Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Tatiane Assone dos Santos

Associação dos polimorfismos de IFN-lambda 4, KIR e HLA-C em pacientes vivendo com HTLV-1

São Paulo

Novembro 2016

Tatiane Assone dos Santos

Associação dos polimorfismos de IFN-lambda 4, KIR e HLA-C em pacientes vivendo com HTLV-1

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Prof. Assoc. Jorge Simão do Rosário Casseb

Ficha catalográfica

Preparada pelaBiblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Santos, Tatiane Assone dos

Associação dos polimorfismos de IFN-lambda 4, KIR e HLA-C em pacientes vivendo com HTLV-1 / Tatiane Assone dos Santos. – São Paulo, 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb

Descritores: 1. POLIMORFISMO. 2. INTERFERONS. 3. IFNECÇÕES POR HTLV-1. 4. ANTIGENOS HLA.

USP/IMTSP/BIB-09/2016.

Folha de Aprovação para Tese de Doutorado
Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: Tatiane Assone dos Santos

Titulo da Dissertação: “Associação dos polimorfismos de IFN-lambda 4, KIR e HLA-C em pacientes vivendo com HTLV-1”

Orientador: Prof. Assoc. Jorge Simão do Rosário Casseb

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 07 de novembro de 2016, considerou:

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

Examinador(a)
Assinatura.....
Nome: Dr. Philip J. Norris
Instituição: Blood System Research Institute

Examinador(b)
Assinatura.....
Nome : Dr. Augusto César Penalva de Oliveira
Instituição: Instituto de Infectologia Emilio Ribas

Examinador(c)
Assinatura.....
Nome :Drª. Fernanda Toledo
Instituição : Universidade de São Paulo / Faculdade de Medicina – Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho

Examinador(d)
Assinatura.....
Nome : Dr. Expedito J. Luna
Instituição : Universidade de São Paulo / Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Presidente :
Assinatura .....
Nome: Prof Assoc. Jorge Simão do Rosário Casseb
Instituição: Universidade de São Paulo / Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que tem feitoepor tudo que ainda fará, pelas promessas e por tudo que representa em 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, obrigada por todo apoio e incentivo. Vocês são as pessoas mais importantes para mim e devo a vocês tudo o que eu sou.A todos os amigos que compartilharam este momento apoiando-me e torcendo por esta conquista.

Ao meu orientador Prof. Jorge Casseb, que confiou no trabalho e me ensinou lições valiosas, que jamais esquecerei. Obrigada por todo incentivo, serei sempre grata por tudo que me fez durante todos estes anos; sua amizade levarei para sempre.

Ao Dr. Philip J. Norris por me receber em seu laboratório no *Blood System Research Institute*, em *San Francisco*, obrigada por todo o incentivo e suporte durante o tempo que passei com você.

A todos que me receberem no *Blood System Research Institute*, em especial a Fredda Assencio, Leilane Montalvo e Sonia Bakkour.Obrigada por me acolherem tão calorosamente, pelo tempo, ensinamentos e dedicação; vocês são pessoas especiais que fizeram parte deste trabalho.

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

A Fernanda Malta por sua ajuda em todos os momentos, as valiosas discussões e sua amizade, esta tese não seria a mesma sem sua contribuição.

Ao Dr. Luiz Augusto Marcondes e a Drª. Olinda do Carmo Luiz do Departamento de Medicina Preventiva da FMUSP, a Drª Fernanda Toledo do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho

agradeço pela preciosa ajuda nas análises estatísticas e nas discussões deste trabalho.

A toda equipe de médicos, em especial ao Dr. Augusto P. Oliveira, a Drª. Jerusa Smid e ao Dr. Arhur Paiva,aproveito para agradecer também aos residentes e colaboradores do ambulatório de HTLV e do ambulatório de Hepatologiado IIER, que cederam seu tempo e seus pacientes para este estudo.

