



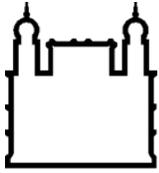
MINISTÉRIO DA SAÚDE
&
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T
EM CRIANÇAS CO-INFECTADAS PELOS VÍRUS DE
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E
LINFOTRÓPICO T HUMANO TIPO-1 (HTLV-1)**

Autora: Nádia Alves Amade

Maputo, Junho de 2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

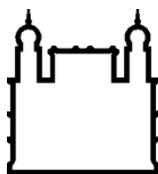
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NÁDIA ALVES AMADE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T
EM CRIANÇAS CO-INFECTADAS PELOS VÍRUS DE
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E
LINFOTRÓPICO T HUMANO TIPO-1 (HTLV-1)**

Orientadores: Prof. Dr. Wilson Savino

Dr. Ilesh V. Jani



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

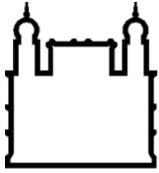
A481 Amade, Nádia Alves

Caracterização fenotípica de linfócitos T em crianças co-infectadas pelos vírus de imunodeficiência humana (HIV) e linfotrópico T humano tipo-1 (HTLV-1) / Nádia Alves Amade. – Rio de Janeiro, 2015.
xii,45 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 46-50

1. HIV-1. 2. HTLV-1. 3. Células T CD4+. 4. Moçambique. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: NÁDIA ALVES AMADE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T
EM CRIANÇAS CO-INFECTADAS PELOS VÍRUS DE
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E
LINFOTRÓPICO T HUMANO TIPO-1 (HTLV-1)**

Orientadores: Prof. Dr. Wilson Savino

Dr. Ilesh V. Jani

Aprovada em: _____/_____/_____

EXAMINADORES:

Dra. Alda da Cruz

Dra. Paula Vaz

Dra. Nilsa de Deus

Declaração

Eu, Nádia Alves Amade, declaro por minha honra que este trabalho foi feito por mim e que a informação aqui obtida durante a realização da pesquisa é meramente verdadeira.

Maputo, aos 05 de Julho de 2011

(Nádia Alves Amade)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu filho Íllan Amade Murargy, que dentro do meu ventre, e hoje nos meus braços, com o seu sorriso, abraços e ouvindo-o gritar “mãe”, deu-me ainda mais força para tornar este projecto numa realidade.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu marido Shadit Murargy, que sempre me deu todo seu apoio para que ingressasse no mestrado, e sempre esteve ao meu lado e ajudando-me a superar as dificuldades encontradas, mostrando-se ansioso para ver este trabalho tornar-se realidade.

Gostaria também de igual modo, agradecer aos meus orientadores, Dr. Ilesh Jani e Dr. Wilson Savino que com toda sabedoria e experiência souberam me auxiliar ao longo deste percurso e finalmente fazer com que este trabalho passasse de “protocolo de estudo” para “dissertação de mestrado”. O meu muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos Eduardo Samo Gudo, Raquel Matavele, Ivan Manhiça e Orvalho Joaquim pelo apoio e colaboração.

O meu muito obrigado vai também para os meus queridos pais, que também sempre se mostraram orgulhosos da filha, e sempre estiveram do meu lado e ajudaram-me incondicionalmente quando precisei. Sem eles, não teria conseguido chegar até aqui. Estarão SEMPRE no meu coração.

Não poderia esquecer de agradecer todos os funcionários de saúde do Hospital Geral de Mavalane e 1º de Maio, Departamento de Dermatologia do Hospital Central de Maputo, bem como a todos pacientes que aceitaram participar neste estudo, pois sem eles, seria impossível a realização deste projecto.

Finalmente, aos meus colegas do ex-Departamento de Imunologia.

Acrónimos

HTLV-1	Vírus Linfotrófico T Humano tipo 1
CNBS	Comité Nacional de Bio-Ética para a Saúde
ELISA	Ensaio imuno-enzimático ligado à enzima
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparésia Tropical Espástica
K ₃ EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
INS	Instituto Nacional de Saúde de Moçambique
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ATL	Leucemia/Linfoma das células T do adulto
TARV	Tratamento anti-retroviral
OMS	Organização Mundial da Saúde
UNAIDS	Join United Nations Programme on HIV/AIDS
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
CD	Grupo de diferenciação (Cluster of Defferentiation)
ARN	Ácido Ribonucléico
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
IL	Interleucina
FITC	Fluorocromo- Fluoresceína Isotiacinato
PE	Fluorocromo- Ficoeretrina
PerCP	Fluorocromo- Proteína de Clorofila Peridina
APC	Fluorocromo- Aloficocianina
INSIDA	O Inquérito Nacional de Prevalência, Riscos Comportamentais e Informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique

Sumário

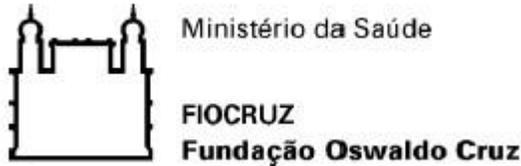
1. Introdução	13
1.1 Vírus Linfotrópico das células T-Humanas (HTLV-1).....	13
1.1.1 Estrutura e organização genómica do HTLV-1.....	14
1.1.2 Epidemiologia	16
1.1.3 Transmissão do Vírus.....	17
1.1.4 Doenças Associadas ao HTLV.....	18
1.2 Vírus de Imunodeficiência Humana tipo-I.....	19
1.2.1 Características virológicas e patogénicas do HIV-1.....	20
1.2.2 Epidemiologia da infecção do HIV	21
1.2.3 Mecanismos de Transmissão	23
1.2.4 Impacto da Co-Infecção dos Retrovírus HTLV-1 e HIV-1	23
1.2.5 Activação celular.....	24
1.3 Identificação/Definição do Problema de estudo.....	26
2. Objectivos	27
2.1 Objectivo geral.....	27
2.2 Objectivos específicos	27
3. Metodologia.....	28
3.1 Desenho do Estudo	28
3.2. Critérios de Inclusão e de exclusão.....	29
3.3. Colheita de amostra biológica.....	29
3.4. Testagem laboratorial.....	30
3.4.1. Diagnóstico do HIV	30
3.4.2. Diagnóstico do HTLV.....	30
3.4.3 Determinação dos parâmetros hematológicos.....	31
3.4.4 Imunofenotipagem de sub-populações de linfócitos T do sangue total.....	31
3.4.5. Análise estatística.....	32
4. Resultados.....	33
4.1. Características Sócio-demográficas e Imunológicas da População de Estudo.....	33
4.2. Estado de activação das células T CD4 ⁺ na co-infecção por HIV/HTLV-1 em crianças Moçambicanas	36
5. Discussão.....	41
6. Considerações Finais e Perspectivas	45
7. Referências Bibliográficas	46
ANEXOS.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HTLV-1.....	15
Figura 2. Representação esquemática das principais estruturas do vírus HTLV-1,.....	15
Figura 3. Distribuição geográfica do HTLV-1.....	16
Figura 4. Morfologia e estrutura do vírus de HIV-1	20
Figura 5. Representação Esquemática linear do genoma de HIV-1	21
Figura 6. Estimativa da distribuição mundial de indivíduos infectados por HIV	22
Figura 7. Prevalência de infecção pelo HIV em indivíduos adultos provenientes de diferentes regiões de Moçambique	23
Figura 8. Algoritmo de Testagem para Serologia de HIV	30
Figura 9. Perfil representativo da definição da população de linfócitos T	35
Figura 10. Expressão relativa de CD25 pelas células T CD4 ⁺ em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudas.	36
Figura 11. Expressão relativa de CD45RA pelas células T CD4 ⁺ (a) e T CD8 ⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudas.....	37
Figura 12. Expressão relativa de CD45RO pelas células T CD4 ⁺ (a) e T CD8 ⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudas.....	38
Figura 13. Expressão relativa de CD38 pelas células T CD4 ⁺ (a) e T CD8 ⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudas.....	39
Figura 14. Contagem em números absolutos e números relativos de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em pacientes adultos mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1	40

Índice de Tabelas

Tabela 1. Prevalência de HTLV-1 em Moçambique e Swazilândia.....	17
Tabela 2. Anticorpos monoclonais usados para identificação de marcadores celulares.....	32
Tabela 3. Características gerais de crianças co-infectadas (HIV/HTLV-1),.....	33
Tabela 4. Distribuição das sub-populações de células T para crianças moçambicanas co-infectadas HIV/HTLV-1, mono-infectadas (HIV) e crianças saudáveis.	34



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

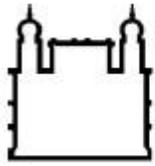
PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN CO-INFECTED BY IMMUNODEFICIENCE VIRUS (HIV) AND HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE-1 (HTLV-1)

ABSTRACT **MASTER THESIS**

Nádia Alves Amade

The Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV) is one of the most serious infectious diseases in the world and particularly in Africa where more than two thirds of cases were reported worldwide. This scenario is aggravated to the extent that co-infections may arise, making the immune system weaker. Human-T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), has been implicated as a frequent co-pathogenesis in regions where HIV and HTLV are frequent. Influence of HTLV-1 in the progression of HIV disease, are closely related, not only by molecular events, but also for their powers to induce cell activation. However, the mechanisms by which chronic activation induced by HTLV-1 can potentially affect the progression to AIDS in children is not described. In this study, we analyzed the activation status of CD4 and CD8 in Mozambican children chronically infected with HIV-1, and being in antiretroviral treatment (ART). To this end, we analyze it from whole blood cells of patients co-infected mono-infected (HIV) and virus-uninfected controls (healthy). The cells were then stained with antibodies specific for molecules: CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD45RO, CD38 and analyzed by flow cytometry. Our results showed that in co-infected children there is a higher expression of the marker CD25 and CD38, although not statistically significant and an increase in the CD45RO marker in the same patients when compared with mono-infected and health controls. In conclusion, although co-infected individuals have HIV/HTLV-1 CD4 T cell counts high or normal, these cells are functionally altered, showing high levels of cellular activation.

Keywords: HIV-1/HTLV-1, CD4 + T cells; Mozambique.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T EM CRIANÇAS CO-INFECTADAS PELOS VÍRUS DE IMUNODIFICIÊNCIA HUMANA (HIV) E LINFOTRÓPICO T HUMANO TIPO-1 (HTLV-1)

RESUMO**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Nádia Alves Amade**

O Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 (HIV) constitui uma das doenças infecciosas mais graves do mundo e particularmente em África onde mais de 2/3 de casos de todo o mundo foram reportados. Este cenário agrava-se na medida em que co-infecções possam surgir, tornando o sistema imune mais débil. O Vírus Linfotrópico da Células T Humanas (HTLV-1), tem sido implicado como frequente co-patogénese em regiões onde o HIV e HTLV são frequentes.

A Influência do HTLV-1 na progressão da doença por HIV, está intimamente relacionada, não apenas pelos eventos moleculares, mas também pelos seus poderes de induzirem activação celular. Contudo, os mecanismos pelo qual a activação crónica induzida pelo HTLV-1 pode potencialmente afectar a progressão para SIDA, em crianças, não está descrito. Neste estudo, analisamos o estado de activação de células T CD4 e T CD8 em crianças moçambicanas cronicamente infectadas por HIV-1, e estando em tratamento anti-retroviral (TARV). Para tal, analisamos as células a partir do sangue total dos pacientes co-infectados, mono-infectados (HIV) e controles não infectados por vírus (sadios). As células foram então marcadas com anticorpos específicos para as moléculas: CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD45RO, CD38 e analisados por citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que nas crianças co-infectadas verifica-se uma expressão mais elevada do marcador CD25 e CD38, apesar de não se mostrarem estatisticamente significativos e um aumento no marcador CD45RO nos mesmo pacientes quando comparados com os mono-infectados e sadios. Concluindo, embora indivíduos co-infectados por HIV/HTLV-1 apresentem contagens de células T CD4 elevados ou normais, estas células estão funcionalmente alteradas, apresentando níveis de activação celular elevados.

Palavras-Chave: HIV-1/HTLV-1, Células T CD4 +; Moçambique

1. Introdução

1.1 Vírus Linfotrópico das células T-Humanas (HTLV-1)

O HTLV-1 foi isolado pela primeira vez em um paciente com linfoma cutâneo de células T. Posteriormente, outros casos esporádicos de associação entre HTLV-1 e neoplasias malignas de células T foram relatados. Em 1985, na Martinica, pesquisadores estabeleceram a associação entre a infecção pelo HTLV-1 e a paraparesia espática tropical (TSP). Esta associação foi detectada em diferentes regiões do mundo como Caraíbe, Japão, África, América do Sul, América Central e Sul do Pacífico, sendo também denominada como mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (revisto em Araújo *et al.*, 1993).

Em 1908 Ellerman e Bang afirmaram que um agente biológico era capaz de causar transformações malignas, facto este observado quando ao injectar infiltrado celular obtido de tecido leucêmico de pássaros em galinhas, conseguiram produzir leucemia nas mesmas (Lins, R. M., 2004). Posteriormente, Rous em 1911 relatou que esses vírus apresentavam capacidade de causar sarcoma em pintos, ficando então conhecido como Sarcoma de Rous. A certeza de transmissão horizontal dos referidos retrovírus deu-se em 1964 quando Jarret *et al.*, conseguiram isolá-los de células leucêmicas de gatos. Independentemente, Termin *et al.*, 1970, comunicaram o descobrimento da enzima denominada transcriptase reversa em vírus tumorais RNA.

