INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA EM DERMATOLOGIA E
IMUNODEFICIÊNCIAS – LIM 56

Determinação do Perfil do Polimorfismo da IL28B em Indivíduos coinfectados
pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus linfotrópico de células T
humanas tipo 1 (HTLV-1)

Proponente: Tatiane Assone dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Casseb

São Paulo

Março 2013

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Santos, Tatiane Assone dos

Determinação do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos
coinfectados pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus
linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) / Tatiane Assone
dos Santos. – São Paulo, 2013.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb

Tatiane Assone dos Santos

Determinação do Perfil do Polimorfismo da IL28B em Indivíduos coinfectados pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Folha de Aprovação para Dissertação

Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: Tatiane Assone dos Santos

Titulo da Dissertação: “Determinação do Perfil do Polimorfismo da IL28B em Indivíduos coinfectados pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)”

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Examinador(a)

Assinatura

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que tem feito, pelo que vai fazer, pelas promessas, e por tudo que representa na minha vida, pela oportunidade de realizar este sonho, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho, que me trouxeram inspiração e me incentivaram todos os dias.

A minha família, que me apoiaram e financiaram meus estudos por todos estes anos, apesar de não entenderem muito bem ainda o que faço. Obrigada por tudo, vocês são as pessoas mais importantes na minha vida.

Ao meu orientador Dr. Jorge Casseb, que confiou no meu trabalho, e me ensinando lições valiosas, que jamais esquecerei.

A todos os amigos, velhos e novos, que compartilharam este momento me apoiando e sofrendo junto de mim (Marcia, Karen, Daniela, Maria, Ericka, Marcelo, Maiara, Fernando, Adriele, Patricia, Rodrigo), torcendo por essa conquista.

Ao Dr. Fernando Vieira, que com sua inspiração proporcionou grandes e valiosas ideias, contribuindo grandemente.

A toda equipe de médicos, residentes e colaboradores do ambulatório de HTLV e do ambulatório de Hepatologia do IIER, que cederam seu tempo e seus pacientes para este estudo.

Ao departamento de imunologia do laboratório central do IIER, em especial a Ana Paula M. A. da Silva e a Karen C. R. Madureira.

Aos pacientes, que compartilharam sua história de vida, sem isso não seria possível a realização deste.

A toda equipe do laboratório LIM56, obrigada pela colaboração. Ao grupo de Imunovirologia, pelo apoio, colaboração e pelas valiosas discussões.

THE FUTURE BELONGS TO THOSE WHO
BELIEVE IN THE BEAUTY OF THEIR
DREAMS...

ELEANOR ROOSEVELT

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características dos 144 indivíduos infectados por HTLV-1.....	18
Tabela 2.	Análises bivariadas do polimorfismo da IL28B em pacientes infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos vs HAM/TSP).....	20
Tabela 3.	Análise Multivariada do polimorfismo da IL28B em pacientes portadores de HTLV-1.....	21
Tabela 4.	Características dos pacientes monoinfectados pelo HTLV-1.....	22
Tabela 5.	Análise Univariada do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos monoinfectados por HTLV-1.....	23
Tabela 6.	Características dos coinfectados (HCV/HTLV-1).....	24
Tabela 7.	Análise univariada do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos coinfectados por HCV/HTLV-1 associados a HAM/TSP.....	25
Tabela 8.	Características dos indivíduos com Hepatite C	26
Tabela 9.	Análise univariada do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos coinfectados por HCV/HTLV-1 associados ao HCV	27

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do genoma do HTLV-1.....	05
Figura 2	Mecanismo de Ação da IL28B perante tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina em Indivíduos com Hepatite C	07
Figura 3	Esquema de persistência de infecção e resposta virológica sustentada para HCV.....	08

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Carga proviral de HTLV-1 em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP.....	19
Gráfico 2	Associação da carga proviral de HTLV-1 ao perfil do polimorfismo da IL28B, SNP rs12979860 (a) e SNP rs8099917 (b).....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ATL – Leucemia de células T do adulto

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-Americano

cDNA - DNA complementar

DNA – Ácido desoxiribonucleico

EDTA K3 - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA –ensaio imunoenzimático

FAM – 6-carboxifluoresceína

FDA - administração de comidas e medicamentos (norte americano)

λ gt11 – vetor gt11

GWAS – Associação de estudos de genoma

HAM/ TSP– Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HIV-1 –vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HLA – Complexo de histocompatibilidade

HTLV-1 – vírus linfotrópico de células T humanas tipo1

IDU – usuário de drogas injetáveis

IFN α – Interferon alfa

IFN λ – Interferon lambda

IIER-SP – Instituto de Infectologia “Emílio Ribas” de São Paulo

IL-12 – interleucina 12

IL28B – Interleucina 28-beta

JAK-STAT –Janus quinase e transdutor de sinal e ativador de transcrição

KIR - receptores inibitórios de células natural killer

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informação de Biotecnologia

NF- κ B - fator nuclear kappa B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

PCR –Reação da Cadeia da Polimerase

PEG-IFN – Interferon Peguilado

RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RNA – Ácido ribonucleico

RVS - Resposta virológica sustentada

SAME - Serviço de arquivos médicos

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TAMRA -6-carboxi-tetrametil-rodamina

TCD4+ - Linfócito T CD4+

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF – α – fator de necrose tumoral tipo alfa

TSP – Paraparesia Espástica Tropical

WB – Western-Blot

RESUMO

Introdução: O polimorfismo de IL28B foi descrito como fator importante na patogênese de infecções causadas por alguns vírus. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se polimorfismos (SNP rs8099917 IL28B e SNP rs12979860) foram associados na presença de HAM/TSP. Métodos: O estudo incluiu 188 pacientes do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas” de São Paulo, divididos em três grupos: 117 Indivíduos infectados pelo HTLV-1 (49 assintomáticos e 68 com HAM TSP), 47 Pacientes monoinfectados pelo vírus da Hepatite C (HCV) e 24 coinfectados pelo HTLV- 1 e HCV. Amostras de sangue foram coletadas, e o PBMC separado através da centrifugação por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. O DNA foi extraído usando um kit comercial, e armazenado a - 80 ° C e, a carga proviral do HTLV-1 foi quantificada. Os SNPs da IL28B na região rs8099917 e rs12979860 foram analisados em todos os grupos por PCR StepOnePlus. Resultados: A análise estatística usando modelo multivariado que incluiu as variáveis: gênero, idade, e carga proviral do HTLV-1, mostrando que o polimorfismo IL28B SNP rs12979860 não foi associado com a HAM/TSP. Em contraste, o SNP rs8099917 GG alelo foi associada com HAM/TSP, quando comparado aos indivíduos assintomáticos (OR = 6,25; IC95% = 1,22-32,00). Conclusão: Pessoas com SNP rs8099917 genótipo GG podem apresentar uma resposta imune distinta contra a infecção pelo HTLV-1. Assim, parece razoável sugerir que uma pesquisa de polimorfismos IL28BSNP rs8099917 deve ser realizada em todos os indivíduos HTLV-1, a fim de monitorar o risco de desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Hepatite C. Polimorfismo. Infecções por HTLV-I. Interleucinas.

ABSTRACT

Background: The polymorphism of IL28B was described as important in the pathogenesis of infections caused by some viruses. The aim of this research was to evaluate whether IL28B gene polymorphisms (SNP rs8099917 and SNP rs12979860) were associated with HAM/TSP. Methods: The study included 188 patients of the Institute of Infectious Diseases “Emilio Ribas” of São Paulo, they formed three groups: 117 subjects infected with HTLV-1 (49 asymptomatic and 68 with HAM TSP), 47 chronic HCV monoinfected patients and 24 co-infected with HTLV-1 and HCV. Blood samples were collected and PBMC separated by density gradient centrifugation in Ficoll-Hypaque. DNA was extracted using a commercial kit, and the DNA was stored at -80 ° C for later analysis. Thereafter, the proviral load of individuals with HTLV-1 was quantified. SNPs rs12979860 and rs8099917 in the region of IL28B were analyzed in all groups by PCR StepOnePlus system in real time. Results: A multivariate model analysis, including gender, age, and HTLV-1 DNA proviral load, showed that IL28B polymorphism SNP rs12979860 was not independently associated with HAM/TSP outcome. In contrast, the SNP rs8099917 allele GG was independently associated with HAM/TSP outcome (OR=6.25; IC95%=1.22–32.00). Conclusion: Persons with SNP rs8099917 genotype GG may present a distinct immune response against HTLV-1 infection. So, it seems reasonable to suggest that a search for IL28B polymorphisms should be performed for all HTLV-1-infected subjects in order to monitor their risk for disease development; however, since this is the first description of this finding in the literature, we should first replicate this study with more HTLV-1-infected persons to strengthen the evidence already provided by our results.

Keywords: Hepatitis C. Polymorphism. HTLV-I Infections. Interleukins.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
SUMÁRIO.....	XI
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. OBJETIVO.....	10
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	10
4. MÉTODOS	11
4.1 LOCAL DE ESTUDO.....	11
4.2 POPULAÇÃO ALVO.....	11
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	11

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:	12
4.5 GRUPOS ESTUDADOS.....	12
4.6 ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	12
4.6.1 Coleta e preparo das amostras:	13
4.6.2 Extração de DNA.....	13
4.6.3 Carga Proviral para HTLV-1	13
4.6.4 Análise da Região rs12979860 e rs8099917 do Gene da IL28B.....	15
4.6.5 Controle de Qualidade dos Dados	15
4.6.6 Análise Estatística	15
4.6.7 Considerações Éticas.....	16
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ANEXO A	42
ANEXO B	46
ANEXO C	50
ANEXO D	51
ANEXO E	52
ARTIGO SUBMETIDO	53

1.INTRODUÇÃO

Estima-se que 15 a 25 milhões de pessoas em todo mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1)(1-2), entretanto a maioria delas permanece assintomática. Apesar da infecção pelo HTLV-1 ocorra em todo mundo, sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica, fatores étnicos e raciais ou ainda em grupos populacionais mais expostos aos fatores de risco(3).

Por apresentarem mecanismos de transmissão superponíveis, a infecção concomitante pelo HCV (vírus da Hepatite C Crônica) e HTLV-1 é esperada. A Organização Mundial da Saúde estima que existam cerca de 170 milhões de portadores do HCV no mundo. De modo geral, considera-se que a prevalência da infecção pelo HCV alcance 3% da população mundial, com variações de 0,1% a taxas superiores a 12%, dependendo do país(4-5). No Brasil, os estudos de prevalência são na maioria realizados por casos descobertos em bancos de sangue, o que acaba limitando as estatísticas. Recentemente, o Ministério da Saúde notificou entre 1999 a 2010, que maior frequência foi do sexo masculino, e somaram 60,5% (42.342) dos casos registrados (6).

As coinfeções com HIV ou HTLV podem alterar tanto desenvolvimento da patogenese como alterar a resposta ao tratamento do HCV(7). Foi descrita a possibilidade de que outros vírus possam interferir na patogênese hepática quando coinfectados pelo HTLV-1/HCV(7). A imunidade celular envolvida no desenvolvimento e progressão de hepatopatias associadas à interação entre HTLV-1 e HCV pode contribuir para alterações na evolução natural das doenças causadas por estes vírus, como por exemplo, o desenvolvimento de hepatocarcinomas em coinfectados(8). Outra característica é a influência do HTLV-1 sobre os efeitos do tratamento com IFN (interferon) de pacientes com HCV crônica (9). A coinfeção HTLV-1/HCV pode estar relacionada com a ineficácia de resposta ao tratamento para HCV com IFN, pois a resposta imune

em portadores de HTLV-1 está comprometida, afetando assim o curso da doença causada pela infecção por HCV(10).

Os testes de polimorfismos associados à resposta virológica sustentada (RVS) e a terapia para HCV, com único gene vem sendo muito utilizado, pois existem evidências de que a resposta imunológica viral está associada ao loco 19, assim diversos grupos estudaram a correlação entre o polimorfismo da IL28B (interleucina 28 tipo beta) em dois pontos deste loco, o rs12979860 e o rs8099917 (11-13), demonstrando a associação desses dois pontos de mutações pontuais com a variação do genoma viral e a carga viral contribuindo para resposta virológica quando submetido a tratamento(12).