A todos os funcionários e amigos do laboratório LIM-56, em especial ao Dr. Gil Bernard, ao Prof. Alberto Duart, Edna, Evelyn, Maíra, Tatiana, Eduardo, Lucio, Sr. Luiz, Celeste, D. Silvia, e Daniel, obrigada pela colaboração e incentivo. Ao grupo de Imunovirologia, pelo apoio, colaboração e pelas valiosas discussões.

A CAPES pela bolsa regular, cedida pelo programa de pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, ao CNPq pela bolsa nº. 234058/2014-5do programa ciências sem fronteiras, e a FAPESP pelo auxílio 2014/22827-70, cedido para realização deste projeto.

Aos pacientes, que compartilharam sua história de vida, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho, o qual é dedicado a todos vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos níveis de susceptibilidade/proteção para HAM/TSP associadosaos alelos HLA..... 09

Tabela 2 - Sondas e iniciadores Carga Proviral de HTLV-1..... 18

Tabela 3 - Lista de *iniciadores* e sonda do polimorfismo do KIR..... 19

Tabela 4 - Análise univariada das variáveis sócio-demográficas dos voluntários portadores de HTLV-1..... 22

Tabela 5 - Análise univariada das variáveis laboratoriais dos voluntários portadores de HTLV-1..... 23

Tabela 6 - Análise multivariada das variáveis associadas a HAM/TSP..... 24

Tabela 7 - Análise univariadado modelo dominante dos polimorfismos de *IFN-λ4* e HLA-C associados à HAM/TSP..... 25

Tabela 8 - Análise univariada dos alelos recessivos dos polimorfismos de *IFN-λ4* e HLA-C associados à HAM/TSP..... 26

Tabela 9 - Análise multivariada do modelo recessivo dos polimorfismos de *IFN-λ4* e HLA-C associados à HAM/TSP..... 26

Tabela 10- Frequências alélicas e distribuição genotípica do no grupo de indivíduos assintomáticos..... 28

Tabela 11- Frequências alélicas e distribuição genotípica do no grupo de indivíduos com HAM/TSP..... 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de Ação da *IFN-λ4* perante tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina em Indivíduos com Hepatite C..... 02

Figura 2- Representação esquemática do genoma do HTLV-1..... 05

Figura 3- Mecanismo de interação entre o receptor de *KIR2DL2* e as células NK na resposta imune celular contra células infectadas pelo HTLV-1..... 08

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Marcadores virais e imunológicos de risco elevado para HAM/TSP..... 27

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB-AS	Albumina AS
ALB-S	Albumina S
APCs	Células apresentadoras de antígeno
Asp	Aspergina
ATL	Leucemia de células T do adulto
Céls	Células
CO_2	Gás carbônico
CPM	Contagem por minuto
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAN	6-carboxifluoresceina
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia tropical espática
HBV	Vírus da hepatite B
HBZ	Fator de codificação viral de leucina
HCV	Vírus da hepatite C
HIV-1	Vírus da imunodeficiência huma tipo 1
HLA	Complexo de histocompatibilidade
HLA-22	Complexo de histocompatibilidade 22
HLA-A	Complexo de histocompatibilidade A
*HLA-A*02*	Complexo de histocompatibilidade A*02
HLA-B	Complexo de histocompatibilidade B
*HLA-B*5401*	Complexo de histocompatibilidade B*5401
HLA-C	Complexo de histocompatibilidade C
*HLA-CW*08*	Complexo de histocompatibilidade CW*08
HLA-CW82	Complexo de histocompatibilidade CW82
HLA-DP	Complexo de histocompatibilidade DP
HLA-DQ	Complexo de histocompatibilidade DQ
HLA-DR	Complexo de histocompatibilidade DR
HLA-DR1	Complexo de histocompatibilidade DR1
*HLA-DRB1*0101*	Complexo de histocompatibilidade DRB1*0101
HPV	Papiloma vírus humano
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T tipo 1

HTLV-2	Vírus linfotrópico de células T tipo 2
HTLV-3	Vírus llinfotrópico de células T tipo 3
HTLV-4	Vírus linfotrópico de células T tipo 4
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-e	Interferon e
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IIER	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
IL-15	Interleucina 15
IL28A	Interleucina 28 A
IL28B	Interleucina 28 B
IL29	Interleucina29
IFN-λ1	Interferon lambda 1
IFN-λ2	Interferon lambda 2
IFN-λ3	Interferon lambda 3
IFN-λ4	Interferon lambda 4
JAK/STAT	Janus quinase e transdutor de sinal e ativador de transcrição
KIR	Receptores inibitórios de células natural killer
KIR2DL3	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DL3*
KIR2DL	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DL*
KIR2DL1	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DL1*
KIR2DL2	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DL2*
KIR2DS1	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DS1*
KIR2DS2	Receptores inibitórios de células natural killer *KIR2DS2*
LPA	Linfoproliferação
$LTCD4^+$	Linfócitos T citotóxico tipo 4^+
$LTCD8^+$	Linfócitos T citotóxico tipo 8^+
Lys	lisina
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
N	Número da amostra
OR	*Odds Ration*
p12	Proteína 12
p13	Proteína 13
p30	Proteína 30
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico

PCR	Reação de cadeia de polimerase
PEG-IFN	Interferon Peguilado
PHA	Fitohemaglutinina
PVL	Carga proviral
px	Proteína x
qPCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
Rex	Proteína Rex
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento para restrição
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
RVS	Resposta virológica sustentada
SAME	Serviço de arquivos médicos
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Mutação em um único alelo
SYBR	Fluoro cromo de ácido nucleico verde
TANRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
TaqMan	Sonda de hibridização Taq Man
Tax	Proteína Tax
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TNF-α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
VIC	2-tricloro-7-fenill-6-carboxi fluorescencia
WB	Western-Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µl	Microlitros
ml	Mililitros
°C	Graus celsius
nº	Número
nM	Nanomolar
µg/ml	Micrograma por mililitros
X	Vezes
<	Menor
>	Maior
±DP	Mais ou menos desvio padrão
≤	Menor igual

RESUMO

Assone T. Associação dos polimorfismos de IFN-lambda 4, KIR e HLA-C em pacientes vivendo com HTLV-1 (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2016.

As doenças virais têm sido importantes causas de morbidade e mortalidade nas últimas décadas, sendo que algumas delas são relacionadas com polimorfismos genéticos, que determinam a susceptibilidade do hospedeiro ou a resistência a essas infecções, influenciando na patogênese, além de desempenhar importante papel em respostas ao tratamento. Entre elas, destaca-se o HTLV-1, sendo que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo possuem esse vírus. Apenas 5% dos indivíduos infectados desenvolverão algum tipo de doença relacionada a tal infecção, entre elas destaca-se a HAM/TSP. Apesar da complexidade, o entendimento das interações hospedeiro versus HTLV-1 é de fundamental importância para avaliar prognóstico clínico dos portadores assintomáticos, visto que as opções diagnósticas e de tratamento não são adequadas, até o momento, para determinar o risco de progressão para HAM/TSP. Com isso, este trabalho objetivou estudar a associação entre alguns marcadores virais, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de HAM/TSPem pacientes infectados por HTLV-1. O ambulatório de HTLV do Instituto de Infectologia “Emilio Ribas” (IIER) possui uma coorte de portadores de HTLV em seguimento há 19 anos, para o presente estudo foram selecionados 247 voluntários portadores de HTLV-1, por conveniência. Somente pacientes adultos, com seguimento ativo no ambulatório no período de junho de 2011 até julho de 2016 foram convidados a participar. Este protocolo foi aprovado pelo CEP do IIER (Nº13/2011), e o TCLE foi obtido de todos os voluntários participantes. Os indivíduos foram classificados de acordo com seu quadro clínico neurológico em dois grupos: Grupo I (160 assintomáticos) e Grupo II (87 HAM/TSP). Amostra de sangue venoso foi coletada e as células mononucleares separadas. O material foi utilizado para o ensaio de PVL e para a genotipagem de IFN-λ4, HLA-C e KIR, pela técnica de qPCR . A análise estatística no modelo multivariado mostrou associação de risco para HAM/TSP com as variáveis LPA (p=0,001) e a idade (p=0,019), além disso, o polimorfismo doIFN-λ4 no rs8099917 foi associado no modelo recessivo(OR=0,31, IC=0,105 - 0,961) como fator de proteção ao desfecho.:Esse modelo estudado explica 8% dos fatores de progressão e de proteção para HAM/TSP. Desse modo, estudos genéticos multicêntricos envolvendo análise de exoma e maior número de casos de HAM/TSP, deveriam ser realizados. O entendimento da patogênese da mielopatia pode oferecer marcadores de valor prognóstico importantes para o manejo clínico, além de contribuir para o achado de novas intervenções terapêuticas no futuro.