A importância dessa descoberta reside no facto de que novas pesquisas tiveram êxito ao se conhecer melhor o mecanismo de replicação viral após a entrada do vírus na célula. Verificou-se que a transcriptase reversa copia o genoma do vírus para DNA (ácido disoxirribonucléico). Este DNA é integrado no genoma da célula do hospedeiro, formando o provírus que por sua vez é usado como modelo para a síntese do RNA viral que será incorporado nas novas partículas virais em formação, reportado posteriormente por Gallo *et al.*, 1970, denominado actualmente como Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo I, conhecido pela sigla em inglês HTLV-I (Human T-Lymphotropic Virus-I).

Após o isolamento do HTLV-I, um segundo retrovírus, o vírus humano linfotrópico de células T tipo-2 (HTLV-2), foi identificado em células de um paciente com o diagnóstico de leucemia de células pilosas. No entanto, sua associação com condições patológicas não está suficientemente esclarecida (Gallo *et al.*, 2005).

1.1.1 Estrutura e organização genómica do HTLV-1

O HTLV-1 pertence ao género deltaretrovirus e é parte da família *Retroviridae* tipo C, subfamília *Oncornaviridae*. Tal como outros retrovírus, o HTLV-1 possui uma DNA polimerase dependente de RNA, uma transcriptase reversa que transcreve o seu genoma de RNA em DNA. Este DNA é integrado no genoma humano onde permanece latente e persiste como provírus escapando da vigilância imunológica.

O genoma do vírus possui 9032 nucleotídeos e contém os genes *gag*, *pol* e *env* de forma similar a outros retrovírus (Figs. 1-2). Adicionalmente, o HTLV-1 apresenta uma sequência próxima à extremidade 3' conhecida como região X, a qual codifica duas proteínas não estruturais, Tax e Rex (Bangham, 2000). A proteína Tax está envolvida na patogénese das doenças causadas pelo HTLV-1. O seu papel na patogénese da Leucemia/Linfoma das células T do Adulto (ATL) está relacionado à sua capacidade transactivadora, levando ao descontrole do processo de proliferação celular. Na HAM/TSP, a proteína tax participa em um conjunto de processos relacionados à invasão linfocitária e à resposta inflamatória crónica no Sistema Nervoso Central (SNC) (Proeitti, 2006).

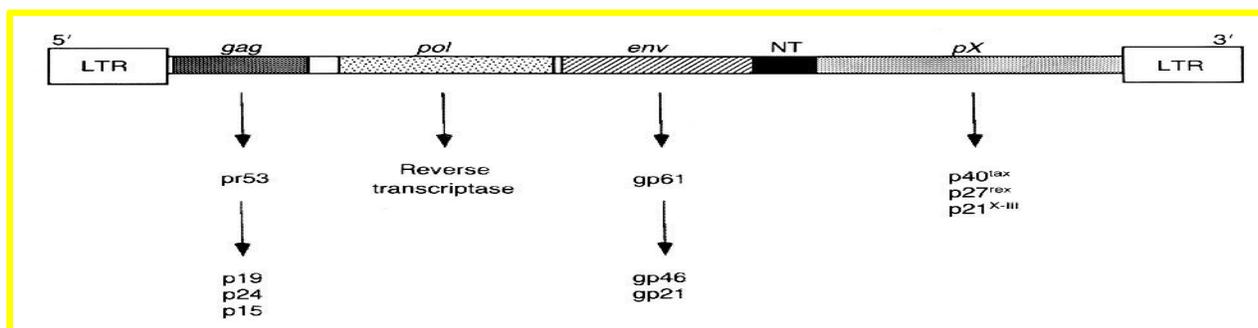


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HTLV-1.

O genoma proviral é constituído de: *env*: codifica as glicoproteínas externas do envelope (a precursora gp61-68 e sua derivada gp46) e a proteína transmembranar (gp21); *pol*: codifica as enzimas transcriptase reversa (p99), Rnase, endonuclease e protease; *gag*: codifica as proteínas do core viral (a precursora p52 e suas derivadas p15, p19 e p24); *tax*: codifica a proteína p40^{tax}, transactivadora do segmento LTR viral e de genes da célula eucariótica infectada; *rex*: codifica a proteína p27^{rex}, reguladora pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus; **segmento LTR**: presente nas extremidades do genoma pró-viral contém as regiões reguladoras da transcrição viral. Modificado a partir de Taylor, 1998.

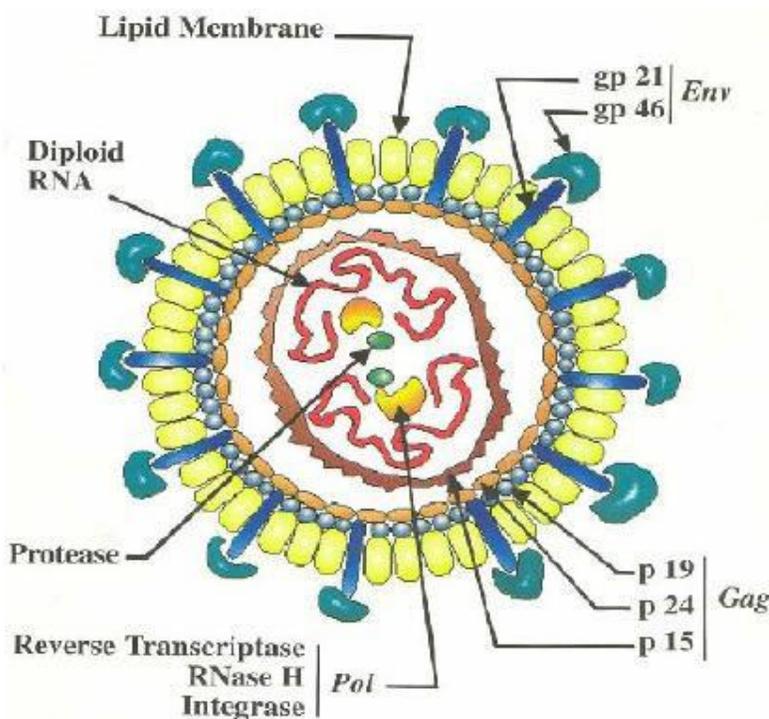


Figura 2. Representação esquemática das principais estruturas do vírus HTLV-1, incluindo a membrana lipídica, as proteínas do envelope assim como as enzimas (Gallo, 1986).

1.1.2 Epidemiologia

O HTLV-1 é um retrovírus oncogénico humano com poder transformante sobre as células T (Grassmann *et al.*, 2005). Foi o primeiro retrovírus humano descoberto e é um retrovírus com importante potencial patogénico. Estima-se que no mundo existam cerca de 20 milhões de pessoas infectadas por este vírus (Proietti *et al.*, 2005; Maloney *et al.*, 2000).

Este vírus é endémico em várias regiões tais como Japão, América do Sul e países da África subsaariana (Benin, Camarões, Guiné-Bissau). Casos esporádicos têm sido reportados em áreas não endémicas como Estados Unidos da América e Europa (Fig. 3), principalmente em emigrantes das áreas endémicas de HTLV-1 e utilizadores de drogas intravenosas (Wilks *et al.*, 1993; Proietti *et al.*, 2005).

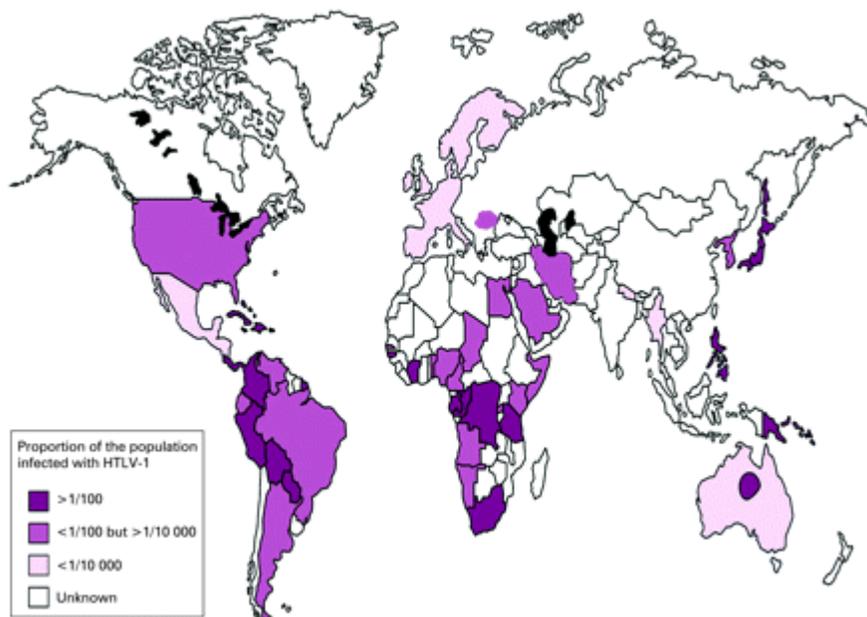


Figura 3. Distribuição geográfica do HTLV-1. Países endémicos para o HTLV-1 (Fonte: Proietti, 2005).

As mulheres são 2-3 vezes mais afectadas que os homens e a idade de aparecimento da doença corresponde geralmente aos 40 anos. A prevalência do HTLV-1 aumenta com a idade em ambos os sexos. Vários estudos foram descritos evidenciando a prevalência do HTLV-1 em Moçambique e países vizinhos, como por exemplo Swazilandia, conforme ilustrado na tabela abaixo:

Tabela 1. Prevalência de HTLV-1 em Moçambique e Swazilândia.

Local	Prevalência	Grupo Alvo	Referências
Moçambique	1,2%	Dadores de Banco de Sangue	Cunha <i>et al</i> , 2007
Moçambique	4,5%	Mulheres grávidas	Bhatt <i>et al</i> , 2009
Moçambique	0,89%	Dadores de Banco Sangue	Gudo <i>et al</i> , 2009
Moçambique	2,3% (Norte: 2,4%; Centro: 3,9%; Sul: 0,9%)	Pacientes HIV positivos nos Centros de Saúde	Caterino-de-Araújo <i>et al</i> , 2010
Swazilândia	Ndzevane: 2.8%; Malindza: 5.4%	Refugiados moçambicanos vivendo na Swazilândia	Van Rensburg <i>et al</i> , 1995

1.1.3 Transmissão do Vírus

a) Pessoa-pessoa

Existem três principais vias de transmissão do HTLV-1: (i) transmissão da mãe para o filho (via transplacentária durante o parto, mas principalmente durante o aleitamento. A transmissão intra-uterina ou perinatal também pode acontecer); (ii) transmissão por via sanguínea (partilha de agulhas contaminadas, transfusão sanguínea); (iii) transmissão sexual (Bittencourt, 1998; Neto & Sohler, 2009).

b) Célula-célula

Para que ocorra a transmissão eficiente do HTLV-1 de célula a célula é necessário que haja contacto celular. Contudo, o mecanismo de invasão célula a célula ainda não está totalmente esclarecido. O HTLV-1 expressa uma glicoproteína, proteína do envelope (*env*), necessária na infecção e fusão entre células. Algumas moléculas de adesão (ICAM-1, ICAM-3 e VCAM) actuam como co-factores na fusão celular induzida pelo HTLV-1, aumentando a adesão celular.

Após a entrada do vírus na célula, seu genoma é copiado para o ácido desoxirribonucléico (DNA) pela enzima transcriptase reversa, e é integrado no genoma celular, formando o provírus.

A síntese do RNA viral é feita por enzimas celulares, usando o provírus integrado como modelo. Após a integração do RNA, este é transcrito para cDNA pela transcriptase reversa, e o DNA integrado dentro do genoma do hospedeiro (Maloney *et al.*, 2000). O RNA é então processado para formar as proteínas virais e também o RNA que será introduzido nas novas partículas virais em formação (Soares *et al.*, 2001).

Quando o HTLV-1 é transmitido, as células infectadas juntam-se e formam sinapses virológicas com as células não infectadas. Proteínas virais e o genoma viral RNA são depois transferidos para dentro da célula-alvo.

1.1.4 Doenças Associadas ao HTLV

Em média, 5% dos portadores poderão desenvolver manifestações clínicas graves do tipo hematológica, a leucemia/linfoma das células T do adulto (ATL), doenças inflamatórias como HAM/TSP, uveítes, dermatite infecciosa e miosite.

O HTLV-I persiste indefinidamente no hospedeiro infectado, mas só 5% destes indivíduos infectados progridem para doença; a maioria permanece como portador assintomático (Walshe, 1967). Destes 5%, 1-2% desenvolve doença hematológica, ATL, enquanto que 2-3 % apresentam um quadro de disfunção neurológica, a HAM/TSP.

A *ATL* é uma malignidade progressiva dos linfócitos T periféricos caracterizados por uma deficiência da imunidade celular. Estima-se que a quarta parte destes pacientes desenvolve infecções oportunistas como resultado da condição grave de imunodeficiência periférica. Esta deficiência provém de uma acumulação de alterações genéticas advindas da actividade das proteínas reguladoras do HTLV-1 (Blank *et al.*, 1995) e tipicamente leva ao êxito letal em período de cerca de 12 meses após o surgimento da doença.