A etnia está associada ao perfil de polimorfismo encontrado nas populações, no SNP (Polimorfismo de nucleotídeo único) rs12979860 o genótipo CC está mais presente em populações descendentes de caucasianos, asiáticos, hispânicos e menos presente em descendentes de africanos (13-14). Entretanto, o perfil SNP rs8099917, o genótipo TT predomina em descendentes de caucasianos e asiáticos (13, 15) , não temos ainda informações sobre a frequência em outras populações.

Recentemente, TREVIÑO et al. (2012)(16), avaliou o perfil do polimorfismo da IL28B utilizando o SNP rs12979860 e a carga proviral de HTLV-1, em indivíduos portadores de HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP (mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia tropical espástica), observou-se um significativo aumento da carga proviral em pacientes que possuíam o perfil da IL28B rs12979860 CT/TT entre os indivíduos com HAM/TSP. Isto sugere que a imunidade inata está criticamente envolvida na secreção de interferon λ 3, contribuindo para o controle da replicação viral, diminuindo assim o risco de desenvolver HAM/TSP. O grupo de Kamihira S, et al (2012)(17), observaram um grupo de indivíduos coinfectados por HCV/HTLV-1, genotipando o SNP rs8099917, demonstrando que a expressão da IL28B suprime sua expressão independente do desenvolvimento de ATL (leucemia de células T no adulto) .

Considerando a relevância dessas infecções e a existência de lacunas no conhecimento da evolução clínica de coinfectados por HCV/HTLV-1, uma

série de pacientes monoinfectados por HTLV-1, coinfectados HCV/HTLV-1, e indivíduos infectados pelo HCV isoladamente foram analisados. As características clínicas e laboratoriais, verificando qual o perfil do polimorfismo do gene da IL28B nessa população, e quais dessas características clínicas inferem principalmente no desenvolvimento de HAM/TSP foram também avaliadas. O principal achado do estudo foi à associação do polimorfismo da IL28B SNP rs8099917 (GG) com o desenvolvimento de HAM/TSP quando comparados com portadores assintomáticos do HTLV-1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O vírus linfotrópico de células T humanas (Human T-cell lymphotropic vírus), HTLV-1 foi primeiramente descrito por POIESZ et al. (1980)(18), a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Esse vírus tem sido relacionado principalmente a duas entidades mórbidas: a leucemia/ linfoma de células T de adultos e a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP)(19). Estudos soro epidemiológicos para a infecção pelo HTLV, só foram possíveis a partir de 1983, quando foram introduzidos testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1 (20).

As taxas de soroprevalência do HTLV-1 diferem de acordo com a área geográfica, a composição sociodemográfica da população estudada e os comportamentos de risco individuais (3). Estima-se que 15 a 25 milhões de pessoas em todo mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (1, 21), entretanto, a maioria delas permanece assintomática.

O HTLV-1 é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, e subfamília *Orthoretrovirinae*, subfamília formada por vírus que contêm no seu genoma *oncogenes*, que são sequências de ácidos nucleicos que geram produtos capazes de induzir o aparecimento de neoplasias em animais e humanos (20).

A morfologia do HTLV-1 é semelhante aos demais retrovírus, porém, além das regiões comuns aos retrovírus, possui uma região adicional chamada pX responsável por codificar as proteínas regulatórias, Tax e Rex e as proteínas acessórias p12, p13 e p30, importantes para a infectividade viral, proliferação e immortalização das células, e ainda, podem ter influência sobre a patogênese (19, 22-23) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HTLV-1

Fonte: Adaptado de LLORENS, C , 2011(23).

Pouco se sabe a razão da evolução do estágio assintomático para HAM/TSP. Apesar dos vários estudos mostrando a importância da resposta imune, o perfil genético do portador do HTLV-1 pode ter muita relevância. Por exemplo, indivíduos com HLA (antígeno leucocitário humano) classe I tem maior susceptibilidade de evoluir para a doença que outros tipos de HLA(24), assim como citocinas inflamatórias como o IFN lambda, interleucina 15 (IL-15) e fator de necrose tumoral (TNF- α)(25).

Mais recentemente, outros fatores imunológicos têm sido implicados na patogênese de algumas doenças virais, recentemente três polimorfismos em locos independentes do genoma da IL28B foram associados a respostas antivirais (11-12, 26). O exemplo mais estudado é referente à resposta ao tratamento de pessoas vivendo com HCV.

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado pela primeira vez através de biologia molecular pela Chiron Corporation e Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) em 1989. Após a extração dos ácidos nucleicos, sintetizou-se uma molécula de DNA complementar (cDNA), que foi inserida em um vetor (λ gt11) e expressa em *E. coli*, mostrando-se reativo apenas o gene 5-1-1, o que resultou na identificação do antígeno C100-3, o primeiro a ser utilizado em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra HCV. A pesquisa por marcadores sorológicos permitiu determinar a prevalência, incidência e transmissão do novo agente viral, denominado vírus da hepatite C (HCV) (27-30).

Atualmente, a transmissão da hepatite C através de hemoderivados é rara; porém esta forma de contágio foi a principal via de propagação da transmissão viral nos anos precedentes a 1993, quando foi instituída a triagem em bancos de sangue após a disponibilização de kits comerciais (6).

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV não foram ainda totalmente elucidados. Além das *quasispecies*, a grande capacidade mutagênica do vírus propicia seu constante escape do sistema imune. Além disso, a carga viral e o genótipo também podem influenciar na evolução para a forma crônica. A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, costuma ter um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas até a hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma(7). A lise dos hepatócitos e consequente dano hepático ocorrem por ação indireta do vírus, através da ação de linfócitos T citotóxicos (7).

Sabe-se que o HCV não é apenas hepatotrópico, mas é também um vírus linfotrópico, capaz de replicar in vitro em linhagem de células T humanas(31-32), já que sequências genômicas do vírus foram encontradas. Em populações de células B e T periféricas de pacientes com hepatite C crônica (33). O HCV pode infectar diretamente o tecido linfático e sua estimulação levar ao desenvolvimento de linfomas de células B com malignidade (34).

Nos últimos anos, a possibilidade de que outros vírus possam interferir na patogênese hepática quando coinfectados pelo HCV/HTLV-1(7) foi estudada pelo nosso grupo. Notamos em número elevado de pessoas coinfectadas uma alteração do padrão das enzimas hepáticas, pois quando coinfectados teriam uma menor elevação comparada aqueles monoinfectados pelo HCV(7). Como a presença do HTLV-1 é relativamente elevada entre usuários de drogas endovenosas(35) e/ou os que receberam transfusão de sangue antes 1993 existe uma grande possibilidade de coinfecção pelo HCV, e vice-versa, pessoas com HCV apresentam coinfecção e HTLV-1. No Brasil, poucos estudos, ao nosso conhecimento, foram realizados com essa abordagem, encontramos na maioria estudos mostrando coinfecção com outros vírus como HIV-1, além do vírus HTLV-1 e HCV(35).

Os testes de polimorfismos associados à RVS (resposta virológica sustentada) e a terapia para HCV, tem sido relacionada a uma variação pontual em um único gene. A IL28B, também conhecida como IFN- λ 3, é responsável pela codificação do IFN tipo 3, que está agrupado ao gene com o IFN- α e IFN- λ 1 e λ 2 no cromossomo 19q13.13 . A IL28B interage com um receptor de classe II de citocina heterodimera, induzindo uma sinalização intracelular utilizando a via JAK/STAT e MAPK, levando a uma resposta interferon sensível, o que resulta em uma resposta inibitória a replicação ao vírus da Hepatite C (HCV) quando submetido ao tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina (36) (Figura 2) ,porém fatores como a variação do genoma viral e a carga viral podem contribuir negativamente na resposta virológica, não ativando este sistema , além da característica genética do hospedeiro nas regiões específicas do cromossomo (rs12979860 e rs8099917), que ocasiona uma diferença na conformação da citocina, não proporcionando assim o encaixe ao receptor, inviabilizando a via de ativação (11).

Figura 2. Mecanismo de Ação da IL28B perante tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina em Indivíduos com Hepatite C

Adaptado: Thio, et al, 2010.

O polimorfismo com perfil de alelos CC no SNP rs12979860 está associado ao clareamento espontâneo da infecção HCV. Nos últimos dois anos, a associação de estudos de genomas (GWAS) relacionam numerosos polimorfismos interferentes no perfil de resposta tanto espontânea, quanto ao tratamento utilizando PEG-IFN (interferon peguilado) no locus17 e locus 18, respectivamente(11).

Já o SNP rs8099917, os pacientes com alelo TT, tem sido utilizado como importante fator preditor de resposta ao tratamento com interferon α peguilado e ribavirina, em indivíduos portadores de HCV. Este fato tem sido importante para compreendermos melhor a patogênese do HCV(11, 26).

A infecção pelo HCV persiste em cerca de 30% dos indivíduos infectados, podendo levar ao desenvolvimento de doença hepática crônica, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular(11, 14). Fatores epidemiológicos, virais e do hospedeiro têm sido associados com as diferenças na resposta virológica ou na persistência da infecção (Figura 3)(14). Estudos demonstram que a resposta imune intensa contra o vírus, favorece o clareamento espontâneo. Entretanto, a variação nos genes envolvidos na resposta imune pode contribuir para a capacidade de clareamento viral (12). As coinfeções com HIV ou HTLV podem alterar tanto desenvolvimento da patogênese como alterar a resposta ao tratamento do HCV(7, 37).

Figura 3. Esquema de persistência de infecção e resposta virológica sustentada para HCV

Adaptado: Thio, et al, 2010.

3. OBJETIVO

Estudar o perfil do polimorfismo da IL28B entre pacientes infectados pelo HTLV-1 e suas formas clínicas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Avaliar o perfil de haplótipos do polimorfismo da IL28B e sua importância na apresentação clínicas dos portadores do HTLV-1;

2) Avaliação da carga proviral do HTLV-1 e sua correlação com o perfil do polimorfismo IL28B;

3) Distribuição do polimorfismo da IL-28B nos pacientes coinfectados com HCV e HTLV-1.

4. MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

Serviço de Ambulatório de HTLV e de Hepatologia do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, em São Paulo.

4.2 POPULAÇÃO ALVO

Um total de 450 indivíduos com teste de PCR confirmatório para HTLV-1, que estão em acompanhamento no ambulatório de HTLV, desses 117 indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram selecionados consecutivamente durante suas consultas laboratoriais, além de 24 coinfectados pelo HTLV-1 e HCV, que foram convidados a participar e aceitaram, compondo assim um total de 141 indivíduos. Para compor a população de monoinfectados por HCV, recrutamos 47 indivíduos consecutivamente durante sua consulta ambulatorial de rotina no ambulatório de Hepatologia. Deste modo, compondo uma população total de 188 indivíduos neste estudo e o recrutamento foi realizado no período de maio de 2011 a maio de 2012.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Somente indivíduos adultos com idade superior a 18 anos, que possuam PCR positivo para HCV e HTLV-1 que estejam em acompanhamento regular no ambulatório do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas” (IIER).

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Pacientes portadores de HCV e/ou HTLV-1, que possuam outras coinfeções virais (HIV, HBV), e aqueles que apresentarem dados incompletos ou que sejam incapazes de responder ao questionário.

4.5 GRUPOS ESTUDADOS

Um total de 188 pacientes que preencheram os critérios de inclusão durante o período de coleta foram analisados, e ficaram classificados da seguinte forma:

Grupo 1: 117 indivíduos infectados pelo HTLV-1

Grupo 2: 47pacientes mono infectados pelo HCV crônicos

Grupo 3: 24 coinfectados pelo HTLV- 1 e HCV.

4.6 ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Rotineiramente, os testes sorológicos foram realizados no laboratório clínico no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, no setor de imunologia, onde são realizados o teste de GOLD ELISA HTLV-1/2® (Teste imunoenzimático) e o teste de para Western Blot (WB) MP Diagnostics (MPD) HTLC Blot 2.4®, conforme as instruções dos respectivos fabricantes, para triagem de HTLV. As amostras, após a confirmação por WB são encaminhadas e processadas no LIM-56 no Instituto de Medicina Tropical, onde a reação da cadeia de polimerase qualitativo é realizada e seu produto amplificado utilizado para o estudo do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), para a tipagem viral (HTLV-1 ou HTLV-2).

