficacy for prophylaxis of bacterial infections and reduction of hospitalizations in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J*. 1994.13(6):477-84.
- 68- Brasil. Boletim Terapêutico de HIV/AIDS, DST e Hepatites Virais da Sociedade Brasileira de Infectologia, 2003. 1-8.
- 69- Kramer AS, Lazzaroto AR, Spriz E, Manfroi WC. Metabolic abnormalities, antiretroviral therapy and cardiovascular disease in elderly patients with HIV. *Arq Bras Cardiol*. 2009. 93(5):561-8.
- 70- Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Em Saúde e Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia antirretroviral. 2008.
- 71- Yoshimoto EC, Diniz EMA, Vaz FAC. Evolução clínica e laboratorial de recém-nascidos de mães HIV positivas. *Rev Assoc Med Bras*, 2005. 51(2): 100-5.
- 72- Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Infecções congênitas e perinatais. *J Pediatr*, 1999. 75(Supl 1):S15-30.
- 73- Sociedade Brasileira de Pediatria & Ministério da Saúde. Estudo colaborativo multicêntrico para avaliar as taxas de transmissão vertical do HIV. 2003. Anais do 10º Congresso Paulista de Pediatria e 32º Congresso Brasileiro de Pediatria.
- 74- Moreno YMF. Proliferação celular e citocinas BCG específicos em crianças com AIDS: Efeito de suplementos Nutricionais. [Tese] Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2007.

- 75- Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, Clark DR, Sorensen TU, Dreves AM, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood*. 2001. 98:398-404.
- 76- Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, Blanche S. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS*. 2003.17:2053-61.
- 77- Meira DG, Lorand-Metze IHG, Toro ADC, Silva MTN, Vilela MMS. Bone marrow features in children with HIV infection and peripheral blood cytopenias. *J Trop Pediatr*. 2005. 51(2):114-9.
- 78- Isgrò A, Mezzaroma I, Aiuti A, Fantauzzi A, Pinti M, Cossarizza A, Aiuti F. Decreased apoptosis of bone marrow progenitor cells in HIV-1 infected patients during highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2004. 18:1335-44.
- 79- Müller F, Tjonnfjord GE, Nordoy I, Kvale D, Mellbye OJ, Aukrust R, Froland SS. Immunophenotypic analyses of CD34+ cell subsets in bone marrow from HIV-infected patients during highly-active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Invest*. 2002. 32:535-40.
- 80- Feola DJ, Garvy B.A. Combination exposure to zidovudine plus sulfamethoxazole-trimethoprim diminishes B lymphocyte immune responses to *Pneumocystis murina* infection in healthy mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2006.13:193-201.
- 81- Shearer WT, Easley KA, Goldfarb J, Rosenblatt HM, Jenson HB, Kovacs A, McIntosh K. Prospective 5-year study of peripheral blood CD4, CD8, and CD19/CD20 lymphocytes and serum Igs in children born to HIV-1 women. *J Allergy Clin Immunol*. 2000. 106(3):559-66.
- 82- Blanche S, Rouzioux C, Moscato MLG, Veber F, Mayaux MJ, Jacomet C. et al. A prospective study of infants born to women seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*. 1989. 320:1643 – 8.

- 83- Culnane M, Fowler M, Lee SS, McSherry G, Brady M, O'Donnell K, Mofenson L, Gortmaker SL, Shapiro DE, Scott G, Jimenez E, Moore EC, Diaz C, Flynn PM, Cunningham B, Oleske J. Lack of long-term effects of in utero exposure to zidovudine among uninfected children born to HIV-infected women. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 219/076 Teams. *JAMA*. 1999. 281: 151-7.
- 84- Newell ML, Huang S, Fiore S, Thorne C, Mandelbrot L, Sullivan JL, Maupin R, Delke I, Watts DH, Gelber RD, Cunningham CK. PACTG 316 Study Team: Characteristics and management of HIV-1-infected pregnant women enrolled in a randomised trial: differences between Europe and the USA. *BMC Infect Dis*. 2007; 7:60.
- 85- Gesner M, Papaevangelou V, Kim M, Chen S, Moore T, Krasinski K, et al. Alteration in the proportion of CD4 T lymphocytes in a subgroup of Human Immunodeficiency Virus-exposed-uninfected children. *Pediatrics*. 1994. 93(4): 624-30.
- 86- Gray L, Newell M, Cortina-Borja M, Thorne C, Peckham P. European Collaborative Study. Are there gender and race differences in cellular immunity patterns over age in infected and uninfected children born to HIV-infected women? *JAIDS*. 2003. 33(5):635-41.
- 87- Borkowsky W, Rigaud M, Krasinski K, Moore T, Lawrence R, Pollack H. Cell-mediated and humoral immune responses in children infected with human immunodeficiency virus during the first four years of life. *J Pediatr*. 1992. 120(3):371-5.
- 88- Watanaveeradej V, Samakoses R, Kerdpanich A, Aree C, Nitayabhan S, Viputtikul K, Sukwit S, Simasathie S. Antibody response to hepatitis B vaccine in infants of HIV-positive mothers. *Int J Infect Dis*. 2002. 6:240-1.
- 89- Moss WJ, Clements CJ, Halsey NA. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003. 81(1):61-70.

- 90- Dworzak MN, Fritsch G, Fröschl G, Printz D, Gadner H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood*. 1998.1;92(9):3203-9.
- 91- Hoft DF, Brown RM, Roodman ST. Bacille Calmette-Guérin vaccination enhances human $\gamma\delta$ T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J Immunol*. 1998.161(2):1045-54.
- 92- Mazzola TN. Deficiência da resposta imune celular à vacina de Bacillus Calmette-Guérin em lactentes expostos e não infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. [Tese -mestrado] Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- 93- Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metze K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol*. 2006. 28: 55–9.
- 94- Rybka MO, Cintra ML, de Souza EM, Metze K. Density of dendritic cells around basal cell carcinomas is related to tumor size, anatomical site and stromal characteristics, and might be responsible for the response to topical therapy. *Int J Dermatol*. 2008. 47:1240-4.
- 95- Pacheco SE, McIntosh K, Ming L, Mofenson LM, Diaz C, Foca M, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: an analysis of the women and infants transmission study. *J Infect Dis*. 2006. 194:1089-97.
- 96- Ono E, Nunes dos Santos AM, Succi RCM, Machado DM, de Angelis DSA, Salomão R, et al. Imbalance of naïve and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res*. 2008. 41:700-8.
- 97- Bunders M, Thorne C, Newell ML; European Collaborative Study: Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in uninfected children of HIV-1-infected mothers. *AIDS*. 2005. 19(10):1071-9.

- 98- Hygino J, Lima PG, Filho RGS, Silva AAL, Saramago CSM, Andrade RM, et al.: Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. *Clin Immunol.* 2008. 127:340-7.
- 99- Resino S, Galán R, Correa R, Pajuelo J, Bellón JM, Muñoz-Fernandez MA. Homeostatic role of IL7 in HIV-1 infected children on HAART: association with immunological and virological parameters. *Acta Paediatr.* 2005. 94: 170-7.
- 100- Sadeghi M, Susal C, Daniel V, Naujokat C, Zimmermann R, Huth-Kuhne A, Opelz G. Decreasing soluble CD30 and increasing IFN γ plasma levels are indicators of effective highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retrov.* 2007. 23:886-90.
- 101- Durandy A, Thuillier L, Forveille M, Fischer A. Phenotypic characteristics of human newborns' B lymphocytes. *J Immunol.* 1990. 144:60-5.
- 102- Ceredig R, Bosco N, Maye PN, Andersson J, Rolink A. In interleukin-7-transgenic mice, increasing B lymphopoiesis increases follicular but not marginal zone B cell numbers. *Eur J Immunol.* 2003. 33(9):2567-76.
- 103- Carniel EF, Morcillo AM, Blotta MH, Da Silva MTN, Mazzola TN, Antonio MARGM, et al. Immunogenicity and safety of combined intradermal recombinant hepatitis B with BCG vaccines at birth. *Vaccine.* 2008. 26:647-52.
- 104- Economides A, Schmid I, Anisman-Posner DJ, Plaeger S, Bryson YJ, Uittenbogaart CH. Apoptosis in cord blood T lymphocytes from infants of human immunodeficiency virus-infected mothers. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998.5:230-4.
- 105- Brady KA, Atwater SK, Lowell CA. Flow cytometry detection of CD10(cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates. *Br J Haem.* 1999. 107:712-5.
- 106- Rimsza LM, Douglas VK, Thige P, Saxonhouse MA, Calhoun DA, Christensen MS, Sola MC. Benign B-cell precursors (hematogones) are the predominant lymphoid population in the bone marrow of preterm infants. *Biol Neonate.* 2004.86:247-53.

- 107- Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, Tangye SG. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol.* 2006.176:1507-16.
- 108- Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Sthiem ER, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the pediatrics AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003. 112:973-80.
- 109- Schönland SO, Zimmer JK, Lpoez-Benitez CM, Widmann T, Ramim KD, Goronzy JJ, Weyand CM. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Immunology.* 2003. 102(4): 1428-34.
- 110- Shuter J, Bernstein SL. Cigarette smoking is an independent predictor of non-adherence in HIV-infected individuals receiving highly active antiretroviral therapy. *Nicotine&Tobacco Res.* 2008. 10:731-6.
- 111- Wojna V, Robles L, Skolasky RL, Mayo R, Selnes O, de La Torre T, et al. Associations of cigarette smoking with viral immune and cognitive function in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Virol.* 2007. 13:561-8.
- 112- Daher S, Fonseca F, Ribeiro OG, Musatti CC, Gerbase LM. Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999. 83(1):77-9.
- 113- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today.* 1993.14(7):353-6.
- 114- Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Papp O, Varga P. Progesteron-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005. 89:118-25.
- 115- Halonen M, Lohman IC, Stern DA, Spangenberg A, Anderson D, Mobley S, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol.* 2009.182:3285-93.

- 116- Sachdeva N, Oshima K, Cotter A, Ashman M, Davila L, Okazaki T, et al. Analysis of immunological markers associated with pregnancy and HIV-1 infection: relevance in perinatal transmission in HIV-1-infected pregnant women with low plasma viral load. *Am J Reprod Immunol*. 2008. 60:264-73.
- 117- Barbaro G, Lacobellis G. Metabolic syndrome associated with HIV and highly active antiretroviral therapy. *Current Diabetes Reports*. 2009. 9:37-42.

Anexos

Anexos

Parecer Comitê de ética

 Andamento do projeto - CAAE - 0108.0.146.000-06				
Título do Projeto de Pesquisa MATURAÇÃO DE CÉLULAS B EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE CRIANÇAS EXPOSTAS AO HIV DURANTE A GESTAÇÃO				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	06/04/2006 15:26:07	05/07/2006 14:59:15		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	30/03/2006 17:17:24	Folha de Rosto	FR88538	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	06/04/2006 15:26:07	Folha de Rosto	0108.0.146.000-06	CEP
3 - Protocolo Pendente no CEP	25/04/2006 16:38:13	Folha de Rosto	157/2006	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	05/07/2006 14:59:15	Folha de Rosto	157/2006	CEP

 Voltar

Apêndices

Apêndices

Apêndice I

Artigo submetido

Assunto:	6914576237217307 The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns
De:	"BioMed Central Editorial" <editorial@biomedcentral.com>
Data:	Sex, Março 26, 2010 6:11 pm
Para:	"Prof Irene Lorand-Metze" <ilmetze@unicamp.br>
CC:	"Irene Lorand-Metze" <ilmetze@unicamp.br>
Prioridade:	Normal
Filtros de Mensagem:	Automatically From To Subject
Opções:	Ver cabeçalho completo Ver Versão para Impressão Baixar como um arquivo

Article title: The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns
MS ID : 6914576237217307
Authors : Eliane Borges-Almeida, Helaine MBPM Milanez, Maria Marluce S Vilela, Fernanda GP Cunha, Beatriz M Abramczuk, Suiellen C Reis-Alves, Konradin Metze and Irene Lorand-Metze
Journal : BMC Infectious Diseases

Dear Prof Lorand-Metze

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/6914576237217307_article.pdf
(284K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you

uploaded with
this submission.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1806719760372173_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript shortly. The submitting author can check on the status of your manuscript in peer review at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Author's covering letter for initial submission

Title: The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns

Authors:

Version: 1 Date: 26 March 2010

Comments:

Dear Editors,

Herewith we are submitting the manuscript “The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns” by Borges-Almeida et al for publication as research paper in BMC Infectious Diseases.

The present text deals with a prospective controlled observation on cord blood of term HIV exposed newborns compared to normal ones. We have analyzed the T and B lymphocyte subsets as well as B-cell maturation and the variation related to cytokine profile and maternal HAART treatment during pregnancy as well as smoking and hard drug use.

HIV-exposed infants had a higher proportion of B lymphocytes, especially CD19+/CD5+ ones. To our knowledge, this result has never been described in the literature. Maternal HIV infection affected especially cord blood B cells and smoking T lymphocytes.

The data are original, and have not been published elsewhere, nor are under consideration for publication by any other journal.

Browsing your journal we saw that a lot of papers dealing with HIV infection are published there.

Looking forward for your appreciation

Yours sincerely

Prof Dr Irene Lorand-Metze

State University of Campinas – Brazil

Apêndice II

Consentimento livre e esclarecido
(resolução 196/96-251/97)

Título: **Maturação de Células B em Sangue de Cordão Umbilical de Crianças expostas ao HIV durante a gestação**

Pesquisadores: Prof^a Dr^a Irene Lorand-Metze, Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela, Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco, Prof^a Dr^a Helaine Milanez, Eliana Martorano Amaral, Prof. Dr. Sérgio Marba e Eliane Borges de Almeida.

Local: HEMOCENTRO e CIPED/FCM-UNICAMP.

- 1. Introdução:** as informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que você possa ter sobre este termo e sobre o estudo. Por favor, leia-o cuidadosamente e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.
- 2. Propósito:** você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar se ocorrem mudanças na formação das células que ajudam na defesa do organismo do bebê e se algumas substâncias (citocinas) produzidas pela mãe durante a gestação, por causa da infecção pelo vírus HIV, podem agir sobre estas células. Para você decidir se deseja ou não participar deste estudo de pesquisa, você deve entender o bastante para fazer uma decisão consciente. Este processo é conhecido como consentimento informado.
- 3. Retrospectiva:** a transmissão do HIV da mãe para seu bebê ocorre em 15% a 25% das gestações quando nenhuma precaução é tomada. Atualmente, este risco tem diminuído com o tratamento com antiretrovirais em combinação com o parto cesáreo e a suspensão do aleitamento materno. O bebê não infectado, mas que foi exposto ao HIV durante a gestação, tem a defesa do organismo prejudicada e pode ter resposta deficiente a vacinação.
- 4. Descrição do estudo:** irão participar deste estudo o bebê e a mãe que concordar com o

mesmo. A mãe será entrevistada e será coletada cerca de 15 mL de sangue da veia periférica entre a 32ª até no máximo a 35ª semana de gestação, para dosagem de citocinas. No momento do parto, será coletado 15 mL de sangue do cordão umbilical, para análise das células de defesa do organismo do bebê e dosagem de citocinas, esta coleta é totalmente indolor para o bebê. Estas amostras após análise laboratorial serão descartadas, portanto, não serão armazenadas nem utilizadas em outros estudos.

5. **Desconforto, riscos e benefícios esperados:** o método de coleta utilizado ao qual os participantes da pesquisa serão submetidos não acarretarão qualquer risco, custo ou dano imediato ou potencial ao participante. Por outro lado, oferecem elevada possibilidade de gerar conhecimento em benefício na qualidade de vida e sobrevivência dos participantes da pesquisa, especialmente do bebê, quanto à tendência a ter infecções e resposta a vacinas.
6. **Exclusões:** recém-nascido portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave.
7. **Compensação:** não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, portanto, a mesma não inclui a possibilidade de indenização.
8. **Confidencialidade dos registros:** você tem direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá confidencial nos âmbitos possíveis da lei, assegurando proteção de sua imagem, sigilo e respeitando valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. Como condição de sua participação nesta pesquisa, você permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos neste estudo, aos membros da Comissão de Ética responsáveis pela análise do projeto. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.
9. **Direito em participar, recusar ou sair:** ao participar, você concorda em cooperar com os procedimentos que foram executados e que foram descritos acima, não abrindo mão

de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado. Sua participação neste estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito. O pesquisador tem o direito de desligá-la do estudo a qualquer momento que julgar necessário.

10. Contatos: ainda se houver qualquer dúvida sobre o estudo você poderá receber mais esclarecimentos falando com as médicas: Dr^a Irene Lorand-Metze e Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela.

Endereços:

1. HEMOCENTRO/UNICAMP. Rua Carlos Chagas, nº480, Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP 13083-970, fone: (XX19) 3788 86 71
2. Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)/FCM/UCAMP, Campinas, SP. CEP 13083-970, fone: (XX19) 3788 89 58 ou 3788 89 59.
3. Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP 13084-971, CX Postal 6111, fone (XX19) 3788 89 36 ou 3788 71 87.

**Consentimento livre e esclarecido – Grupo Controle
(resolução 196/96-251/97)**

Título: Maturação de Células B em Sangue de Cordão Umbilical

Pesquisadores: Prof^a Dr^a Irene Lorand-Metze, Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela e Eliane Borges de Almeida.

Local: HEMOCENTRO e CIPED/FCM-UNICAMP.

1. Introdução: as informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que você possa ter sobre este termo e sobre o estudo. Por favor, leia-o cuidadosamente e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.

2. Propósito: você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar se ocorrem mudanças na formação das células que ajudam na defesa do organismo do bebê e se algumas substâncias (citocinas) produzidas pela mãe durante a gestação, podem agir sobre estas células. Para você decidir se deseja ou não participar deste estudo de pesquisa, você deve entender o bastante para fazer uma decisão consciente. Este processo é conhecido como consentimento informado.

3. Retrospectiva: sua amostra de sangue e do cordão umbilical do seu bebê será utilizada para comparar com o resultado obtido de mães HIV positivas, cujos bebês não infectados, mas que foram expostos ao HIV durante a gestação, tem a defesa do organismo prejudicada e pode ter resposta deficiente a vacinação.

4. Descrição do estudo: irão participar deste estudo o bebê e a mãe que concordar com o mesmo. A mãe será entrevistada e será coletada cerca de 15 mL de sangue da veia periférica entre a 32^a até no máximo a 35^a semana de gestação, para dosagem de citocinas. No momento do parto, será coletado 15 mL de sangue do cordão umbilical, para análise das células de defesa do organismo do bebê e dosagem de citocinas, esta coleta é totalmente indolor para o bebê. Estas amostras após conclusão deste estudo serão descartadas, portanto, não serão armazenadas nem utilizadas em outros estudos.

5. Desconforto, riscos e benefícios esperados: o método de coleta utilizado ao qual os participantes da pesquisa serão submetidos não acarretarão qualquer risco, custo ou dano imediato ou potencial ao participante. Por outro lado, oferecem elevada possibilidade de gerar conhecimento em benefício na qualidade de vida e sobrevivência dos participantes da pesquisa, especialmente do bebê, quanto à tendência a ter infecções e resposta a vacinas.

6. Exclusões: recém-nascido portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave.

7. Compensação: não existem danos imediatos ou futuros previsíveis decorrentes da pesquisa, portanto, a mesma não inclui a possibilidade de indenização.

8. Confidencialidade dos registros: você tem direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá confidencial no âmbito possível da lei, assegurando proteção de sua imagem, sigilo e respeitando valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. Como condição de sua participação nesta pesquisa, você permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos neste estudo, aos membros da Comissão de Ética responsáveis pela análise do projeto. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

9. Direito em participar, recusar ou sair: ao participar, você concorda em cooperar com os procedimentos que foram executados e que foram descritos acima, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado. Sua participação neste estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito. O pesquisador tem o direito de desligá-la do estudo a qualquer momento que julgar necessário.

10. Contatos: ainda se houver qualquer dúvida sobre o estudo você poderá receber mais esclarecimentos falando com as médicas: Dr^a Irene Lorand-Metze e Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela.

Endereços:

1. HEMOCENTRO/UNICAMP. Rua Carlos Chagas, nº480. Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP 13083-970, fone: (XX19) 3788 86 71.
2. Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)/FCM/UCAMP, Campinas, SP. CEP 13083-970, fone: (XX19) 3788 89 58 ou 3788 89 59.
3. Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP 13084-971, CX Postal 6111, fone (XX19) 3788 89 36 ou 3788 71 87.

Pesquisa: Maturação de Células B em Sangue de Cordão Umbilical de Crianças Expostas ao HIV Durante a Gestação

CONSENTIMENTO INFORMADO

Li a descrição do estudo de pesquisa, que foi explicado dentro da minha compreensão e também conversei sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Compreendo que minha participação é voluntária e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejudicar ou influenciar os resultados. Confirmando também que recebi cópia deste termo de consentimento.

Autorizo a liberação dos dados obtidos neste estudo aos pesquisadores, aos membros da comissão de ética, assim como a publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos e jornadas científicas.

*Não assine este termo se não tiver tido a oportunidade de fazer perguntas e tiver recebido respostas satisfatórias a todas elas.

Nestes termos, concordo com a participação minha de meu (minha) filho (a) no estudo.

Assinatura do paciente ou responsável – data ____/____/____.

Consentimento livre e esclarecido

Nome da mãe

.....

Nome da criança

.....

Assinatura

.....

Nome do Pesquisador

.....

Assinatura

.....

Apêndice III

QUESTIONÁRIO

DATA: ____/____/____

FICHA N°: ____

CASO: (1)

CONTROLE: (2)

CAISM: (1)

MATERNIDADE DE CAMPINAS: (2)

- Nome mãe: _____ Prontuário: _____
 Apelido: _____ idade: _____
 Estado civil: com companheiro fixo ⁽¹⁾ sem companheiro fixo ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾
 Escolaridade da mãe (em anos de estudo concluídos): _____
 Ocupação da mãe: _____
- Nome do pai: _____
 Apelido: _____ idade: _____
 Escolaridade do pai (em anos de estudo concluídos): _____
 Ocupação do pai: _____
- Endereço: _____
 Referência: _____
 Bairro: _____ CEP: _____
 Fone: _____ Celular: _____
 Contato para recado: _____
- Renda familiar: _____
 Mês/ano referência: _____
- N° de pessoas que usufruem a renda: _____
- N° de filhos vivos: _____ n° de filhos mortos: _____
- Duração da gestação (em semanas): _____
- Tipo de parto _____
- Tipo de gravidez: única ⁽¹⁾ gemelar ⁽²⁾ outras ⁽³⁾ ignorado ⁽⁹⁾
- N° de consultas pré-natal: _____
- Intercorrências gestacionais _____
- História pessoal: hepatite: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ Qual? _____
 Tuberculose: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ Quando? _____
 Tuberculose: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ Quem? _____
 É bacilífero: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾
- Imunização (quais e datas?): _____
- Tabagismo: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ tempo: _____ n°/dia: _____
- Álcool: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ tempo: _____
- Outras drogas ilícitas: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾ Quais? _____
- História familiar: imunodeficiência primária: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾
 Tuberculose em atividade: sim ⁽¹⁾ não ⁽²⁾ FI ⁽⁹⁾
- Sorologias:

	HIV	HEPATITE B	LUES	CARGA VIRAL	
DATA 1					
DATA 2					

Apêndice IV

Recém-nascido

DATA: ____/____/____

FICHA N°: ____

CASO: (1)

CONTROLE: (2)

CAISM: (1)

MATERNIDADE DE CAMPINAS: (2)

Nome

RN: _____prontuário: _____

Data de nascimento: ____/____/____ sexo: masculino⁽¹⁾ feminino⁽²⁾

Apgar: _____ Raça: caucasóide⁽¹⁾ negróide⁽²⁾ amarela⁽³⁾ parda⁽⁴⁾ indígena⁽⁵⁾

Peso ao nascer: _____ comprimento: _____ PC: _____ capurro: _____