A *HAM/TSP* é uma doença neurológica de natureza inflamatória, afectando predominantemente o cérebro e a medula espinal. Clinicamente é caracterizada por fraqueza e espasticidade dos membros inferiores, incontinência urinária, e hipereflexia. Histopatologicamente verifica-se uma atrofia da medula espinal envolvendo dismielinização perivascular e degeneração axonal. Estudos associam os danos neurológicos à actividade citotóxica de linfócitos TCD8+ específicos

para a proteína tax, uma proteína imunodominante em indivíduos HTLV-1 positivos portadores de doença (Maloney *et al.*, 2000).

O Sistema Nervoso Central (SNC) tem sido considerado como um microambiente imunologicamente privilegiado onde reacções imunes distintivas ocorrem qualitativamente similares, porém mais brandas comparativamente a outros tecidos, isto é, as células do sistema imune migrantes fornecem uma vigilância mínima, mas suficiente. Estas condições são mantidas fisiologicamente por mecanismos de barreira e controlo da entrada de linfócitos com receptores específicos e pela expressão mínima de moléculas MHC pelas células neurais. Apesar desta estrutura blindada, o SNC às vezes torna-se alvo de reacções imunes aberrantes contra antígenos próprios, gerando um estado patológico de autoimunidade (Tsukasaki *et al.*, 1994).

A HAM/TSP é um modelo neuroinflamatório favorecido pela expressão de uma das proteínas do HTLV-1, que induz a transactivação de moléculas e permite uma infiltração de linfócitos no SNC. Este processo é feito por um mecanismo de interacções moleculares entre os linfócitos circulantes e as células endoteliais infectadas pelo HTLV-1 (Tsukasaki *et al.*, 1994).

O HTLV-I está implicado também em desordens inflamatórias graves como uveítes, alveolites pulmonares, síndrome de Sjogren e dermatites infecciosas (LaGrenade *et al.*, 1967).

1.2 Vírus de Imunodeficiência Humana tipo-I

A síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), descrita pela primeira vez em 1980, é caracterizada por uma profunda imunossupressão com diversos aspectos clínicos, incluindo infecções oportunistas. Em 1981 surgem os primeiros casos da infecção por HIV nas cidades de Los Angeles e Nova Iorque (Estados Unidos da América). Estes doentes apresentavam determinadas patologias, típicas de imunossupressão graves, como Sarcoma de Kaposi, e infecções oportunistas múltiplas. Apenas em 1982, esta patologia foi nomeada, ficando conhecida como “Síndrome da Imunodeficiência Adquirida”, por resultar de um conjunto de sinais e sintomas, que provocavam a diminuição da imunidade, existindo défice imunológico acentuado (revisto em Barroso, 2008).

É causada pelo retrovírus denominado vírus da imunodeficiência humana (HIV) que primariamente infecta macrófagos e células T CD4⁺.

1.2.1 Características virológicas e patogênicas do HIV-1

O HIV é um vírus de RNA da família dos retrovírus de formato esférico, com aproximadamente 10 nm de diâmetro, que possui duas fitas de RNA de polaridade positiva. A estrutura básica do vírus compreende repetições terminais longas (LTR's) em cada extremidade do genoma, que são importantes para a integração do vírus, genes *gag* que codificam proteínas estruturais básicas com p17 e p24, genes *pol* codificando a polimerase, transcriptase reversa e integrase, e genes *env* responsáveis pela síntese do envelope viral (gp120 e gp41), conforme ilustrado nas Fig. 4 e 5.

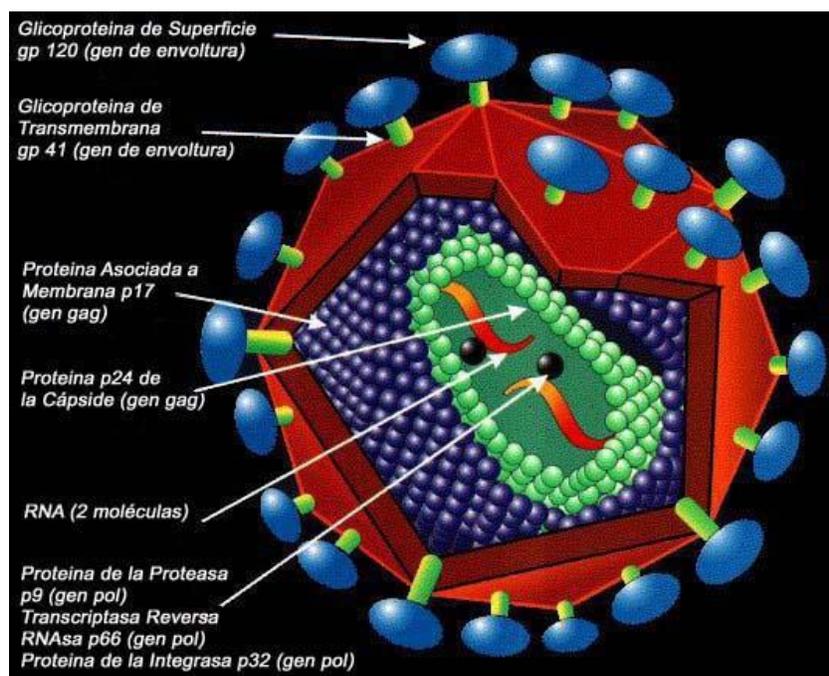


Figura 4. Morfologia e estrutura do vírus de HIV-1 (Taylor, 1998), ilustrando a localização das diversas proteínas virais, e fitas de RNA.

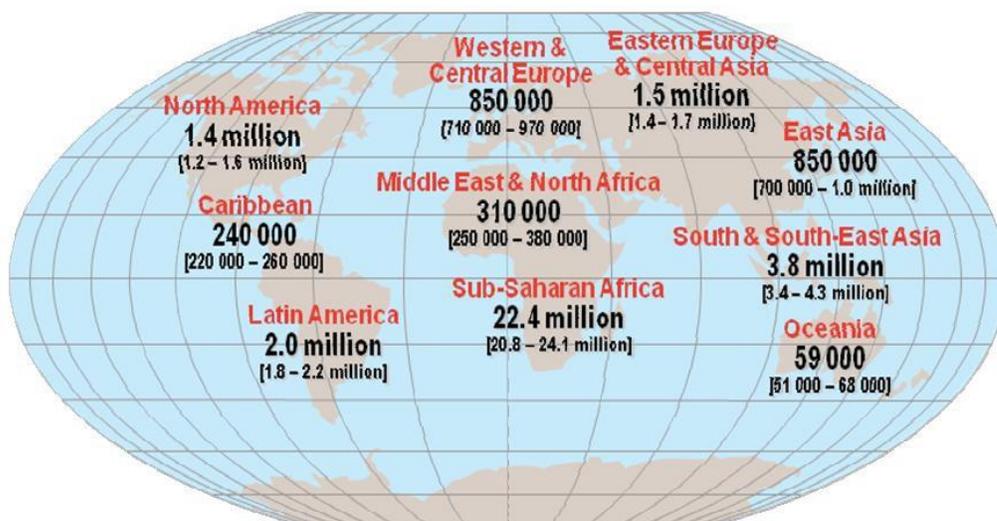


Figura 6. Estimativa da distribuição mundial de indivíduos infectados por HIV (UNAIDS, 2009).

Dados do INSIDA liberados em 2009, demonstraram que Moçambique apresenta uma prevalência de HIV-1/2 de 11.5% na população adulta entre os 15-49 anos de idade (INSIDA, 2009). Na região Norte de Moçambique verificou-se uma prevalência de 9%, na região Centro uma prevalência de 18%, e na região Sul uma prevalência de 21% (Fig. 7).

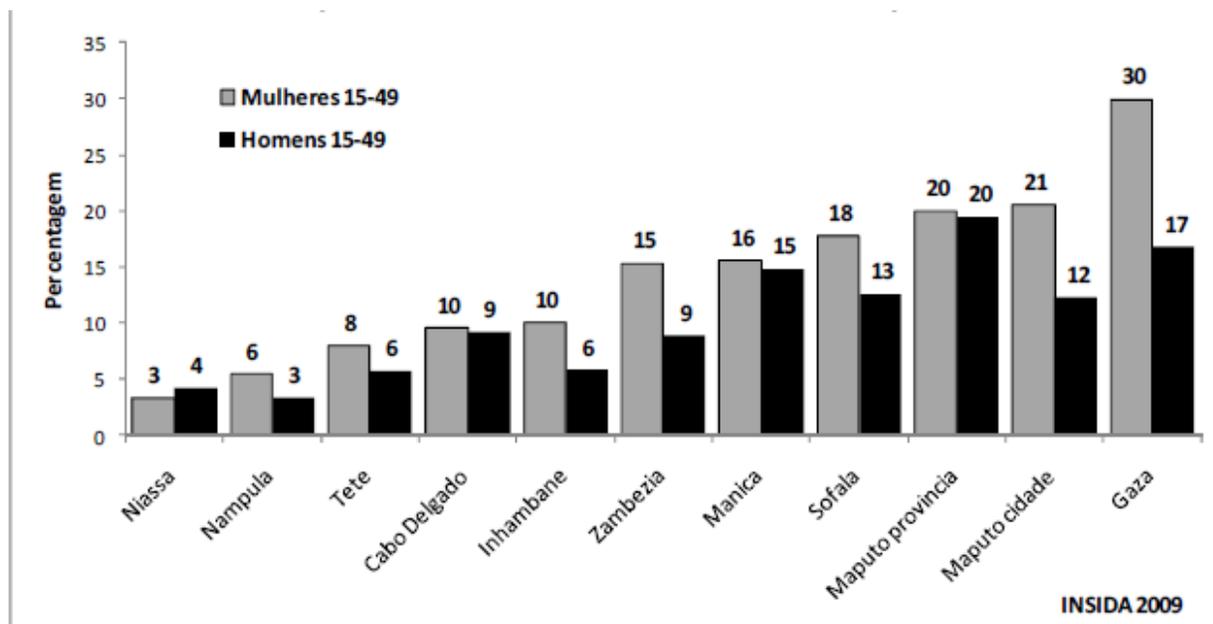


Figura 7. Prevalência de infecção pelo o HIV em indivíduos adultos, provenientes de diferentes regiões de Moçambique (INSIDA, 2009).

Celina Abreu, 2009, conduziu um estudo para avaliar os subtipos de HIV-1 de diferentes regiões geográficas de mulheres moçambicanas grávidas seropositivas e virgens aos fármacos antiretrovirais. O subtipo C mostrou-se mais prevalente nas nossas populações, contudo, amostras colhidas entre 2002-2004 em 144 pacientes virgens ao TARV, confirmaram a prevalência do subtipo C (80,8%) e a introdução de novos subtipos como G (3,8%), formas recombinantes circulantes e formas não tipadas U (Bártole *et al.*, 2009).

1.2.3 Mecanismos de Transmissão

A maioria dos casos de infecção pelo HIV no mundo resulta da transmissão por contacto sexual. Os outros modos de transmissão incluem a transmissão parenteral, transmissão vertical e a partir de transfusão de sangue contaminado, embora a expectativa seja de que isto se torne cada vez mais raro, devido ao rastreamento de rotina para este patógeno (Knipe & Howley, 2007). Para a transmissão sexual, o risco parece ser maior de homem para mulher, do que de mulher para homem devido as características fisiológicas da mulher, como uma grande área de superfície da mucosa que está exposta ao fluído seminal (Klimas *et al.*, 2008). O risco de transmissão de homem para homem é ainda maior do que o risco de transmissão heterossexual, sendo mais frequente em pessoas praticando sexo anal receptivo (Knipe & Howley 2007).

1.2.4 Impacto da Co-Infecção dos Retrovírus HTLV-1 e HIV-1

Os linfócitos T CD4 e macrófagos são os maiores alvos nesta co-infecção (Szabó *et al.*, 1999). Este aspecto está relacionado à acção de cada agente sobre a célula hospedeira. Na infecção pelo HTLV-1 verifica-se um estímulo persistente à proliferação linfocitária. O HIV apresenta actividade citopática, que ao longo do tempo reduz progressivamente a população de células T CD4⁺, levando pacientes ao estágio de imunodeficiência que caracteriza a SIDA.

Outro aspecto refere-se ao facto de que tanto o HIV-1 como o HTLV-1 apresentem tropismo para o mesmo tipo de célula, isto é células que expressam a molécula CD4. Dados sugerem que pacientes co-infectados progridem mais rapidamente para a SIDA do que indivíduos mono-infectados (Gudo *et al.*, 2009).

Foi descrito por Bhatt *et al.*, 2009, uma prevalência do HTLV-1 de 4.5% em indivíduos infectados por HIV em Moçambique. A consequência desta co-infecção ainda não é bem

conhecida. Foi inicialmente assumido que a co-infecção HIV-1/HTLV-1 poderia conduzir mais rapidamente a progressão para a SIDA. Sugere-se também que uma co-infecção estaria associada ao aumento do risco de desenvolvimento de condições neurodegenerativas, dentre elas um quadro que se assemelha a HAM/TSP (Berger, *et al.*, 1991; Beilke, *et al.*, 2005; Tulus, *et al.*, 2009).