Seguindo as normas do Ministério da Saúde no país, os pacientes com suspeita de infecção por HCV, realizam teste de quimioluminescência no laboratório clínico no Instituo de Infectologia Emilio Ribas, no setor de

imunologia, utilizando o teste ADVIA Centaur® (Siemens®), seguindo as instruções do fabricante. Após estas etapas de confirmação do diagnóstico, o paciente se torna elegível ao estudo, seguindo ainda os critérios descritos anteriormente de inclusão e exclusão.

4.6.1 Coleta e preparo das amostras:

As amostras de sangue dos pacientes foram colhidas por punção venosa e as identificações realizadas com auxílio de um agente de saúde, colocando-se o nome e o número conforme o prontuário médico em um tubo contendo EDTA K3 (0,054 ml/tubo), com aproximadamente 10 ml de sangue venoso periférico. Os tubos foram centrifugados a 2500 RPM por 15 minutos. Armazenamos as alíquotas do plasma e soro -80°C para o processamento posterior da triagem sorológica e testes confirmatórios. Obtivemos as células mononucleares pela separação do gradiente de concentração de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemicals, St Louis, MO) e ficaram estocadas à -80°C para a realização de testes moleculares.

4.6.2 Extração de DNA

As amostras de células mononucleares obtidas foram submetidas a um processo de extração de DNA pelo kit comercialmente disponível (ILLUSTRA Blood Genomic Prep Mim Spin Kit, GE Healthcare, Life Sciences, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi armazenado em freezer -80°C .

4.6.3 Carga Proviral para HTLV-1

A carga proviral de HTLV-1 foi quantificada utilizando a técnica de PCR em tempo real, usando primers e sondas do gene da pol do vírus HTLV-1 que são os seguintes: SK110 (5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3', nucleotídeo 4758-4779 do HTLV-1, e SK111 (5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3',

nucleotídeo 4943-4920 do HTLV-1). Utilizamos sonda TaqMan interna para HTLV-1 (5'-CTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3'). Os fluorômetros utilizados para marcação da sonda foram: na porção 5' FAM(6-carboxifluoresceína) como repórter, e na porção 3' TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina).

O DNA da albumina humana foi utilizado como controle nesta reação em todas as amostras. Utilizamos como referência endógena para normalizar a variação entre as diferenças na contagem de células mononucleares e durante a extração do DNA da amostra. Para esta quantificação utilizamos os primers Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') e Alb-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3') e a sonda de albumina Taq Man(5'-FAMCCTGTCATGCCCCACACAAATCTCTCCTAMRA-3'), os fluorômeros utilizados para marcação da sonda foram: na porção 5' FAM como repórter, e na porção 3' TAMRA (38-39). Para um volume final da reação de 25- μ l , foi utilizado um Mix de PCR para HTLV-1 ou DNA para albumina consistindo em 5 μ l DNA extraído, primers SK110 e SK11 ou Alb-S e Alb-AS (10nM de cada), 10 nM sonda para HTLV-1 ou albumina TaqMan probe, TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Para ambos HTLV-1 e DNA para albumina a amplificação foi realizada da seguinte forma: após um ciclo de 50°C por 2 min e um ciclo de 95°C por 10 minutos. Temos um segundo bloco de amplificação consistindo de 45 ciclos de repetição da seguinte forma: 15' s a 95°C e 1 min a 60°C. Para isto utilizamos o equipamento ABI 7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA).

Este protocolo possui um limite de detecção de 200 cópias de provírus em 10⁴ células mononucleares, o número final de cópias foi estimado pela interpolarização de um plasmídeo, utilizando uma curva de regressão, normalizado com a quantidade de cópias de albumina presente na amostra, a qual foi quantificada em paralelo. Todas as amostras foram quantificadas em duplicata. Os resultados foram expressos como quantidade de cópias de HTLV-1 DNA/10⁴ PBMCs (38-39).

4.6.4 Análise da Região rs12979860 e rs8099917 do Gene da IL28B

Para analisarmos as regiões do gene IL28B rs12979860 e rs8099917 utilizamos o kit comercial 40X SNP Genotyping Assays StepOnePlus Real-time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, USA) pelo sistema TaqMan SNP Genotyping Assay, e o TaqMan Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Foster City, CA) desenvolvido pela Applied Biosystems. (40). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, inclusive os controles positivos com todas as suas variações nas regiões dos SNPs estudados, e os controles negativos.

4.6.5 Controle de Qualidade dos Dados

A coleta de dados foi realizada pelo pesquisador principal com auxílio dos residentes e médicos dos respectivos ambulatórios do IIER-SP. A entrada dos dados foi realizada por duas pessoas do setor administrativo do laboratório de pesquisa, e posteriormente esses dados foram conferidos pelo pesquisador principal. Os resultados são tabulados em planilhas elaboradas no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) e os dados coletados exportados para o programa estatístico SPSS versão 19.0 (IBM).

4.6.6 Análise Estatística

Os dados foram tratados por meio de estatística descritiva, com cálculos de percentuais, frequências. Na comparação de doentes com HAM/TSP e assintomáticos será utilizado o teste t se tiver distribuição normal, e os que não foram normais utilizamos a prova U de Man-Whitney para a comparação e o ρ de Spearman com o propósito de descobrir o relacionamento entre as variáveis. Os gráficos foram confeccionados no software GraphPad Software 5.0 (La Jolla, CA, EUA), utilizando o teste de Anova para comparar os grupos. Utilizamos análise logística bivariada para identificar possíveis associações com a HAM/TSP. Variáveis associadas com um valor de significância de $p < 0,20$ com o desfecho (HAM/TSP) a análise bivariada foi

incluída no modelo multivariado de regressão logística, para realizar estes testes utilizamos o software STATA 11 (StataCorp. 2009. Stata: Release11. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP, TX, EUA).

4.6.7 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo nº 2012/133 (anexo C), e do Instituto de Infectologia “Emilio Ribas” nº 13/2011 (anexo D) e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo nº 356/12 (anexo E), somente os pacientes, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, fizeram parte desta pesquisa.

5. RESULTADOS

Seguindo a divisão dos grupos, as análises foram realizadas em três momentos diferentes, primeiramente, analisamos todos os pacientes infectados por HTLV-1, incluindo os coinfectados por HCV, onde comparamos os indivíduos com HAM/TSP e os assintomáticos. Foram estudados 60 indivíduos assintomáticos e 84 indivíduos com HAM/TSP. A média da idade foi de 52 anos, sendo 66,66% do sexo feminino (Tabela 1). A distribuição alélica da IL28B no SNP rs12979860 em assintomáticos portadores de HTLV-1 foi: CC (n = 31; 21,5%), CT (n = 107; 74,3%) e TT (n = 6, 4,2%), (Tabela 1). A mediana da carga proviral de HTLV-1 (PVL) para assintomáticos com HTLV-1, foi de 36 cópias, enquanto que em pacientes com HAM / TSP foi de 236 copias/104 PBMC ($p = 0,009$) (Gráfico 1). O genótipo da IL28B CT no SNP rs12979860, o mais frequente em indivíduos com HAM/TSP do que em portadores assintomáticos ($p = 0,42$) (Gráfico 2a).

Tabela 1. Características dos 144 indivíduos infectados por HTLV-1

Variáveis	Categoria	N	%
Gênero	Masculino	48	33.3
	Feminino	96	66.7
Idade (anos)	≤ 30	5	3.5
	31 – 40	28	19.4
	41 – 50	27	18.8
	> 50	84	58.3
Status Clínico	HAM/TSP	84	58.3
	Assintomáticos	60	41.7
Polimorfismo IL28B			
SNP rs12979860	CC	31	21.5
	CT	107	74.3
	TT	6	4.2
SNP rs8099917	TT	88	61.1
	GT	38	26.4
	GG	18	12.5

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

Gráfico 1. Carga proviral de HTLV-1 em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP

A distribuição alélica da IL28B para o SNP rs8099917 em portadores assintomáticos de HTLV-1 mostrou TT (n = 88; 61,1%), GT (n = 38; 26,4%) e GG (n = 18, 12,5%) (Tabela 1), sendo que o alelo TT foi mais frequente em indivíduos com HAM/TSP que em assintomáticos, porém não foi estatisticamente significante (p = 0,4633) (Gráfico 2b).

Gráfico 2. Associação da carga proviral de HTLV-1 ao perfil do polimorfismo da IL28B, SNP rs12979860 (a) e SNP rs8099917 (b)

A análise bivariada revelou que a carga proviral foi significativamente associada à HAM/ TSP ($p < 0,01$), bem como o polimorfismo SNP rs8099917 ao genótipo GG ($p = 0,02$) (Tabela 2).

Tabela 2. Análises bivariadas do polimorfismo da IL28B em pacientes infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos VS HAM/TSP)

Variáveis	Total N(%)	Assintomáticos (%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%CI)	Valor de P
Gênero					
Masculino	48 (33.3)	20 (33.3)	28 (33.3)	0.81 (0.37-1.75)	0.90
Feminino	96 (66.7)	40 (66.7)	56 (66.7)	1	-
Idade (anos)					
Idade > 50 anos	84 (58.3)	31 (51.7)	53 (63.1)	1.74 (0.89-3.39)	0.10
Idade ≤ 50 anos	60 (41.7)	29 (48.3)	31 (36.9)	1	-
Carga proviral de HTLV-1					
<200	81 (56.2)	45 (75.0)	36 (42.9)	1	-
≥200	63 (43.8)	15 (25.0)	48 (57.1)	4.26 (2.07-8.79)	0.001
SNP rs12979860					
CC	31 (21.5)	16 (26.6)	15 (17.9)	1	-
CT	107 (74.3)	40 (66.7)	67 (79.7)	1.78 (0.79-4.00)	0.16
TT	6 (4.2)	4 (6.7)	2 (2.4)	0.53 (0.08-3.35)	0.50
SNP rs8099917					
TT	88 (61.1)	40 (66.7)	48 (57.1)	1	-
GT	38 (26.4)	18 (30.0)	20 (23.8)	0.93 (0.43-1.98)	0.84
GG	18 (12.5)	2 (3.3)	16 (19.1)	6.66 (1.44 -30.74)	0.02

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

Um modelo de análise multivariada, incluindo sexo, idade, ecarga proviral de HTLV-1, mostrou que o polimorfismo IL28B SNP rs12979860 não foi associado à HAM/TSP. Em contraste, o SNP rs8099917 no alelo GG foi associado à HAM/TSP (OR = 6,25; IC95% = 1,22-32,00). Neste modelo, a idade também foi significativamente associada com o resultado quando incluído como uma variável contínua. (Tabela 3).

Tabela 3. Análise Multivariada do polimorfismo da IL28B em pacientes portadores de HTLV-1

Variáveis	OR (95% CI)	Valor de P
Idade (continua)	1.03 (1.00-1.06)	0.04
Gênero	0.94 (0.41-2.16)	0.89
Carga proviral de HTLV-1		
<200	1	-
≥200	4.62 (2.06 – 10.34)	0.001
SNP rs12979860		
TT	0.16 (0.02 – 1.40)	0.10
CT	1.52 (0.61 – 3.78)	0.36
CC	1	-
SNP rs8099917		
GG	6.25 (1.22 – 32.00)	0.03
GT	1.13 (0.48 – 2.68)	0.78
TT	1	-

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

Analisamos os monoinfectados por HTLV-1 separadamente, onde observamos um total de 117 de indivíduos monoinfectados por HTLV-1 foram estudados, é na sua maioria do sexo feminino (71%), com idade superior a 50 anos (74%), 58% assintomáticos. Quanto ao perfil da IL28B, foi notado que o

para o SNP rs12979860, 74% apresentaram genótipo CT, e no rs8099917, 58% genótipo TT (tabela 4).

Tabela 4. Características dos pacientes monoinfectados pelo HTLV-1.