Polimorfismo.Interferons.Infecções por HTLV-1.Antigenos HLA.

ABSTRACT

Assone T. Association of IFN-lambda 4, KIR and HLA-C polymorphisms in HTLV-1 subjects (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2016.

The viral diseases have been major causes of morbidity and mortality in recent decades, some of which are related to genetic polymorphisms, which determine the susceptibility or resistance to these infections, influencing the pathogenesis, besides of playing an important role in responses to treatment. Among them, it is highlighted HTLV-1, in which around 10 to 20 million people worldwide. Only 5% of infected subjects will develop some kind of disease related to such infection, including HAM/TSP. Despite the complexity, the understanding of host interactions versus HTLV-1 is fundamental importance to evaluate clinical prognosis of asymptomatic subjects, once the diagnostic options and treatment are not adequate, so far, to determine the risk of progression to HAM/TSP. Therefore, the purpose of this study was to investigate the association among some genetic polymorphisms, viral and immunological markers related to the development of HAM/TSP in HTLV-1-infected subjects. At the Institute of Infectious Diseases "Emilio Ribas" (IIER) has a cohort of HTLV subjects followed up for 19 years, for this study 247 volunteers with HTLV-1were selected for convenience. Only adult patients with active follow up in the period from June 2011 to July 2016 were invited to participate. This protocol was approved by the ethical committee at IIER (nº13/2011), informed consent was obtained. Subjects were classified according to their neurological status in two groups: Group I (160 asymptomatic) and Group II (87 HAM / TSP). Blood sample was collected and PBMCs The DNA was used to the PVL assay and IFN-λ4, HLA-C and KIR genotyping using qPCR. It has been observed an association to HAM/TSP with LPA variables (p=0.001) and age (p=0.019) in the multivariable analysis. On the other hand, the polymorphism of IFN-λ4 rs8099917 was associated in the recessive model (OR=0.31, CI=0.105-0.961) as a protective factor to HAM/TSP. This study explains 8% of progression and protective factors for HAM/TSP. Thus, multi-center studies involving genetic analysis and more cases of HAM/TSP, should be done. The understanding of the HAM/TSP pathogenesis can provide important markers of prognostic value for clinical management and contribute to the discovery of new therapeutic interventions in the future.

Polymorphism.Interferons.HTLV-1.HLA antigens.