Existe a possibilidade de a co-infecção pelo vírus de HTLV-1 em indivíduos infectados pelo vírus de HIV-1, elevar o número de linfócitos T CD4⁺ no momento do evento definidor de SIDA, inferindo que essa contagem possa ser um marcador laboratorial incompleto nos pacientes com a co-infecção HIV-1/HTLV-1.

1.2.5 Ativação celular

Linfócitos e outras células do sistema imune são classificados de acordo com as moléculas de superfície celular designadas por CD (“cluster of differentiation”). Leucócitos humanos têm mais de 300 marcadores, e uma determinada célula pode expressar vários deles. Células T auxiliares de fenótipo CD4⁺, por exemplo, coordenam a resposta imune, enquanto que células T citotóxicas, e expressando CD8 atacam, são capazes de exercer efeito citolítico sobre as células infectadas pelo vírus.

Existe um consenso na literatura (Becherer *et al.*, 1990; Sadora *et al.*, 2008; Yasunaga *et al.*, 2008) que ambos, HIV e HTLV, separadamente induzem modificações funcionais na população de linfócitos T, caracterizado dentre outros, pela diminuição de células naïves e altos níveis de activação celular quando comparados com indivíduos não infectados.

O progresso natural da infecção por HIV-1 causa mudanças nas proporções da maior parte das sub-populações de linfócitos T. Por exemplo, a progressão de HIV conduz rapidamente a uma depleção de linfócitos T CD4⁺ co-expressando CD28 (Ostrowski *et al.*, 2003). Deficiência da co-expressão de CD28 nas células T acarreta conseqüências funcionais, pois este marcador é a primeira molécula co-estimuladora para as células T naïves, que após o contacto aumenta a sobrevivência da célula T e previne a indução de anergia celular. Consequentemente, a maioria

das células CD4⁺ podem se tornar apoptóticas ou anérgicas após a activação numa infecção avançada por HIV.

Indivíduos infectados por HIV apresentam uma diminuição no número de linfócitos T de memória e naïve (CD45RA⁺CD62L⁺). Além disso, a infecção precoce por HIV está associada à depleção de células T de memória (CD45RO⁺) e expansão de CD8⁺ a células activadas (CD45RA⁺,CD62L,CD38⁺,CD27⁺ e CD45RO⁺) (Yasunaga, *et al.*, 2008).

Tem sido também demonstrado que baixos níveis de células CD4⁺CD28⁺ e baixa reactividade das células T para co-estimulação CD3/CD8 conduzem ao SIDA. Além disso, níveis celulares de CD4⁺CD28⁺ correlacionam negativamente com vários marcadores de progressão para a doença (HIV). Altos níveis de células T CD38⁺ ou expressão de CD38 nas células T foi recentemente mostrado como predizem para rápida progressão para SIDA, perda de células CD4⁺ e morte (Ostrowski *et al.*, 2003).

Está bem estabelecido que a imortalização e transformação das células induzidas pelas proteínas Tax e Rex, codificadas pelos genes de HTLV-1 constituem o maior evento ligado ao crescimento e proliferação de células T CD4⁺.

Gudo *et al.*, 2009, demonstraram que indivíduos co-infectados apresentaram baixa expressão de CD45RA⁺ (marcador fenotípico de linfócitos T naïve) nas células T CD4⁺. Células naïve são consideradas como as primeiras células a serem depletadas na presença de activação imune. Contudo, a magnitude e impacto exercido por estas células na progressão do HIV não está ainda bem esclarecido. Algumas hipóteses poderiam explicar este aspecto:

- 1) Mecanismo homeostático levando à substituição de células mortas;
- 2) Recrutamento massivo de células naïve imposto pelo mecanismo que conduz à activação;
- 3) Insuficiência de produção de células T (Gudo *et al.*, 2009).

Outro marcador de linfócitos T naïve (CD62L) também foi avaliado no contexto da co-infecção HIV/HTLV-1 por Gudo *et al.* (2009), onde é perdido normalmente após a activação. Como esperado, verificou-se uma drástica redução de linfócitos CD4⁺CD62L no grupo dos co-infectados, quando comparado com os monos-infectados por HIV. A redução destas células naïve foi acompanhada por altas frequências de células activadas e de memória medidas por CD45RO⁺ (memória), CD38⁺ e CD25⁺ (activadas).

No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, até o presente momento não foi efectuado nenhum estudo onde é avaliada a co-infecção *versus* activação celular em crianças.

1.3 Identificação/Definição do Problema de estudo

Foi recentemente demonstrado que o HTLV-1 é prevalente na população de indivíduos infectados pelo HIV-1 bem como em doadores de sangue em Moçambique. Nenhuma das infecções dispõe de tratamento curativo. É sabido que o HIV-1 apresentando uma actividade citopática, reduz o número de células T CD4⁺, levando os pacientes a um estado de deficiência imunitária. Por outro lado, a infecção por HTLV-1 apresenta também um tropismo pelas células T CD4⁺, induzindo no entanto, proliferação linfocitária que resulta em linfocitose T CD4⁺.

Em pacientes adultos, alguns estudos referem que esta co-infecção (HIV/HTLV) progride mais rapidamente para a SIDA. Contudo, estudos semelhantes ainda não foram realizados em crianças co-infectadas onde sabe-se que as crianças apresentam o sistema imune menos desenvolvido quando comparados com os adultos, e também estão menos expostas a diversos patógenos que os adultos, o que poderia predizer em caso de hiper activação uma maior progressão para a doença.

2. Objectivos

2.1 Objectivo geral

Avaliar o perfil fenotípico dos linfócitos T (T CD4 e T CD8 em crianças co-infectadas pelos Vírus HIV-1 e HTLV-1.

2.2 Objectivos específicos

- Comparar a frequência de diferentes populações linfocitárias (TCD4 e TCD8) nas crianças co-infectadas com HIV-1 e HTLV-1 com as crianças mono-infectadas (só com HIV) e crianças saudáveis não infectadas.
- Comparar os níveis de activação celular nos grupos de estudo.

3. Metodologia

3.1 Desenho do Estudo

Foi um estudo do tipo caso-controlo, no qual foram definidos como casos crianças com co-infecção (HIV-1 e HTLV-1) e como controlos crianças mono-infectadas pelo HIV e crianças saudias (sem HIV e sem HTLV).

Os pacientes desta análise foram selecionados de outro estudo de vigilância realizado em Moçambique denominado “Seroprevalência do vírus HTLV-1 em crianças mocambicanas HIV 1/2 seropositivas”. Naquele estudo, foram incluídos um total de 807 pacientes HIV+ onde 11 destes tiveram diagnóstico confirmado para HTLV-1. Dos 11 pacientes co-infectados pelos vírus HIV e HTLV-1, alguns não foram possíveis contactá-los por diversas razões, nomeadamente: mudança de residência o que comprometeu a busca activa desses pacientes, falta nas consultas de rotina nas datas presentes nas fichas de consulta e também paciente que não aceitou participar no estudo. Assim sendo, foram selecionados para esta análise 4 pacientes co-infectados por HIV/HTLV-1.

A todas as crianças elegíveis foi solicitado aos encarregados de educação/tutor legal, consentimentos informados, questionário de recolha de dados clínicos e foi colhida uma amostra de sangue (5 mL) após a realização de uma consulta médica. Esta amostra de sangue foi usada para realizar o rastreio de anticorpos anti-HTLV-1, e HIV, contagem de células T CD4⁺ e determinação de parâmetros hematológicos.

Uma nova consulta médica foi marcada, seis semanas após a primeira, na qual os resultados dos testes laboratoriais realizados na primeira consulta foram entregues aos participantes e/ou ao seu parente/tutor legal.

Cada criança identificada com co-infecção HIV/HTLV-1 foi pareada com duas crianças com mono-infecção por HIV e uma criança saudável (não infectada) de acordo com idade, sexo, estadiamento clínico da OMS e tempo de duração de tratamento antiretroviral. A todos os casos identificados e no respectivo grupo controlo foi colhida informação clínica e uma nova amostra de sangue na segunda consulta (5 ml) para realizar estudos para a determinação de parâmetros imunológicos.

Uma terceira consulta médica foi marcada oito semanas após a segunda, para que os resultados dos testes laboratoriais fossem entregues às crianças e/ou ao seu parente/tutor legal. Todas crianças com co-infecção detectadas no estudo foram seguidas nas respectivas Unidades Sanitárias.

Os pacientes foram recrutados no Hospital Geral de Mavalane e Centro de Saúde 1º de Maio.

3.2. Critérios de Inclusão e de exclusão

Foram elegíveis a participar no estudo, as crianças (caso) com idade entre os 18 meses e 14 anos; seropositivas para HIV; e cujo tutor legal tenha aceite a participação no estudo. Além disso, foram elegíveis a participar no estudo, crianças saudáveis (controlos) com idade entre os 18 meses e 14 anos; seronegativas para HIV e HTLV-1; e cujo tutor legal tenha concordado com a participação das mesmas no referido estudo.

A não-assinatura do termo de consentimento pelo responsável, a ausência da segunda colheita de sangue ou a desistência de participar implicou em exclusão imediata do estudo.

3.3. Colheita de amostra biológica

A todas as crianças com seu estado serológico positivo para a infecção de HIV, colheu-se 5 ml de sangue para o rastreio de HTLV. Este grupo foi pareados de acordo com a idade, sexo, estadio clínico e tempo de tratamento com fármacos antiretrovirais.

As amostras de sangue foram colhidas de uma forma asséptica da região cubital em tubo de vácuo contendo K₃EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, San José, Califórnia, EUA). Após o estabelecimento e elegibilidade dos grupos de estudo (4 crianças com HIV-1/HTLV-1 e 9 crianças com HIV-1), 5 ml de sangue foram novamente colhidos num tubo de vácuo contendo EDTA para os ensaios funcionais de imunologia. As amostras recolhidas foram enviadas para o INS em menos de 6 horas após a colheita.

3.4. Testagem laboratorial

3.4.1. Diagnóstico do HIV

O diagnóstico de HIV-1/2 em todos pacientes foi feito usando o algoritmo de testagem nacional para o HIV em Moçambique, que consiste em dois testes rápidos imunocromatográficos para a detecção de anticorpos anti-HIV-1/2 (ver Fig. 8). O rastreio dos casos é feito usando o *Determine HIV-1/2* (Abbott Laboratories, Japão) e os casos reactivos confirmados com o segundo teste- *Unigold HIV* (Trinity Biotech, Irlanda), de acordo com as instruções do fabricante. Os casos não-reactivos no *Determine* foram considerados como negativos, e os que foram reactivos em ambos os testes, foram considerados como positivos para HIV-1/2. Os que foram reactivos no *Determine* e não-reactivos no *Unigold* foram considerados como sendo Indeterminados.

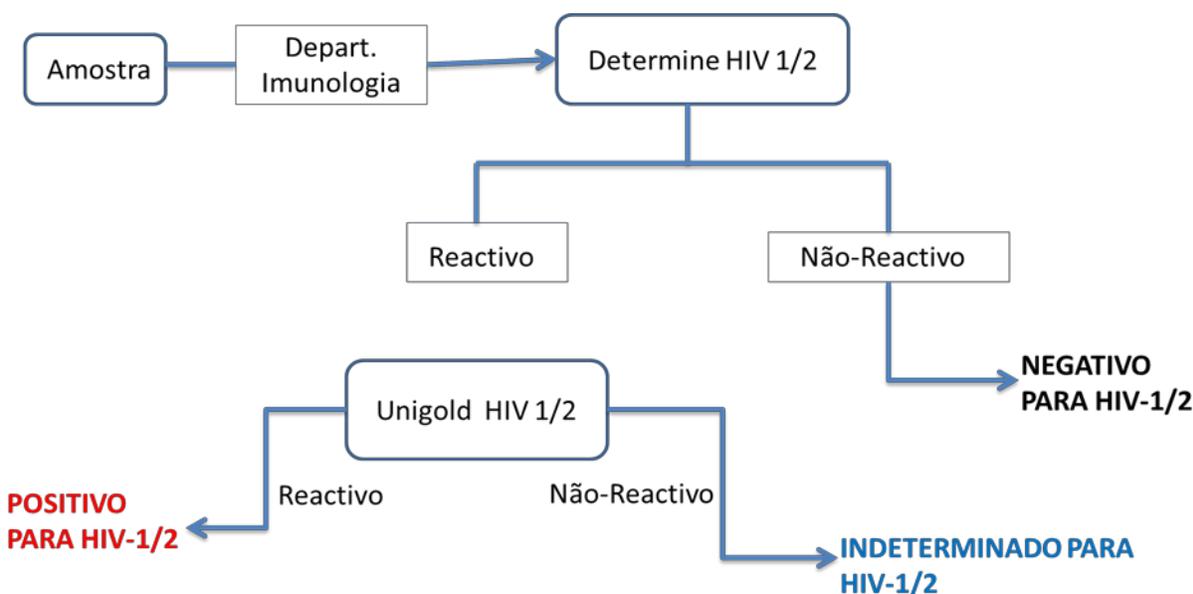


Figura 8. Algoritmo de Testagem para serologia de HIV

3.4.2. Diagnóstico do HTLV

Todas as amostras foram testadas para a presença de anticorpos anti-HTLV -1/2 usando um teste imunoenzimático (MP Diagnostics HTLV 1/2 ELISA 4.0, Singapura) segundo as orientações do fabricante. Todas as amostras reactivas foram confirmadas por *Western blot* (MP Diagnostic HTLV BLOT 2.4, Singapura) onde todos pacientes com reactividade para antígenos codificados

pelo gene *gag* (p19 com ou sem p24) e dos dois antígenos codificados por *Env* (GD21 e rgp46-I) eram consideradas como infectadas pelo HTLV-1.