Variáveis	N(%)
Gênero	
Masculino	33 (28.21)
Feminino	84 (71.29)
Idade (Anos)	
31 – 40	34 (18.18)
41 – 50	32 (16.58)
> 50	122 (74.36)
Status clínico	
Assintomático	68 (58.12)
HAM/TSP	49 (41.88)
SNP rs12979860	
CC	25 (21.37)
CT	87 (74.36)
TT	5 (4.27)
SNP rs8099917	
TT	68 (58.12)
GT	31 (26.50)
GG	18 (15.38)

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

No grupo monoinfectados por HTLV-1, relacionamos ainda o status clínico com a carga proviral e o perfil da IL28B nos SNPs rs12979860 e rs8099917. Foi observada uma correlação entre a carga proviral superior a 200 cópias ($p = 0,001$) e a HAM/TSP (OR = 3,95 (1,78 – 8,77)). Na análise do perfil da IL28B, observamos uma associação entre o SNP rs8099917 no alelo GG ($p = 0.013$) e a HAM/TSP (OR=7,11(1,51 – 33,34)) (tabela 5).

Tabela 5. Análise Univariada do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos monoinfectados por HTLV-1

Variáveis	Total	AssintomáticoN (%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%CI)	Valor de P
Gênero					
Masculino	33	14 (42,42)	19 (57,58)	0,96 (0,42 – 2,19)	0,94
Feminino	84	35 (41,67)	49 (58,33)	1	
Idade (Anos)					
> 50 anos	70	23 (32,86)	21 (44,68)	2,53 (1,18 – 5,41)	0,017
≤ 50 anos	47	26 (55,32)	21 (44,68)	1	
Carga Proviral de HTLV-1					
<200	64	36 (56,25)	28 (43,75)	1	0,001
≥200	53	13 (24,53)	40 (75,47)	3,95 (1,78 – 8,77)	
SNP rs12979860					
CC	25	12 (48)	13 (52)	1	
CT	87	33 (37,93)	54 (67,02)	1,51 (0,61 - 3,70)	0,36
TT	4	4 (80)	1 (20)	0,23 (0,22 - 2,36)	0,21
SNP rs8099917					
TT	68	32 (47,06)	36 (52,94)	-	-
GT	31	15 (48,39)	16 (51,61)	0,94 (0,40 – 2,21)	0,90
GG	18	2 (11,11)	16 (88,89)	7,11 (1,51 – 33,34)	0,013

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

No grupo de coinfectados (HCV/HTLV-1), observamos que 54% dos indivíduos eram do sexo masculino, 79% com idade superior a 50 anos, e assintomáticos (58%), o alelo mais frequente encontrado nesse grupo no SNP

rs12979860 foi o CT (75%) e no rs8099917 o TT (71%) (tabela 6). Esses dados corroboram com os dados encontrados nos indivíduos mono infectados por HTLV-1, porém devido ao tamanho da amostra, esses resultados devem ser vistos com cautela.

Tabela 6. Características dos coinfectados (HCV/HTLV-1)

Variáveis	N(%)
Genero	
Masculino	13 (54.17)
Feminino	11 (45.83)
Idade (Anos)	
31 – 40	2 (8.33)
41 – 50	3 (12.50)
> 50	19 (79.17)
Status Clínico	
Assintomático	14 (58.33)
HAM/TSP	10 (41.67)
SNP rs12979860	
CC	5 (20.83)
CT	18 (75)
TT	1 (4.17)
SNP rs8099917	
TT	17 (70.83)
GT	7 (29.17)
GG	-

SNP: Polimorfismo de nucleotideo único

A análise Univariada do grupo de coinfectados por HCV/HTVL-1, não demonstrou nenhuma associação entre a carga proviral de HTLV-1 ($p = 0,72$), o SNP rs12979860 ($p = 0,47$) e o rs8099917 ($p = 0,93$) (tabela 7).

Tabela 7. Análise univariada do perfil do polimorfismo da IL28B em indivíduos coinfectados por HCV/HTLV-1 associados à HAM/TSP

Variáveis	Total	Assintomáticos N(%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%CI)	Valor de P
Gênero					
Masculino	13	5 (38,46)	8 (61,54)	1,33(0,26 – 6,80)	0,35
Feminino	11	5 (45,45)	6 (54,55)	1	
Idade (Anos)					
> 50 anos	5	1 (20)	4 (80)	0,27 (0,02 – 2,96)	0,28
≤ 50 anos	19	9 (47,37)	10 (52,63)	1	
Carga Proviral de HTLV-1					
<200	15	8 (53,33)	7 (46,67)	1	
≥200	9	2 (22,22)	7 (77,78)	1,37 (0,22- 8,29)	0,72
SNP rs12979860					
CC	5	3 (60)	2(40)	1	
CT	18	7 (38,89)	11 (61,11)	2,35 (0,31 – 17,85)	0,47
TT	1	1(100)	-	-	-
SNP rs8099917					
TT	17	7 (41,18)	10 (58,82)	1	
GT	7	3 (42,86)	4 (57,14)	0,93 (0,15 – 5,54)	0.93
GG	-	-	-	-	-

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

Com a finalidade de responder a possível interação entre HCV/HTLV-1 e IL28B, foi estudado um subgrupo de 47 pacientes infectados somente pelo HCV. A Tabela 8 mostra que entre esses indivíduos, 57% eram mulheres e 72% mais que 50 anos de idade. Os SNPs mais frequentes foram no rs12979860, 46% foram CT, 38% CC e 15% TT, e no rs8099917, os genótipos TT e GT foram encontrados em 49% cada, apenas uma pessoa apresentou perfil GG (Tabela7). Portanto, não observamos diferença entre a distribuição no rs12979860 nos pacientes com HCV comparados aos grupos com HTLV-1 e coinfectados (HCV/HTLV-1). Por outro lado, o genótipo TT foi predominante no snp rs8099917, entre os pacientes com HCV (70% vs 49%, $p=0,8$).

Tabela 8. Características dos indivíduos com Hepatite C crônica

Variáveis	N(%)
Gênero	
Masculino	20(42.55)
Feminino	27(57.45)
Idade (Anos)	
31 – 40	6 (13.95)
41 – 50	6 (13.95)
> 50	31 (72.09)
SNP rs12979860	
CC	18 (38.30)
CT	22 (46.61)
TT	7 (14.89)
SNP rs8099917	
TT	23 (48.94)
GT	23 (48.94)
GG	1 (2.13)

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

A tabela 9 mostra o perfil da IL28B (SNP rs12979860 e rs8099917), entre os coinfectados (HCV/HTLV-1) e o grupo mono infectados por HCV. Nesta análise não observamos associação entre os SNP e a coinfeção.

Tabela 9.

Variáveis	Total	HCV/HTLV-1 N(%)	HCV N(%)	OR (95%CI)	Valor de P
SNP rs12979860					
CC		5 (20.83)	18 (38.30)	1	-
CT		18 (75)	22 (46.61)	0,34 (0,09 - 1,24)	0,07
TT		1 (4.17)	7 (2.13)	1,94 (0,16 – 52,39)	1,00
SNP rs8099917					
TT		17 (70.83)	23 (48.94)	1	-
GT		7 (29.17)	23 (48.94)	2,43 (0,7 – 7,99)	0,10
GG		-	1 (2.13)	-	-

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

6. DISCUSSÃO

A neuropatologia da HAM/TSP fornece evidências de que mecanismos imunes mediados desempenham um papel importante na patogênese da doença(40). Estudos anteriores comparam respostas celulares e respostas imunes humoral em pacientes com HAM/TSP, em assintomáticos, e em controles soronegativos para HTLV-1, mostrando que o vírus infecta uma variedade de células linfotrópicas, induzindo doença neurológica progressiva ou linfomas de células T em alguns portadores(41-42).

Analizamos de duas formas o grupo de infectados por HTLV-1, a primeira observou apenas os indivíduos monoinfectados, e na outra análise incluímos os coinfectados por HCV, que foi escolhido devido ao fato de compartilhar as mesmas vias de transmissão do HTLV-1, incluindo parenteral, sexual e vertical, porém essas vias de infectividade se diferenciam entre eles(35). Analizamos o desfecho dos casos em relação à presença ou não de HAM/TSP.

O principal achado deste estudo foi à associação independente de polimorfismos da IL28B no SNP rs8099917 (GG) com o desenvolvimento de HAM/TSP, quando comparados com portadores assintomáticos do HTLV-1. O polimorfismo SNP rs12979860 implica uma resposta virológica sustentada para a infecção pelo HCV em pacientes tratados com interferon alfa peguilado e ribavirina(43). Entretanto, esses achados não foram observados em outras infecções, tais como infecções por HBV e HIV (44), assim como não demonstramos em relação ao HTLV-1, com exceção em pacientes com infecção aguda pelo HIV, a resposta ao antiretroviral foi relacionada ao SNP rs12979860(45).

Vale ressaltar que a resposta imune parece ser um fator crucial na patogênese da HAM/TSP. Por exemplo, estudo anterior realizado pelo nosso grupo, mostrou que os pacientes com HAM/TSP apresentaram maiores níveis de IFN-gama em comparação com pacientes assintomáticos(46). Além disso, o perfil do polimorfismo no SNP rs12979860 induz a produção de IFN-lambda 3, e

uma resposta imune a infecção por HTLV-1 , levando a um dano neuronal na medula espinhal (36, 41).

Outras características genéticas, como alguns haplótipos de HLA, foram descritas como envolvidas na patogênese da HAM / TSP (29) ou fatores pró-inflamatórios(30). Neste sentido, os polimorfismos na IL28B são influenciados pela ascendência genética. Da mesma forma, entre os pacientes crônicos do HCV, aqueles que carregavam o alelo G no rs8099917 tiveram menor expressão de RNA mensageiro de IL28B nas células PBMC (11). Como foi relatado recentemente genes estimulados por interferon, provavelmente regulam a expressão de citocinas, e essa regulação pode ser diferente no tecido infectado e ainda entre os tipos de células dentro do fígado e da medula espinhal (31). Sabe-se que a IL28B atenua a produção da IL-13; e é também possível que a citocina produzida em pessoas com o alelo de proteção diminua a expressão desta, levando a um efeito semelhante ao protetor e menores interações entre inibitórios KIR e HLA-C (32). Assim, a IL28B e outros três interferons tais como IL28A ou IL-29 ativam a cascata antiviral via JAK-STAT que é semelhante e provavelmente sinérgica aos interferons do tipo 1 (como o interferon alfa), embora utilize distintos receptores, contribuindo para imune patogênese da HAM/TSP.

Neste sentido, Treviño et al., avaliaram um total de 41 indivíduos espanhóis portadores de HTLV-1, sendo 29 assintomáticos e 12 com HAM/TSP. Desses, 56% eram mulheres, e a média de idade foi de 46 anos, 78% tinham origem latina americana. Em relação à carga proviral, demonstrou que a média para indivíduos sintomáticos foi de 637 cópias/ 10^4 PBMC, e os assintomáticos apresentaram uma média de 60 cópias/ 10^4 PBMC. Em relação ao perfil do polimorfismo da IL28B, o autor só estudou o SNP rs122979860, obtendo a seguinte distribuição alélica: CC (n=22, 54%), CT (n=16, 39%) e TT (n=3, 7%) (16), o que difere consideravelmente da nossa população onde a maior distribuição alélica observada no grupo de monoinfectados por HTLV-1 no SNP rs12979860 foi de CT (74%). Nesse estudo, apesar da elevada carga proviral entre pacientes com HAM/TSP, não foi observada nenhuma associação entre a HAM/TSP e IL28B, apesar da carga proviral ter sido associada a HAM/TSP ($p=0.001$), o que mais uma vez diferiu dos nossos

achados, quando correlacionamos ao SNP rs12979860 isso não se manteve significativo ($p=0.4633$), este fato poderia ter ocorrido devido ao número limitado da amostra estudada ($n=12$).

Corroborando com nossos dados, Sanabani et al. 2012, realizou um estudo em um grupo de 112 infectados por HTLV-1, com média de idade de 55 anos, sendo 63% mulheres, onde 81 (72.3%) eram assintomáticos, 24 (21.4%) HAM/TSP e 7 (6.3%) com ATL. Ele observou que a média da carga proviral nos indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP foi de 60 cópias/1000 PBMC e nos indivíduos com ATL foi de 272 cópias/1000 PBMC ($p<0.001$). Em relação a frequência alélica no SNP rs12979860, observaram que 45% apresentavam genótipo CC, 48% CT e 7% TT. A carga proviral e o perfil do polimorfismo da IL28B no SNP12979860, não houve correlação entre elas ($p=0.7$)(47), como observado em outras populações virais(48), onde não foi encontrado correlação entre a regulação da carga proviral de HTLV-1 e o polimorfismo da IL28B (47).

No grupo de coinfectados com HCV e HTLV-1, o perfil do polimorfismo mais frequente encontrado nesse grupo foi para o SNP rs12979860 foi CT (75%) e para o rs8099917 TT (71%) (tabela 2), esses dados corroboram com os dados encontrados nos indivíduos monoinfectados por HTLV-1. Kamihira et. al, realizaram um estudo na cidade de Nagasaki, Japão, com o objetivo de verificar a correlação entre o perfil rs8099917 e a coinfeção HCV/HTLV-1, em 340 indivíduos, subdivididos em 59 indivíduos sadios, 73 portadores de HTLV-1 (sendo 47 com ATL, e 26 assintomáticos), 179 indivíduos monoinfectados por HCV e 29 coinfectados (HCV/HTLV-1). A distribuição alélica encontrada no grupo dos coinfectados (HCV/HTLV-1) foi de 76% que possuíam o genótipo TT ($p=0.9$)(17) o que se aproxima dos dados encontrados em nosso estudo. Vale ressaltar que os pacientes com HAM/TSP foram estudados pela primeira para esse SNP.

Até o presente momento, não existem nenhum relato na literatura em relação ao perfil rs8099917 correlacionado com a HAM/TSP, sendo assim essa a primeira descrição. A análise univariada do grupo de coinfectados por HCV/HTLV-1, não demonstrou nenhuma associação entre a carga proviral de HTLV-1 ($p = 0,72$), e o perfil do polimorfismo da IL28B rs12979860 ($p = 0,47$) e

o rs8099917 ($p = 0,93$). Entretanto, Kamihira et al. mostraram que o perfil rs8099917 não está associado a coinfeção entre HCV/HTLV-1 e nem a ATL, porém descreve que encontrou uma baixa expressão de RNA mensageiro de IL28B nos indivíduos com perfil TT. Esses dados indicam que existe algum mecanismo ainda não descrito que afete a resposta imune ao vírus, pois as maiores expressões de RNA mensageiro de IL28B estão presentes no grupo de monoinfectados por HTLV-1(17). A explicação seria que IFN- λ geralmente é supra regulado, através da ativação da via do NF-kappa Beta após a infecção viral. Por conseguinte, este aumento pode ser explicado em virtude de uma proteína viral do HTLV-1, que tem a capacidade de ativação do NF-kappa Beta, estar presente durante este processo de ativação. Além disso, é instrutivo que IFN- λ tem uma função potente para expandir células T regulatórias que dão origem a ATL(49) as quais são principalmente infectadas com HTLV-1, o que predispõe ao desenvolvimento de ATL. Não existe estudo sobre essa citocina e a patogênese da HAM/TSP(17).

Uma limitação deste estudo se refere ao polimorfismo da IL28B, este é influenciado pela ascendência genética, dado o contexto histórico da colonização brasileira, a população exibe características genéticas únicas, apresentando fenótipos de populações africanas, europeia e ameríndia (12). Por exemplo, o alelo GG (SNP rs8099917) genótipo é mais frequente em asiáticos, africanos, enquanto o genótipo CC (SNP rs12979860) é mais frequente em populações europeias e ameríndias. Estudos brasileiros mostram que em média 60% dos pacientes monoinfectados por HCV apresentam perfil da IL28B no rs12979860 o genótipo CT e TT, o que corrobora com os dados encontrados em nosso estudo(50-52). Até o presente momento, não temos dados brasileiros sobre o perfil rs8099917, porém nossos achados são semelhantes por outros autores (12).

Assim, pela primeira vez, foi observada associação do polimorfismo da IL28B no SNP rs8099917 ao desfecho clínico, tal como descrevemos. De fato, é importante salientarmos que a carga proviral de HTLV-1 em paciente com HAM/TSP, é de 3-4 vezes maior do que quando comparados com os portadores assintomáticos, o que pode estar relacionado com muitas das respostas imunológicas discutidas anteriormente(53). Outras características

genéticas, como alguns haplótipos HLA, têm sido descritos como envolvidos na patogênese da HAM/TSP (24), ou fatores pró-inflamatórios(54), que não foram estudadas e poderiam influenciar na patogênese da HAM/TSP.

7. CONCLUSÃO

1. O perfil alélico da IL28B, foi mais prevalente no SNP rs12979860 genótipo CT no grupo de monoinfectados por HTLV-1, onde 67,2% pacientes com HAM/TSP e 37,93% assintomáticos.
2. No SNP rs8099917 a maior prevalência observada foi no genótipo TT, observada no grupo de monoinfectados por HTLV-1, onde 88,89% pacientes com HAM/TSP e 11,11% assintomáticos.
3. O polimorfismo da IL28B foi estatisticamente significativo relacionado ao genótipo GG no SNP rs8099917;
4. Apesar dos pacientes com genótipo mutante do SNP rs8099917. apresentarem maior carga proviral (maior 2,5 vezes), essa diferença não foi significativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia*. 2003 Jan;17(1):26-38. PubMed PMID: 12529656.
2. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388. PubMed PMID: 23162541. Pubmed Central PMCID: 3498738.
3. Galvao-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira Junior OC, Franco LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997 Feb;37(2):242-3. PubMed PMID: 9051104.
4. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jan;38(1):41-9. PubMed PMID: 15665987.
5. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):41-6. PubMed PMID: 16614741. Pubmed Central PMCID: 1415844.
6. Pereira GFM, Givisiez JM, Coelho RdA, Oliveira SBd, Amorim TRd. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2011.
7. Cardoso DF, Souza FV, Fonseca LA, Duarte AJ, Casseb J. Influence of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Infection on laboratory parameters of patients with chronic hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009 Oct-Dec;51(6):325-9. PubMed PMID: 20209267.
8. Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, et al. T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus--positive blood donors without viremia. *Hepatology*. 1996 Oct;24(4):790-5. PubMed PMID: 8855177.
9. Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with

hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):35-41. PubMed PMID: 10608748.

10. Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K, Mitsutake A, Kashiwagi S, Hayashi J. Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis.* 2001 Nov 1;184(9):1114-9. PubMed PMID: 11598833.

11. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature genetics.* 2009 Oct;41(10):1100-4. PubMed PMID: 19749758.

12. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009 Sep 17;461(7262):399-401. PubMed PMID: 19684573.

13. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *The American journal of gastroenterology.* 2011 Jan;106(1):38-45. PubMed PMID: 20924369.

14. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):798-801. PubMed PMID: 19759533. Pubmed Central PMCID: 3172006.

15. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2010 Dec;139(6):1865-76. PubMed PMID: 20950615. Pubmed Central PMCID: 3072961.

16. Trevino A, Lopez M, Vispo E, Aguilera A, Ramos JM, Benito R, et al. Development of tropical spastic paraparesis in human T-lymphotropic virus type 1 carriers is influenced by interleukin 28B gene polymorphisms. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012 Jul;55(1):e1-4. PubMed PMID: 22460962.

17. Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, Uno N, Morinaga Y, Mori S, et al. Paradoxical expression of IL-28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C virus. *Virol J.* 2012;9:40. PubMed PMID: 22336134. Pubmed Central PMCID: 3308917.

18. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Dec;77(12):7415-9. PubMed PMID: 6261256. Pubmed Central PMCID: 350514.
19. Casseb J, Fukumori L, Vergara M, Sanabani S, Marchiori P, Duarte A, et al. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in Sao Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006 May;101(3):273-6. PubMed PMID: 16862321.
20. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982 Nov 5;218(4572):571-3. PubMed PMID: 6981847.
21. Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med*. 2000 Jan;18(1):109-19. PubMed PMID: 10645850.
22. Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Wong-Staal F, Pavlakis GN. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science*. 1985 Aug 16;229(4714):675-9. PubMed PMID: 2992082.
23. Llorens C, Futami R, Covelli L, Dominguez-Escriba L, Viu JM, Tamarit D, et al. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D70-4. PubMed PMID: 21036865. Pubmed Central PMCID: 3013669.
24. Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):7278-84. PubMed PMID: 11120862.
25. Azimi N, Jacobson S, Leist T, Waldmann TA. Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. *J Immunol*. 1999 Oct 1;163(7):4064-72. PubMed PMID: 10491011.

26. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature genetics*. 2009 Oct;41(10):1105-9. PubMed PMID: 19749757.
27. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62. PubMed PMID: 2523562.
28. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):362-4. PubMed PMID: 2496467.
29. Morton TA, Kelen GD. Hepatitis C. *Annals of emergency medicine*. 1998 Mar;31(3):381-90. PubMed PMID: 9506498.
30. Milagres FA, Duarte MI, Viso AT, Segurado AC. Hepatitis C virus and human T-lymphotropic virus coinfection: epidemiological, clinical, laboratory and histopathological features. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Jul-Aug;42(4):363-8. PubMed PMID: 19802468.
31. Ferri C, Caracciolo F, Zignego AL, La Civita L, Monti M, Longombardo G, et al. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 1994 Oct;88(2):392-4. PubMed PMID: 7803287.
32. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol*. 1992 Nov 15;149(10):3339-44. PubMed PMID: 1385523.
33. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis*. 2002 Mar 15;185(6):720-7. PubMed PMID: 11920289.
34. Ferri C, Caracciolo F, La Civita L, Monti M, Longombardo G, Greco F, et al. Hepatitis C virus infection and B-cell lymphomas. *Eur J Cancer*. 1994;30A(10):1591-2. PubMed PMID: 7833125.
35. Bahia F, Novais V, Evans J, Le Marchand C, Netto E, Page K, et al. The impact of human T-cell lymphotropic virus I infection on clinical and immunologic outcomes in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus.

Journal of acquired immune deficiency syndromes. 2011 Aug;57 Suppl 3:S202-7. PubMed PMID: 21857319.

36. Thio CL, Thomas DL. Interleukin-28b: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. *Gastroenterology*. 2010 Apr;138(4):1240-3. PubMed PMID: 20184973.

37. Brites C, Sampalo J, Oliveira A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS reviews*. 2009 Jan-Mar;11(1):8-16. PubMed PMID: 19290030.

38. Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2002 Apr;102(1-2):37-51. PubMed PMID: 11879691.

39. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Nov;38(11):1643-7. PubMed PMID: 16258633.

40. Scherzer TM, Hofer H, Staettermayer AF, Rutter K, Beinhardt S, Steindl-Munda P, et al. Early virologic response and IL28B polymorphisms in patients with chronic hepatitis C genotype 3 treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Journal of hepatology*. 2011 May;54(5):866-71. PubMed PMID: 21145807.

41. Jacobson S, Krichavsky M, Flerlage N, Levin M. Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 1997 Apr;11 Suppl 3:73-5. PubMed PMID: 9209303.

42. Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol*. 2002 Feb;190(2):133-59. PubMed PMID: 11807819.

43. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment

failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010 Apr;138(4):1338-45, 45 e1-7. PubMed PMID: 20060832.

44. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Hoots WK, et al. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis*. 2010 Dec 1;202(11):1749-53. PubMed PMID: 20977343. Pubmed Central PMCID: 2974014.

45. Machmach K, Abad-Molina C, Romero-Sanchez MC, Abad MA, Ferrando-Martinez S, Genebat M, et al. IL28B Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. *J Infect Dis*. 2013 Feb;207(4):651-5. PubMed PMID: 23225905.

46. Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LM, Olah I, da SDAJ, et al. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2009 Oct;70(4):403-7. PubMed PMID: 19751276.

47. Sanabani SS, Nukui Y, Pereira J, da Costa AC, de Oliveira AC, Pessoa R, et al. Lack of evidence to support the association of a single IL28B genotype SNP rs12979860 with the HTLV-1 clinical outcomes and proviral load. *BMC Infect Dis*. 2012;12:374. PubMed PMID: 23259930. Pubmed Central PMCID: 3547796.

48. Rallon NI, Restrepo C, Naggie S, Lopez M, Del Romero J, Goldstein D, et al. Interleukin-28B gene polymorphisms do not influence the susceptibility to HIV-infection or CD4 cell decline. *Aids*. 2011 Jan 14;25(2):269-71. PubMed PMID: 21099665.

49. Mennechet FJ, Uze G. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4417-23. PubMed PMID: 16478884.

50. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, Machado TM, Lemaire DC, Mendes CM, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012 Mar;32(3):476-86. PubMed PMID: 22098416.

51. Moreira S, Garcia RF, Gutberlet A, Bertol BC, Ferreira LE, Pinho Mde S, et al. A straightforward genotyping of the relevant IL28B SNPs for the prediction

of hepatitis C treatment outcome. *J Virol Methods*. 2012 Sep;184(1-2):93-7. PubMed PMID: 22664181.

52. Ferreira PR, Santos C, Cortes R, Reis A, Tenore Sde B, Silva MH, et al. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012 Feb;67(2):509-10. PubMed PMID: 22146876.

53. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998 Dec;4(6):586-93. PubMed PMID: 10065900.

54. Montanheiro P, Vergara MP, Smid J, da Silva Duarte AJ, de Oliveira AC, Casseb J. High production of RANTES and MIP-1alpha in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Journal of neuroimmunology*. 2007 Aug;188(1-2):138-42. PubMed PMID: 17588676.

55. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Oct;78(10):6476-80. PubMed PMID: 7031654. Pubmed Central PMCID: 349062.

56. Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Proietti FA, Namen-Lopes S, et al. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Am J Ophthalmol*. 2006 Nov;142(5):811-15. PubMed PMID: 16989761.

57. Hoshino H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. *Front Microbiol*. 2012;3:222. PubMed PMID: 22737146. Pubmed Central PMCID: 3380293.

58. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H, Yashiki S, Karino S, Zaninovic V, et al. Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Sep 20;15(14):1235-9. PubMed PMID: 10505671.

59. Moxoto I, Boa-Sorte N, Nunes C, Mota A, Dumas A, Dourado I, et al. [Sociodemographic, epidemiological and behavioral profile of women infected with HTLV-1 in Salvador, Bahia, an endemic area for HTLV]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 Jan-Feb;40(1):37-41. PubMed PMID: 17486251. Perfil

sociodemografico, epidemiologico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma area endemica para o HTLV.

60. Trevino A, Lopez M, Vispo E, Aguilera A, Ramos JM, Benito R, et al. Development of Tropical Spastic Paraparesis in Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Carriers Is Influenced by Interleukin 28B Gene Polymorphisms. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul;55(1):e1-e4. PubMed PMID: 22460962. Epub 2012/03/31. Eng.
61. Ge D FJ, Thompson AJ, et al. . Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461:3.
62. Chen L, Sun J, Meng L, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. *J Gen Virol*. 2010 Feb;91(Pt 2):382-8. PubMed PMID: 19846672.
63. Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, Pekarek V, Kelner D, Rodia M, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes and immunity*. 2007 Apr;8(3):254-61. PubMed PMID: 17361203.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde

Protocolo nº.:

O (a) Sr(a) foi selecionado(a) e está sendo **CONVIDADO(A)** para participar da pesquisa intitulada: **Determinação do Perfil do Polimorfismo da IL28B em Indivíduos co-infectados com o vírus da Hepatite C crônica Genótipo 1 e pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)**, no ambulatório do “**Instituto de Infectologia Emílio Ribas**”.

Esta pesquisa tem como **objetivo**: determinar o perfil do polimorfismo da IL28B de pessoas que tem o vírus HTLV- 1e/ ou o vírus da Hepatite C, com isso verificaremos como o vírus agem no organismo, e também como seria a resposta do organismo frente a infecção. Os resultados deste estudo irão nos ajudar a entender como esses vírus agem no organismo entre os pacientes de nosso país, visto que a maioria dos estudos sobre esse assunto foi realizada no exterior. Nós teremos **3 grupos** de pessoas que serão convidadas a participar da pesquisa:

1º Grupo : Pacientes que estão sendo atendidos pelo **ambulatório de HTLV** (Dr. Augusto Penalva, as quartas-feiras) e possuem o vírus do **HTLV-1**. Nos pacientes que se encaixam neste grupo , realizaremos exame de sangue para avaliar se o Sr. (a) possui uma variação genética em uma proteína que pode demonstrar como será a resposta do vírus da HTLV-1 em relação ao desenvolvimento da TSP/HAM (doença que o vírus do HTLV-1 causa em 5% dos pacientes que tem esta infecção, levando a paralisia das pernas), e também analisaremos o seu prontuário médico, coletando informações sobre seus exames de sangue já realizados como : hemograma, glicemia, TGO, TGP.

2º Grupo: Pacientes que estão sendo atendidos pelo **ambulatório de Hepatologia** (Dr. Fernando Vieira, segunda, terça e quartas- feiras) e possuem o vírus do **Hepatite C**. Nos pacientes que se encaixam neste grupo,

realizaremos exame de sangue para avaliar se o Sr. (a) possui uma variação genética em uma proteína que pode demonstrar como será a resposta do vírus da Hepatite C ao tratamento, e também analisaremos o seu prontuário médico, coletando informações sobre seus exames de sangue já realizados como: hemograma, glicemia, TGO, TGP.

3º Grupo: Pacientes que estão sendo atendidos pelo **ambulatório** pelo **ambulatório de HTLV** (Dr. Augusto Penalva, as quartas-feiras) e possuem o vírus do **HTLV-1** e o vírus da **Hepatite C**. Nos pacientes que se encaixam neste grupo, realizaremos exame de sangue para avaliar se o Sr. (a) possui uma variação genética em uma proteína que pode demonstrar como será a resposta do vírus da Hepatite C ao tratamento, e essa mesma proteína pode nos mostrar como será a resposta do vírus da HTLV-1 em relação ao desenvolvimento da TSP/HAM (doença que o vírus do HTLV-1 causa em 5% dos pacientes que tem esta infecção, levando a paralisia das pernas). Analisaremos o seu prontuário médico, coletando informações sobre seus exames de sangue já realizados como : hemograma, glicemia, TGO, TGP.

Nós informaremos o Sr.(a) a qual grupo você pertence no momento da entrevista e vamos circular o grupo ao qual pertence, na sua cópia deste termo.

A pesquisa terá duração de 2 anos, com o término previsto para março de 2013.

Aos pacientes do **Grupo 1 , 2 e 3** realizamos uma coleta de sangue onde coletaremos dez (10) ml de seu sangue para a realização de um exame que nos mostra quantos vírus HTLV- 1 e 2 tem no seu sangue. Caso seja preciso, você será chamado para nova coleta de sangue, igual à primeira, para que refaçamos o exame, você poderá sentir algum desconforto na hora da coleta do sangue, no local onde a agulha será colocada o Sr.(a) pode sentir dor, que logo desaparecerá; poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa, que também desaparecerá depois de algum tempo, desmaio, ou em casos extremos pode ocorrer uma infecção na sua veia, que será tratada. Este sangue será coletado por uma equipe especializada que trabalha no Laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas”, e utilizaremos todas as

técnicas para evitar todos os desconfortos mencionados acima. A amostra de sangue obtida será estocada em freezer -20 C até a realização dos exames, e será descartada após o término da pesquisa. Caso o paciente recuse/desista de participar do estudo, as amostras serão descartadas.

Sua **participação** nesta pesquisa consistirá em responder as perguntas a serem realizadas sob a forma de questionário, onde perguntaremos sobre sua vida pessoal, por exemplo: seu estado civil, seu salário, seu comportamento em relação ao uso de drogas, sua vida sexual. A entrevista será respondida em questionário— que será guardado por cinco (05) anos e será destruído após esse período.

Suas respostas ao questionário serão tratadas de forma **anônima e confidencial**, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Quando for necessário exemplificar determinada situação, sua privacidade será assegurada uma vez que seu nome será substituído de forma aleatória. Os **dados coletados** serão utilizados apenas **NESTA** pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Sua participação é **voluntária**, isto é, a qualquer momento você pode **recusar-se** a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e **retirar seu consentimento**. Sua recusa ou desistência não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que forneceu os seus dados, como também na que trabalha.

Sr(a) não terá nenhum **custo ou quaisquer compensações financeiras**. Não haverá nenhum **benefício** à sua participação, a não ser de aumentar o conhecimento científico para compreender a infecção pelo vírus da Hepatite C e o vírus HTLV- 1.

Caso tenha alguma dúvida em relação a questões éticas da pesquisa o Sr(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto do Instituto

de Infectologia Emilio Ribas pelo telefone (11)3896-1406 ou pelo e-mail: comitedeetica-iier@ig.com.br .

OSr(a) receberá uma cópia deste termo, caso tenha qualquer dúvida sobre a pesquisa pode entrar em contato com Tatiane Assone ou Dr. Jorge Casseb pelo telefone (11) 3066-7194 ou pelo e-mail (tatianeassone@usp.br ou jorge_casseb@yahoo.com.br), podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Desde já agradecemos!

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO.

Nome e assinatura do paciente

Data: ____/____/____

Etiqueta do Paciente :

Nome e assinatura de quem obteve o

TCLE

DATA

ANEXO B

Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências - LIM-56

Av. Dr. Eneas 500, 3º andar– Tel.: (11) 3061-7499 / 7457 Fax.:
(11) 3081-7190

Questionário Sócio Demográfico

A- Dados Pessoais

1-Identificação: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: () _____ - _____ ou () _____ - _____

e-mail.: _____

2-Data da entrevista: ____/____/____

3-Data de Nascimento: ____/____/____

4-Escolaridade:

1-nenhuma. 2-de 1ª a 4ª série. 3-de 5ª a 8ª série.

4-2º grau. 5-superior. 6-não respondeu.

5-Renda familiar em salários mínimos:

1-< 2. 2-de 2 a 4. 3-de 5 a 10.

4-maior que 10. 5-não sabe. 6-não respondeu.

6-Situação marital:

1-casado/amigado 2-solteiro 3-separado 4-viúvo 5-não respondeu

7-Raça/cor (auto-referida) que você se considera :

1-branca 2-negra 3-amarela 4-parda 5-indígena 6-não respondeu

B- Dados comportamentais**1. Ingere Bebida Alcolica?**

Sim 2- Não 3- Eventualmente

2. Fuma?

Sim 2- Não 3- Ex-fumante

3-Idade da 1ª relação sexual: ()

4-Relação sexual nos últimos 12 meses:

1-não teve 2-só com mulheres 3-com homens e mulheres

4-só com homens 5-não respondeu.

5-Usa preservativo com parceira (o) eventual:

1-não tem parceira (o) eventual 2-sempre 3-às vezes usa

4-nunca usa 5-não respondeu

6 -Usa preservativo com parceira (o) fixa (o):

1-não tem parceira fixa (o). 2-sempre. 3-às vezes usa.

4-nunca usa. 5-não respondeu.

7- Número de parceiros (as),com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

1-nenhuma. 2-só uma. 3- duas a quatro.

4- cinco a dez. 5-mais de dez. 6-não responde.

8- Já usou ou usa algumas das drogas abaixo:

1-maconha. 2-cocaína. 3-craque. 4-LSD.

5-ectasy. 6-cola 7-mais de uma anterior. 8-nenhuma.

9-Compartilha ou já compartilhou agulhas e/ou sergingas?

1 . Sim 2.Não

10- Já fez transfusão de sangue?

1 . Sim 2.Não

11-Tomou vacina de revólver (que eram administradas na escola)?

1 . Sim 2.Não

12- Compartilha ou já Compartilhou algum desses objetos pessoais:

- Escova de Dentes: 1 . Sim 2.Não

- Objetos de Manicure (lixas, alicates, esmaltes, etc.) : 1 . Sim 2.Não

-Lâmina de Barbear: 1 . Sim 2.Não

13- Realizou alguma cirurgia?

