

Prémio Thomé Villar / Boehringer Ingelheim 2005 (Secção A)

Thomé Villar / Boehringer Ingelheim Award 2005 (Section A)

Maria Alcide Tavares Marques¹
Vera Alves²
Victor Duque³
M Filomena Botelho⁴

Pulmão profundo – Reacção celular ao VIH

Deep lung – Cellular reaction to HIV

Recebido para publicação/received for publication: 06.12.10

Aceite para publicação/accepted for publication: 06.12.19

Resumo

A evolução da infecção VIH é caracterizada por uma grande variabilidade individual. Na verdade, como em outros processos da mesma natureza, depende largamente das complexas inter-relações que num dado momento se estabelecem entre o hospedeiro e o agente agressor. Contudo, nesta infecção, essa correlação assume um papel determinante. Desde o início da pandemia que o pulmão se assumiu como alvo preferencial de complicações, quer de origem infecciosa quer de outras etiologias. A esta inevitabilidade biológica diríamos não serem de facto estranhas as características anatomo-funcionais do órgão, enquanto interface privilegiada entre o meio interno e o ambiente exterior, aliadas a particularidades de ordem imunológica que o tornam, sob muitos aspectos, um órgão único.

Cedo se constatou que esta infecção se acompanhava de uma disfunção imunológica progressiva que culminava na completa exaustão deste sistema nas fases terminais da doença. Desde o reconhecimento da SIDA até à presente data foram sendo adquiridos enormes conhecimentos não só em relação ao vírus, como aos seus mecanis-

Abstract

The course of HIV infection is accompanied by a wide individual variability. The complex and large interplay between host and viral factors is crucial in the disease's evolution. The lung has been recognised from the beginning of the disease as one of the main targets of infectious and non-infectious complications of AIDS. In this setting both anatomic and immunologic particularities of this organ play an important role.

The hallmark of HIV is progressive immune dysfunction. Despite the intensive research into the pathogenesis, several questions remain to be answered on the dynamic effects of HIV on pulmonary cells. Previous studies in which we have participated showed the early presence of lymphocytic alveolitis from the asymptomatic phase of infection. Since then, many collected data has brought new insights into the immune and biochemical mechanisms involving HIV cell entry, as well as target cells, cytokines and other cellular mediators.

¹ Departamento de Ciências Pneumológicas e Alergológicas dos Hospitais da Universidade de Coimbra (Director: Prof. Doutor M Fontes Baganha)

² Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra (Director: Prof. Doutor Santos Rosa)

³ Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra (Director: Prof. Doutor Meliço Silvestre)

⁴ Instituto de Biofísica/Biomatemática da Faculdade de Medicina de Coimbra (Directora: Prof.ª Doutora M Filomena Botelho)

mos patogénicos, no entanto subsistem ainda numerosas questões para as quais o estado da arte ainda não dispõe de respostas. Nessas incluíamos os efeitos do VIH na dinâmica celular do pulmão. Vários estudos efectuados, nos quais tivemos oportunidade de participar, demonstraram a presença de uma alveolite linfocitária durante a fase assintomática da infecção. Desde essa altura têm-se vindo a adquirir novos conhecimentos relativos aos mecanismos imunológicos e bioquímicos subjacentes à entrada do VIH nas células, às células-alvo, ao microambiente citotónico, assim como de outros mediadores celulares envolvidos. Neste contexto, a descoberta de que receptores específicos de quimiocinas actuavam como co-receptores para o VIH abriu definitivamente um novo capítulo na investigação dirigida aos mecanismos responsáveis pelo tropismo viral e infecção celular. Neste âmbito, vários autores têm salientado a importância, para além da molécula CD4, dos receptores quimiocínicos CCR5 e CXCR4 na ligação e, posteriormente, na entrada do vírus nas células, reconhecendo-se em relação ao primeiro uma importância fundamental na transmissão da infecção, enquanto que o CXCR4 parece ser utilizado por estirpes virais que emergem tardiamente no decurso da doença, quer isoladamente, quer em associação com o CCR5.

Objectivo: O nosso estudo dirigiu-se fundamentalmente à avaliação da dinâmica celular do pulmão profundo em doentes com SIDA, abrangendo a determinação das cargas virais no líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA), a celularidade envolvida nos mecanismos de defesa desse território e tropismo viral, através dos receptores quimiocínicos CCR5 e CXCR4.

Material: Estudámos 14 doentes portadores de SIDA, com uma média de idades de $39 \pm 14,3$ anos (9 homens e 5 mulheres) todos infectados pelo VIH1, heterossexuais, dos quais 6 eram fumadores e 8 não fumadores, e sem antecedentes de toxicodependência. Estes doentes foram referenciados pelo Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra para a realiza-

In this context, the discovery that specific chemokine receptors could act as co-receptors for HIV, allowed a better understanding of the mechanisms underlying viral cellular entry and tropism. On this issue several authors have reported that in addition to the CD4 molecule, most strains of HIV use the chemokine receptor CCR5 for viral attachment and entry into the host cells. This receptor seems to be very important in disease transmission, whereas CXCR4 receptor tends to be used by the viral strains that emerge later in the disease in addition to or instead of the CCR5.

Aims: To evaluate the pulmonary cellular dynamics in AIDS patients regarding the viral load in bronchoalveolar lavage fluid (LLBA), as well as cellularity and tropism through CCR5 and CXCR4 receptors.

Material: 14 AIDS patients were enrolled in this study, with a mean age of 39 ± 14.3 years (9 males and 5 females) all HIV1, heterosexuals, 6 smokers and 8 non-smokers, none of them drug addicts. These patients were referred to bronchoscopy with BAL, for clinical suspicion of opportunistic lung infections. These patients were later divided into two groups: Group I (recent diagnosis) and Group II (non-recent diagnosis). While all patients had AIDS, group I had also recent diagnosis of opportunistic infections and had not received yet anti-retroviral therapy whilst group II had a long-term disease evolution with several opportunistic episodes and anti-retroviral therapeutic.

Methods: BAL was performed both in the middle bronchus in diffuse or in other segmentar bronchus, depending on radiographic abnormalities. Plasma viral load was performed through PCR-RT in blood samples with EDTA, centrifuged and frozen (-80° Celsius) in the first 4 hours after being collected. The viral load in BALf was quantified in 9 patients using the automatized Cobas Ampliprep/Cobas Amplicor HIV1 Monitor TM Test, version 1.5 Roche Diag-

ção de broncofibroscopia e lavagem broncoalveolar (LBA), por suspeita clínica de infecção pulmonar oportunista. Posteriormente, este conjunto de doentes seria dividido e analisado em dois grupos: Grupo I, designado por diagnóstico recente e Grupo II, englobando os de diagnóstico não recente. De facto, embora todos estes doentes fossem portadores de SIDA, a Amostra Clínica era constituída por indivíduos com infecções oportunistas de diagnóstico recente, nos quais ainda não tinha sido instituída terapêutica anti-retroviral, primeiro grupo, enquanto o segundo grupo incluía doentes com doença mais prolongada, com vários episódios infecciosos oportunistas e tratamento anti-retroviral, para além de outros esquemas terapêuticos.

Métodos: Todos os doentes após, consentimento informado, foram submetidos a exame broncoendoscópico e LBA, após anestesia local da orofaringe e cordas vocais com lidocaína a 2%, sob monitorização cardíaco-respiratória. O LBA foi efectuado com base nas alterações evidenciadas pela telerradiografia do tórax: lobo médio nas lesões difusas, ou outro brônquio segmentar correspondente a alterações radiológicas localizadas

A determinação das cargas virais no líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA), em 9 doentes, foi efectuada pela quantificação do ARN-VIH1, através de PCR-RT, nas primeiras 4 horas após a colheita (sendo cada amostra centrifugada), procedendo-se posteriormente nas aliquotas do sobrenadante à congelação a menos 80° C, até à extracção e amplificação dos ácidos nucleicos. Realizou-se igualmente, na totalidade da amostra, a determinação das viremias plasmáticas (14 doentes), a partir de amostras de sangue colhido em EDTA, com processamento ulterior (separação do plasma e congelamento a menos 80°C). A extração e amplificação dos ácidos nucleicos foi efectuada por um método automatizado *Cobas Ampliprep/Cobas Amplicor HIV1 Monitor TM Test, version 1.5 Roche Diagnostic Systems*. Este método permite a obtenção duma sequência de 155 nucleótidos situada numa região altamente conservada do gene *gag*. Os resultados foram observados numa escala numérica com

nostic Systems. The results were expressed in a numeric scale, with a dynamic variation of 50-750.000 copies of RNA HIV1/cm³ and later converted into a logarithmic scale.

In 10 patients an immunological study was carried out in BALf and blood to quantify the lymphocyte populations and subsets (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 and CD56CD8) as well as the receptors CD3CCR5, CD4CCR5, CD8CCR5, CCR5Mø, CXCR4, CD3CXCR4, CXCR4CD14 and co-stimulatory molecule CD28, CD3CD28, CD4CD28, CD8CD28 through monoclonal antibodies – CD8FITC, CD19FITC, CD3PE, CD56PE, CD4PECY5-Lymphogram Cytognos; CCR5PE, CXCRFITC-R & D Systems; CD8Cy5 and CD3Cy5-DaKo, CD4PE, CD14PE, CD28FITC-Immunotech; CD4FITC-CLB, CD8Percp- Beckton Dickinson and CD3 APC – Beckton Dickinson, by flow cytometry (Facs Calibur-Beckton-Dickinson) with 3 or 4 fluorescences – FL1-FITC, FL2-PE, FL3-PECY, FL4-APC. In the statistical analysis, we used the Student *t*-test, and linear correlation.

Results: Presence of HIV1 in BALf ($2.95 \log \pm 3.08 \log$), in small levels compared with plasma viral loads ($5.89 \log \pm 5.90 \log$) (Table IV). There was great variability of viral loads in BALf as there was in blood independent of the time elapsed between diagnosis and the exam.

As for the lymphocytic populations and subsets in blood (Table V) determined in 13 patients, there was a significant fall of total lymphocytes as well as of their subsets, although more marked in CD4 cells; 42.9% had CD4 levels < 50 cels/mm³ and only 2 patients (n° 12, 13) had CD4 > 250 cels/mm³. The CD19 was reduced with an individual distribution similar to the CD4 subset. In most cases, the fall of CD8 accompanied the decrease of CD4 and CD19 (patients-n° 7 and 8). The lymphocyte populations

uma variação dinâmica situada entre as 50 e 750 000 cópias de ARN VIH1/cm³, procedendo-se posteriormente à sua conversão logarítmica.

No LLBA (10 doentes) e no sangue (13 doentes) foi efectuado um estudo imunológico, dirigido à quantificação das populações e subpopulações linfocitárias: CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 e CD56CD8, assim como dos receptores: CD3CCR5, CD4CCR5, CD8CCR5, CCR5Mø, CXCR4, CD3CXCR4, CXCR4CD14 e da molécula de co-estimulação CD28, CD3CD28, CD4CD28, CD8CD28 através de anticorpos monoclonais – CD8FITC, CD19FITC, CD3PE, CD56PE, CD4PECY5-Lymphogram Cytognos; CCR5PE, CXCRFITC-R & D Systems; CD8Cy5 e CD3Cy5 - DaKo, CD4PE, CD14PE, CD28FITC – Immunotech; CD4FITC-CLB, CD8Percp – Beckton Dickinson e CD3 APC – Beckton Dickinson, por citometria de fluxo (*Facs Calibur-Beckton-Dickinson*) a 3 ou 4 fluorescências – FL1-FITC, FL2-PE, FL3-PECY, FL4-APC. Na análise estatística dos resultados foram utilizados os testes *t*-Student e de correlação linear.

Resultados: Salientamos os seguintes: presença do vírus no LLBA (2,95 log ± 3,08 log), embora em quantidades inferiores às detectadas no sangue (5,89 log ± 5,90) e grande variabilidade das cargas virais, tanto no sangue como no LLBA, independente do período de tempo entre o diagnóstico e a realização do exame; as populações e subpopulações linfocitárias no sangue (Quadro V), em 13 doentes, mostraram uma queda acentuada, tanto dos linfócitos totais como das suas populações e subpopulações, que atingia maior expressão nas células T-CD4. Apenas em 2 casos (doentes n.ºs 12 e 13) esta subpopulação era superior a 250 células/mm³ e em 42,9% era inferior a 50 células/mm³. A população CD19 encontrava-se igualmente em níveis inferiores ao normal com uma distribuição individual semelhante à da subpopulação CD4. Na maior parte dos casos, a diminuição dos CD8 acompanhava a redução dos CD4 e CD19 (doentes n.ºs 7 e 8); na LLBA (Quadro VI), o estudo das populações e subpopulações linfocitárias (10 doentes) revelou uma distribuição percentual seme-

and subsets in BALf (10 patients) (Table VI) showed a percentual distribution similar to that observed in blood (Table VII) for CD3, CD19, CD4 and CD8 lymphocytes, although the percentage of T cells was higher than in blood ($94.5 \pm 5 / 84.1 \pm 10.4$) as opposed to B cells ($2.2 \pm 3 / 10.4 \pm 9.6$). In BALf CD8 T cells were higher than in blood ($77.7 \pm 17.6 / 67.6 \pm 4.2$), which was not observed for the CD4 lymphocytes (8.1 ± 9.5 BALf *vs.* 10.4 ± 9.6 in blood). The natural killer activity expressed by CD56 T cells had important individual variations in both biological fluids: higher levels in blood than in BALf ($9.1 \pm 8 / 2.9 \pm 1.9$). The cytotoxic activity of CD56CD8 was similar in blood and in BALf ($2.2 \pm 2 / 1.7 \pm 1.2$) while the individual distribution seemed more homogeneous in BALf (Table VI) than in blood (Table VII). The double-negative (DN) cells had slightly higher values in BALf (7.6 ± 4.5 *vs.* 5.6 ± 5.3). Curiously, in BALf we observed a higher percentage of less differentiated cells (13 ± 13.6) (Table VI). The analysis of the receptors CCR5 and CXCR4 showed in general terms different behaviour concerning the two biological means (Tables VI and VII). Thus, the CCR5 CD3 was higher in blood (10.9 ± 13.2) than in BALf ($8.4 \pm \pm 3.5$) while the CCR5 CD4 and CCR5 CD8 had an increased expression in BALf in relation to blood (2 ± 2.3 and $4.9 \pm 3.7 / 0.9 \pm 0.7$ and 4.1 ± 4.0 respectively). Concerning the expression of this receptor on monocyte macrophage lineage a marked higher value was attained in BALf ($77.8 \pm \pm 41$ in BALf *vs.* 18.7 ± 15 in blood). On the contrary the total expression of CXCR4 was higher in BALf (31 ± 19.9) than in blood ($16.4 \pm \pm 8.1$). This tendency extended equally to the T lymphocytes (26.6 ± 19.8 *vs.* 10.7 ± 7.6) and also to the monocyte-macrophage lineage in an exuberant manner ($84.5 \pm 30.2 / 4.8 \pm 4.6$). The co-

lhante à que foi observada no sangue (Quadro VII) em relação às células CD3, CD19, CD4 e CD8, embora no LLBA a percentagem de linfócitos-T fosse superior neste meio em relação ao sangue ($94,5 \pm 5 / 84,1 \pm 10,4$), ao contrário do que se observou nos linfócitos-B ($2,2 \pm 3 / 10,4 \pm 9,6$). Também no LLBA se verificou uma percentagem mais elevada de linfócitos-T CD8 do que no sangue ($77,7 \pm 17,6 / 67,6 \pm 4,2$), o que não se observou em relação às células T-CD4 ($8,1 \pm 9,5$ LLBA *vs.* $10,4 \pm 9,6$ no sangue); a actividade *natural killer* (NK) expressa pelas células T CD56 apresentava importantes variações individuais em ambos os meios, mas com valores mais elevados no sangue do que no LLBA ($9,1 \pm 8 / 2,9 \pm 1,9$); quanto à actividade citotóxica avaliada através das células CD56CD8, era similar no LLBA e no sangue ($2,2 \pm 2 / 1,7 \pm 1,2$), parecendo, contudo, que a distribuição individual era mais homogênea no primeiros destes meios (Quadros VI e VII); as células duplamente negativas (DN) apresentavam-se com valores ligeiramente mais elevados no LLBA ($7,6 \pm 4,5$ *vs.* $5,6 \pm 5,3$). Curiosamente, neste meio observa-se uma percentagem elevada das células menos diferenciadas ($13 \pm 13,6$) (Quadro VI). A análise dos receptores celulares CCR5 e CXCR4 mostrou, em termos globais e médios, diferentes comportamentos entre si e em relação aos meios biológicos (Quadros VI e VII). Assim, o CCR5 CD3 era mais elevado no sangue ($10,9 \pm 13,2$) do que no LLBA ($8,4 \pm 3,5$); no entanto, o CCR5 CD4 e a CCR5 CD8 encontravam-se em maior percentagem no LLBA do que no sangue ($2 \pm 2,3$ e $4,9 \pm 3,7 / 0,9 \pm 0,7$ e $4,1 \pm 4,0$ respectivamente). No que diz respeito aos valores deste receptor na linha monocítica-macrofágica ele apresentava-se muito mais elevados no LLBA ($77,8 \pm 41$ no LLBA *vs.* $18,7 \pm 15$ no sangue). Pelo contrário, o CXCR4 total era mais elevado no LLBA $31 \pm 19,9$ do que no sangue ($16,4 \pm 8,1$); esta tendência manifestava-se igualmente em relação aos linfócitos-T ($26,6 \pm 19,8$ *vs.* $10,7 \pm 7,6$) e à linha monocítica-macrofágica, aliás, de uma forma exuberante ($84,5 \pm 30,2 / 4,8 \pm 4,6$). A actividade co-estimulatória CD28 mostrou-se superior no sangue ($22,8 \pm 16,2$) em comparação com o LLBA ($15,9 \pm 10,1$) para as células T

stimulatory activity of CD28 showed higher values in blood (22.8 ± 16.2) than in BALf (15.9 ± 10.1) for total T cells, CD4 and CD8 lymphocytes 22.5 ± 16.7 ; 7.8 ± 8.3 ; $13.3 \pm 8.3 / 16.5 \pm 10.5$; 2.9 ± 2.8 ; 10.8 ± 8.0 respectively).