3.4.3 Determinação dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos (hemoglobina, neutrófilos, basófilos) foram determinados usando um auto-analizador de hematologia (Sysmex KX-21N, Japão).

3.4.4 Imunofenotipagem de sub-populações de linfócitos T do sangue total

Para esta fase do estudo, 5 ml de sangue foram colhidos em tubo de vácuo contendo EDTA (vacutainer, Becton Dickinson, San José, EUA). Posteriormente, a 50 µl de sangue total foram adicionados 20 µl de *cocktail* de anticorpos previamente preparados de acordo com os painéis: CD25-FITC/CD4-PerCP/CD8-APC; CD45RA-FITC/CD45RO-PE/CD4-PerCP/CD8-APC; CD38-FITC/CD4-PE/CD3-PerCP/CD8-APC

Após adicionados os anticorpos, a suspensão foi agitada por 3 segundos no vortéx e incubada em câmara escura por 15min a 4°C. Terminado o período de incubação, foram adicionados 450µl de solução de lise/amostra (FACS Lysing solution; Becton Dickinson, EUA, diluída 1:10 em água destilada) para lise dos eritrócitos. Após a adição desta solução, as amostras permaneceram em câmara escura por 15 minutos. As amostras foram adquiridas utilizando citómetro de fluxo FACSCalibur™ (Beckton-Dickinson, San Diego, EUA), usando o software MULTISSET (Beckton-Dickinson).

Em cada dia de realização dos ensaios, correu-se uma amostra de indivíduo do grupo controlo para verificar se haveria necessidade de ajustar o instrumento. Após o ajuste do instrumento no primeiro dia de corrida das amostras, nos ensaios subsequentes procurou-se manter os mesmos valores ou aproximados, das voltagens dos detectores de fluorescência e da dispersão da luz. Não foi observada nenhuma variação da intensidade dos *lasers* durante os ensaios. Foi colhido um total de 2×10^5 eventos na região de linfócitos por amostra. A região de análise foi delimitada a partir dos parâmetros de tamanho e granulidade, com base na dispersão de luz frontal *versus* dispersão de luz lateral. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *Summit*, versão 4.3 (Dako Corporation, Colorado, EUA).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais usados para identificação de marcadores celulares

Especificidade Molecular	Clone	Fluorocromo	Diluição	Fabricante
CD4	SK3	PerCP	1/100	BD Pharmingen
CD4	SK3	PE	1/20	BD Pharmingen
CD3	SK3	PerCP	1/5	BD Pharmingen
CD8	SK3	APC	1/100	BD Pharmingen
CD38	SK3	FITC	1/20	BD Pharmingen
CD45RA	SK7	FITC	1/5	BD Pharmingen
CD45RO	UCHL1	FITC	1/5	BD Pharmingen
CD25	SK3	FITC	1/5	BD Pharmingen

3.4.5. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando os pacotes estatísticos STATA 10. Usou-se o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis para comparação de medianas entre os grupos*. Foram considerados valores de *p* igual ou inferiores a 0.05 para termos de comparação/correlação.

4. Resultados

4.1. Características Sócio-demográficas e Imunológicas da População de Estudo

A população de estudo consistiu em 9 crianças HIV positivas, 4 crianças co-infectadas com HIV/HTLV-1 e 4 crianças saudáveis (CS) sem HTLV nem HIV. Todas as crianças HIV positivas estavam a receber o tratamento anti-retroviral (TARV). A mediana das idades foi de 7,5 anos (IQR: 4,0-10,25 anos) para as crianças co-infectadas e 7 anos (IQR: 5,0-11,5 anos) para as crianças mono-infectadas. Tanto as crianças co-infectadas como as mono-infectadas encontravam-se no estadio clínico 2 de HIV-1, segundo os critérios preconizados pela OMS. Não foi identificado nenhum caso de HAM/TSP ou ATL dentre os grupos de estudo.

Tabela 3. Características gerais de crianças co-infectadas (HIV/HTLV-1), mono-infectados (HIV) e crianças saudáveis

Características Gerais	HIV/HTLV-1 (n=4)	HIV (n=9)	CS (n=4)
Idade (anos)			
Mediana	7,5	7	6,5
IQR	4,0-10,25	5,0-11,5	5,3-7,8
Género			
Masculino	2	5	2
Feminino	2	4	2
Estadio Clínico HIV			
I	0	0	N/A
II	4	9	N/A
III	0	0	N/A

Comparou-se também as subpopulações de células T para cada grupo de estudo (tabela 4), onde constatou-se que o grupo dos indivíduos co-infectados apresentava maior contagem de células TCD4+ (mediana=1840 céls/mm³ *versus* 777 céls/mm³ e 35% *versus* 26,5%) quando comparados com crianças HIV positivas. Contudo, apesar destas diferenças, o valor de p não foi estatisticamente significativo.

Tabela 4. Distribuição das sub-populações de células T para crianças moçambicanas co-infectadas HIV/HTLV-1, mono-infectadas (HIV) e crianças saudáveis.

Subpopulações de Células T	HIV/HTLV-1 (n= 4)	HIV (n=9)	CS (n=4)	Valor de p*		
				(HIV vs CS)	(HIV/HTLV-1 vs HIV)	(HIV/HTLV-1 vs CS)
Contagem de células CD4⁺ (cels/mm ³)						
Mediana	1840	777	1230			
IQR	994-2686	266-1279	1205-1557,5	0,2	0,2	0,4
Percentual de células CD4⁺						
Mediana	35	26,5	43			
IQR	26,5-43,5	14-36	42-44	0,09	0,4	0,4
Contagem de células CD8⁺ (cels/mm ³)						
Mediana	1341	995	927			
IQR	1174-1508	800-1050	730-1124	0,6	0,08	0,2
Percentual de céls T CD8⁺						
Mediana	32	38,3	27,5			
IQR	25-38,5	28-48	27-28	0,3	0,4	0,5
Razão TCD4⁺/TCD8⁺						
Mediana	0,8	0,9	3,0			
IQR	0,8-2,5	0,3-1,5	1,7-3,2	0,3	0,5	0,4

*Teste Não Paramétrico Kruskal-Wallis

Para a análise das subpopulações de linfócitos T do sangue total dos pacientes, utilizou-se gráficos em dot plot obtidos por citometria de fluxo, conforme ilustrado na figura 9.

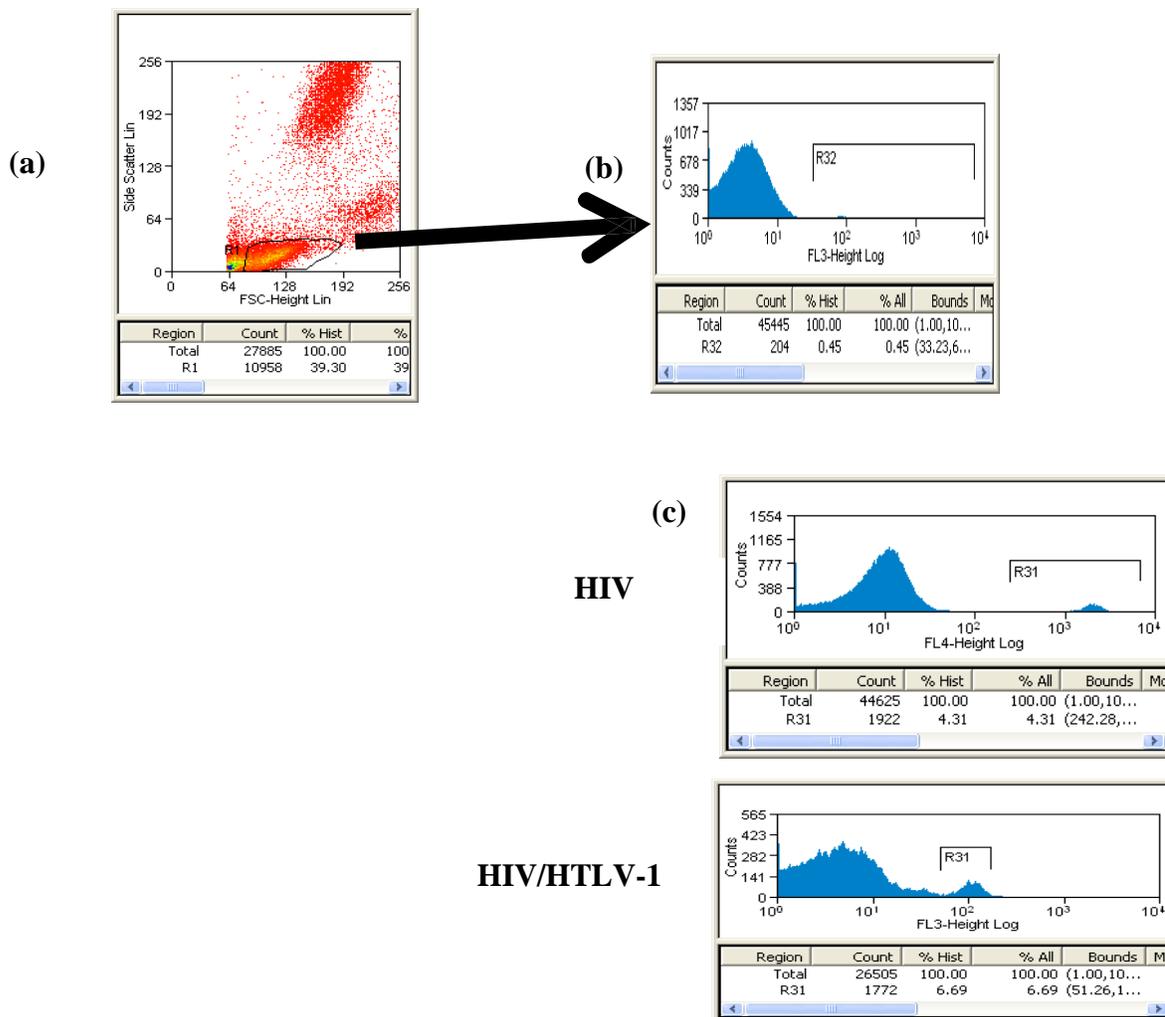


Figura 9. Perfil representativo da definição da população de linfócitos T a partir do gráfico em dot plot (a), do histograma na região de positividade para CD4 (b) e um histograma representando o pico de positividade para células T CD4 (c) para cada grupo de estudo: controlos saudáveis (CS), pacientes mono-infectados (HIV) e co-infectados (HIV/HTLV).

4.2. Estado de activação das células T CD4⁺ na co-infecção por HIV/HTLV-1 em crianças Moçambicanas

Alguns marcadores de activação celular como CD25, CD45RA, CD45RO E CD38, foram analisados em linfócito T CD4 e TCD8 de crianças HIV, co-infectadas por HIV/HTLV-1 e crianças saudias.

O marcador CD25 corresponde à cadeia alfa do receptor de IL-2, e é expresso em células T activadas. De acordo com a figura abaixo, verifica-se que a mediana de expressão absoluta de CD25 em linfócitos T CD4⁺ em pacientes co-infectados foi de 4,08 (IQR: 0,45-11,05), enquanto que no grupo de mono-infectados foi de 1,81 (IQR: 0,33-3,40) e do grupo sadio foi de 2,96 (IQR: 1,68-3,23). Estes dados indicam-nos que a expressão de CD25 foi similar entre os grupos de estudo avaliados (HIV/HTLV vs HIV, $p=0,5$; HIV/ HTLV vs Sadio, $p=0,9$)

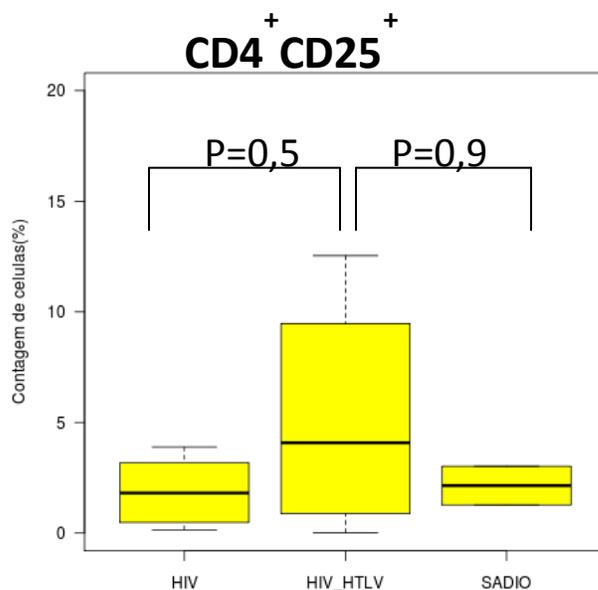


Figura 10. Expressão relativa de CD25 pelas células T CD4⁺ em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudias.

Analizou-se também a expressão de CD45RA em células T CD4⁺ (figura 5a) e T CD8⁺ (figura 5b). Este marcador é normalmente expresso nos linfócitos T Naíve e sua densidade diminui após a activação. No grupo dos co-infectados, a expressão de CD45RA nas células T CD4⁺ mostrou

uma mediana de 7,26 (IQR: 1,85-15,24) quando comparado com os mono-infectados (mediana=1,45; IQR: 0,64-2,71), e tal diferença mostrou-se estatisticamente significativa com o valor de $p=0,05$.