1 . Sim 2.Não

14-Já sofreu acidente com material Perfurocortante?

1 . Sim 2.Não

15-Fez tatuagem?

1 . Sim 2.Não

17-Foi amamentado ao nascer?

. Sim Tempo_____ 2.Não

15-Exames laboratoriais

RESULTADO HCV:_____ DATA DO TESTE HCV:____/____/____

RESULTADO HTLV:_____ DATA DO TESTE HTLV:____/____/____

RESULTADO HIV:_____ DATA DO TESTE HIV:____/____/____

16-Forma de contaminação:

1-Prática HSM (homem faz sexo com mulher) 2-prática HSH (Homem que

faz sexo com homem) 3-UDI(usuário de drogas injetável) 4-Hemotransfusão

5-não sei 6-não respondo

17-Carga viral do HCV (RNA) atual (qualitativa):_____

18-Genótipo HCV:

19-Biópsia:

20-ALT:

21-Eletoforese de Proteínas:

Albumina :_____ Gama Globulina:_____

ANEXO C

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMÍLIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 13/11
PARECER N.º 232/2012

Data: 19/9/2012

Título da Pesquisa: "Determinação do perfil de polimorfismo da IL28b em indivíduos co-infectados pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)"

Investigador Responsável: Dr. Fernando Vieira Souza

Autora Principal: Tatiane Assone dos Santos

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa toma ciência e Aprova:

- Nova versão do projeto com o título alterado;
- Nova versão do TCLE.

O CEP aguarda o Parecer de Aprovação do CEP da FMUSP.

(X) APROVADO

() REPROVADO

() COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

☐ SIM ☐ NÃO

CONEP

☐ SIM ☐ NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) ☐ SIM ☐ NÃO

Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R.

ANEXO D

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo – Brasil
e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefone: (55-11) 3061-7193 e 3061-8650 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 30 de maio de 2012.

Ilmo. Sr.
Dr. Jorge Casseb
(aos cuidados de Tatiane Assone dos Santos)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob o número **CPE-IMT 2012/133** e intitulado “Determinação do perfil do Polimorfismo da IL28b em indivíduos coinfectados pelo vírus da Hepatite C crônica (HCV) e pelo vírus Linfotrópico de células T Humanas tipo 1 (HTLV-1”, sob sua responsabilidade. O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para aprovação.

Atenciosamente

Dr. Jorge Casseb

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

ANEXO E

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **23.10.12** tomou ciência dos documentos apresentados ao Projeto nº **356/12** intitulado **“Determinação do Perfil do Polimorfismo da IL28-b em indivíduos co-infectados pelo vírus da Hepatite C Crônica (HCV) e pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo (HTLV-1)”**, apresentado, avaliado e aprovado pelo Instituto de Medicina Tropical , e por não haver nenhum óbice ético , **a proposta foi aprovada.**

Pesquisador(a) Responsável: Jorge Simão do Rosário Casseb

Pesquisador(a) Executante : Tatiane Assone dos Santos

CEP-FMUSP, 23 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ARTIGO SUBMETIDO

IL28B gene polymorphism SNP rs8099917 allele GG is associated with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 carriers

*Tatiane Assone dos Santos^{1,2}, *Fernando Vieira de Souza⁴, *Karen Oliveira Gaester^{1,2}, Daniela Cardeal da Silva², *Luiz Augusto Marcondes Fonseca³, Olinda do Carmo Luiz³, João Renato Rebello Pinho², Alberto JS Duarte¹, Augusto Penalva de Oliveira⁴, *Jorge Casseb^{1,2}

- 1- Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, Department of Dermatology, University of São Paulo Medical School, Brazil
- 2- Institute of Tropical Medicine of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- 3- Department of Preventive Medicine, University of São Paulo Medical School, Brazil
- 4- Institute of Infectious Diseases “Emilio Ribas” (IIER) of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Authors who contributed equally to this study.

Corresponding author:

Dr. Jorge Casseb, Laboratory of Investigation in Dermatology and Immunodeficiencies – LIM56, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 500, 3rd Floor, Building II, São Paulo, SP, Brazil
.Tel.: +55 11 3061 7194, Fax: +55 11 3081 7190; E-mail address: jcasseb10@gmail.com

Alternative corresponding author:

Tatiane Assone, MsC .Laboratory of Investigation in Dermatology and Immunodeficiencies – LIM56. Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 500, 3rd Floor, Building II, São Paulo, SP, Brazil
.Tel.: +55 11 3061 7194, Fax: +55 11 3081 7190; E-mail address: tatianeassone@usp.br

Background: The polymorphism of IL28B was described as important in the pathogenesis of infections caused by some viruses. The aim of this research was to evaluate whether IL28B gene polymorphisms (SNP rs8099917 and SNP rs12979860) were associated with HAM/TSP.

Methods: The study included 144 subjects were classified according to their neurological status in two groups: Group I (60 asymptomatic HTLV-1 carriers) and Group II (84 HAM/TSP patients). Blood samples were collected, and PBMC separated by Ficoll density gradient centrifugation. DNA was extracted using a commercial kit, and the DNA was stored at -80°C for later analysis. After this, the proviral load was quantified, and the rs8099917 and rs12979860 SNPs in the region of IL28B-gene were analyzed by StepOnePlus Real-time PCR System.

Results: A multivariate model analysis, including gender, age, and HTLV-1 DNA proviral load, showed that IL28B polymorphism SNP rs12979860 was not independently associated with HAM/TSP outcome. In contrast, the SNP rs8099917 allele GG was independently associated with HAM/TSP outcome (OR=6.25; IC95%=1.22– 32.00).

Conclusion: Persons with SNP rs8099917 genotype GG may present a distinct immune response against HTLV-1 infection. So, it seems reasonable to suggest that a search for IL28B polymorphisms should be performed for all HTLV-1-infected subjects in order to monitor their risk for disease development; however, since this is the first description of this finding in the literature, we should first replicate this study with more HTLV-1-infected persons to strengthen the evidence already provided by our results.

Keywords: HAM/TSP; proviral load; IL28B, HTLV-1, SNP

Introduction

Human T-cell lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) is a retrovirus etiologically linked with adult T-cell leukemia/lymphoma [1], HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and other inflammatory diseases [4]. This virus is endemic in Japan, Caribbean Basin, and some countries in Latin America [5, 6], with more than 15-25 million people infected worldwide [7, 8]. In Brazil, the highest prevalence of HTLV-1 is found in the Northeastern region, particularly in the cities of Sao Luiz and Salvador [9].

New evidence has shown that the pathogenic mechanism of disease-associated HTLV-1 infection is an impairment of the immunity [10]. More recently, it has been demonstrated that IL28B (also known as interferon lambda 3) polymorphisms were more likely to occur among HTLV-1/HCV co-infected subjects and that the IL28B polymorphisms were associated with higher proviral loads in HTLV-1 carriers [11].

IL28B is located on chromosome 19, using a cytokine receptor that is specific to the IL10R β and IL28R α , which is expressed in macrophages, dendritic cells and hepatocytes. The signaling receptors for interferons are the result of phosphorylation of JAK1 and Tyk2 kinases, which actively transcribe the factor containing STAT1, STAT2 and interferon regulatory factor 9. Those groups of interferons up regulate viral infections by other interferons, leading to an immune response to HCV [12]. This adjustment is similar to IFN- α , and although the specific mechanism remains unknown, the haplotype can exert effects on different contexts such as transcription of mRNA half-life or cytokine receptor affinity [13]. Thus, the aim of this study was to examine the association between IL28B polymorphisms (rs8099917 and rs12979860 SNPs) and HAM/TSP in a large cohort of HTLV-1-infected subjects in Sao Paulo city, Brazil.

Patients and Methods

The HTLV outpatient Clinic from Institute of Infectious Diseases “Emilio Ribas” (IIER) has been following HTLV-infected patients for 15years, 144 of whom were studied in this project. For the purpose of this study, only patients who were in active follow-up during the period from June 2011 to May 2012 were invited to participate.

The Ethical Board of the IIER approved the protocol (Number 13/2011), and an informed signed consent was obtained from all participants prior to study inclusion. The subjects were classified according to their neurological status in two groups: Group I (60 asymptomatic HTLV-1 carriers) and Group II (84 HAM/TSP patients). Blood samples were collected in acid-citrate-dextrose solution, and PBMC separated by Ficoll density gradient centrifugation (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Cells were washed with saline solution; cell number was adjusted to 2×10^6 cells and then stored at -80°C . DNA was extracted using a commercial kit (Illustra Tissue and Cells GenomicPrep Mini Spin kit, Easton Turnpike,

Fairfield, CA) according to manufacturer's instructions. After this procedure the DNA was stored at -80°C for later analysis.

Quantitation of HTLV-1 proviral load

The HTLV-1 proviral load was quantified by real-time PCR, using primers and probes targeting the *pol* gene: SK110 (5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3', HTLV-1 nucleotide 4758-4779 (GenBank accession No. J02029), and SK111 (5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3', HTLV-1 nucleotide 4943-4920). The internal HTLV-1 TaqMan probe (5'-CTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3') was selected using the Oligo (version 4, National Biosciences, Plymouth, MI, USA) and Primer Express (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Boston, MA, USA) software programs and checked by a search of GenBank. The probe was located between positions 4829 and 4858 of the HTLV-1 genome and carried a 5' reporter dye FAM (6-carboxy fluorescein) and a 3' quencher dye TAMRA (6-carboxy tetramethylrhodamine). For quantification of the human albumin gene, the primers Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') and Alb-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3') and the albumin TaqMan probe (5'-FAMCCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCTAMRA-3') were used as described previously [14, 15]. Albumin DNA was quantitated jointly in all samples in order to determine the amount of DNA used as an endogenous reference to normalize variations due to differences in PBMC counts or DNA extraction. The 25- μ l PCR mixture for HTLV-1 or albumin DNA amplifications consisted of 5 μ l DNA extract, primers SK110 and SK111 or Alb-S and Alb-AS (10nM of each), 10 nM HTLV-1 or albumin TaqMan probe, TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems®, Foster City, CA). For both the HTLV-1 and albumin DNA amplifications, after one cycle at 50°C for 2 min and one cycle at 95°C for 10 min, a two-step PAC procedure was used consisting in 15 s at 95°C and 1 min at 60°C for 45 cycles. Amplifications were carried out using the ABI 7300Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA). The HTLV-1 copy number in each clinical sample was estimated by interpolation from the plasmid regression curve. To determine the proviral load, the HTLV-1 DNA copy number was normalized to the amount of the cellular albumin of the clinical sample, which was quantified in parallel. All samples were run in duplicates. Results were expressed as HTLV-1 DNA copies/10⁴ PBMCs, as described elsewhere [15]. Based on the median of asymptomatic individuals, 200 copies/10⁴ PBMCs of PVL was used as a cut off to discriminate from HAM/TSP subjects.

Testing for rs8099917 and rs12979860 SNP Genotyping

The rs8099917 and rs12979860 SNPs in the region of IL28B-gene were analyzed by StepOnePlus Real-time PCR System (ABI TaqMan allelic discrimination, Applied Biosystems, Foster City, CA) with the help of a Custom TaqMan SNP Genotyping Assay developed together with Applied Biosystems. The sequences were obtained from NCBI Entrez SNP Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). 5'-GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' was used as the forward and 5'-GCGCGSGTGCAATTCAA-3' as the reverse primer for rs12979860. For rs8099917, 5'-TCACTGTTCTCCTTTTGTTCCT-3' was used as the forward and 5'-CCAGCTACCAAAGTGTATACAGCAT-3' as the reverse primer [16]. Also, TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used. All samples were run in duplicated, and negative and positive controls for all variations of each SNP regions were also included in the analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using Student's t-test for parametric data, and the chi-square test for proportions. Possible differences in patient characteristics or laboratory values among the groups were evaluated with two-way Mann-Whitney's test and Kruskal-Wallis test. Group analysis was done using Anova test (GraphPadSoftware 5.0, La Jolla, CA). Bivariate logistic analysis was performed to identify independent variables associated with HAM/TSP. Variables associated with the outcome at a significance level of $p < 0.20$ (HAM/TSP/TSP) in the bivariate analysis were included in a multivariate logistic model; the only exception to this procedure was the inclusion of the variable gender, which was included regardless of its statistical significance in the bivariate model. Logistic analysis were performed with the aid of Stata 11 software (StataCorp. 2009. *Stata: Release 11*. Statistical Software. College Station, TX).