Conclusions: 1. HIV infection is responsible for important and extensive abnormalities in lung host defences.

2. The complex interaction between host and aggressor as well as the immune response particularly represented by natural killer and cytotoxic activities, apoptosis, and opportunistic diseases or others, therapeutics and other factors may contribute to the difficulty in obtaining homogenous medical samples within research. There are also ethical issues that restrict a purely scientific approach to these patients.

3. These results point to a pulmonary response to HIV in a compartmentalised fashion according to the dynamic cellular elements involved and receptors in which the latter had distinct profiles related to the biological fluids. In this context, the lung compartmental response is particularly dependent on alveolar macrophages activity which is from the beginning the cornerstone of this process and is the last cellular defense mechanism in this territory when all others are profoundly affected.

4. The dynamics of chemokines receptors may be very important in therapeutic approach as the blockage of the CCR5 receptor does not seem to trigger an increased expression of CXCR4 strains. In fact, we found that CXCR4 remained high in monocyte-macrophage cells throughout infection and its expression was increased in T-lymphocytes in Group II patients as opposed to CCR5 behavior in BALf which significantly decreases. However, in blood, CCR5 expression increased, unlike CXCR4.

5. Due to high co-existing opportunistic infections (71.4%) we cannot ignore the hypothesis that this increased expression of CXCR4 was a result of the modulation induced by opportunistic agents.

totais, CD4 e CD8 ($22,5 \pm 16,7$; $7,8 \pm 8,3$; $13,3 \pm 8,3$ / $16,5 \pm 10,5$; $2,9 \pm 2,8$; $10,8 \pm 8,0$, respectivamente).

Conclusões: 1. A infecção VIH é reponsável por extensas e diversificadas alterações nos mecanismos de defesa do pulmão profundo.

2. A complexa interacção entre o hospedeiro e o agente agressor, bem como a resposta imunológica, particularmente a *natural killer* e citotóxica, apoptose e doenças oportunistas, ou outras, podem dificultar a obtenção de amostras médicas homogêneas. Para além disso, considerações de ordem ética restringem, naturalmente, a abordagem destes doentes com finalidades exclusivamente científicas.

3. Os resultados obtidos apontam tendencialmente para uma resposta pulmonar compartimentada à agressão VIH, com base na dinâmica celular envolvida e no perfil dos receptores encontrado nos líquidos biológicos estudados. Neste contexto, esta compartimentação parece estar particularmente na dependência da actividade dos macrófagos alveolares que constituem, desde o início, o eixo fundamental destes processos, representando o último mecanismo celular de defesa deste território, quando os outros estão já profundamente alterados.

4. O estudo da dinâmica dos receptores quimioquímicos pode vir a ter importantes implicações terapêuticas. De facto, foi já demonstrado que o bloqueio do receptor CCR5 não foi acompanhado por um aumento da expressão do receptor CXCR4. Neste estudo tivemos oportunidade de verificar que o CXCR4 se manteve elevado nas células monocíticas-macrofágicas durante a doença, aumentando a sua expressão nos linfócitos T nos doentes do Grupo II, ao contrário do comportamento do CCR5 no LLBA, que diminuía significativamente. No sangue, porém, a expressão do CCR5 aumentava.

5. A elevada co-existência de infecções oportunistas (71,4%) leva-nos a colocar a hipótese de que a modulação induzida pelos germes possa contribuir para a elevada expressão do CXCR4.

6. Finally, this striking individual variability undoubtedly has clinical implications. This makes a case-by-case management strategy the correct approach.

Rev Port Pneumol 2007; XIII (2): 175-212

Key-words: Bronchoalveolar lavage, AIDS, cellularity, CCR5 and CXCR4 receptors.

6. Finalmente, esta tão marcada variabilidade individual tem indiscutivelmente implicações clínicas. Em termos gerais, podemos dizer que, para uma mais correcta abordagem terapêutica, cada doente deve ser prévia e individualmente analisado neste contexto.

Rev Port Pneumol 2007; XIII (2): 175-212

Palavras-chave: Lavagem broncoalveolar, SIDA, celularidade, receptores CCR5 e CXCR4.

Introdução

Há mais de duas décadas que foi reconhecida a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), uma das piores epidemias da história humana recente, encarada por alguns como a *praga do século XX*, tendo em conta a enorme mortalidade de que se tem feito acompanhar, responsável, ainda em 2003 (UNAIDS/WHO 2003)¹, por 3 milhões de mortos em todo o mundo e por 5 milhões de novos casos, a que se associa o seu impacto social, cultural e económico.

A nível científico, porém, este desafio tem-se traduzido por um esforço imenso na aquisição de novos conhecimentos nos vários ramos do saber e por alterações substanciais nos cuidados clínicos, no enquadramento legal, nas estratégias globais de saúde dos diversos países, bem como, a um patamar mais nuclear e conceptual, na própria medicina, para a qual o binómio doença/órgão começa a dar lugar ao reconhecimento mais *integralista*, diríamos, de mecanismos comuns das doenças, espelhando bem o desejo de equilíbrio entre o poder da ciência e o humanismo da medicina moderna.

Desde o início da epidemia de SIDA, em 1981, se reconheceu que o pulmão constituía um dos principais órgãos-alvo, sede de infecções oportunistas e de processos tumorais.

Durante essa década, a par da investigação dirigida à síntese de medicamentos anti-retrovirais, com base nos conhecimentos que foram sendo adquiridos acerca da biologia e da caracterização molecular do vírus, a profilaxia de certas infecções oportunistas marcaram de forma significativa a abordagem estratégica desta infecção, contribuindo de uma forma directa e decisiva para a redução da morbilidade. A utilização mais recente, na década de noventa, da designada terapêutica anti-retroviral de alta potência (HAART) viria a ter um profundo impacto na história natural da doença, quer em termos de morbilidade quer de mortalidade.

Num estudo epidemiológico realizado em França em 1998², constatou-se que a incidência de pneumonia a *Pneumocystis jirovecii* por 10 000 pessoas/ano passou de 174, em 1995, para 47 em 1998; ainda no mesmo período de tempo, pôde verificar-se uma

A síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), uma das piores epidemias da história humana recente

**A pneumonia
a *Pneumocystis*
jiroveci foi
menos frequente
na era HAART**

redução nas incidências de doença a citomegalovírus (CMV), *Mycobacterium avium complex* (MAC), toxoplasmose e sarcoma de Kaposi. O mesmo estudo mostrou, igualmente, que outras infecções oportunistas que ocorrem com graus mais acentuados de imunossupressão atingiam quase que exclusivamente doentes que não tinham sido sujeitos a terapêutica anti-retroviral potente ou aqueles em que esta não foi eficaz. Também numa outra análise retrospectiva efectuada nos Estados Unidos³, a pneumonia a *Pneumocystis jiroveci* foi menos frequente na era HAART, em comparação com o período pré-HAART; pelo contrário, as pneumonias bacterianas e os linfomas não Hodgkin parecem ter sido mais frequentes durante a utilização de anti-retrovirais potentes (15 vezes superior, neste último caso), o que foi atribuído pelos autores a uma estimulação das células B, persistentemente mantida durante a terapêutica, ou à existência de anormalias do sistema imunológico recentemente restaurado. Um dado favorável a esta explicação parece residir na elevada frequência com que estes doentes são atingidos por infecções prévias a CMV, as quais constituem um marcador do importante grau de imunossupressão; neste contexto, a recuperação imunológica far-se-ia de forma *defeituosa* ou incompleta, colocando estes doentes num risco acrescido para o desenvolvimento destas neoplasias.

Em relação à tuberculose, na ausência de terapêutica anti-retrovírica potente, os doentes co-infectados com VIH e *Mycobacterium tuberculosis* apresentam, na sua forma latente, um risco elevado (cerca de 10%/ano) de virem a desenvolver uma tuberculose activa, contrariamente ao que se observa em indivíduos seronegativos, a

qual ronda os 10% durante toda a vida. Esta maior incidência de tuberculose pulmonar na infecção VIH prende-se, naturalmente, com as alterações da imunidade celular induzidas por esta última. Neste contexto, o γ INF é a citocina efectora mais importante na resposta imune ao bacilo de Koch; produzida por linfócitos T (CD4 e CD8), induz a activação dos macrófagos, que, por um lado, desencadeiam a libertação de radicais oxidantes, responsáveis pela morte intracelular ou pela inibição do crescimento micobacteriano, e, por outro, o aumento da expressão de moléculas da classe II do MHC (*major histocompatibility complex*) e da produção do factor de necrose tumoral (TNF). Aliás, estudos efectuados em doentes com SIDA⁴ revelaram baixos níveis de γ INF, o que pode estar em relação directa com o aumento de incidência da tuberculose nestes doentes. Neste âmbito, a HAART, ao promover o aumento numérico e funcional dos linfócitos T-CD4, favorecendo eventualmente o estabelecimento de uma resposta Th1 aos antígenos micobacterianos, induz uma reacção granulomatosa do organismo tendente a conter a infecção⁵. Os mesmos autores⁴ demonstraram ainda que a HAART permite restaurar a resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis*, embora esta se processe de uma forma lenta e gradual (em comparação com a supressão da carga viral e com o aumento dos T-CD4 sanguíneos) e não chegue a atingir os níveis detectados em indivíduos seronegativos.

De facto, a tuberculose pulmonar pode sobrevir com graus modestos de imunodepressão, contrariamente ao observado noutras infecções oportunistas. Em França, Mayaud e Cadranel⁶ verificaram uma ra-

**O γ INF é a citocina
efectora mais
importante na
resposta imune
ao bacilo de Koch**

zoável diminuição da sua incidência nos seropositivos entre 1995 e 1998: 80 para 39 casos de tuberculose pulmonar e 51 para 33 casos de tuberculose extrapulmonar. Esta persistência da tuberculose parece resultar, segundo estes autores, de vários factores: por um lado, do seu aparecimento numa fase de imunossupressão moderada ($CD4 > 200$ cels/mm³), em relação à qual cerca de 16,4% das situações de tuberculosas pulmonar e extrapulmonar constituíram as manifestações inaugurais da SIDA; por outro como resultado do risco de nova infecção (reinfecção exógena).

Também sob o ponto de vista clínico, a infecção VIH veio modificar a *clássica* apresentação da tuberculose pulmonar; basta para tanto recordar que cerca de 35% dos doentes co-infectados têm radiografias torácicas normais, que 5% apresentam baciloscopias positivas com exames radiográficos inalterados, e que 72% dos doentes com $CD4 < 200$ cel/mm³ são anérgicos⁷.

Um outro aspecto que se prende, naturalmente, com a restauração imunológica consiste na interrupção da profilaxia face às infecções oportunistas. A este propósito, num estudo suíço alargado⁸ envolvendo um total de 2410 indivíduos infectados pelo VIH aos quais foi aplicada a HAART, e com um *follow-up* de 15 meses, os seus autores constataram que o risco de desenvolvimento de infecções oportunistas sob terapêutica anti-retrovírica potente é muito elevado nos meses iniciais de tratamento e que os factores preditivos da progressão da doença se encontravam relacionados com os níveis basais de CD4 e com a resposta virológica à terapêutica, chamando a atenção para uma cuidadosa vigilância dos doentes com taxas de CD4 inferiores ou iguais a $50 \times 10^6/\mu\text{L}$.

Assim, a HAART veio modificar o espectro das infecções oportunistas nos doentes que respondem ao tratamento, bem como a interrupção segura, quer da profilaxia primária, quer de secundária, contra alguns dos agentes infecciosos por elas responsáveis^{9,10}.

Porém, esta modalidade terapêutica originaria novas manifestações pulmonares no decurso do tratamento. Neste contexto, o aparecimento de reacções paradoxais despertou um justificado interesse, face aos problemas de ordem clínica e terapêutica que se lhe encontram associados. De entre os vários estudos publicados a este respeito, salientamos o de Narita¹¹, o qual refere a exacerbação transitória da sintomatologia e das lesões pulmonares tuberculosas em doentes sob terapêutica antibacilar e HAART; neste trabalho, o agravamento traduziu-se por hipertermia, linfadenopatias intratorácicas e cervicais, derrames pleurais, aumento das lesões radiológicas iniciais e/ou aparecimento de infiltrados miliares. Estas reacções têm sido atribuídas a causas imunológicas e teriam por base uma poderosa resposta de hipersensibilidade retardada, uma diminuição dos mecanismos de supressão e/ou um aumento da exposição a antígenos micobacterianos decorrente da actividade microbicida dos antibacilares. Tais situações observavam-se cerca de duas semanas após o início do tratamento anti-retroviral. Por outro lado, os doentes que eram anérgicos no início do tratamento exibiam, durante a fase de agravamento, reacções positivas à prova de Mantoux. Nestas circunstâncias, diversos autores viriam a propor a interrupção temporária da terapêutica anti-retroviral ou antituberculosa nas situações mais graves de linfadenopatias compressivas ou de outras lesões responsáveis por sintomas significativos, conse-

Sob o ponto de vista clínico, a infecção VIH veio modificar a clássica apresentação da tuberculose pulmonar

A HAART veio modificar o espectro das infecções oportunistas nos doentes que respondem ao tratamento

lhando, ainda, o recurso a ciclos curtos de corticoterapia.

Ainda neste âmbito, tem vindo a ser referenciado o desencadeamento de doenças pulmonares granulomatosas – *sarcoidose-like* em doentes sob o efeito da HAART. Nacache¹² refere dois casos de sarcoidose diagnosticados dois anos e meio após o reconhecimento da infecção VIH num doente, e oito anos, no segundo, os quais se encontravam sob HAART. Nestas situações, a análise do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) revelou a presença de uma alveolite linfocitária CD4 e de uma elevação significativa da relação CD4/CD8 em relação ao sangue, a par de uma elevação da SACE e de uma infiltração granulomatosa identificada nas amostras histopatológicas obtidas através de biópsias brônquicas e pulmonares transbrônquicas. O mecanismo patogénico subjacente afigura-se similar ao invocado para os agravamentos paradoxais da tuberculose: o(s) eventuais antígeno(s) *responsáveis* pela sarcoidose, já presentes nos indivíduos infectados pelo VIH com baixos níveis de CD4, seriam, nestas circunstâncias, insuficientes para induzirem uma resposta granulomatosa até que a terapêutica anti-retroviral potente veio permitir a sua expressão. Outros autores¹³ citam dois casos de sarcoidose recorrente em doentes seropositivos para o VIH sob HAART, com antecedentes de sarcoidose assintomática desde há décadas, para a qual não efectuaram qualquer tipo de tratamento, e que dois anos, num dos casos, e alguns meses, no outro, desenvolveram, após terem iniciado o tratamento, um quadro de infiltrados pulmonares bilaterais, com níveis de CD4 de 253 cel/mm³ e de 371 cel/mm³, respectivamente. Estes doentes apresentavam pa-

drões funcionais respiratórios restritivos e a presença de granulomas não caseosos nas biópsias pulmonares, tendo iniciado corticoterapia da qual resultaram melhorias clínica, radiológica e funcional. Os autores responsáveis por esta descrição chamam ainda a atenção para a frequência com que estes doentes com infiltrados pulmonares e insuficiência respiratória são rotulados como portadores de pneumonias a *Pneumocystis jiroveci*, ou adquiridas na comunidade, sem serem sujeitos a uma investigação diagnóstica mais exaustiva, sobretudo quando apresentam nos seus antecedentes patologias susceptíveis de serem influenciadas pela terapêutica anti-retroviral.