Em relação à expressão deste marcador nas células T CD8⁺, os dados não mostraram-se significativamente diferentes entre os grupos de estudo (HIV/HTLV: mediana=3,91; IQR: 3,33-9,79 e HIV: mediana=1,68; IQR: 0,79-5,23). No entanto, quando o grupo co-infectado foi comparado com o grupo sadio verificamos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$)

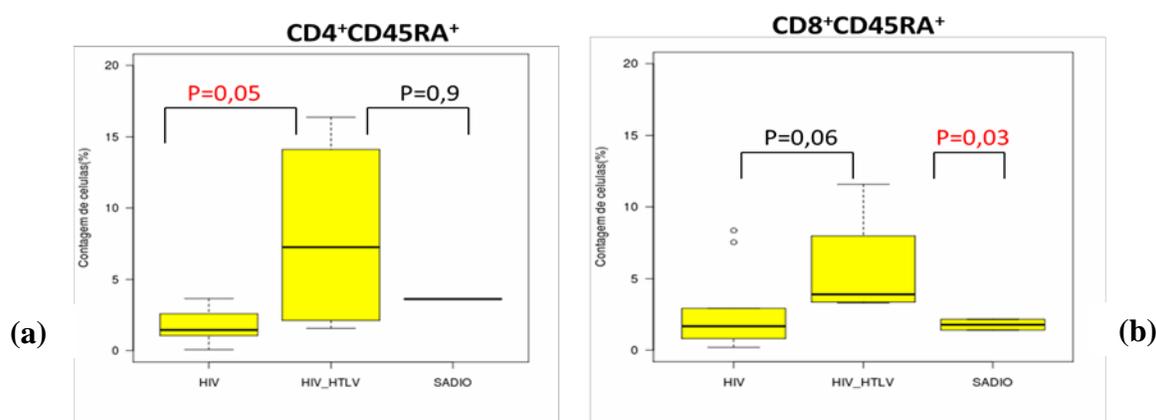


Figura 11. Expressão relativa de CD45RA pelas células T CD4⁺ (a) e T CD8⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças sadias.

Avaliou-se também o nível de activação celular, através do marcador CD45RO nas células T CD4⁺ (figura 6a) e T CD8⁺ (figura 6b). A mediana da expressão deste marcador no grupo dos co-infectados nas células T CD4⁺ foi de 2,63 (IQR: 0,85-6,98) e nos grupos dos mono-infectados observou-se uma mediana de 0,49 (IQR: 0,25-1,04) e esta diferença foi estatisticamente significativa, com o valor de $p=0,05$. Este marcador não mostrou diferenças significativas quando expresso nas células T CD8⁺ ($p=0,1$).

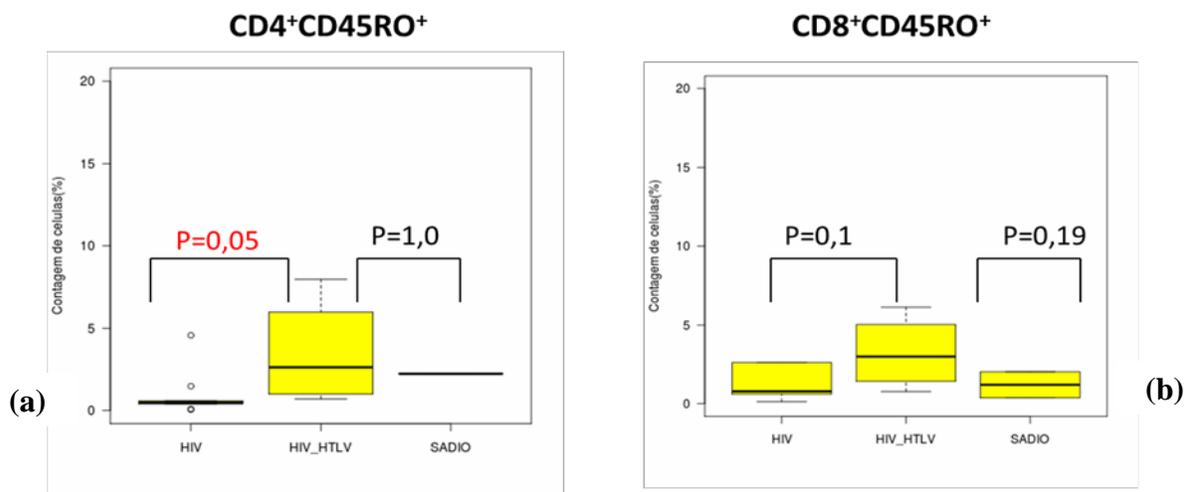


Figura 12. Expressão relativa de CD45RO pelas células T CD4⁺ (a) e T CD8⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças sadias.

Avaliou-se o nível de activação do marcador CD38 nas células T CD4⁺ e T CD8⁺, em pacientes co-infectados e mono-infectados. De acordo com a figura 7, a mediana da expressão de CD38 nas células T CD4 em pacientes co-infectados foi de 4,005 (IQR: 1,48-7,70) quando comparados com os mono-infectados (mediana=1,60; IQR: 0,13-3,61), contudo os dados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (HIV/HTLV vs HIV, $p=0,08$; HIV/HTLV vs Sadio, $p=0,14$).

Em relação à mediana da expressão de CD38 nas células T CD8⁺, em pacientes co-infectados foi de 5,97 (IQR: 2,97-8,61) quando comparados com os mono-infectados (mediana=2,36; IQR: 0,89-5,35), sem no entanto as diferenças mostrarem-se estatisticamente significativas entre os grupos (HIV/HTLV vs HIV, $p=0,08$; HIV/HTLV vs Sadio, $p=0,1$).

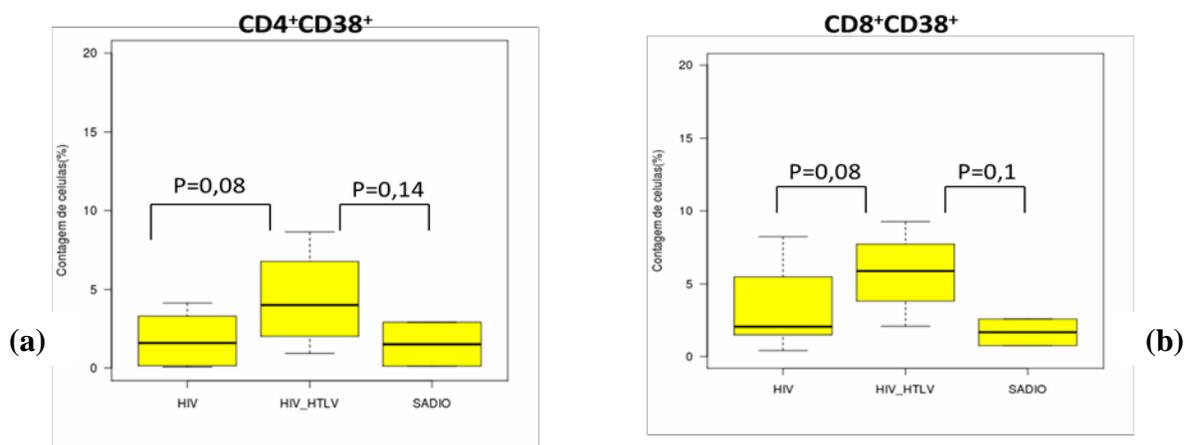


Figura 13. Expressão relativa de CD38 pelas células T CD4⁺ (a) e T CD8⁺ (b), em pacientes mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1, e crianças saudias.

Finalmente, comparamos os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos mesmos grupos de estudo, mas desta feita em adultos estando também no estadio clínico 2 de HIV-1 e em tratamento antiretroviral, usando dados de outro estudo (Matevele, 2009).

Neste contexto, verificou-se que a mediana da contagem dos linfócitos T CD4 absoluto no grupo co-infectado foi de 1076 (IQR: 769,5-1409,5) quando comparado com o grupo HIV, com mediana de 300,3 (IQR: 220,3-468,0), e esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa com o valor de p igual a 0,001. Em relação aos valores de CD4 percentuais, também mostraram-se estatisticamente significativos (p=0,01) quando comparados os dois grupos: HIV/HTLV-1, (mediana= 35; IQR: 26,8-41,3) e HIV (mediana= 18; IQR: 10,0-22,5). Para a contagem de linfócitos T CD8, tanto em números absolutos como relativos, não se observaram diferenças significativas entre os grupos de estudo.

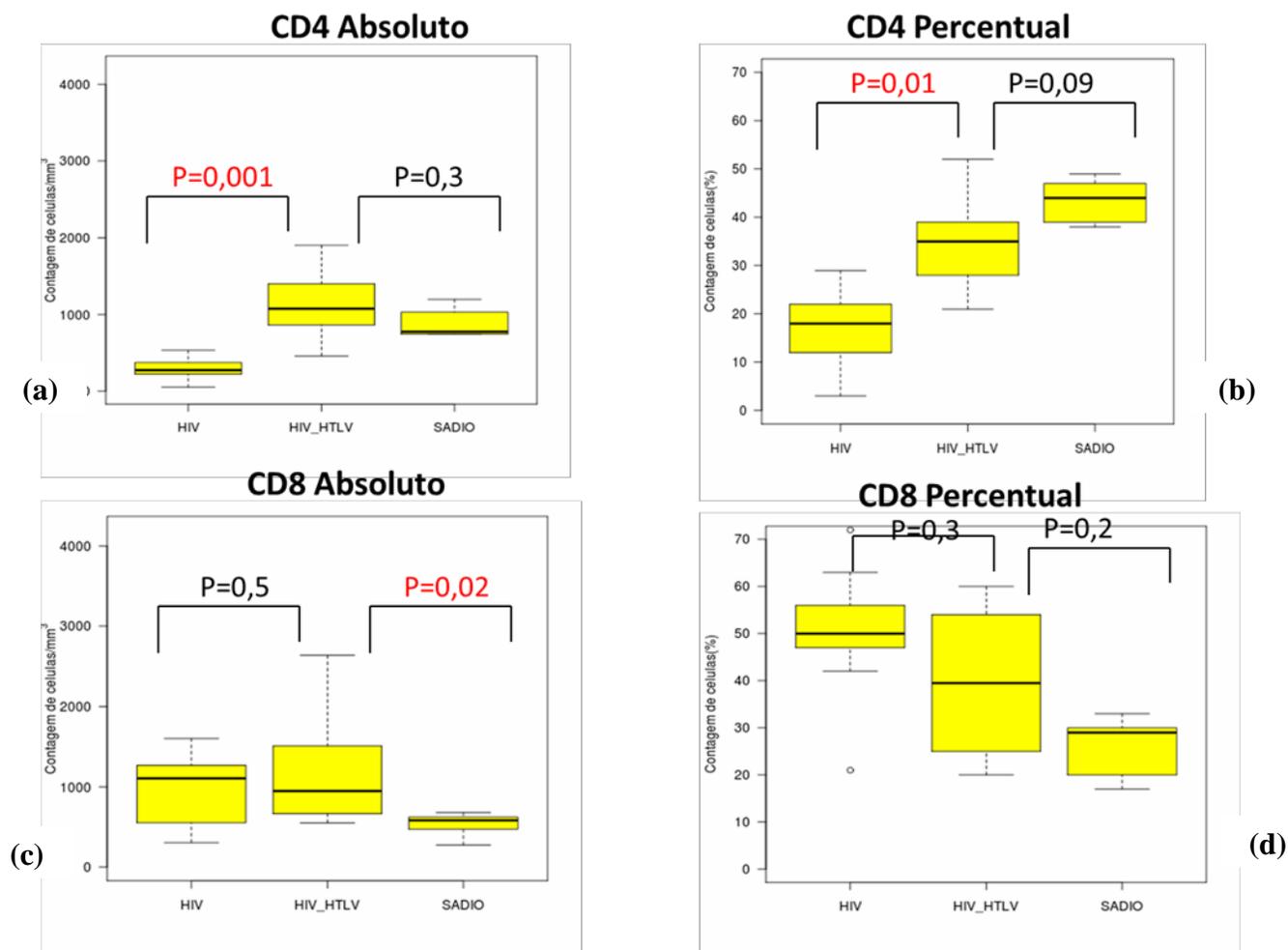


Figura 14. Contagem, em números absolutos (a, c) e números relativos (b, d) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, em pacientes adultos mono infectados por HIV, co-infectados por HIV/HTLV-1 (Matevele, 2010).

5. Discussão

Co-infecções por HIV e HTLV-1 têm sido reportadas em populações que vivem em áreas endêmicas e em pessoas pertencentes aos grupos de risco para HIV. Contudo, a consequência da co-infecção por HTLV-1 em pacientes portadores de HIV ainda não está amplamente entendida. Por exemplo, ainda permanece a ser esclarecido se o HTLV conduz a uma progressão mais rápida na doença por HIV, tendo em vista que estes vírus apresentam tropismo comum para os linfócitos T expressando o receptor CD4 (Beilke *et al.*, 1994; Moriuchi *et al.*, 1998; Szabó *et al.*, 1999;).