Results

Sixty asymptomatic HTLV-1-infected subjects and 84 HAM/TSP patients were studied. The mean age of the study population was 52 years, and 96 (66.7%) were females (Table 1). Sexual risk of transmission was not different for HAM/TSP and asymptomatic patients (data not shown). IL28B allelic distribution at the SNP rs12979860 in HTLV-1 patients was as follows: CC (n=31; 21.5%), CT (n=107; 74.3%) and TT (n=6; 4.2%), (Table 1). Median HTLV-1 DNA proviral load (PVL) from asymptomatic HTLV-1 subjects was 36 copies, while that from HAM/TSP patients was 236 copies/ 10^4 PBMC ($p=0.009$) (Figure 1). Furthermore, the IL28B CT genotype was more frequent in HAM/TSP patients than in asymptomatic carriers ($p=0.42$) (Figure 2a). IL28B allelic distribution at the SNP rs8099917 in HTLV-1 patients was: TT (n=88;

61.1%), GT (n=38; 26.4%) and GG (n=18; 12.5%) (Table 1). TT allele was more frequent in HAM/TSP patients when compared to asymptomatic carriers ($p=0.4633$) (Figure 2b). Bivariate analysis revealed that the proviral load was significantly associated with HAM/TSP ($p<0.01$), as well the polymorphism SNP rs8099917 in the profile GG ($p=0.02$) (Table 2).

A multivariate model analysis, including gender, age, and HTLV-1 DNA proviral load, showed that IL28B polymorphism SNP rs12979860 was not independently associated with HAM/TSP outcome. In contrast, the SNP rs8099917 allele GG was independently associated with HAM/TSP outcome (OR=6.25; IC95%=1.22– 32.00). In this model, age was also significantly associated with the outcome when included as a continuous variable (Table 3).

Discussion

The neuropathology of HAM/TSP provides evidence that immune mediated mechanisms may play a significant role in the pathogenesis of the disease [16]. Some studies have described and compared both cellular and humoral immune responses in patients with HAM/TSP, asymptomatic HTLV-1-seropositive individuals, and in HTLV-1-seronegative controls [17, 18].

The major finding of this study, so far, was the independent association of IL28B polymorphism SNP rs8099917 (GG) with the development of HAM/TSP when compared to asymptomatic HTLV-1 carriers. To our knowledge, this is the first time that these findings have been related with HAM/TSP outcome, although polymorphism SNP rs12979860 has already been implicated in a sustained virological response to HCV infection in patients treated with pegylated interferon alpha and ribavirin [19], a finding that has not been demonstrated for other infections, such as HBV and HIV infections [20]. Moreover, the profile of polymorphism SNP rs12979860 would induce the production of IFN-lambda 3, and an immune active HTLV-1 infection with neuronal damage in the spinal cord, indicating additional evidence for immune damage in the HAM/TSP pathogenesis [13, 17]. Our own previous study showed that patients with HAM/TSP had higher levels of IFN-gamma production compared to asymptomatic patients [21].

The majority of the studies, so far, emphasized the polymorphism SNP rs12979860. However, Soriano's group showed higher proviral loads among HAM/TSP patients, although no association between HAM/TSP and IL28B has been found [12]. This fact could have been due to the small sample size (n=12 patients) or to a different ethnic background of patients in that study. More recently, a Brazilian study also failed to find a positive association between the IL28B rs12979860 polymorphisms and an increased risk of developing HAM/TSP in 24 patients [22].

Thus, for the first time, this polymorphism was associated to clinical outcome, as described in our study. In fact, PVL is important in HAM/TSP patients since they may have up to 5-6 times more HTLV-1 proviral DNA in PBMC when compared to asymptomatic carriers, what may be related to many of the immunologic responses discussed above [23]. Other genetic background characteristics, such as some HLA haplotypes, have been described as involved in HAM/TSP pathogenesis [24] or pro-inflammatory factors [25]. In this regard, IL28B polymorphisms are influenced by genetic ancestry. Given the historical context of the Brazilian colonization, the population displays unique genetic characteristics, presenting phenotypes from African, European and Amerindian populations [26]. For example, the allele GG (SNP rs8099917) genotype is more frequent in Asiatic, African and European Americans, while CC (SNP rs12979860) genotype is more frequent in European and Amerindian populations [27]. The distribution of those genotypes is similar to the genotype distribution found in our study.

Similarly, among HCV chronic patients, those who carried the G risk allele at rs8099917 had lower PBMC mRNA expression of IL28B [28]. It is likely that regulation will differ in the infected tissue and even between cell types within the liver and may be spinal cord, as has been reported recently for some interferon stimulated genes [29]. IL28B attenuates IL-13; it is also possible that the cytokine produced in persons with the protective allele diminishes IL-13 to a lesser extent than the molecule with the risk allele, similar to the protective effect of the least inhibitory interactions between KIR and HLA-C [30]. Thus, IL28B and other type 3 interferons like IL28A or IL-29 trigger an antiviral cascade via JAK-STAT that is similar to probably synergistic with type 1 interferons (such as interferon alfa), although using distinct receptors, contributing to HAM/TSP immune pathogenesis.

Finally, an attempt of explanation: persons with SNP rs8099917 genotype GG may present a distinct immune response against HTLV-1 infection. So, it seems reasonable to suggest that a search for IL28B polymorphisms should be performed for all HTLV-1-infected subjects in order to monitor their risk for disease development; however, since this is the first description of this finding in the literature, we should first replicate this study with more HTLV-1-infected persons to strengthen the evidence already provided by our results. It is likely that IL28B may have some importance for protection against disease progression [13], but longitudinal studies should be done in order to assess this hypothesis.

Table 1. Characteristics of the HTLV-1-infected subjects in the cohort

Variable	Category	N	%
Gender	Males	48	33.3
	Females	96	66.7
Age (years)	≤ 30	5	3.5
	31 – 40	28	19.4
	41 – 50	27	18.8
	> 50	84	58.3
Clinical Status	HAM/TSP	84	58.3
	Asymptomatic	60	41.7
SNP rs12979860	CC	31	21.5
	CT	107	74.3
	TT	6	4.2
SNP rs8099917	TT	88	61.1
	GT	38	26.4
	GG	18	12.5

SNP: Single nucleotide polymorphism

Table 2.Bivariate analysis of IL28B polymorphisms and HTLV-1-associated myelopathy

Characteristic	Total N(%)	Asymptomatic(%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%CI)	P Value
Male	48 (33.3)	20 (33.3)	28 (33.3)	0.81 (0.37-1.75)	0.90
Female	96 (66.7)	40 (66.7)	56 (66.7)	1	-
Age > 50 years	84 (58.3)	31 (51.7)	53 (63.1)	1.74 (0.89-3.39)	0.10
Age ≤ 50 years	60 (41.7)	29 (48.3)	31 (36.9)	1	-
HTLV-1 DNA proviral Load					
<200	81 (56.2)	45 (75.0)	36 (42.9)	1	-
≥200	63 (43.8)	15 (25.0)	48 (57.1)	4.26 (2.07-8.79)	0.001
SNP rs12979860					
CC	31 (21.5)	16 (26.6)	15 (17.9)	1	-
CT	107 (74.3)	40 (66.7)	67 (79.7)	1.78 (0.79-4.00)	0.16
TT	6 (4.2)	4 (6.7)	2 (2.4)	0.53 (0.08-3.35)	0.50
SNP rs8099917					
TT	88 (61.1)	40 (66.7)	48 (57.1)	1	-
GT	38 (26.4)	18 (30.0)	20 (23.8)	0.93 (0.43-1.98)	0.84
GG	18 (12.5)	2 (3.3)	16 (19.1)	6.66 (1.44 -30.74)	0.02

SNP: Single nucleotide polymorphism

Table 3. Multivariate analysis for IL28B polymorphisms and HTLV-1-associated myelopathy outcome

Characteristic	OR (95% CI)	P value
Age (continuous)	1.03 (1.00-1.06)	0.04
Gender	0.94 (0.41-2.16)	0.89
HTLV-1 DNA proviral Load		
<200	1	-
≥200	4.62 (2.06 – 10.34)	0.001
SNP rs12979860		
TT	0.16 (0.02 – 1.40)	0.10
CT	1.52 (0.61 – 3.78)	0.36
CC	1	-
SNP rs8099917		
GG	6.25 (1.22 – 32.00)	0.03
GT	1.13 (0.48 – 2.68)	0.78
TT	1	-

SNP: Single nucleotide polymorphism

Figure 1. HTLV-1 proviral DNA in asymptomatic and HAM/TSP carriers **Figure 2. HTLV-1 proviral DNA in accordance to IL28B polymorphisms SNP rs12979860 (a) and SNP rs8099917 (b)**

Acknowledgments

To all participants who contributed to this study. To Rosa Maria Nascimento Marcusso, Adriele Fontes, Fernando A.M. Costa and Liã Barbara Arruda for helpful discussions.

Support: CNPq:134001/2011-7; FAPESP:2010/07076-4; FAPESP: 2012/23397-0

References

1. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**; 78:6476-80.
2. Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **1985**; 2:407-10.
3. Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1986**; 1:1031-2.
4. Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, et al. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Am J Ophthalmol* **2006**; 142:811-15.
5. Hoshino H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. *Front Microbiol* **2012**; 3:222.
6. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H, et al. Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1999**; 15:1235-9.
7. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* **2012**; 3:388.
8. Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med* **2000**; 18:109-19.
9. Moxoto I, Boa-Sorte N, Nunes C, et al. [Sociodemographic, epidemiological and behavioral profile of women infected with HTLV-1 in Salvador, Bahia, an endemic area for HTLV]. *Rev Soc Bras Med Trop* **2007**; 40:37-41.
10. Kamihira S, Usui T, Ichikawa T, et al. Paradoxical expression of IL28B mRNA in peripheral blood in human T-cell leukemia virus type-1 mono-infection and co-infection with hepatitis C virus. *Virol J* **2012**; 9:40.
11. Trevino A, Lopez M, Vispo E, et al. Development of Tropical Spastic Paraparesis in Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Carriers Is Influenced by Interleukin 28B Gene Polymorphisms. *Clin Infect Dis* **2012**; 55:e1-e4.
12. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **2010**; 139:1865-76.
13. Thio CL, Thomas DL. Interleukin-28b: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. *Gastroenterology* **2010**; 138:1240-3.
14. Dehee A, Cesaire R, Desire N, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* **2002**; 102:37-51.
15. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res* **2005**; 38:1643-7.
16. Scherzer TM, Hofer H, Staettermayer AF, et al. Early virologic response and IL28B polymorphisms in patients with chronic hepatitis C genotype 3 treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *J Hepatol* **2011**; 54:866-71.

17. Jacobson S, Krichavsky M, Flerlage N, Levin M. Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* **1997**; 11 Suppl 3:73-5.
18. Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol* **2002**; 190:133-59.
19. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* **2010**; 138:1338-45, 45 e1-7.
20. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, et al. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis* **2010**; 202:1749-53.
21. Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, et al. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol* **2009**; 70:403-7.
22. Sanabani SS, Nukui Y, Pereira J, et al. Lack of evidence to support the association of a single IL28B genotype SNP rs12979860 with the HTLV-1 clinical outcomes and proviral load. *BMC Infect Dis* **2012**; 12:374.
23. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* **1998**; 4:586-93.
24. Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol* **2000**; 165:7278-84.
25. Montanheiro P, Vergara MP, Smid J, da Silva Duarte AJ, de Oliveira AC, Casseb J. High production of RANTES and MIP-1alpha in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of neuroimmunology* **2007**; 188:138-42.
26. Ge D FJ, Thompson AJ, et al. . Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **2009**; 461:3.
27. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **2012**; 32:476-86.
28. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* **2009**; 41:1100-4.
29. Chen L, Sun J, Meng L, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. *J Gen Virol* **2010**; 91:382-8.
30. Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, et al. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes and immunity* **2007**; 8:254-61.