Nestas circunstâncias, a panorâmica geral da infecção modificou-se, sobretudo nos países com recursos económicos mais alargados e com sistemas de saúde bem implantados no terreno. Contudo, nos países pobres a infecção pelo VIH, a par de outras, não só tratáveis como curáveis, continua a constituir um flagelo para milhões de seres humanos.

Resposta imunológica do pulmão profundo à infecção VIH

O aparelho respiratório constitui a maior interface entre o ambiente externo e o meio interno. Na realidade, a mucosa que o recobre corresponde a uma superfície de cerca de 140 m², o que, aliado à sua composição estrutural, justifica o facto de poder ser considerado, também, um órgão mucoso. Apesar dessa extensa exposição ao ar ambiente, em condições normais ele mantém-se notavelmente estéril, não só por ser detentor de engenhosas barreiras mecânicas, mas por possuir diversificados meios de defesa, entre os quais se destacam os celulares, alguns

Tem vindo a ser referenciado o desencadeamento de doenças pulmonares granulomatosas – sarcoidose-like em doentes sob o efeito da HAART

O aparelho respiratório constitui a maior interface entre o ambiente externo e o meio interno

deles altamente especializados e que asseguram a sua integridade morfo-funcional.

De entre estes últimos, os macrófagos, linfócitos e neutrófilos constituem a primeira linha de defesa celular, podendo sofrer processos de activação, migração e diferenciação em células efectoras especializadas quando estimuladas por agentes estranhos. A eficiência deste sistema é assegurada por um fluxo de células com origem na circulação sistémica ou na medula óssea. A comunicação celular tem por base uma rede complexa de citocinas que actuam não só como interlocutores celulares, mas igualmente como mediadores funcionais da proliferação, diferenciação e activação de células imunocompetentes¹⁴.

O sistema imunológico pulmonar inclui ainda estruturas linfóides e não linfóides privativas, organizadas ou difusamente dispersas no parênquima. Este tecido linfóide encontra-se representado por folículos distribuídos ao longo da árvore brônquica, os quais são constituídos por um centro germinativo de células B, rodeado por linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. Tanto os linfócitos como os macrófagos dispersos no tecido pulmonar podem encontrar-se, quer isolados, quer em pequenos agregados, distribuídos pela submucosa e pela lâmina própria. Estas células são igualmente detectadas entre as células epiteliais e no interstício pulmonar.

Os macrófagos alveolares representam a linhagem mononuclear fagocitária do pulmão; a maior parte deles provém de monócitos circulantes formados na medula óssea, os quais migram para o pulmão através das paredes alveolares, onde sofrem uma maturação¹⁴. Estes macrófagos alveolares têm particularidades importantes em relação aos de

outros tecidos¹⁴; entre elas salienta-se o facto de se localizarem estrategicamente na interface ar/tecido, pelo que se encontram permanentemente expostos aos antígenos inalados.

O *pool* macrofágico a nível pulmonar é regulado por vários factores, dos quais se destaca o *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Para além disso, estas células são atraídas aos locais de inflamação pelos seus mediadores e, igualmente, por produtos microbianos (endotoxinas), imuno-complexos, factores do complemento, leucotrienos, citocinas, etc. A sua enorme capacidade fagocitária passa, em algumas situações, pela estreita colaboração com as células T, sobretudo na remoção de agentes patogénicos intracelulares, após prévia ingestão por endocitose, seguida de degradação e transporte de parte desses produtos até à membrana celular, onde se ligam a moléculas da classe II do MHC, ou seja, à estrutura do macrófago apresentadora de antígenos ao receptor de linfócitos T, actuando, assim, nestas circunstâncias, como uma célula acessória. Segundo Agostini¹⁴, esses elementos celulares dispõem de receptores com alta afinidade para a porção Fc das imunoglobulinas G e E, bem como para o complemento. Em condições fisiológicas, uma pequena subpopulação de macrófagos (<5%)¹⁴ reage com os determinantes CD4, um dos principais receptores do VIH. Libertam ainda mediadores da resposta imunológica (factor de necrose tumoral α (TNF- α), IL1, IL6, IL8, γ -INF e GM-CSF, etc.), os quais desenvolvem a sua actividade através da expansão policlonal e do aumento das funções celulares efectoras.

Na coinfeção tuberculose/SIDA, o receptor CXCR4 encontra-se predominantemen-

Os macrófagos alveolares representam a linhagem mononuclear fagocitária do pulmão

**A tuberculose acelera
a progressão para
a SIDA**

te expresso nos macrófagos alveolares. Estudos *in vitro* demonstraram que a infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium tuberculosis* aumentava a expressão de CXCR4, enquanto *in vivo* a melhoria da doença a diminuía. No LLBA dos doentes com tuberculose pulmonar parece existirem níveis elevados de MIP 1 β , RANTES (CCL5) e CX3CL1 (fractalquina), mas não de SDF 1 α (*stromal-derived-factor-1 α*). A tuberculose criaria assim um ambiente propício à replicação viral através do aumento da expressão do CXCR4 nos macrófagos alveolares e à supressão do CCR5, influenciada pelo aumento da expressão de citocinas. Estas alterações explicariam a razão pela qual a tuberculose acelera a progressão para a SIDA¹⁵.

Quanto às células dendríticas, os agentes microbianos são reconhecidos pelos receptores *toll-like* (TLR)¹⁶ expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC), nas quais se incluem células dendríticas imaturas dos tecidos periféricos, fagócitos mononucleares, células de Langerhans da pele, etc. O reconhecimento do agente patogénico pelo TLR, a internalização, o processamento e a exposição ao MHC do antígeno microbiano processado levam à maturação das células dendríticas, as quais, seguidamente, migram para os gânglios linfáticos de drenagem. A maturação envolve ainda uma expressão aumentada de antígenos MHC e de receptores de quimiocinas inflamatórias (CCR1, CCR2, CCR5 e CCR6), assim como de moléculas co-estimuladoras e de adesão¹⁶. Por outro lado, ela encontra-se também associada ao aumento da secreção de citocinas inflamatórias (IL2, IL10, IL12, IL18, TNF- α) e de quimiocinas – proteína inflamatória do macrófago (MIP 1 α , MIP 1 β , MIP 2)⁽¹⁶⁾. *In vivo*, é possível reco-

nhecer alterações na produção de citocinas e quimiocinas por estes elementos celulares em diferentes fases da infecção VIH¹⁷. A capacidade de as células dendríticas maduras determinarem respostas do tipo Th1 ou Th2 depende do perfil de produção de citocinas e da interacção do receptor TLR com o agente microbiano¹⁸. A secreção de γ -INF pelos T-CD4 Th1 (bem como pelos T-CD8 e *natural killer*) conduz à activação de macrófagos e ao desencadeamento de uma potente resposta contra o agente patogénico intracelular, enquanto as células Th2, tipicamente produtoras IL4 e IL5, levam à produção de imunoglobulinas e à mudança de uma resposta IgG para IgE¹⁶.

Tanto as células dendríticas como as moléculas por elas libertadas constituem o elo de ligação entre as respostas imunes, inata e adquirida, contra agentes patogénicos invasores¹⁶. Em relação à infecção VIH, as células dendríticas desempenham um importante papel face à infecção ao nível da mucosa, por representarem um primeiro alvo para o vírus e, sobretudo, por permitirem a transmissão de estirpes R5 do VIH a células T-CD4 através da ligação dos viriões a moléculas de adesão específicas intercelulares. A interacção não determina a infecção destas células¹⁶, mas mascara e protege os viriões até que encontrem linfócitos T-CD4 e macrófagos altamente susceptíveis¹⁶.

O número e as funções das células dendríticas diminui durante a infecção, como consequência da *lise* mediada por linfócitos citotóxicos (CTL)¹⁹. *In vitro*, essas células podem ser infectadas tanto por estirpes R5 como por CXCR4 dependentes (X4), embora se observe apenas uma replicação eficiente com as R5. Ao longo da infecção VIH, vários autores puderam constatar mudanças na produ-

ção de citocinas e quimiocinas pelas células dendríticas¹⁷, bem como a sua recuperação, numérica e funcional, sob terapêutica anti-retroviral²⁰.

Os linfócitos pulmonares encontram-se, quer nos folículos onde os linfócitos B *naive* e os linfócitos T se diferenciam em linfócitos de memória e efectores, quer em circulação, respondendo quando reconhecem os antígenos. Sempre que um antígeno desconhecido franqueia as barreiras de defesa, inicia-se um processo complexo de comunicações entre as células acessórias dos folículos pulmonares, sobretudo as dendríticas e os linfócitos T-*naive*, levando à transformação destes em linfócitos-memória (CD45RO), os quais se dirigem aos locais de inflamação. O recrutamento linfocitário envolve a interacção de vários factores, como a integrina presente na superfície celular dos linfócitos, com ligandos expressos pelo endotélio inflamado, sabendo-se que tanto as citocinas (IL1, γ -INF e TNF- α) como os produtos bacterianos podem aumentar a expressão de moléculas de adesão a nível endotelial.

No território pulmonar, as células T, quando activadas, produzem um conjunto de linfocinas nas quais se incluem o γ -INF e a IL2, responsáveis por múltiplas actividades biológicas, entre as quais se destaca a replicação *in situ* das células T após estimulação antigénica. A IL2 é ainda indutora da síntese de anticorpos pelas células B e do aumento da capacidade citotóxica local; pensa-se, igualmente, que a sua influência se estende ainda aos macrófagos¹⁴, aumentando a expressão de GM-CSF.

Os linfócitos T-CD4 subdividem-se em dois tipos de células *helper*, designadas por Th1 e Th2, com base no perfil de produção de lin-

focinas. Assim, as células Th1 libertam IL2, IL12, γ -INF e TNF- β , enquanto as Th2 produzem IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13. Ambas podem segregar GM-CSF e IL3. Sob o ponto de vista funcional, Th1 encontram-se associados às respostas de hipersensibilidade retardada, promovem a síntese de IgG e, através do γ -INF, inibem a libertação de citocinas pelos linfócitos Th2 e a síntese de IgE; por seu lado, os Th2 são capazes de inibir os Th1 através da IL10¹⁴.

Na mucosa respiratória encontram-se ainda linfócitos citotóxicos específicos (CTL), activados por estimulação antigénica, e linfócitos *natural killer* (NK). Os citotóxicos reconhecem as células-alvo através da interacção molecular do seu receptor (TCR) com um peptídeo associado a uma molécula do MHC, geralmente da classe I no caso dos linfócitos citotóxicos CD8 e, mais raramente, da classe II. A diferenciação dos linfócitos T em células citotóxicas implica a expressão de genes codificadores de moléculas efectoras da *lise* celular (granzimas, perforinas) e a citotoxicidade exige um contacto membranar entre células efectoras e células-alvo associadas à presença de co-sinais produzidos pelas moléculas de aderência intercelulares²¹.

Um dos aspectos mais relevantes da infecção VIH prende-se com o estado de imunodeficiência que resulta da diminuição numérica e funcional dos linfócitos T-CD4 ao longo da doença. Com efeito, durante a infecção primária, a replicação viral incontroável determina: A activação da resposta imune de mediação celular, através do aumento quantitativo de linfócitos CD8 activados que expressam CD38, CD45RO e HLA-DR; a elevação das células NK; e o aumento das concentrações de citocinas, sobretudo do

No território pulmonar, as células T, quando activadas, produzem um conjunto de linfocinas

A diminuição dos linfócitos T-CD4 na infecção VIH é acompanhada por uma progressiva alteração da imunocompetência local

γ INF responsável pela expansão oligoclonal dos CD8. Estes aspectos caracterizam a resposta imunológica à infecção primária, mais tarde acompanhada pelo desenvolvimento da resposta humoral. Mas à medida que se vai assistindo à diminuição dos marcadores de activação, a doença progride para a fase crónica. Embora grande parte da replicação viral ocorra em linfócitos CD4 activados, o vírus pode infectar outras células relativamente inactivas e não replicativas, permitindo a emergência de outras infecções²². De facto, a diminuição dos linfócitos T-CD4 na infecção VIH é acompanhada por uma progressiva alteração da imunocompetência local, pelo aumento da susceptibilidade às infecções oportunistas e ao desenvolvimento de neoplasias. Esta depleção celular pode ter por base um excesso de destruição e/ou uma diminuição da produção de células T.

Entre os complexos mecanismos responsáveis pela diminuição destas células, é referido um aumento da apoptose dos CD4 e dos CD8, e, embora esta possa estar associada ao estado de contínua activação induzida pelo vírus, tal circunstância não permite, de *per se*, explicar o facto de só uma minoria dos linfócitos apoptóticos se encontrarem *fisicamente* infectados pelo VIH. A apoptose é o processo de morte celular programada, essencial à manutenção da homeostasia. Entre os vários mecanismos que para ela contribuem incluem-se: a activação imunológica crónica, a ligação da gp 120 ao receptor de CD4, o aumento da produção de ligandos citotóxicos ou de proteínas virais a monócitos, macrófagos, células B e, ainda, a acção de linfócitos T-CD8 que destroem CD4 não infectados, bem como o efeito citopático directo do próprio vírus. No entanto, a infecção de células não activadas

em repouso, como linfócitos e macrófagos, não desencadeia a apoptose; esta circunstância permite explicar o desenvolvimento de reservatórios virais.

As células *natural killer* constituem um elemento importante do sistema imunológico inato e, no homem, representam cerca de 15% dos linfócitos do sangue periférico. Contrariamente às células T e B, não possuem receptores antígeno-específicos²³, mas produzem várias citocinas e quimiocinas quando activadas, o que lhes permite modular outras células imunes e regular a hematopoiese. Uma das suas funções mais relevantes consiste na capacidade de *lisar* células malignas ou infectadas por vírus, sem prévia sensibilização. Inicialmente, pensava-se que esta população celular era relativamente homogénea; contudo, hoje reconhece-se que existem populações *natural killer* distintas com várias capacidades funcionais. Algumas destas células possuem fraca capacidade citotóxica, embora sejam fortes produtoras de citocinas, enquanto outras exibem, predominantemente, uma actividade citotóxica. Embora se possam encontrar nos tecidos, existem sobretudo em circulação, deslocando-se ao longo do endotélio vascular, onde exercem uma *função de patrulha*. Contrariamente aos linfócitos T, não possuem receptores antígeno-específicos, podendo ligar-se a outras células através de moléculas e destruí-las, aquando da libertação do conteúdo dos seus grânulos citolíticos (perforina, serina-protease, proteoglicanos) ou induzindo apoptose²⁴. Após exercerem a sua função citolítica, estão aptas a nova ligação e à destruição de outro alvo. Entre as citocinas que produzem contam-se o γ INF, o TNF α , a IL1, a IL5, a IL8, a IL10, o GM-CSF, e, ainda, quimiocinas como linfotactina α , MIP

As células natural killer constituem um elemento importante do sistema imunológico inato

1 α , MIP 1 β , RANTES, quimiocina derivada dos macrófagos (CCL22), defensinas e IL8. Podem ainda expressar vários receptores específicos para as quimiocinas – CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CX3CR1 –, bem como para as citocinas IL2, IL12, IL15, IL21 e γ INF.

Dado que os vírus não representam formas de vida autónoma, dependendo da maquinaria das células do hospedeiro para se poderem replicar, a defesa contra estes agentes passa pela destruição das células infectadas do hospedeiro²³. As principais células envolvidas no combate aos vírus são os linfócitos T e os NK. Na infecção VIH, as células CD4 *helper* são os principais alvos das estirpes T trópicas, sendo destruídas após a infecção. Como constituem o eixo fundamental da resposta imune adquirida, a sua depleção é responsável pelo estabelecimento de uma imunodeficiência grave, caracterizada pelo aparecimento de infecções oportunistas. Neste contexto, os monócitos e as células NK constituem as principais células efectoras inatas no combate às infecções virais. Os monócitos expressam CD4 em baixa densidade e são sensíveis à infecção pelo VIH, através de estirpes M trópicas. Quanto às células NK, embora tenha sido descrita em seres humanos²⁵ uma população de células com fenótipo CD4+NK que exibiam receptores CCR5 ou CXCR4 infectadas pelo VIH, a maioria delas são CD4- e resistem à infecção VIH. A diminuição do número destes elementos celulares no sangue de doentes seropositivos para o VIH está geralmente associada a uma rápida progressão da doença, o que atesta a importância funcional destas células no controlo da infecção. Por outro lado, a função NK é regulada, habitualmente, a partir de receptores da classe I do

MHC; ora, o VIH1 parece diminuir a expressão MHC 1 na superfície das células do hospedeiro através das moléculas Vpu e Nef²⁶, suspeitando-se de que se trate de uma adaptação do vírus para escapar à acção citotóxica das células T que requerem a apresentação de antígenos específicos no contexto das moléculas da classe I do MHC. Esta alteração desequilibra o balanço entre sinais de activação e de inibição, tornando as células do hospedeiro susceptíveis à acção lítica das células NK.