Alguns autores mostram que pacientes co-infectados por HIV e HTLV-1, e virgens ao tratamento por drogas anti-retrovirais (TARV), progredem mais rapidamente para o SIDA com níveis altos de T CD4 (Beilke *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2011).

No presente estudo, vimos que mesmo durante o TARV, o grupo de crianças co-infectadas permanece com níveis de linfócitos T CD4⁺ elevados, quando comparados com o grupo das mono-infectadas também estando a receber o TARV (tabela 4). Estes dados vão de acordo com outros trabalhos realizados em Moçambique (Bhatt *et al.*, 2009; Gudo *et al.*, 2009 e Matavele *et al.*, 2010) onde constatou-se que indivíduos adultos em regime de TARV apresentavam taxas mais altas de linfócitos T CD4⁺ quando comparados a indivíduos mono-infectados por HIV, e no mesmo regime terapêutico.

É bem descrito que a infecção por HTLV-1 gera crescimento e proliferação de linfócitos T, produção espontânea elevada de IFN- γ , TNF- α e IL-6, uma vez que os genes *tax* e *rex* (proteínas codificadas por HTLV-1), que regulam a transactivação da replicação viral, regulam também a expressão das proteínas virais (Souza-Machado *et al.*, 2003).

Sem grandes surpresas, verificou-se o aumento (apesar de não ser estatisticamente significativo, $p=0,5$) das células de memória, CD25⁺ (activadas) nas crianças co-infectadas quando comparados com as crianças mono-infectadas e crianças saudias. Verificou-se um número significativo de células T CD4⁺T CD25⁺ em crianças co-infectadas quando comparadas com as crianças mono-infectadas e saudias. Este achado vai de encontro com outros estudos realizados

feito em adultos (Gudo *et al.*, 2009). Está bem esclarecido que este facto verifica-se como sendo consequência da indução de IL-2, IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , e TGF- β , expressa pela proteína tax do vírus de HTLV-1, descritos acima que pode influenciar na proliferação das células T (Kubota *et al.*, 1998).

Nossos dados vão também de encontro aos estudos realizados em portadores assintomáticos de HTLV-1 realizados por Al- Fahim *et al.*, (1999), onde demonstrou que esses pacientes apresentavam elevados níveis de células CD25 e HLA-DR.

Em relação à expressão de CD38, não houve diferenças tanto em linfócitos T CD4⁺ bem como em linfócitos T CD8⁺. Este aspecto pode estar relacionado ao reduzido tamanho amostral do estudo, pois quando comparado com achados de outros estudos feitos em adultos, verificou-se que a frequência das células CD38⁺ nos linfócitos T CD8 era elevada nos indivíduos co-infectados em relação aos indivíduos mono-infectados e sadios. Contudo, não se verificou o aumento do marcador CD38 nos linfócitos T CD8⁺ nestes indivíduos. Este marcador tem sido considerado melhor preditor de diagnóstico para SIDA e resposta ao TARV, quando comparado à carga viral por si só. Este aspecto é relevante pelo facto de estar a ser proposto para sua inclusão na prática clínica para monitorar a progressão de doença em indivíduos infectados por HIV. Níveis elevados de células CD8⁺CD38⁺, CD8⁺CD25⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺ pode ser devido à estimulação crônica em resposta à infecção por HTLV-1, e ser indicativo para o prognóstico da progressão da infecção ou desenvolvimento da doença (Al- Fahim *et al.*, 1999).

Foi descrito também que a carga viral do HTLV-1 pode ser influenciada pelas drogas anti-retrovirais, sendo que os inibidores da transcriptase reversa poderiam diminuir a carga proviral do HTLV-1. Esta redução poderia ser explicada pela combinação de dois eventos (Machuca & Soriano, 1997): (i) supressão da transcriptase reversa não conhecida (ii) diminuição da expansão clonal das células infectadas causadas pelos fármacos com efeito citostático.

Apesar da detecção do HTLV-1-DNA durante a terapia, o vírus não desenvolve mutações associada à resistência ao TARV. A falta de conhecimento sobre a evolução do gene pol sob pressões selectivas da droga, sugerem uma interrupção quase total da replicação do vírus durante este tempo.

Com base nestes achados, acrescido a um tamanho amostral muito reduzido, podemos então inferir que provavelmente tenham influenciado para obtenção não significativa dos nossos dados, referentes aos marcadores de activação CD38 e CD25.

Foi constatado que tanto o HIV como o HTLV induzem (separadamente) modificações funcionais na população de linfócitos T, caracterizada pela diminuição de populações naïve e altos níveis de activação da célula quando comparada com indivíduos sadios (Gudo *et al.*, 2009).

Surpreendentemente, nossos dados mostraram um aumento tanto na população de células naïve como na população de células de memória ($p=0,05$). Crianças co-infectadas mostraram elevadas proporções de CD45 RO+ nas células T CD4 quando comparadas com o grupo mono-infectado e o grupo sadio. Células naïve são consideradas geralmente como as primeiras a serem depletadas na presença da activação imune e, os nossos achados mostram um aumento destas células nas crianças co-infectadas.

A produção reduzida de células T naïve tem sido bem reportada em outros estudos sobre indivíduos infectados por HTLV-1 e também por outro lado, demonstra-se que o provírus é detectado em uma subpopulação de linfócitos T CD4 de memória, mas não em células CD8, indicando que o HTLV-1 promove a proliferação de linfócitos T de memória (Jun-ichirou *et al.*, 2008). Contudo, a magnitude e impacto exercido pelas células naïve na progressão do HIV não está ainda bem esclarecido. Algumas hipóteses poderiam explicar este aspecto:

- 1) Mecanismo homeostático de substituição de células mortas;
- 2) Recrutamento massivo de células naïve, imposto pelo mecanismo que conduz à activação;
- 3) Insuficiência de produção de células T (Gudo *et al.*, 2009).

Por um lado, a infecção pelo HIV leva à destruição, e indução da disfunção dos linfócitos T CD4⁺ e suas subpopulações (Sakai *et al.*, 2010) e uma redistribuição dessas células pelos diversos tecidos do organismo e à diminuição da actividade tímica (Douek *et al.*, 1998). Sabe-se que o timo representa o maior local de produção e geração dos linfócitos T, onde a sua evolução relacionada com a idade pode afectar a capacidade do timo para reconstituir as células T CD4⁺, as quais são perdidas durante a infecção por HIV (Douek *et al.*, 1998). Por outro lado, em

pacientes sob regime de tratamento com anti-retroviral altamente eficaz verifica-se um aumento progressivo de células naïve expressas nos linfócitos T CD4⁺. Estas células poderiam ter surgido devido à expansão de células existentes na periferia ou através da produção tímica de novas células naïves (Douek *et al.*, 1998).

O conjunto de resultados apresentados em nossa dissertação de mestrado mostra que pacientes co-infectados e em tratamento anti-retroviral, continuam a apresentar contagens mais altas de células T CD4⁺ quando comparados com crianças mono-infectadas e sadias até mesmo quando comparadas com adultos estando também a receber o TARV. Além disso, constataram-se níveis de activação celular de alguns marcadores sob as subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 nas crianças co-infectadas o que nos poderia a levar a afirmar que a hiperactivação imune não só os tornam mais susceptíveis de adquirir o HIV, mas também ao progresso mais rápido da doença.

6. Considerações Finais e Perspectivas

Este é o primeiro estudo a ser realizado em crianças onde se descreve o estado de activação de algumas subpopulações de linfócitos T. Este trabalho permitiu-nos concluir que crianças co-infectadas com os vírus HIV e HTLV-1, em regime de TARV, expressam níveis de linfócitos T CD4+ elevados e marcadores de activação celular (CD25, CD 45RA, CD45RO e CD38) mais acentuados quando comparados com as crianças com HIV e crianças sadias. Pelo tamanho amostral ter sido pequeno, propusemos a continuar esta linha de trabalho, no sentido de obter um número maior de pacientes co-infectados, com os respectivos controlos, com o objectivo de re-avaliar os dados e poder dar mais sustentabilidade a nossos achados.

7. Referências Bibliográficas

1. Abreu CM, Brindeiro PA, Martins AN, Arruda MB, Bule E, Stakteas S, *et al.* “Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates circulating in pregnant women from Mozambique”. *Arch Virol.* 2008 153:2013-7.
2. Al-Fahim P, Cabre L, Kastrukoff K, Dorovini-Zis K, Oger J. “Blood Mononuclear Cells in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy: Lymphocytes Are Highly Activated and Adhesion to Endothelial Cells Is Increased”. *Cell Immunol.* 1999 198:1-10.
3. Almeida JM, Letang E, Nhampossa T, Avala E, David C, Mendez C, *et al.* “Rapid Suppression of HIV-RNA Is Associated with Improved Control of Immune Activation in Mozambican Adults Initiating Antiretroviral Therapy with Low CD4 Counts”. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011. [em impressão]
4. Bangham CR. “HTLV-1 infections”. *J Clin Pathol*, 2000. 53:581-6.
5. Bártolo I, Casanovas J, Bastos R, Rocha C, Abecasis AB, Folgosa E, *et al.* “HIV-1 Genetic Diversity and Transmitted drug Resistance in Health Care Setting in Maputo, Mozambique”. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 51:323-31.
6. Becher P, Gutsch D, Fischer J. “Co-Infection HTLV-I/II and HIV-1”. *Lancet.* 1990 335: 738-40.
7. Beilke MA, PT, O'Brien M., John LC., Stephanie MB., Elsa LW., Patricia JK. *et al.* “Clinical Outcomes and Disease Progression among Patients Coinfected with HIV and Human T Lymphotropic Virus Types 1 and 2”. *Clin Infect Dis.* (2004) 39 (2): 256-263
8. Beilke MA, Dorge VLT, Sirois M, Bhuiyan A, Murphy EL *et al.* “Relationship Between Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Type 1/2 Viral Burden and Clinical and Treatment Parameters among Patients with HIV Type 1 and HTLV/1/2 Coinfection”. *Clin Infect Dis.* 2007 ;44:1229-34.
9. Beilke MA, Greenspan DL, Impey A, Thompson J, Didier PJ. “Laboratory Study of HIV-1 and HTLV-I/II Coinfection”. *J Med Virol.* 1994 44:132-43.

10. Berger J, Raffanti S, Svenningsson A, MacCarthy M, Snodgrass S, and Resnick L. "The role of HTLV-1 in HIV-1 neurologic disease". *Neur* 1991: 197-202.
11. Bhatt NB, Gudo ES, Semá C, Bila D, Di Mattei P, Augusto O, *et al.* "Loss of correlation between HIV viral load and CD4+ T-cell counts in HIV/HTLV-1 co-infection in treatment naive Mozambican patients". *Int J STD AIDS*. 2009 20:863-8.
12. Bittencourt, AL. "Vertical transmission of HTLV-I/II: a review". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998 40:245-51.
13. Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Costa EA, Manuel RC. "Prevalence of human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1/2) in individuals from public health centers in Mozambique". *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 26:559-61.
14. Chen GY, Chen G, Wang C, Hsu T, Hsu MM, Yang P *et al.* "Prevalence of Skin Diseases Among Schoolchildren in Magong, Penghu, Taiwan: A Community-based Clinical Survey". *J Formos Med Assoc*. 2008 107:21-9.
15. Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P, Gudo JP, Ingrand I, Mondlane J, *et al.* "Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique". *J Med Virol*. 2007. 79(12):1832-40.
16. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, *et al.* "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection". *Nature*. 1998 396:690-5.
17. Gallo C. "History of the Discovery of the First Human Retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2". *Oncogene*. 2005. 24:5926-5930
18. Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, *et al.* "High Frequencies of Th1-type CD4+ T cell specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis". *Blood*. 2002 99:3335-41
19. Grassmann R, Aboud M, Jeang K. "Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax". *Oncogene*. 2005 24:5976-5985.
20. Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto Ado R, Otsuki K, Chambo E, Amade N, *et al.* "Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo City, Mozambique". *Transfusion*. 2009 49:1146-50

21. Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto Ado R, Otsuki K, Chambo E, Amade N, *et al.* “Serologic and Molecular Typing of Human T-lymphotropic Virus Amosng Blood Donors in Maputo City, Mozambique”. *Transfusion*. 2009, 49:1146-1150.
22. Gudo ES, Bhatt NB, Bila DR, Abreu CM, Tanuri A, Savino W *et al.* “Co-Infection by Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-I) and Human T Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I): Does Immune Activation Lead to a Faster Progression to AIDS?”. *BMC Infectious Disease*. 2009 9:1-13
23. Invida: “Inquérito Nacional de Prevalência, riscos, Comportamentos e Informação sobre HIV/SIDA em Moçambique”. INS/MISAU- Moçambique; 2009.
24. Klimas K, Koneru A, Fletcher M. “Overview of HIV”. *Psychosom Med*. 2008 70:523-30.
25. Knipe DM, Howley PM. “Fields Virology”. 5.ed. USA: Williams e Wilkins, 2007.
26. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. “Demonstration of Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Tax-Specific CD81 Lymphocytes Directly in Peripheral Blood of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Patients by Intracellular Cytokine Detection”. *J Immunol*. 1998 161:482-8.
27. LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. “Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection”. *Lancet*. 1990 336:1345-7
28. Lins RM. “Soroprevalência do HTLV-I/II em Comunidades Indígenas do Estado do Amazonas”. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Amazonas. Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. 2004.
29. Machuca A, Rode´s B, Soriano V. “The effect of antiretroviral therapy on HTLV infection”. *Virus Research*. 2001 78:93-100.
30. Maloney EM, Hisada M, Palmer P, Brooks K, Pate E, Wiktor SZ, *et al.* “Human T cell lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in Jamaica: a case report of clinical and biologic correlates”. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 19:560-5.
31. Matavele R. “Co-infecção pelos retrovirus HIV-1/HTLV-1: Impacto sobre o fenótipo das células T Regulatórias”. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Nacional de Saúde/Fiocruz. 2010.

