



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

**Doutoramento:**

Ciências Biomédicas

**Nome do Aluno:**

Catarina dos Santos Cortesão

**Tema da Tese:**

Studies on a human model and a murine model of immunodeficiency: HIV-2 infection and TACI deficiency.

**Área:**

Ciências Biomédicas

**Especialidade:**

Ciências Biopatológicas

**Data da Defesa:**

21/12/2009

**Classificação:**

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

**Júri:**

Presidiu o Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor Rui Victorino e estiveram presentes os vogais: Professores Doutores Jeffrey L. Platt, Marília Cascalho, University of Michigan, E.U.A., Paula Maria das Neves Ferreira da Silva, Universidade do Porto, Rui Victorino, João Taborda Barata, Ana Espada de Sousa, todos da Universidade de Lisboa.



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

## RESUMO

Neste trabalho foram investigados alguns mecanismos que contribuem para a manutenção de imunocompetência usando dois modelos: um modelo humano natural atenuado da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a infecção pelo HIV-2; e um modelo murino de deficiência de células B por defeito de TACI (*Transmembrane Activator and Calcium Modulating Cyclophilin Ligand Interactor*). A Parte I deste trabalho intitulada “Produção de células T durante a infecção pelo HIV-2” teve por objectivo estudar o impacto da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2 (HIV-2) na maturação das células T no timo e na sua diferenciação na periferia. A epidemia HIV/SIDA constitui actualmente um dos principais problemas de saúde, estimandose que entre 1981 e 2007 aproximadamente 65 milhões de pessoas foram infectadas em todo o mundo. Os agentes responsáveis pela SIDA são o HIV-1 e HIV-2. A infecção por HIV-1 é caracterizada por uma inexorável depleção das células T CD4, para a qual contribuem vários factores além de efeitos citopáticos do vírus. Independentemente dos mecanismos envolvidos na depleção das células T CD4, um factor determinante do ritmo de progressão da doença é a capacidade de reconstituição do compartimento de células T. Num indivíduo saudável, a manutenção da população de células T é assegurada por mecanismos homeostáticos que regulam a proliferação e sobrevivência de células na periferia, conjuntamente com a produção de linfócitos no timo, sendo a contribuição tímica dependente da idade. A infecção pelo HIV-1 associa-se a alterações da produção *de novo* de células T e, por outro lado, a uma activação imunitária persistente que compromete os mecanismos de proliferação homeostática. Na infecção por HIV-2, a progressão da doença é mais lenta do que por HIV-1 associando-se a um impacto limitado na sobrevivência da maioria dos adultos infectados. A infecção por HIV-2 caracteriza-se por um ritmo de perda das células T CD4 menos acentuado e por menor carga viral circulante, embora os níveis de activação imunitária sejam semelhantes nos doentes infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2 com grau de depleção de células T CD4 comparável. Deste modo, a infecção por HIV-2 pode ser considerada um modelo natural de doença HIV “atenuada”. O primeiro objectivo deste trabalho foi estudar o papel da interleucina 7 (IL-7), uma citocina essencial para a homeostasia das células T, em situações clínicas de linfopenia provocadas pela infecção pelo HIV-2. Os níveis séricos de IL-7 foram quantificados por ELISA e determinou-se a expressão da cadeia  $\alpha$  do seu receptor (IL-7Ra) em células T CD4 e CD8 por citometria de fluxo, num estudo transversal envolvendo grupos de doentes infectados pelo HIV-2 e doentes infectados pelo HIV-1, equiparados para idade e estadio da doença. Os resultados documentaram uma correlação entre os níveis séricos de IL-7 e o grau de depleção de células T CD4 na infecção pelo HIV-2, que se revelou significativamente mais forte do que a observada na infecção pelo HIV-1, sendo esta semelhante à documentada em outros *cohorts* de doentes infectados pelo HIV-1. É importante realçar que na fase inicial da infecção por HIV-2 os níveis séricos de IL-7 não diferem do grupo controlo de indivíduos saudáveis, ao contrário dos níveis elevados documentados nos doentes infectados pelo HIV-1. Nos estadios mais avançados, os níveis séricos de IL-7 apresentam-se significativamente aumentados em ambas as infecções em comparação com o grupo de controlos saudáveis. Em relação ao receptor IL-7Ra documentou-se uma melhor preservação da sua expressão nas diferentes sub-populações de células T, em particular nas células T CD4 *naive*, nos doentes infectados pelo HIV-2. Estes resultados sugerem uma maximização da utilização dos recursos de IL-7 disponíveis durante a infecção pelo HIV-2. O timo é essencial para o desenvolvimento e maturação das células T, contribuindo assim para manter a diversidade do repertório do receptor das células T (TCR). Esta diversidade é considerada fundamental para montar respostas contra novos agentes patogénicos e para prevenir a evasão de microorganismos persistentes às respostas do sistema imunitário. Apesar de o timo envolver com a idade, é actualmente reconhecida a funcionalidade do timo adulto,

principalmente em situações clínicas em que há necessidade de reconstituir as populações de células T na periferia. Não existem estudos sobre a função tímica na infecção pelo HIV-2. É plausível admitir que o melhor curso da infecção pelo HIV-2 seja devido, em parte, a uma melhor capacidade do timo de compensar a perda de células T e de manter na periferia uma maior diversidade do repertório do TCR. A função tímica pode ser avaliada através da quantificação de pequenos fragmentos de DNA episómicamente designadas *T-cell receptor excision circles* (TREC), resultantes dos rearranjos, na timopoiese, dos genes das cadeias que compõem o TCR. Durante a maturação das células T ab, ocorre o rearranjo do gene da cadeia b seguido do rearranjo do gene da cadeia a, originando, respectivamente, bTREC e sjTREC entre outros. A proliferação celular que ocorre entre estes dois rearranjos é o principal determinante do número de timócitos gerados no timo. Como os níveis de TREC se diluem progressivamente com a proliferação celular, a quantificação do rácio sj/b TREC nas células do sangue periférico permite estimar a dinâmica proliferativa intratímica e, desta forma, indirectamente a produção de linfócitos T no timo. Assim, no segundo objectivo proposto para esta parte do trabalho, utilizou-se esta metodologia para estimar a função tímica em grupos de doentes infectados com HIV-2 e doentes infectados com HIV-1, correlacionando-a com parâmetros de progressão da doença. Tal como esperado, os indivíduos saudáveis apresentaram uma diminuição do rácio sj/bTREC de acordo com a idade, sendo estes valores significativamente inferiores na infecção pelo HIV-1. Nos doentes infectados pelo HIV-2 documentou-se uma relativa manutenção do rácio sj/b TREC com a idade. Em conclusão, os resultados aqui apresentados sugerem que na infecção pelo HIV-2, quer a timopoiese quer a homeostasia das células T na periferia estão menos comprometidas, podendo contribuir para um ritmo de progressão da doença mais lento. Estes resultados enfatizam o papel do timo como alvo terapêutico para uma completa reconstituição imunitária em conjugação com terapêutica anti-retroviral na infecção pelo HIV-1. A Parte II deste trabalho, intitulada "Regulação pelo TACI da diferenciação de células B após estimulação antigénica", teve por objectivo geral clarificar o papel da molécula TACI na diferenciação de células B. Esta molécula é uma proteína transmembranar tipo III da superfamília dos receptores do TNF (*Tumor Necrosis Factor*), expressa em células B. A sua importância tem sido evidenciada em estudos de modelos de ratinho com deficiência em TACI onde se observam infecções bacterianas recorrentes do tracto respiratório e hipogamaglobulinemia, designadamente de IgG e IgA, atribuídas a uma disfunção das células B. A deficiência em TACI foi recentemente associada a Imunodeficiência Comum Variável (IDCV), um grupo heterogéneo de doenças caracterizadas por deficiência de produção de anticorpos. Estima-se que 5% a 10% dos doentes diagnosticados com IDCV têm pelo menos uma mutação no *locus TNFRSF13B* que codifica o TACI. Com o objectivo de clarificar de que forma o TACI promove a produção de anticorpos, examinou-se o efeito da deficiência de TACI num modelo de ratinho em que a maioria das células B produz um anticorpo específico para o hapteno *4-hydroxy, 3-nitro-phenylacetic acid* (NP), o modelo Quasi-Monoclonal (QM). Os ratinhos QM TACI KO e QM TACI+ foram imunizados com NP-Ficoll, que activa as células B na ausência de ajuda das células T e por essa razão se denomina um estímulo T-independente. A frequência de células B produtoras de anticorpos foi avaliada por ELISPOT e os anticorpos produzidos foram quantificados por ELISA. Neste ratinho observou-se que a deficiência em TACI nas células B causa uma diminuição no número de células produtoras de IgM e IgG específicas para NP em resposta a NP-Ficoll. Determinou-se que a origem do defeito na produção de anticorpos reside no estadio precedendo a diferenciação em plasmócitos. De facto, deficiência em TACI não diminui a intensidade e frequência de activação ou proliferação das células B quando estimuladas por NP-Ficoll. Pelo contrário, células B deficientes em TACI permaneceram em ciclo celular durante mais tempo e produziram clones maiores do que células B TACI+ após imunização com NP-Ficoll sugerindo controle da expansão clonal por TACI. Estes resultados sugerem que TACI exerce duas funções autónomas nas células B: por um lado, controla o número de ciclos de proliferação após activação; por outro lado, estimula a diferenciação das células B em plasmócitos. Assim, este estudo contribuiu para clarificar o aparente paradoxo que envolve o papel simultaneamente activador e inibidor do TACI na função das células B.