Outros vírus, como o CMV²³, codificam uma proteína semelhante à molécula I do MHC humana, como forma de impedirem a *lise* de elementos celulares infectados pelas NK. Na infecção VIH, as células NK encontram-se não só diminuídas em relação às observadas em indivíduos saudáveis, como funcionalmente alteradas²⁷, existindo uma supressão significativa da produção de TNF α e de γ INF. Sob tratamento anti-retrovírico, as cargas virais diminuem e as células NK parece recuperar a sua capacidade citotóxica, embora se mantenha a sua incapacidade para produzir γ INF²³. São, no entanto, importantes no controlo da viremia, parecendo existir um aumento da sua actividade em indivíduos expostos mas não infectados, o que contribui, nesta situação, para a protecção contra a infecção primária. As alterações funcionais induzidas pelo VIH traduzem-se por uma diminuição da produção de citocinas e quimiocinas, bem como pela capacidade citolítica, que parece ocorrerem paralelamente à progressão da doença.

Os polimorfonucleares neutrófilos (PMN-N) constituem a segunda linha de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas. Em condições normais, e em indivíduos não fumadores, os PMN-N encontram-se numa peque-

As principais células envolvidas no combate aos vírus são os linfócitos T e os NK

Os polimorfonucleares neutrófilos constituem a segunda linha de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas

As quimiocinas constituem uma grande família de proteínas quimiotácticas que regulam a activação e o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação

na percentagem (< a 5%) no pulmão, mas podem ser rapidamente recrutados a partir dos vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos se a quantidade de microrganismos se elevar em relação à capacidade fagocitária dos macrófagos, ou se os agentes patogénicos forem particularmente virulentos. A migração até aos locais de inflamação é dirigida pelos macrófagos sob a libertação de vários factores quimiotácticos para os granulócitos, nos quais se incluem as IL1 e IL8, o γ -INF e o TNF- α ¹⁴.

Ainda neste contexto, salienta-se o papel das quimiocinas, originalmente descritas como proteínas de defesa do hospedeiro e que hoje se reconhece terem funções biológicas mais alargadas, para além de simples moduladores imunológicos. Exercem os seus efeitos biológicos ligando-se a receptores na superfície das células.

As quimiocinas constituem uma grande família de proteínas quimiotácticas que regulam a activação e o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação através da interacção com receptores²⁸. Embora cada um destes receptores se ligue a uma só classe de quimiocinas, eles podem unir-se a vários membros da mesma classe com alta afinidade. Atendendo ao seu papel na defesa do hospedeiro, numerosos agentes patogénicos intracelulares têm utilizado estes receptores como porta de entrada e meio de transmissão de doenças²⁹. A ligação ao receptor da quimiocina dá origem a uma cascata de mecanismos intracelulares que culmina nos seus efeitos biológicos – activação da quimiotaxia, mas igualmente um conjunto de funções em diferentes leucócitos, como o aumento do *burst* respiratório, a desgranulação, a fagocitose, a síntese de mediadores lipídicos, etc.

Em 1996 foi clonado²⁸ o gene humano do receptor da quimiocina CC, posteriormente designado por CCR5. Este é uma proteína G ligada a um receptor (GPCR), e a sua activação é responsável por uma série de alterações celulares. Liga-se a várias quimiocinas (MIP 1 α , MIP 1 β , RANTES) que bloqueiam ou diminuem a sua expressão³⁰, mas a sua função não se encontra ainda completamente esclarecida, mesmo *in vivo*. Exprime-se em várias subpopulações de linfócitos e em monócitos-macrófagos sanguíneos, em órgãos linfóides primários e secundários e em tecidos não inflamados. O CCR5 está ainda presente no epitélio, no endotélio, no músculo liso vascular, nos fibroblastos, em células nervosas, etc., e estudos efectuados em animais (ratos), nos quais o CCR5 era deficiente, mostraram apenas alterações limitadas dos processos imunes de mediação celular. A deficiência em seres humanos parece não aumentar a susceptibilidade a doenças, embora o CCR5 pareça estar implicado na activação de células Th1²⁸.

O interesse por este receptor aumentou substancialmente a partir do momento em que se reconheceu o seu papel como co-receptor de entrada das estirpes M trópicas do VIH nas fases iniciais da infecção. Com efeito, a glicoproteína do envelope do vírus – gp120 – liga-se à proteína CD4 na superfície celular, sofre uma alteração conformacional que lhe permite interagir com o receptor CCR5, após o que ocorre a fusão das membranas celulares, seguida da entrada do vírus na célula. Por isso, os níveis celulares do CCR5 são importantes na determinação do grau de infecção dos seropositivos. De facto, os indivíduos com baixa expressão de CCR5, provocada, por exemplo, pela deleção $\Delta 32$, são menos susceptíveis ao VIH, encontrando-

-se a capacidade de infecção igualmente reduzida. Do mesmo modo, indivíduos com níveis elevados de quimiocinas circulantes e, portanto, com uma expressão reduzida de CCR5, devida à sua ligação a estas e à internalização dos receptores, mostram-se menos vulneráveis à infecção²⁸. Os mecanismos implicados na regulação do número de receptores presentes nas células afiguram-se da mais alta importância. De facto, neste contexto, e segundo vários autores, após a ligação quimiocina-receptor CCR5, o complexo é fosforilado por uma proteína quinase, ligando-se a uma β arrestina²⁸ do CCR5, e na sequência da remoção do estímulo quimiocínico o receptor internalizado é reciclado para a superfície celular através de endossomas²⁸.

Uma célula pode expressar diferentes receptores quimiocínicos em diferentes circunstâncias fisiológicas, o que lhe permite responder a diferentes quimiocinas. Esta expressão programada de receptores quimiocínicos tem provavelmente um importante papel, ao assegurar que uma resposta imune apropriada se desencadeie contra um agente patogénico particular. Assim, a selecção de células efectoras Th1 ou Th2 pode ser influenciada pela expressão dos receptores de quimiocinas, os quais são regulados por citocinas²⁸.

Na infecção VIH, a progressão da doença está associada a uma mudança na preferência de co-receptores, do CCR5 para o CXCR4, o que está associado à expansão das células-alvo e a um prognóstico mais sombrio³¹. Segundo Ronald Veazey³², a maior parte, senão a totalidade das estirpes de VIH e SIV, utiliza o receptor CCR5 para entrar nas células do hospedeiro, enquanto as estirpes virais que ocorrem mais tarde, com a progressão da doença, podem utilizar o re-

ceptor quimiocínico CXCR4, isolada ou conjuntamente com o CCR5. Este autor preconiza que é o estado de activação celular e o *turnover* das células T-CD4 nos tecidos mucosos que determinariam a progressão da doença e a patogenia da SIDA. Um aspecto importante neste contexto é a utilização preferencial de determinado receptor a nível dos tecidos, mais particularmente ao nível das mucosas. Estudos recentes demonstram que, ao contrário das células T-CD4 do sangue periférico e dos gânglios linfáticos que apenas expressam CCR5 numa percentagem de 4% e 7%, respectivamente, não sendo por isso susceptíveis à infecção pelas estirpes R5; as da mucosa intestinal e da vagina expressam-no em elevados níveis (74% e 52%, respectivamente), o que pode explicar a preferência do VIH por este receptor na transmissão sexual da doença.

O CXCR4 é outro dos co-receptores do VIH necessário para a entrada celular de estirpes T trópicas, mas não M trópicas. Encontra-se presente numa grande variedade de células, incluindo a maior parte das hematopoiéticas, as células vasculares endoteliais, os neurónios, etc.²⁹. A alteração do gene do seu ligando SDF1 (*stromal cell derived factor*) produz alterações no desenvolvimento embriológico, imune, circulatório e nervoso²⁹, tendo sido apontado como o co-receptor preferencial dos macrófagos alveolares na co-infecção tuberculose/SIDA¹⁵.

O lavado broncoalveolar na infecção VIH

Há cerca de 35 anos reuniu-se um conjunto de circunstâncias que viriam a fazer desta técnica acessória da broncofibroscopia um método de excelência para o estudo do pulmão

Uma célula pode expressar diferentes receptores quimiocínicos em diferentes circunstâncias fisiológicas

A LBA era rotulada (...) como uma verdadeira biópsia líquida

profundo. Nessa época, os novos conhecimentos acerca da imunidade humoral e celular conduziram a comunidade científica a centrar o seu interesse na compreensão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, sobretudo nos do aparelho respiratório, até então baseados fundamentalmente em modelos animais. A possibilidade de aceder à celularidade pulmonar através dum método simples e seguro resultou de um dos avanços tecnológicos mais importantes da pneumologia – o desenvolvimento do broncofibroscópio por S. Ikeda e colaboradores, no Japão. Com efeito, após a introdução da broncofibroscopia, quer nos EUA, quer na Europa, o lavado broncoalveolar (LBA) foi usado inicialmente para a obtenção de macrófagos alveolares, em voluntários, para estudos funcionais, expandindo-se rapidamente à recolha de outros elementos celulares e ao estudo dos componentes solúveis do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA). A partir destes e de outros trabalhos foi possível observar o perfil imunológico da resposta do pulmão profundo a múltiplas agressões, com interesse não só no diagnóstico, mas, igualmente, na monitorização terapêutica e *follow-up* dos doentes. Assim, por exemplo: a presença de neutrofilia no LLBA de indivíduos portadores de fibrose pulmonar idiopática constituiria um factor de mau prognóstico; a pneumonite de hipersensibilidade encontrar-se-ia associada a uma alveolite linfocitária, sobretudo à custa dos linfócitos supressores; na sarcoidose, a alveolite estaria fundamentalmente na dependência de linfócitos CD4, com relações CD4/CD8 muito elevadas no LLBA.

Todos os estudos subjacentes a estes resultados sugeriam que a análise celular poderia constituir um meio de diagnóstico eficaz e,

certamente, menos invasivo do que a biópsia. De facto, nessa altura, a LBA era rotulada pelos adeptos desta técnica como uma verdadeira *biópsia líquida*, enquanto os menos entusiastas a consideravam equivalente a uma mera contagem de células no sangue ou no líquido cefalorraquidiano. A consagração do método só seria possível quando fosse viável responder à seguinte questão: O perfil celular do LLBA correlaciona-se com a alveolite *in situ*, ou com as alterações parenquimatosas e histopatológicas das biópsias efectuadas simultaneamente e em áreas adjacentes, durante o procedimento? Esta questão viria a ser ultrapassada; de facto, vários investigadores puderam demonstrar que existia uma boa correlação entre ambas as técnicas^{33,34}. Por outro lado, parece ser inquestionável a circunstância desta técnica ter permitido a recolha de células pulmonares e de substâncias solúveis do líquido epitelial para pesquisa, o que permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos de defesa locais, dos componentes imunológicos envolvidos na regulação da inflamação, fibrogénese, produção de surfactante e *clearance*, e, sobretudo, da notável cinética celular e da importância do microambiente celular.

O resultado de tão profícua e numerosa investigação permite-nos hoje aceder melhor à interpretação imunopatogénica de muitas doenças e lançar novos desafios no conhecimento de outras. Neste contexto, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) foi, desde o seu aparecimento, um motivo de pesquisa, face às suas repercussões a nível pulmonar. A série de acontecimentos que ocorrem entre a infecção pelo VIH e o desenvolvimento de doenças respiratórias é complexo, prolongado e ainda não completamente esclarecido. Subjacente a esses acontecimen-

tos encontra-se a presença do vírus em todas as fases da doença, assim como a correlação entre a diminuição de linfócitos T-CD4, o aumento da viremia e a emergência de infecções oportunistas. Desde as fases iniciais da doença que foi possível avaliar o impacto desta infecção a nível pulmonar, detectando-se, logo na fase assintomática, a presença de uma alveolite linfocitária citotóxica e observando-se um comportamento inverso relativamente à população CD4^{38,14,36}, que se crê constituir uma resposta imune adequada às células infectadas no pulmão e um marcador da elevada carga viral neste órgão³⁶.

Segundo Agostini¹⁴, a alveolite linfocitária é devida, sobretudo, à compartimentação de linfócitos citotóxicos que constituiriam a principal arma efectora da resposta imune pulmonar contra o VIH, prevenindo a sua disseminação no microambiente. Contudo, com o decorrer do tempo, os efeitos do VIH incluem um declínio progressivo da resposta citotóxica pulmonar (CTL) e a exaustão dessa actividade favorecedora da emergência de infecções oportunistas. No estabelecimento da alveolite linfocitária estariam envolvidas citocinas, particularmente as derivadas dos macrófagos, como a IL15 e o α TNF, reguladoras da expressão de moléculas envolvidas na apresentação antigénica APC/T, as quais iniciariam a progressão do ciclo celular nos linfócitos residentes; um segundo mecanismo teria por base moléculas quimiotácticas, particularmente as quimiocinas³⁵.

Por outro lado, o vírus é detectável nas células do LLBA, nomeadamente nos macrófagos purificados e nos linfócitos alveolares³⁴. Através da PCR-DNA, que reconhece os vírus latentes, 50 a 86% dos indivíduos infectados exibem o VIH nas células broncoal-

veolares, o que sugere que este agente exista, predominantemente, num estado latente nas células recolhidas pela LBA, pelo menos nos doentes não afectados por infecções oportunistas³⁷. Homer, utilizando a RT-PCR em LLBA de indivíduos infectados, em várias fases da doença, encontrou uma correlação estatisticamente significativa entre a percentagem de linfócitos citotóxicos e a carga viral do LLBA, sobretudo nas fases iniciais e intermédias da infecção (CD4>500 cel/ml – inicial; CD4 entre 200-500 cel/ml – intermédia)³⁶. Este autor refere ainda que nos doentes em fase mais tardia da infecção o fenótipo predominante dos linfócitos é o supressor.

Os macrófagos alveolares de doentes infectados revelam um aumento de antígenos da classe II do MHC necessários para a apresentação do antígeno às células T, o que aumenta a sua capacidade nestes domínios e evidenciam, ainda, receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgG, da IgE e do complemento, bem como uma elevada expressão de antígenos CD4, reflectindo, indirectamente, a presença na sua superfície celular do receptor do VIH e o aumento da produção de citocinas IL1, IL6, IL8, γ INF, TNF α , GM-CSF, MIP 1 α (*macrophage inflammatory protein*). Estas citocinas desempenham o seu papel no estabelecimento da alveolite: o TNF α , a IL1, a IL8 e a MIP 1 α podem promover directamente o recrutamento e a activação de linfócitos, neutrófilos e monócitos e amplificar indirectamente a resposta inflamatória, estimulando outras células, como os fibroblastos e as células epiteliais, a libertarem factores quimiotácticos ou moléculas de adesão; o TNF α favorece o contacto célula-célula no microambiente pulmonar.

O vírus é detectável nas células do LLBA, nomeadamente nos macrófagos purificados e nos linfócitos alveolares

Objectivos

A infecção VIH apresenta, entre outras características, uma grande variabilidade individual. Com efeito, tal como em outros processos infecciosos, é da interacção entre os complexos mecanismos do agente agressor e das defesas inatas ou adquiridas do hospedeiro que resultará o eclodir da doença ou a sua resolução.

No caso particular da infecção VIH, porém, assistimos ao estabelecimento de um processo mais ou menos longo, que conduz à progressiva destruição do sistema imunológico do hospedeiro, processado através de um jogo de forças dinâmicas, nomeadamente a nível celular (activação; diferenciação; proliferação; libertação de mediadores; microambiente químico e citotóxico, etc.), que atinge a totalidade do organismo, adquirindo, no entanto, uma expressão particular a nível pulmonar, face, entre outros factores, à simultânea exposição desta região orgânica ao meio interno e ao ambiente exterior.

Assim, a motivação deste trabalho dirige-se a um novo olhar sobre a dinâmica do processo de defesa pulmonar, agora à luz de novas aquisições científicas que permitam uma melhor compreensão da génese dessa variabilidade de resposta. Esta premissa, a ser confirmada, poderia contribuir para relevantes implicações clínicas, dado que o tratamento que já agora é dirigido à estrutura e mecanismos da penetração celular do vírus passaria a ser adaptado individualmente ao conjunto de alterações que ele produz no hospedeiro.

Por isso, este trabalho teve como objectivo principal o estudo da variabilidade de alguns aspectos do envolvimento imunológico celular do pulmão profundo durante a agressão pelo VIH, na tentativa de contribuir para um melhor conhecimento da dinâmica subjacente a estes mecanismos.

Material e métodos

Material

Este estudo englobou um conjunto de 14 doentes VIH1 positivos, 5 do sexo feminino e 9 do masculino, com uma média de idades de $39,6 \pm 14,3$ anos (Quadro I), referenciados pelo Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra para realização de broncofibroscopia por suspeita clínica de infecção broncopulmonar oportunista.

Posteriormente, este conjunto de doentes seria dividido e analisado em dois grupos; Grupo I, designado por diagnóstico recente; e o Grupo II, englobando os de diagnóstico não recente, pois, embora todos fossem portadores de SIDA, a amostra clínica era constituída por indivíduos com infecções oportunistas de diagnóstico recente, nos quais ainda não tinha sido instituída terapêutica

Quadro I – Amostra médica

Doente	Sexo	Idade
1	F	29
2	M	38
3	F	41
4	M	60
5	M	33
6	M	36
7	F	37
8	M	76
9	F	48
10	M	41
11	F	29
12	M	24
13	M	31
14	M	33
Med \pm DP	9M; 5F	$39,6 \pm 14,3$

A motivação deste trabalho dirige-se a um novo olhar sobre a dinâmica do processo de defesa pulmonar

anti-retroviral, enquanto o segundo grupo incluía doentes com doença mais prolongada, com vários episódios infecciosos oportunistas e tratamento anti-retroviral, para além de outros esquemas terapêuticos.

Métodos

Todos os indivíduos, depois de expressarem o seu consentimento informado, foram submetidos a exame broncoendoscópico e a LBA, após anestesia local da orofaringe e cordas vocais com lidocaína a 2%, encontrando-se os doentes sob monitorização cardíoro-respiratória.

Seguidamente à observação da árvore brônquica, procedeu-se ao encravamento do fibroscópio num brônquio sub-segmentar, cuja localização foi variável, de acordo com o local das alterações presentes na telerradiografia do tórax; na ausência de lesões radiológicas localizadas, esta técnica foi aplicada num dos brônquios subsegmentares do brônquio lobar médio. Após encravamento do fibroscópio, efectuou-se a instilação seriada, através de seringa, de 60cm³ de soro fisiológico aquecido à temperatura corporal, num total de 180 cm³, após o que se procedeu à sua aspiração, igualmente através de seringa. Considerou-se uma boa recolha aquela em que se obteve 60%, ou mais, do soro previamente instilado.

Em 10 doentes foi efectuado um estudo imunológico do LLBA e do sangue para a determinação quantitativa das populações e subpopulações linfocitárias (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 e CD56CD8) e dos receptores CCR5 L, CD4CCR5, CD8CCR5, CCR5Mo, CXCR4, CXCR4CD3, CXCR4CD14, CD28, CD28CD3, CD28CD4, CD28CD8, através de anticorpos monoclonais: CD8FITC,

CD19FITC, CD3PE, CD56PE, CD4PECY5 – lymphogram “cytognos”, CCR5PE, CXCR FITC – R & D Systems, CD8Cy5 e CD3Cy5 – DaKo, CD4PE, CD14PE, CD28FITC-Immunotech; CD4FITC – CLB; CD8Percep – Beckton Dickinson e CD3 APC – Beckton Dickinson.

A leitura foi realizada num citómetro de fluxo (Facs Calibur - Beckton Dickinson) a 3 ou a 4 fluorescências: FL1-FITC (fluoresceína); FL2-PE (ficoeritrina); FL3-PECY (ficoeritrina-cianina); FL4-APC (aloficocianina).

Procedeu-se, em todos os doentes, à quantificação das viremias plasmáticas do VIH, por PCR (*polymerase chain reaction*) de retrotranscrição (PCR-RT) a partir de amostras de sangue colhido em EDTA e, seguidamente, processadas (separação do plasma e congelamento a menos 80°C, nas primeiras 4 horas após a colheita).

Em 9 doentes efectuou-se a quantificação do ARN-VIH1 no LLBA através da PCR-RT. Nas primeiras 4 horas depois da colheita, cada amostra foi centrifugada, e aliquotas do sobrenadante foram congeladas a menos 80°C até à extracção e amplificação dos ácidos nucleicos. Esta extracção foi efectuada por método automatizado “Cobas Ampliprep/Cobas Amplicor HIV1 Monitor TM Test, version 1.5” Roche Diagnostic Systems (Branchburg, New Jersey, USA). Na amplificação dos ácidos nucleicos utilizaram-se dois métodos disponíveis em termos comerciais – método padrão e ultra sensível do sistema “Cobas Amplicor HIV1 Monitor TM Test Version 1.5 Roche Diagnostic Systems”. Este método permitiu a amplificação de uma sequência de 155 nucleótidos situada numa região altamente conservada do gene *gag* do VIH1, limitada pelas sequências iniciadoras SK145 e SKCC1B, optimizadas para se obter um rendimento em termos de amplificação equivalente

para todos (A-G) os subtipos do grupo M do VIH1. Os resultados foram observados na escala numérica, com uma variação dinâmica situada entre as 50 e as 750 000 cópias de ARN do VIH1/cm³ de amostra, tendo sido posteriormente convertidos em escala logarítmica.

Durante todo o procedimento foram acauteladas medidas de anticontaminação.

Para a análise estatística aplicou-se o teste *t* de Student e o teste de correlação linear, utilizando-se para isso o programa computacional disponível.

Resultados

Caracterização da amostra médica

A caracterização da amostra médica (Quadro II) revelou um conjunto de doentes apro-

ximadamente homogéneo em relação aos parâmetros considerados, com excepção da idade. Com efeito, esta apresentava uma média de 39,6±14,3 anos, mas com valores que oscilavam entre os 29 e os 76 anos.

Quanto aos outros, todos eram VIH1 positivos, heterossexuais e não toxicodependentes; pelo que diz respeito ao sexo, 36% eram mulheres e 64% homens, tendo-se verificado uma distribuição sobreponível dos hábitos tabágicos – 43% de fumadores e 57% de não fumadores.

A avaliação clínica destes doentes (Quadro III) permitiu verificar que todos referiam queixas de acordo com a situação patológica e uma tradução imagiológica que justificava a realização do exame broncoendoscópico. Entre os sintomas predominavam a febre e a expectoração purulenta, de acordo, aliás,

Quadro II – Caracterização da amostra médica

N.º doente	Idade	Sexo	HS	HT	Tox	Inf VIH
1	29	F	Ht	NF	N	VIH1 R
2	38	M	Ht	F	N	VIH1 NR
3	41	F	Ht	NF	N	VIH1 NR
4	60	M	Ht	NF	N	VIH1 R
5	33	M	Ht	F	N	VIH1 R
6	36	M	Ht	F	N	VIH1 NR
7	37	F	Ht	NF	N	VIH1 R
8	76	M	Ht	NF	N	VIH1 R
9	48	F	Ht	NF	N	VIH1 NR
10	41	M	Ht	F	N	VIH1 R
11	29	F	Ht	F	N	VIH1 NR
12	24	M	Ht	NF	N	VIH1 R
13	31	M	Ht	F	Ex	VIH1 R
14	33	M	Ht	NF	N	VIH1 R
14	39,6±14,3	9M 5F	Ht	6F 8NF	N	VIH1 9R 5NR

HS – Hábitos sexuais; HT – Hábitos tabágicos; Tox – Toxicodependência; Inf VIH – Infecção VIH; R – Recente; NR – Não recente

PULMÃO PROFUNDO – REACÇÃO CELULAR AO VIH

Maria Alcide Tavares Marques, Vera Alves, Victor Duque, M Filomena Botelho

Quadro III – Avaliação clínica da amostra médica.

N.º doente	Sintomas	IDR	Rx	BFO	Bact LBA	Imuno LBA
1	Candidíase oral e esofágica	Neg.	Padrão intersticial	Inflamat.	PC + CMV - MICT -	Sim
2	S. Febril; exp: purulenta	Neg.	Pleurite esq.; reforço broncovascular	Inflamat.	PC - CMV - MICT -	Sim
3	S. Febril; candidíase genital	Neg.	Reforço broncovascular	Inflamat.	PC - CMV - MICT -	Sim
4	S. Febril; exp: purulenta	Neg.	Padrão interstício nodular	Inflamat. + Sec. Pur.	PC + CMV - MICT -	Sim
5	Candidíase oral; adenopatias cervicais, emagrecimento	Neg.	Reforço broncovascular	Inflamat.	PC + CMV - MICT -	Sim
6	S. Febril; candidíase oral e esofágica	Neg.	Padrão intersticial	Inflamat.	PC + CMV - MICT -	Sim
7	Tosse; exp: purulenta; adenopatias cervicais; candidíase oral	Neg.	Reforço broncovascular	Inflamat.	PC - CMV - MICT +	Não
8	S. Febril; tosse seca; candidíase oral; emagrecimento	Neg.	Padrão intersticial	Inflamat.	PC + CMV + MICT +	Não
9	S. Febril; Exp: purulenta; tosse	Pos.	Infiltrado para hilar esq.	Inflamat.	PC - CMV - MICT +	Não
10	Cefaleias; emagrecimento; perda de equilíbrio	Neg.	Padrão reticular basal	Inflamat.	PC - CMV - MICT -	Não
11	S. Febril; tosse seca	Neg	Padrão intersticial	Inflamat	PC - CMV - MICT -	Sim
12	S. Febril; Exp: purulenta	Neg	Padrão intersticial	Inflamat	PC + CMV - MICT -	Sim
13	Tosse seca; febre	Neg	Reforço broncoalveolar	Inflamat	PC - CMV - MICT +t	Sim
14	S. Febril; tosse seca	Neg	Padrão intersticial	Inflamat	PC - CMV + MICT +t	Não

IDR – Intradermo reacção à tuberculina; BFO – Broncofibroscopia; LBA – Lavado broncoalveolar; PC – *Pneumocystis jirovecii*; CMV – Citomegalovirus; MICT – *Mycobacterium tuberculosis*

com a existência de uma infecção respiratória oportunista detectada pelo exame microbiológico do LLBA e pelo aspecto inflamatório da mucosa da árvore respiratória, observável em todos os indivíduos.

No âmbito das alterações imagiológicas, dominava um padrão intersticial, adstrito, na sua maioria, aos doentes com infecção por *Pneumocystis jirovecii*, seguido pelo reforço broncovascular, nos restantes. Como seria de esperar, o resultado da intradermo-reacção à tuberculina era generalizadamente negativo, com excepção do doente n.º 9.

Quanto ao estudo das cargas virais (Quadro IV), dos seus resultados sobressaem, pela sua relevância, os seguintes aspectos: por um lado, a presença de vírus no LLBA, traduzindo a sua existência no pulmão profundo, naturalmente em quantidades inferiores às do sangue; por outro, a enorme variabilidade dessas cargas, tanto no sangue como no LLBA, independentemente do período de tempo mediado entre o diagnóstico e a realização do exame.

Do estudo imunológico no sangue e no LLBA

A avaliação sanguínea, em valores absolutos, das principais populações e subpopulações linfocitárias (Quadro V), efectuada em treze doentes, mostrou uma acentuada queda, tanto dos linfócitos totais como das suas populações e subpopulações, mais expressivamente nas células T-CD4. Apenas em 2 casos (doentes n.ºs 12 e 13) esta subpopulação ultrapassava as 250 células/mm³, e em 42,9% dos doentes era inferior a 50 células/mm³. Igualmente a população CD19 revelaria níveis muito inferiores ao normal, com uma distribuição individual aparentemente equivalente à da subpopulação CD4.

Quadro IV – Cargas virais

N.º doente	Sangue	LLBA
1	718 000	1010
2	4 110	106
3	685 000	654
4	787 000	2620
5	2 090 000	137
6	680 000	–
7	2 300 000	49
8	621 000	49
9	84 100	153
10	1 880 000	3170
11	546 000	–
12	1 000 000	–
13	41 600	–
14	14 200	–
Med ± DP	769 490 ± 793 871	883 ± 1 194
	5,89 log ± 5,90 log	2,95 log ± 3,08 log

Também na maior parte dos casos as taxas mais baixas de células CD8 correspondiam aos valores mais diminutos da subpopulação CD4 e CD19 (doentes n.ºs 7 e 8).

O estudo das populações e subpopulações linfocitárias no LLBA, realizado em 10 dos 14 doentes (Quadro VI), revelou uma distribuição percentual semelhante à que foi observada no sangue (Quadro VII) em relação às células CD3, CD19, CD4 e CD8, embora no LLBA a percentagem de linfócitos T fosse superior neste meio, em relação ao sangue (94,5±5/84,1±10,4), ao contrário do que se verificou com os linfócitos B (2,2±3/10,4±9,6); também no LLBA existia uma percentagem mais elevada de linfócitos T-CD8 (77,7±17,6/67,6±4,2), o que se não observou com as células T-CD4 (8,1±9,5 no LLBA vs. 10,4±9,6 no sangue).

Quadro V – Populações e subpopulações linfocitárias no sangue (valores absolutos)

N.º doente	Linf. totais	CD19	CD3	CD4	CD8
1	1800	64	1584	108	1476
2	700	35	658	126	539
3	1200	12	1092	12	816
4	1700	204	1292	17	1173
5	500	15	440	40	400
6	–	–	–	–	–
7	100	8	73	8	66
8	100	6	86	8	77
9	1500	195	1260	225	945
10	700	98	476	42	413
11	1000	110	850	110	700
12	800	24	568	256	328
13	800	104	704	320	384
14	500	5	420	80	330
Med ± DP	877 ± 548	68 ± 70	731 ± 465	104 ± 103	588 ± 418

A actividade *natural killer* (NK), marcada pelas células T-CD56, com importantes variações individuais nos dois meios biológicos, expressava-se em níveis mais elevados no sangue ($9,1 \pm 8$) do que no LLBA ($2,9 \pm 1,9$). Quanto à actividade citotóxica, avaliada através das células CD56 CD8, era, em média, similar no LLBA ($1,7 \pm 1,2$) e no sangue ($2,2 \pm 2$), parecendo, no entanto, que a distribuição individual se apresentava mais homogénea no primeiro destes meios (Quadro VI) do que no segundo (Quadro VII). As células duplamente negativas (DN) apresentavam-se em valores ligeiramente mais elevados no LLBA ($7,6 \pm 4,5$ vs. $5,6 \pm 5,3$).

Curiosamente, e ao contrário do que se passava no sangue, no LLBA destacava-se um conjunto de células da linha monocítico-macrófaga em vias de diferenciação que em termos médios atingia uma percentagem de $13 \pm 13,6$ (Quadro VI).

A análise dos receptores celulares CCR5 e CXCR4 evidenciaria, em termos globais e médios, comportamentos diferentes entre si e em relação aos meios biológicos em que foram determinados (Quadros VI e VII). Assim, o CCR5 adstrito à totalidade dos linfócitos T era mais abundante no sangue ($10,9 \pm 13,2$) do que no LLBA ($8,4 \pm 3,5$); no entanto, o CCR5 ligado às células T-CD4 e CD8 encontrava-se em maior percentagem no LLBA do que no sangue ($2 \pm 2,3$ e $4,9 \pm 3,7/0,9 \pm 0,7$ e $4,1 \pm 4,0$, respectivamente). Já em relação aos valores deste receptor nos monócitos/macrófagos, a disparidade de valores atingidos nos dois meios considerados era muito acentuada ($77,8 \pm 41$ no LLBA vs. $18,7 \pm 15$ no sangue).

Ao contrário do CCR5, a expressão do CXCR4 total era mais elevada no LLBA ($31 \pm 19,9$) do que no sangue ($16,48,1$), e esta

Quadro VI – Valores das populações e subpopulações linfocitárias e receptores no LLBA (%)

Casos	CD3	CD4	CD8	CD19	CD56	DN	CD56 CD8	CCR5	CD4 CCR5	CD8 CCR5	CCR5 Mo
1	95,2	4	80,5	0,4	3,8	10,9	1,8	5,7	1,3	4	98,1
2	86,5	22	54	5,6	5,6	4	4	9,8	8,2	1,6	0
3	97,6	0,1	89,7	1,4	1	7,8	0,6	3	0,2	2,5	95,8
4	95,8	0,3	91,3	2,8	1,3	4,1	0,8	12,2	0,2	10,5	97
5	98,1	5,2	81,2	0,5	1,4	10,1	0,8	12,7	2,7	9,2	94,3
6	98,7	0,9	93	0	1,3	5,2	0,8	8,5	0,8	0	0
7	96,3	1,9	91,2	0	3,6	2,4	2	7,8	0,9	5,3	99,5
8	84,7	27,4	39,4	9,1	5,9	17,6	2,9	8,3	2,6	4,1	99,5
9	93	9,8	76,8	1,7	4	5,3	2,9	3,6	1,2	2,1	96,4
10	98,6	9,7	79,9	0,3	1,1	8,7	0,7	12,6	1,9	10	97
Med	94,5	8,1	77,7	2,2	2,9	7,6	1,7	8,4	2,0	4,9	77,8
DP	5,0	9,5	17,6	3,0	1,9	4,5	1,2	3,5	2,3	3,7	41,0

Casos	CxCR4	CxCR4 CD3	CxCR4 CD14	Cel. - Dif	CD28	CD28 CD3	CD28 CD4	CD28 CD8
1	11,7	10,4	98,8	31,2	4,9	4,3	1,9	2,3
2	75,3	66,4	99,4	1,7	20,8	15,1	8,5	5,7
3	21,4	19,4	85,2	11,7	12,5	10,4	0,1	9,5
4	15,3	13,4	85,7	11,9	17,1	15,3	0	14,8
5	17,5	15	89	25,8	17,7	15,6	2,3	13,3
6	16,2	0	0	0	0	0	0	0
7	43,6	41,7	99,6	1,9	23,3	21,3	1,5	19
8	41,6	39	97,3	1,5	7,4	30,1	4,6	4,5
9	43,6	41,6	95,4	7,3	20,3	18,8	3,7	13,6
10	23,3	22,4	94,4	37	34,6	34,2	5,9	25,5
Med	31,0	26,9	84,5	13,0	15,9	16,5	2,9	10,8
DP	19,9	19,8	30,2	13,6	10,1	10,5	2,8	8,0

tendência manifestava-se igualmente em relação aos linfócitos T ($26,6 \pm 19,8$ vs. $10,7 \pm 7,6$) e à linha monocítica/macrofágica, neste caso exuberantemente ($84,5 \pm 30,2/4,8 \pm 4,6$). A avaliação da co-estimulação efectuada através da marcação CD28 mostrou-se su-

perior no sangue ($22,8 \pm 16,2$) em relação ao LLBA ($15,9 \pm 10,1$); esta tendência mantinha-se a nível das células T totais, dos CD4 e dos CD8 ($22,5 \pm 16,7$; $7,8 \pm 8,3$; $13,3 \pm 8,3/16,5 \pm 10,5$; $2,9 \pm 2,8$; $10,8 \pm 8$, respectivamente).

Quadro VII – Valores das populações e subpopulações linfocitárias e receptores no sangue (%)

Casos	CD3	CD4	CD8	CD19	CD56	DN	CD56 CD8	CCR5	CD4 CCR5	CD8 CCR5	CCR5 Mo
1	89	4,8	81,3	2,1	8,9	2,1	1,9	3	0,4	2,3	8,3
2	89,8	19,5	69,6	9,3	0,7	0,6	0	1,8	0,7	0,9	7,1
3	89,6	0,1	70,5	2,5	7,6	19,2	1,9	3,1	0	1,9	10
4	65,5	1,7	57,8	23,1	11,3	6,1	1,7	27,3	1,9	11	15,5
5	86,9	4,2	81,4	2,3	10,7	1,2	2,8	6,3	0,8	4,8	8,6
6	85,1	5	74,7	7,2	7,8	5,6	1,8	41,2	1,8	0	58,2
7	88,2	7,5	75,5	7,8	4	5	1,6	5,2	0,1	3,5	17,4
8	64,5	17,3	38,5	5,8	29,4	8	7,6	3	0,5	2,6	20,3
9	86,7	30,3	50,5	4,1	8,9	3,6	1,7	4	1,1	2,6	17,5
10	95,4	13,8	76,5	2,3	2,1	4,9	1,2	14,2	1,8	11,7	24
Med	84,1	10,4	67,6	6,7	9,1	5,6	2,2	10,9	0,9	4,1	18,7
DP	10,4	9,6	14,2	6,3	8,0	5,3	2,0	13,2	0,7	4,0	15,0

Casos	CxCR4	CxCR4 CD3	CxCR4 CD14	Cel. - Dif	CD28	CD28 CD3	CD28 CD4	CD28 CD8
1	10,3	9,5	3,3	–	8	7,9	3,3	4,5
2	21,5	18,2	5,8	–	34,5	35,5	13,1	22,1
3	6,8	5	4	–	12,4	12	0,3	8,9
4	18,6	5,5	2,5	–	15,3	13,4	1,5	11,5
5	10,3	8,6	1,9	–	11,6	11	2	8,7
6	21,9	0	16,9	–	0	0	0	0
7	21,9	17,3	2,1	–	30,6	30,4	5,9	22,6
8	31,3	25	0,6	–	40,1	37,7	14,6	20,9
9	5,6	4,9	5,3	–	51,9	54,2	25,5	23,2
10	15,8	13,4	5,3	–	23,2	22,9	11,5	10,9
Med	16,4	10,7	4,8	–	22,8	22,5	7,8	13,3
DP	8,1	7,6	4,6	–	16,2	16,7	8,3	8,3

Discussão

No âmbito da discussão dos resultados, julgamos dever assinalar, em primeiro lugar, a circunstância de eles corresponderem a uma amostra médica que desejaríamos mais representativa, o que se não verificou, na de-

pendência de dois factos: por um lado, de apenas podermos dispor de doentes referenciados ao Departamento de Ciências Pneumológicas e Alergológicas pelo Serviço de Doenças Infecciosas com um quadro clínico que necessitasse, para seu esclarecimen-

to, de um exame broncoendoscópico; por outro, da diminuição do número de internamentos e de patologia respiratória oportunista, face à aplicação dos novos esquemas terapêuticos (HAART).

No entanto, apesar de a caracterização e avaliação clínica da amostra médica (Quadros II e III) demonstrarem uma relativa homogeneidade do conjunto dos indivíduos estudados, verificou-se, em relação aos parâmetros aplicados na investigação dirigida às populações e subpopulações linfocitárias e receptores celulares, a presença de uma relevante variabilidade individual dos resultados, tanto no LLBA como no sangue (Quadros VI e VII), dando a sensação de que as múltiplas alterações verificadas impedem a formação de conjuntos homogêneos, face aos numerosos factores envolvidos na resposta do pulmão profundo à infecção VIH.

Por isso nos interrogamos sobre se o alargamento da amostra médica, em circunstâncias habituais sempre desejável, viria a alterar substancialmente o espectro de resultados correspondentes a este trabalho

A acentuada queda dos linfócitos totais, assim como das suas populações e subpopulações, tanto no LLBA como no sangue, e que atingiam marcadamente as células T-CD4, está de acordo com os resultados obtidos por outros autores^{38,40,41,42,43,44}. Curiosamente, apesar da enorme variabilidade detectada nos valores das cargas virais (Quadro IV), tanto no sangue como no LLBA, aos níveis de T-CD4 mais baixos nestes meios biológicos correspondiam as maiores cargas virais, existindo uma correlação entre as cargas virais e os elementos celulares considerados ($p=0,005$ para os linfócitos totais; $p=0,05$ para os CD19; $p=0,004$ para os CD3; $p=0,01$ para os CD4 e $p=0,007$ para os CD8). Já em

relação às infecções respiratórias oportunistas, não nos pareceu que se encontrassem dependentes dos níveis virais no LLBA. Ao analisar as cargas virais do LLBA em função do tempo decorrido entre o diagnóstico e o exame broncoendoscópico, podemos constatar que à maioria dos doentes mais recentes correspondiam as maiores cargas virais no LLBA, à semelhança do que ocorria no sangue periférico (Quadros II e IV).

O pulmão profundo destes doentes apresentava uma percentagem de linfócitos T e da subpopulação CD8 superior à do sangue, ao contrário do que ocorria com a subpopulação CD4, embora menos expressivamente, mas ambos em valores extremamente diminuídos, em oposição ao que se verificava com os linfócitos B, que predominavam nitidamente no sangue (Fig.1).

Ainda na Fig 1, pode-se reconhecer que a actividade *natural killer* era significativamente ($p=0,01$) mais elevada no sangue do que no pulmão, onde apresentava valores extremamente diminuídos e, quanto à actividade citotóxica, esta encontrava-se muito reduzida nestes meios biológicos (Fig. 1). Assinala-se, por isso, a queda acentuada destes dois mecanismos de defesa a nível pulmonar, independentemente das cargas virais e do tempo de infecção. Assim, os baixos níveis de células T-CD4 e T-CD8 com expressão citotóxica poderiam ter contribuído para a ocorrência das infecções oportunistas que atingiram a maioria destes doentes.

Por outro lado, a depleção linfocitária verificada a nível do pulmão profundo poderá justificar a diminuta expressão das actividades reguladora e supressora das subpopulações CD4 e CD8 ligadas à molécula de co-estimulação CD28, as quais, aliás, se apresentavam ligeiramente mais elevadas no sangue (Fig. 2).

Tanto no sangue como no LLBA, aos níveis de T-CD4 mais baixos nestes meios biológicos correspondiam as maiores cargas virais

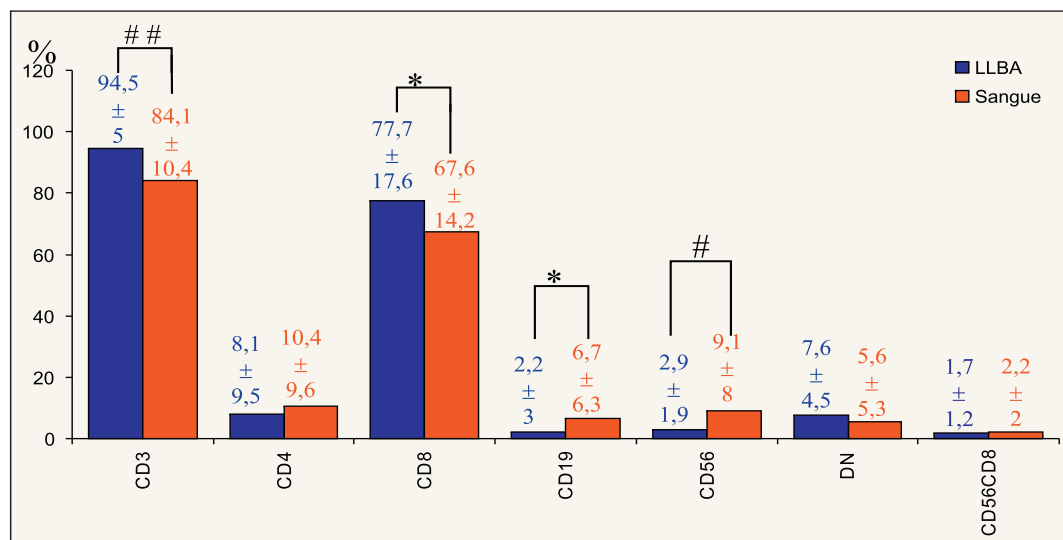


Fig.1 – Distribuição das populações e subpopulações linfocitárias no LLBA e no sangue. (* p<0,03; # p<0,01; ## p<0,003)

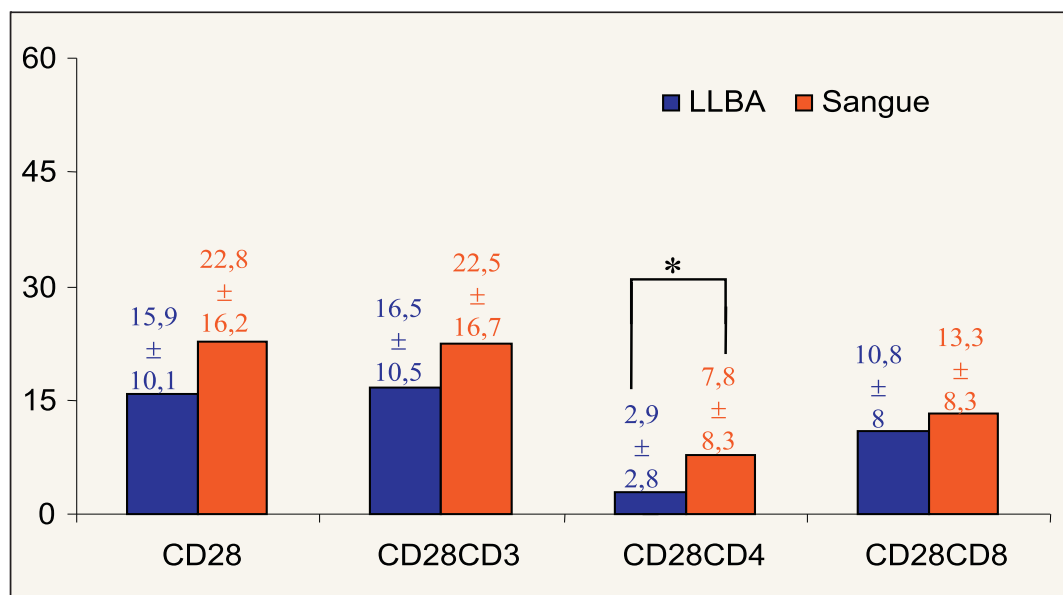


Fig. 2 – Expressão do factor co-estimulatório CD28 no LLBA e no sangue. (* p<0,02).

Assim, a diminuta expressão do receptor CCR5 nas subpopulações CD4 e CD8 presentes no aparelho respiratório destes doentes poderá estar dependente do reduzido nú-

mero destes elementos celulares, eventualmente de acordo com uma fase avançada da doença (Fig. 3); pelo contrário, nas células da linha monocítico/macrofágica, este receptor

abundava expressivamente e em percentagens muito superiores às detectadas no sangue (Fig. 3).

A presença de tão elevada percentagem da expressão do receptor CCR5 neste grupo celular a nível do aparelho respiratório ($77,8 \pm 41\%$) coincide com as descrições de investigações similares³² efectuadas noutros órgãos mucosos, como o intestino (74%) e vagina (52%) *vs* sangue (4%) e gânglio linfático (7%), traduzindo a sua grande sensibilidade para os territórios de grande replicação do VIH.

Quanto à expressão do receptor CXCR4, sempre mais acrescida no pulmão (Fig. 4), encontrava-se em percentagens bastante mais elevadas do que o CCR5, tanto nos linfócitos T como nas células monocítico/macrofágicas, neste último caso com diferenças significativas ($p < 0,005$) em relação ao sangue. Parece, assim, que existe um tropismo viral para os receptores CCR5 e CXCR4, podendo o VIH utilizar qualquer deles.

Face aos resultados apresentados, e nesta fase da doença, os monócitos e os macrófagos do pulmão profundo, para além de constituírem um poderoso reservatório, assumem um importante papel na defesa deste território, demonstrada, em todos os doentes, pela expressiva activação detectada por autofluorescência, como se pode reconhecer, a título exemplificativo, no Caso n.º 1 (Fig. 5). Aliás, se distribuirmos os doentes por dois conjuntos em função da antiguidade da sua infecção, determinada pelo espaço de tempo que decorreu entre o diagnóstico de SIDA e a realização deste estudo – conjunto I (doentes n.º 1, 4, 5, 8, 9 e 10 – diagnóstico recente) e conjunto II (doentes n.º 2, 3, 6 e 7 – diagnóstico não recente), podemos reconhecer que, apesar dos condicionamentos que rodeiam esta amostra médica e da notória variabilidade individual, o comportamento dos receptores celulares CCR5 e CXCR4 parece tendencialmente ligado à fase evolutiva da doença.

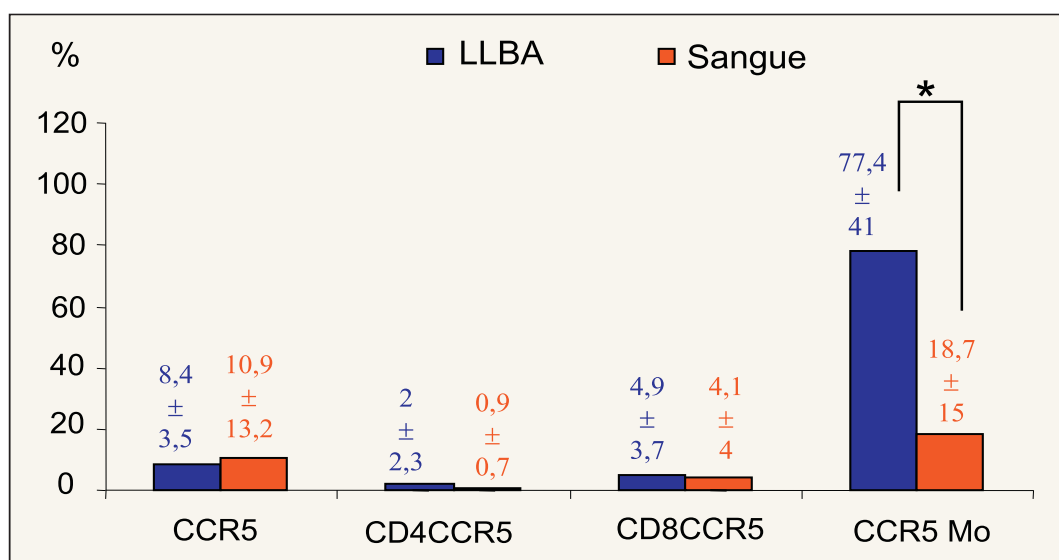


Fig. 3 – Expressão do receptor CCR5 no LLBA e no sangue. (* $p < 0,002$).