32. Melo J, Beby-Defaux A, Faria C, Guiraud G, Folgosa E, Barreto A *et al.* “HIV and HTLV Prevalence Among Women seen for Sexual Transmitted Disease or Pregnancy Follow-Up in Maputo, Mozambique”. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000 23:203-4.
33. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. “Factors Secreted by Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-infected Cells Can Enhance or Inhibit Replication of HIV-1 in HTLV-I-uninfected Cells: Implications for In Vivo Coinfection with HTLV-I and HIV-1”. *J Exp Med.* 1998 187:1689-97.
34. Neto SP, Puccioni-Sohler M, “HTLV-I Associated Myelopathy: Aspects related to Childhood”. *Rev Bras Neurol.* 2009 45:41-46.
35. Ostrowski SR, Gerstoft J, Pedersen BK, Ullum H. “A Low Level of CD4+CD28+ T Cells Is an Independent Predictor of High Mortality in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients”. *J Infect Dis.* 2003 187:1726-34.
36. Proietti, AB, “Cadernos e Hemoninas *HTLV*” 2006. 13:304
37. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. “Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases”. *Oncogene.* 2005 24:6058-68.
38. Sodora DL and Silvestri G. “Immune activation and AIDS pathogenesis”. *Aids.* 2008 22:439-446.
39. Souza-Machado A, Cruz AA, Galvão TS, Carvalho EM. “Immunopathogenesis of HTLV-1 infection: influence upon type 2 immune response”. *Rev Bras alerg imunopatol.* 2003 26:159-67.
40. Szabó J, Beck Z, Csomán E, Liu X, Andirkó I, Kiss J, *et al.* “Differential Patterns of Interaction between HIV Type 1 and HTLV Type I in Monocyte-Derived Macrophages Cultured *in Vitro*: Implications for *in Vivo* Coinfection with HIV Type 1 and HTLV Type I”. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999 15:1653-66.
41. Tsukasaki K, Yamada Y, Ikeda S, Tomonaga M. “Infective dermatitis among patients with ATL in Japan”. *Int J Cancer.* 1994. 57: 293.

42. Tulus M, Melo O, Bezerra A, Araújo A. "Neurological aspects of HIV/human T lymphotropic virus coinfection". *AIDS Rev.* 2009 11:71-8.
43. UNAIDS. "AIDS epidemic update. Geneva: UNAIDS". 2009.
44. Van Rensburg EJ, Lemmer HR, Joubert JJ. "Prevalence of viral infections in Mozambican refugees in Swaziland". *East Afr Med J.* 1995 72:588-90.
45. Verdonck K, Gonzzález E, Dooren S, Vandamme A, Vanham G, Gotuzzo E. "Human T-Lymphotropic Virus 1: Recent Knowledge about an ancient infection". *Lancet Infect Dis.* 2007 7:266-81.
46. Walshe, M. M. "Infective dermatitis in Jamaican children". *Br J Dermatol.* 1967. 79, 229-36
47. Wilks RJ, LaGrenade L, Hanchard B, Campbell M, Murphy J, Cranston B *et al.* "Sibling adult T-cell leukemia/lymphoma and clustering of human T-cell lymphotropic virus type I infection in a Jamaican family". *Cancer.* 1993.72, 2700-4.
48. Yasunaga J, Sakai T, Nosaka K, Etoh K, Tamiya S, Koga S *et al.* "Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state". *Blood.* 2008. 97: 3177-3183.

ANEXOS



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Saúde
Departamento de Imunologia



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO ORAL

Seroprevalência do Vírus Linfotrófico T Humano Tipo-1 em Crianças Moçambicanas HIV 1/2 Seropositivas

O/A Sr.(a) está sendo solicitado a aceitar que o seu parente participe, como voluntário, num estudo científico a ser conduzido pelo Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde. Antes de tomar a sua decisão é importante que leia com atenção esta folha de Informação e Consentimento, que lhe dará a informação necessária sobre vários aspectos do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique. Não hesite em colocar ao seu clínico qualquer questão que lhe ocorra durante a sua participação neste estudo.

1. OBJECTIVO DO ESTUDO

O objectivo deste estudo é avaliar o perfil fenotípico dos linfócitos T em crianças co-infectadas pelos Vírus HIV-1 e HTLV-1 atendidas em Unidades Sanitárias da Cidade de Maputo.

2. INFORMAÇÃO GERAL

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente causador do SIDA (Síndrome da Imunodeficiência adquirida) enquanto que o vírus linfotrófico t humano (HTLV) pode causar várias doenças, tais como cancro de células T (um grupo de células brancas do sangue),

mielopatia (doença dos músculos), doença do sistema nervoso central que leva paralisia ou fraqueza dos membros inferiores e dermatite infecciosa (doença da pele). Em muitos pacientes, estas doenças ocorrem em simultâneo. Para ambas as doenças, ainda não existe cura.

A literatura internacional não dispõe de informação suficiente sobre a patogênese da co-infecção HIV/HTLV-1 em crianças. Assim sendo, este é o primeiro estudo que vai descrever de uma forma multidisciplinar alguns aspectos clínicos e laboratoriais da infecção pelo HTLV-1 em crianças moçambicanas infectadas pelo HIV.

Em Moçambique a prevalência de HTLV em pacientes adultos infectados pelo HIV é de 4,5% e que a mesma cursa com a dissociação entre os parâmetros clínicos e imunológico. No entanto, até a data, não existe em Moçambique um estudo realizado em crianças que demonstre estes factos científicos bem como informação sobre a co-infecção na população pediátrica. Assim sendo, este estudo pretende gerar conhecimento novo sobre a co-infecção HIV/HTLV-1 em crianças moçambicanas residentes na cidade de Maputo. Os resultados deste estudo permitirão aos clínicos e pesquisadores desenhar novas estratégias terapêuticas e diagnósticas para abordagem clínica e também adequar as actuais recomendações para o seguimento das crianças co-infectadas caso estas também apresentem uma linfocitose.

O presente projecto de pesquisa será realizado no Centro de Saúde Polana Caniço, no Centro de Saúde 1º de Maio e no Hospital Geral de Mavalane. Após o rastreio para anticorpos anti-HTLV-1 de todas amostras que atendem a estas unidades sanitárias, cada criança com infecção por HTLV-1 será pareada com duas sem infecção por HTLV-1 e uma criança sem HIV e sem HTLV-1, tendo em conta a idade e o sexo.

Será feita uma comparação e descrição dos parâmetros clínicos e marcadores imunológicos.

Toda testagem laboratorial será realizada no departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde, que possui tecnologia e pessoal qualificado para executar todos procedimentos.

O estudo será conduzido por Nádia Amade, Bióloga, a frequentar o curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas, para obtenção de grau de mestrado, ministrado pelo

instituto Oswaldo Cruz, Brasil, sob supervisão de Dr. Ilesh Jani (Moçambique) e Dr. Wilson Savino (Brasil).

3. SELECÇÃO DOS PARTICIPANTES

Serão elegíveis para participar no estudo todas as crianças que obedecem os seguintes critérios:

- Idade entre os 18 meses e 14 anos de idade com teste rápido de HIV-Positivo;
- Crianças cujo tutor legal aceite a sua participação no estudo.

4. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso o senhor/a concorde com a participação do seu parente neste estudo, ser-lhe-á feito um questionário no qual terá que responder a algumas questões pessoais sobre si e sobre a sua doença incluindo o tratamento da mesma. Por exemplo, algumas das perguntas que ser-lhe-ão feitas são: informação sobre a sua data de nascimento e quando foi diagnosticado o HIV.

Depois do questionário, iremos colher, ao seu parente, uma amostra de sangue equivalente a 1 colher de sopa (5 ml). Esta amostra será usada para determinar níveis de células CD4, determinar parâmetros hematológicos e rastreio de HTLV-1. Com excepção de HTLV-1, todas as outras análises que propomos fazer neste estudo são normalmente feitas durante o seguimento dos pacientes no Serviço Nacional de Saúde. Após a colheita, as amostras de sangue serão enviadas ao Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde onde serão conservadas e processadas. Adicionalmente, o clínico fará um exame médico para identificar outros sinais e sintomas relacionados com HIV e HTLV-1.

Caso o seu parente apresente o resultado de HTLV-1 reactivo (positivo) ou não reactivo (negativo), ser-lhe-á solicitada uma segunda colheita de amostra de sangue (5ml) para a determinação dos parâmetros imunológicos (i.e. determinação de diferentes células de defesa).

Estes resultados ser-lhe-ão entregues dois meses após a segunda consulta. Referir que estes resultados não interferem no seguimento clínico normal do seu parente. O seu médico dará a

informação e irá explicar os resultados dos testes realizados. Uma cópia destes resultados estarão dentro do processo clínico para serem consultados sempre que for necessário durante o seguimento clínico. Outra cópia vai ser arquivada de uma forma segura e confidencial no departamento de Imunologia e será destruída logo após a divulgação dos resultados deste estudo.

5. VANTAGEM DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

O/A Sr.(a) e seu clínico assistente terão acesso aos resultados de exames e estes poderão ser usados para a monitoria e seguimento clínico do seu parente.

6. RISCO, STRESS, DOR E DESCONFORTO ASSOCIADO A SUA PARTICIPAÇÃO

Tirar sangue pode causar medo e um pouco de dor. Mas o técnico tem experiência e tudo fará para tornar o mais confortável possível.

Colheita de sangue: os riscos para os participante são mínimos, apenas os decorrentes da retirada de sangue por punção venosa, tais como dor no momento e local da picada e sangramento (até 5 segundos após a punção).

7. INFORMAÇÃO ACERCA DA CONFIDENCIALIDADE

Os registos relativos à participação do seu parente serão usados para efeitos deste estudo e para monitoria clínica do mesmo.

No início do estudo ser-lhe-à dado um número de identificação do estudo e este número será usado em todos formulários e amostras laboratoriais. Apenas membros do estudo, do comité de ética e a pessoa encarregada da monitorização do estudo terão acesso a informação que liga o seu nome com o seu número do estudo. Os dados recolhidos serão tornados anónimos antes se introdução em qualquer computador.

Poderá ter acesso à informação clínica e dos exames laboratoriais do seu parente em qualquer altura. A sua participação no estudo é completamente voluntária. A participação no estudo não custará nada. Todos os testes laboratoriais são gratuitos. Se recusar participar no estudo continuará a receber o seguimento do HIV na consulta da mesma forma que vem a fazer. O seu parente pode retirar-se do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os seus cuidados médicos presentes ou futuros.

8. QUEM PODE CONTACTAR EM CASO DE PROBLEMAS?

Caso haja questão relacionada a este estudo deve contactar:

Dra Nádia Amade, coordenadora do estudo (Tel: 82-4724670 ou 21-309317)

9. DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Fui informado verbalmente e por escrito sobre este estudo e compreendo de o quê se trata. Sei também quem contactar se necessitar de mais informações. Compreendo que a confidencialidade será mantida. Compreendo que sou livre de retirar do estudo o meu parente em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados normalmente recebidos. Concordo com a participação do meu parente neste estudo como sujeito voluntário e levarei uma cópia desta folha de informação para guardar.

Data e hora

Nome do Tutor Legal

Assinatura (ou impressão do polegar) do Tutor Legal

10. DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu abaixo-assinado, defeni e expliquei ao voluntário/ Tutor Legal numa linguagem que ele compreende, os procedimentos do estudo, os seus objectivos e o risco e benefícios associados com sua participação. Informei o voluntário que a confidencialidade será mantida e que este é livre de se retirar do ensaio em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe na clínica. Seguindo as minhas definições e explicações o voluntário concorda participar no estudo.

Data e hora

Nome do Tutor Legal

Assinatura

ENDEREGO:
 MINISTÉRIO DA SAÚDE
 C. POSTAL 264
 Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
 MAPUTO – MOÇAMBIQUE
 Telefones: 4501117213(4)
 Tlx: 6-239 MISAU MO
 FAX: 258 (0) 42647
 258 (0) 42730



Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as modificações do dia 25 de Agosto de 2010, versão 3.0 efectuadas no protocolo com seguinte título: **"Seroprevalência do vírus Lintóptico T Humano Tipo 1 (HTLV-1) em Crianças Moçambicanas HIV 1/2 Seropositivas"**. Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

Assunto: *Aprovação do protocolo "Seroprevalência do vírus Lintóptico T Humano Tipo 1 (HTLV-1) em Crianças Moçambicanas HIV 1/2 Seropositivas"*.

Ref: 339/CNBS/10 Data 12 de Outubro de 2010

Exmo Senhor
 Dr. Ivan Manhiga
 INS

COMITÊ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
 IRB00002657

MINISTÉRIO DA SAÚDE

REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE