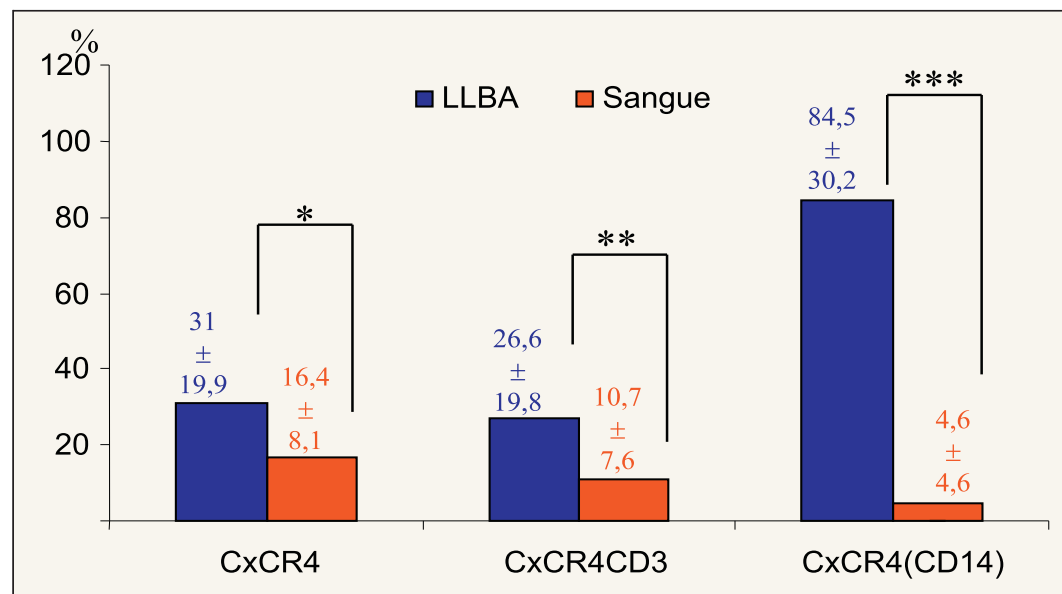


Fig. 4 – Expressão do receptor CXCR4 no LLBA e no sangue. (* t=2,5; p<0,02; ** t=3,3; p<0,005; *** t=7,3; p<0,00002)

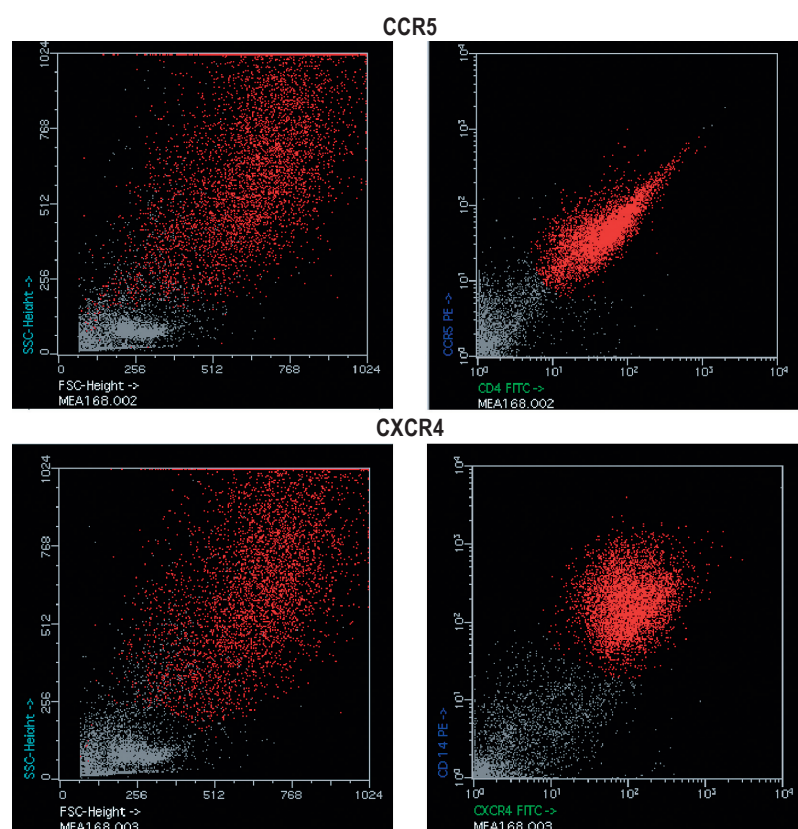


Fig. 5 – Autofluorescência, determinada por citometria de fluxo, das células da linha monocítica/macrofágica que expressavam receptores CCR5 e CXCR4, correspondente ao doente n.º 1.

Assim, o CCR5 ligado à linha celular monócítica-macrofágica dos indivíduos recentemente diagnosticados (Fig. 6) encontra-se larga e significativamente expandido

no pulmão profundo em relação ao sangue ($p < 0,000002$), em níveis muito superiores aos detectado no LLBA das infecções mais antigas (Fig. 7).

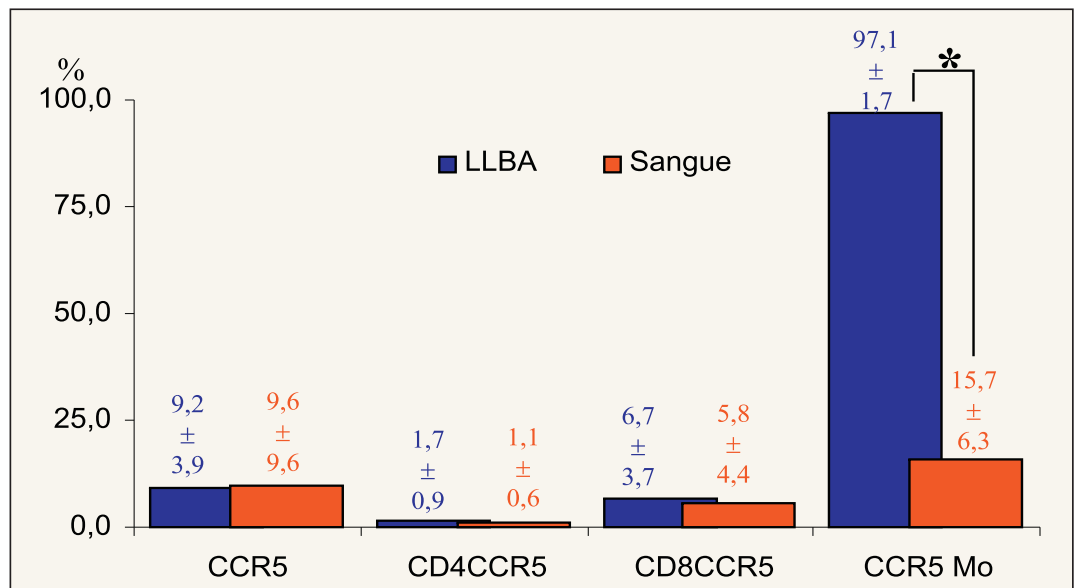


Fig. 6 – Expressão do receptor CCR5 no LLBA e no sangue do conjunto I (diagnóstico recente). (* $t=34,1$; $p < 0,000002$).

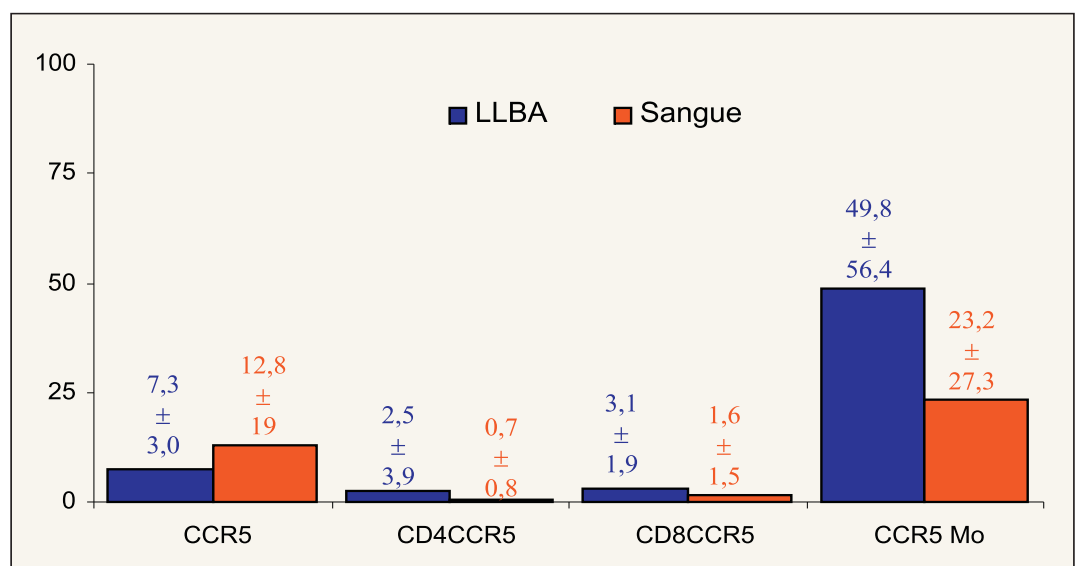


Fig. 7 – Expressão do receptor CCR5 no LLBA e no sangue do conjunto II (diagnóstico não recente).

Curiosamente, a sua evolução no sangue processou-se em termos opostos (Figs. 6 e 7), parecendo aumentar neste meio à medida que diminuía no LLBA.

Já a expressão do receptor CXCR4, igualmente elevada nos monócitos/macrófagos do LLBA, em valores significativamente ($p < 0,0000001$) muito superiores aos do san-

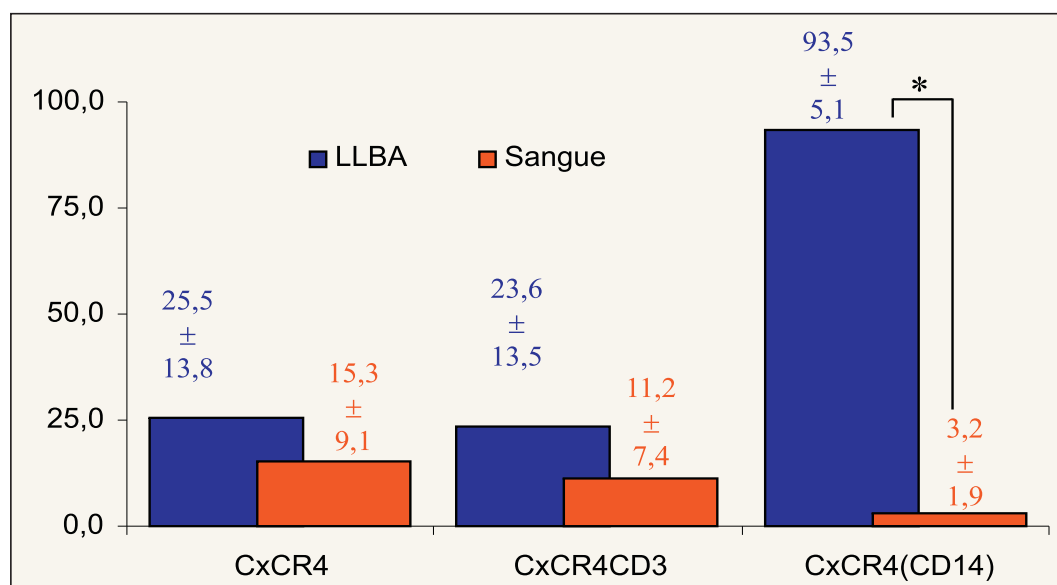


Fig. 8 – Expressão do receptor CXCR4 no LLBA e no sangue do conjunto I (diagnóstico recente). (* $t = 43,4$; $p < 0,0000001$)

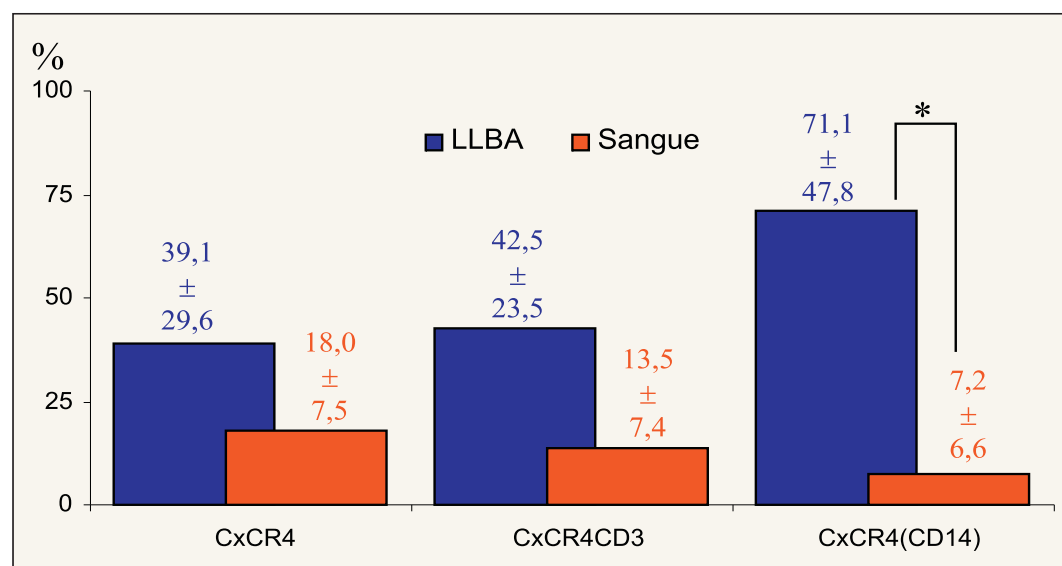


Fig. 9 – Expressão do receptor CXCR4 no LLBA e no sangue do conjunto II (diagnóstico não recente). (* $t = 2,4$; $p < 0,05$)

gue (Fig. 8), diminuía muito mais lentamente no pulmão profundo com a progressão da doença (Fig. 9).
 Por outro lado, também em relação ao receptor CXCR4 ligado aos linfócitos T, sem-

pre em maiores percentagens no LLBA do que no sangue (Figs. 10 e 11), se viria a reconhecer uma tendência evolutiva inversa, com níveis mais elevados no LLBA dos doentes com infecção mais antiga (Figs. 8 e 9).

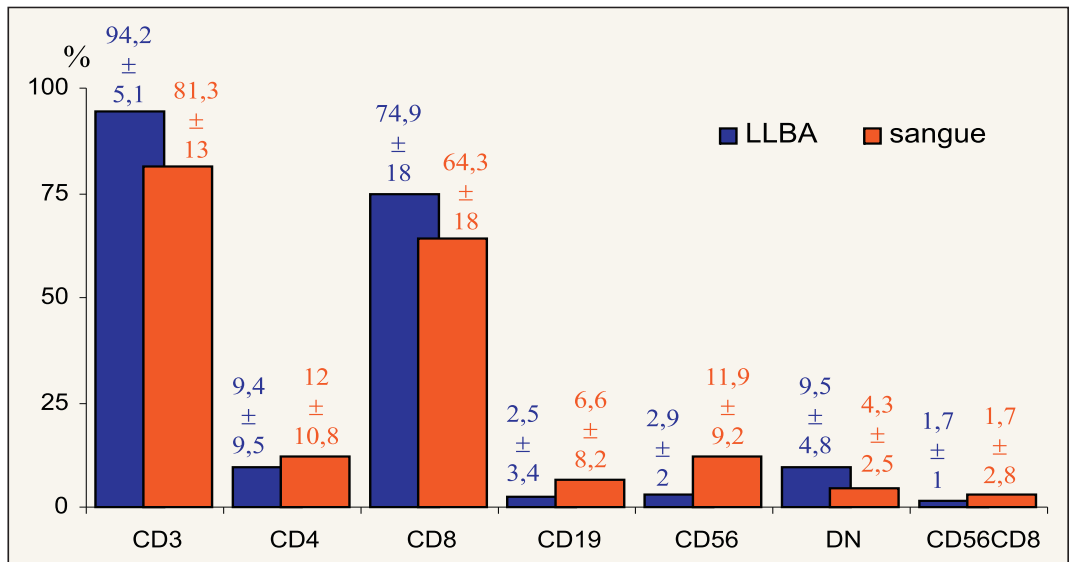


Fig. 10 – Populações e subpopulações linfocitárias no LLBA e no sangue do conjunto I (diagnóstico recente).

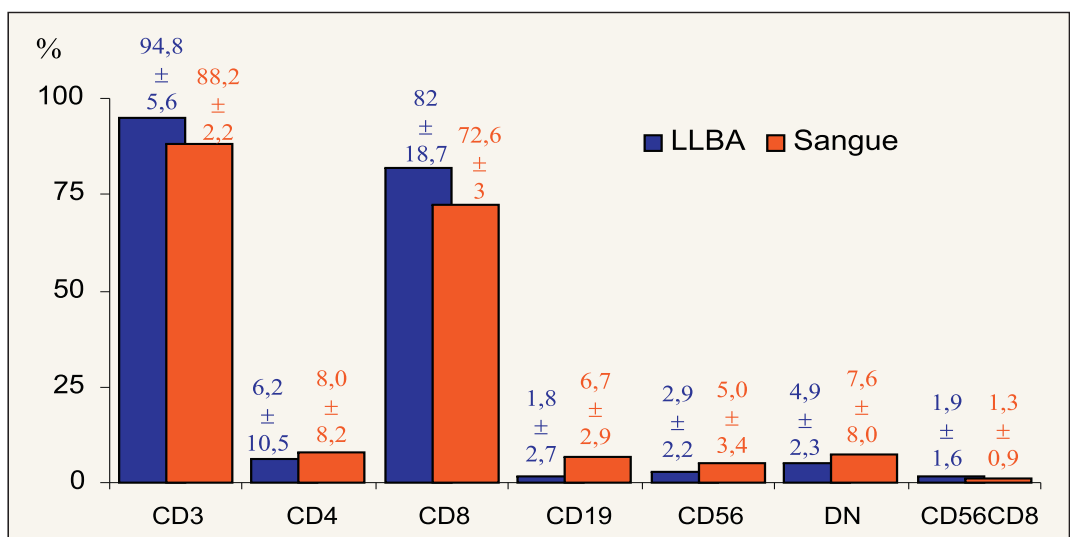


Fig. 11 – Populações e subpopulações linfocitárias no LLBA e no sangue do conjunto II (diagnóstico não recente).

Estes dados parecem sugerir que, em relação aos receptores investigados, aquele que mais se exprime nas células da linha monocítica/macrofágica, e, em menor percentagem, nos linfócitos T do pulmão profundo, ao longo da afecção, é o CXCR4. Com efeito, nas fases evolutivas avaliadas, esta dinâmica dos receptores celulares poderá ter várias explicações, tanto na dependência de eventuais mutações virais, como de prováveis alterações celulares na expressão de receptores, induzida pelo processo inflamatório crónico dependente da infecção VIH, ou da acção do tratamento retroviral, o qual, aliás, não tinha sido ainda aplicado aos doentes do conjunto I. A este processo não deverá ser indiferente o acelerado *turnover* monocítico/macrofágico do pulmão profundo, desencadeado, ao que tudo indica, por citocinas moduladoras do processo inflamatório, responsável por uma expressão destes elementos celulares neste território orgânico, traduzida por uma alveolite macrofágica detectada por Fontes Baganha, Meliço Silvestre e Santos Rosa, entre outros, desde a fase assintomática da doença³⁸.

Os resultados obtidos parecem reforçar a ideia de que, com a progressiva queda dos linfócitos T, fundamentalmente dos CD4, os elementos da linha monocítica/macrofágica assumir-se-iam como as primeiras células efectoras inatas de combate à infecção VIH no pulmão profundo.

Por outro lado, em qualquer dos conjuntos considerados, a actividade *natural killer* e citotóxica pulmonar encontrava-se profundamente diminuída, enquanto no sangue parecia cair com a progressão da doença (Figs. 10 e 11), pressagiando um prognóstico sombrio.

A progressiva diminuição no território pulmonar das células duplamente negativas (au-

sência dos receptores $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$) (Figs. 10 e 11) poderá significar uma queda da percentagem de células indiferenciadas ou de elementos celulares que endocitaram receptores sob o efeito da infecção VIH. Curiosamente, assistia-se, no sangue, a uma evolução inversa da dinâmica destas células (Figs. 10 e 11).

Por último, uma referência ao papel desempenhado neste contexto pelas infecções oportunistas, já que também os seus agentes ou o processo inflamatório por eles desencadeado, ao modificarem o microambiente celular, poderão alterar, a par do aumento da replicação viral, a utilização de receptores celulares pelo VIH, através da produção ou diminuição de determinados grupos citocínicos, como o assinalaram Israël-Biet, em relação ao *Pneumocystis jiroveci*³⁹, e Hyoshihiko Hoshint ao *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵.

Conclusões

1. A infecção VIH desencadeia no pulmão profundo, como em muitos outros órgãos importantes, extensas e diversificadas perturbações dos mecanismos de defesa.
2. Os factores envolvidos nesta luta são de tal forma numerosos, tanto em relação ao agente agressor como ao hospedeiro (estirpe viral, porta de entrada, elementos envolvidos na resposta imunitária, actuação de uma complexa rede de citocinas e de outros mediadores, actividades *natural killer* e citotóxica, expressão de diferentes receptores celulares, apoptose, eventual presença de patologia oportunista – infecciosa ou de outra natureza – resposta terapêutica, etc.) que dificulta a disponibilidade de amostras médicas homogéneas quando se pretende conduzir uma investigação nestes domínios. Este circunstan-

cionalismo vê-se ainda agravado pelas disposições de ordem ética que impõem, naturalmente, acentuadas restrições à abordagem destes doentes com finalidades exclusivamente científicas.

3. Entretanto, julgamos poder afirmar, face aos resultados apresentados, que estes apontam tendencialmente para uma resposta pulmonar à agressão VIH com características de compartimentação, conferida essencialmente, entre outros factores, pela dinâmica dos elementos celulares envolvidos e dos respectivos receptores, com estes últimos a revelarem expressões distintas em função do meio biológico. Neste contexto, a compartimentação da resposta do pulmão profundo encontra-se particularmente dependente da actividade dos macrófagos alveolares, os quais constituem, desde muito cedo, a *peça giratória* destes fenómenos e representam o último mecanismo celular de defesa nesta região orgânica, quando todos os outros se encontram fortemente afectados.
4. Por outro lado, parece que o conhecimento da dinâmica dos receptores celulares estudados, em relação aos quais este trabalho constitui um modesto contributo, fará acalantar fundamentadas esperanças na utilização terapêutica do seu bloqueio, na medida em que já foi demonstrado que a sua aplicação ao receptor CCR5 não desencadeia o perigo de constituição de variantes do VIH para o receptor CXCR4^{45,46}, o que poderá depender dos resultados que observámos quanto ao comportamento destes receptores; de facto, enquanto no pulmão profundo o CXCR4 permaneceu consistentemente elevado nas células monócito-macrofágicas ao longo da infecção e aumentava a sua expressão nos lin-

fócitos-T com a progressão da doença, o CCR5 revelou um comportamento oposto, no LLBA, caindo substancialmente ao longo da infecção, mas, contrariamente ao CXCR4, aumentava a sua expressão no sangue com o decurso do quadro patológico.

5. Dada a elevada coexistência de infecções oportunistas nestes doentes (71,4%), não podemos descartar a hipótese de este domínio da expressão CXCR4 se dever a uma modulação induzida por estes germes oportunistas ou, eventualmente, ter origem em reinfeções por estirpes que predominantemente o utilizem.
6. Finalmente, a expressão de uma tão acentuada variabilidade individual não deixará de acarretar importantes ilações clínicas. De facto, nestas circunstâncias, cada caso parece apontar para a necessidade de o doente respectivo ser analisado individualmente em relação aos principais parâmetros estudados, atitude indispensável à aplicação de uma correcta terapêutica.

Bibliografia

1. AIDS Epidemic Update (UNAIDS/WHO) 2003 (Dec.).
2. Mayaud C, Cadranet J. AIDS and Lung in a Changing World. Thorax 2001; 56:423-6.
3. Wolff AJ, O'Donnell AE. Pulmonary Manifestations of HIV Infection in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. Chest 2001; 120:1888-93.
4. Schluger NW, Perez D and Liu YM. Reconstitution of Immune Responses to Tuberculosis in Patients with HIV Infection Who Receive Antiretroviral Therapy. Chest 2002; 122:597-602.
5. Judson MA. Highly Active Antiretroviral Therapy for HIV with Tuberculosis- Pardon the Granuloma. Chest 2002; 122:399-340.
6. Mayaud C, Cadranet J. Manifestations Pulmonaires in VIH. Doin Éditeurs-Paris 2001; 77-95.

7. Ashkin D, Hollender ES, Narita M. Won't Get Fooled Again Chest 1999; 116:856-7.
8. Ledergerber B, Egger M, Erard V, Weber R, Hirshel B *et al.* AIDS Related Opportunistic Illnesses Occurring After Initiation of Potent Antiretroviral Therapy-The Swiss HIV Cohort Study. JAMA 1999; 282:23.
9. Weverling GJ, Mocroft A, Ledergerber B *et al.* Discontinuation of Pneumocystis carinii Pneumonia Prophylaxis After Start of Highly Active Antiretroviral Therapy in HIV Infection: Euro SIDA Study Group. Lancet 1999; 353:1293-8.
10. Quiros LB, Miro JC, Penã J M *et al.* A Randomized trial of the Primary and Secondary Prophylaxis against Pneumocystis carinii Pneumonia after Highly Active Antiretroviral Therapy in Patients with HIV Infection. N Engl J Med 2001; 344:159-67.
11. Narita M, Ashkin D, Hollender ES, Pitchenik AE. Paradoxical Worsening of Tuberculosis Following Antiretroviral Therapy in Patients with AIDS. Am J Crit Care Med 1998; 158:157-61.
12. Naccache JM, Antoine M, Wislez M, Fleury-Feith, J, Oksenhendler E, Mayaud C, Cadranet J. Sarcoid-Like Pulmonary Disorder in Human Immunodeficiency Virus – Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy. Am J Crit Care Med 1999; 159:2009-13.
13. Lenner R, Bregman Z, Teirstein A S, DePalo L. Recurrent Pulmonary Sarcoidosis In HIV Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. Chest 2001; 119:978-81.
14. Agostini C, Cipriani A, Cadrobbi P, Semenzato G. *In: AIDS and the Lung.* Edit. Semenzato G. European Respiratory Monograph 1995; 89-124.
15. Hoshino Y, Tse DB, Rochford G, Prabhakar S, Hoshino S, Chitkara N, Kuwaabara K, Ching E, Raju B, Gold JA, Borkowsky W, Rom WN, Pine R, Weiden M. Mycobacterium tuberculosis – Induced CXCR4 and Chemokine Expression Leads to Preferential X4 HIV1 Replication in Human Macrophages. J Immunology 2004; 172:6251-8.
16. Alfano M, Poli G. Role of Cytokines and Chemokines in the Regulation of Innate Immunity and HIV Infection. Molecular Immunology 2004; 2-22.
17. Austyn JM. Antigen-Presenting Cells. Am J Resp Crit Care Med 2000; 162:146-50.
18. D'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells Discriminate between Yeasts and Hyphae of the Fungus Candida albicans. Implications For Initiation of T helper Cell Immunity in vitro and in vivo. J Exp Med 2000; 191:1661-74.
19. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, Mawhinney S, Wilson CC. Influence of Plasma Viremia on Defects in Number and Immunophenotype of Blood Dendritic cell subsets in Human Immunodeficiency Virus 1 – Infected Individuals. J Infect Dis 2003; 187:26-37.
20. Gompels M, Patterson S, Roberts MS, Macatonia SE, Pinching AJ, Knight SC. Increase in Dendritic Cell Numbers Their Function and the Proportion Uninfected during AZT Therapy. Clin Exp Immunol 1998; 112:347-53.
21. Revillard JP. Immunologie. Edit. De Boeck Université, Bruxelles 1995; 143-55.
22. Lawn SD, Butera ST and Folks TM. Contribution of Immune Activation To The Pathogenesis and Transmission of Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Clin Microb Rev 2001; 753-77.
23. Jacobs R, Heiken H, Schmidt RE. Mutual Interference of HIV and Natural Killer Cell- Mediated Immune Response. Molecular Immunology 2004; XXX 1-11.
24. Leibson PJ. Signal Transduction during Natural Killer Cell Activation: Inside the Mind of a Killer. Immunity 1997; 6:655-61.
25. Valentin A, Pavlakis GN. Natural Killer Cells are Persistently Infected and Resistant to Direct Killing by HIV-1. Anticancer Res 2003; 23:2071-5.
26. Scheppeler JA, Nicholson JK, Swan DC, Ansari A, McDougal JS. Down Regulation of MHC-I in a CD4+ T Cell Line, CEM-E5 After HIV1 Infection. J Immunol 143:2858-66.
27. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M *et al.* Natural Killer Cells in HIV 1 Infection. Dichotomous Effects of Viremia on Inhibitory and Activating Receptors and Their Functional Correlates. Immunology 2003; 25:1511-6.
28. Mueller A, Strange PG. The Chemokine Receptor CCR5. J Bioch Cell Biology 2004; 36:35-38.
29. Richard HoruK. Survey Chemokine Receptors. Cytokine and Grow Factor Rev 2001; 12:313-35.
30. Lehner T. The Role of Chemokine Ligands and Antibodies To CCR5 Coreceptors in Preventing HIV Infection. Immunol 2002; 23:347-51.
31. Pastore C, Ramos A, Mosier D. Intrinsic Obstacles to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Switching. J Virology 2004; 78:7565-74.

32. Veazey RS, Marx PA and Lackner AA. The Mucosal Immune System: Primary Target for HIV Infection and Aids. *Trends in Immunology* 2001; 22:626-33.
33. Hunninghake GW, Kawanano O, Ferrans VJ, Young RC. Characterization of Inflammatory and Immune Effector Cells in the Lung Parenchyma of Patients With Interstitial Lung Disease. *Am Rev Resp Dis* 1981; 123:407-12.
34. Semenzato G, Chilosi M, Ossie E, Trentin L *et al*. Bronchoalveolar Lavage and Lung Histology Comparative Analysis of Inflammatory and Immunocompetent Cells in patients with Sarcoidosis and Hypersensitivity Pneumonitis. *Am Rev Resp Dis* 1985; 132:400-4.
35. Agostini C, Facco M, Siviero M *et al*. Chemokines IP 10 and Mig Expression and Direct Migration of Pulmonary CD8 CXCR3 T Cells in Lungs of Patients with HIV Infection and T Cell Alveolitis. *Am J Resp Crit Care* 2000; 162:1466-73.
36. Homer L, Twigg III, Linan DS, Richard B, Kenneth S Knox, Rodney J *et al*. Lymphocytic Alveolitis Bronchoalveolar Lavage Viral Load, and outcome in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159:1439-44.
37. Rich EA. Activation-Inactivation of HIV1 in the Lung. *J Biomed Sci* 1998; 5:1-10.
38. Baganha MF, Marques MAT, Leite I, Robalo Cordeiro C, Mota Pinto A, Teixeira ML, Anjos MJ, Lima MAM, Corte Real R, Serra E, Malcata L, Lopes C, Meliço Silvestre A, Santos Rosa A. Alveolite Subclínica em Indivíduos Infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. *Via Pneumológica* 1993; 1:21-31.
39. Israël-Biet D, Esvant H, Laval AM, Cadranet L. Impairment of b chemokine and cytokine production in patents with HIV related Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Thorax* 2004; 59:247-51.
40. Estaquier J, Lelièvre J-D, Petit F, Brunner T, Parseval LM, Richman DD, Ameisen JC, Corbeil J. Effects of Antiretroviral Drugs on Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced CD4+ T-Cell Death. *J Virology* 2002; 59:66-73.
41. Holm GH, Zhang C, Gorry PR, Peden K, Schols D, Clercq ED, Gabuzda DJ. Apoptosis of Bystander T Cells Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 With Increased Envelope/Receptor Affinity and Coreceptor Binding Site Exposure. *Virology* 1998; 78:4541-51.
42. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. Evidence for Increased T Cell Turnover and Decreased Thymic Output in HIV Infection. *J Immunology* 2001; 167:6663-8.
43. Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Boies L, Chen Z, Jenkins M, Mills R, Goodwin C, Shuwirth MC, Danner SA, Haase AT. Kinetics of CD4+T cell repopulation of Lymphoid Tissues after Treatment of HIV 1 Infection. *Immunology* 1998; 95:1154-9.
44. Wang L, Chen JJY, Gelman BB, König R, Cloyd MW. A Novel Mechanism of CD4 Lymphocyte Depletion Involves Effects of HIV on Resting Lymphocytes: Induction of Lymph Node Homing and Apoptosis Upon Secondary Signaling Through Homing Receptors. *J Immunology* 1999; 162:268-76.
45. Lehner T. The Role of CCR5 Chemokine Ligands and Antibodies to CCR5 Coreceptors In Preventing HIV Infection. *Trends in Immunology* 2002; 23:347-51.
46. Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. The Mucosal Immune System: Primary Target for HIV and AIDS. *Trends in Immunology* 2001; 22:626-33.