SUMÁRIO

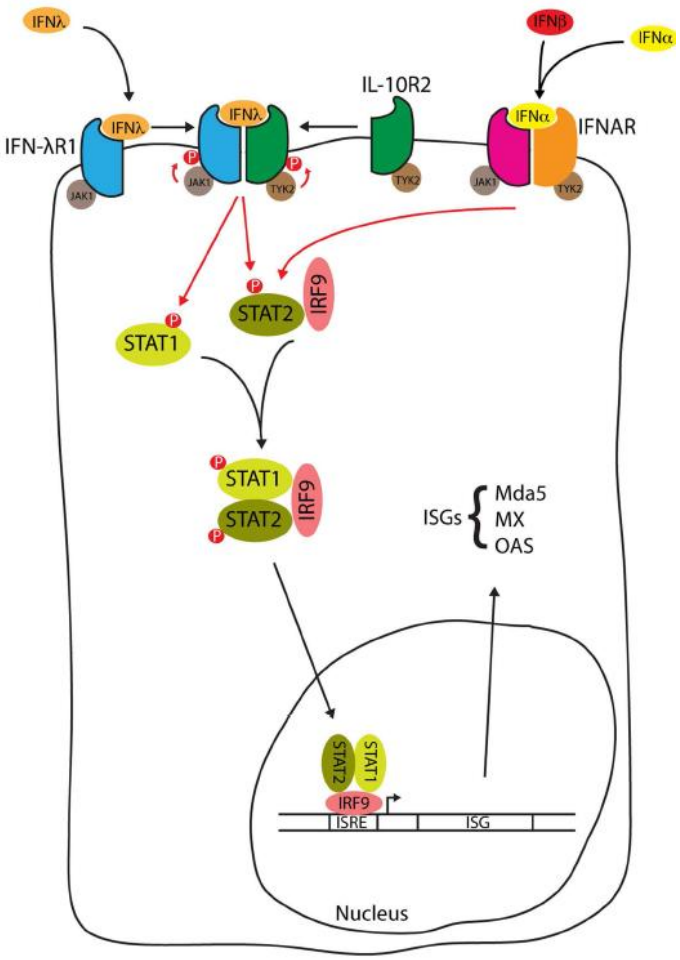
LISTA DE TABELAS VI
LISTA DE FIGURAS VII
LISTA DE ABREVIATURAS VIII
LISTA DE SÍMBOLOS XI
RESUMO XII
ABSTRACT XIII
SUMÁRIO XIV
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO HTLV 4
1.2 ESTRUTUTA VIRAL 4
1.3 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA 5
1.3 INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO 6
2 OBJETIVO 14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 14
3 MÉTODOS 15
3.1 POPULAÇÃO ALVO 15
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 15
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 15
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 15
3.5 GRUPOS ESTUDADOS 15
3.6 ALGORITMO LABORATORIAL 16
3.6.2Extração de DNA 17
3.6.3 Carga Proviral para HTLV-1 17
3.6.4 Ensaio de proliferação de células T 18
3.6.5 Genotipagem de *IFN-λ4*, HLA-C e KIR 18
3.6.6 Controle de Qualidade dos Dados 19
3.6.7 Análise Estatística 20
4 RESULTADOS 21
5 DISCUSSÃO 30
6 CONCLUSÃO 35

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1 INTRODUÇÃO

As doenças virais têm sido importantes causas de morbidade e mortalidade nas últimas décadas. As ocasionadas por vírus persistentes têm sido relacionadas com polimorfismos genéticos, que determinam a susceptibilidade do hospedeiro ou a resistência a essas infecções, influenciando na patogênese, além de desempenhar importante papel em respostas ao tratamento. Pode-se citar diversos vírus como exemplo a esse modelo de interação com o perfil genético do hospedeiro, destacando-se o vírus da Hepatite C (HCV)(1-4), o vírus da imunodeficiência humana do tipo1 (HIV-1) (5-9), o vírus da Hepatite B (HBV) (10-13), o papiloma vírus humano (HPV) (14, 15) e o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) (16-20).

Os testes de polimorfismos associados à resposta virológica sustentada (RVS) e à terapia para HCV têm sido relacionada a uma variação pontual em um único gene. O gene da interleucina 28 tipo B (*IL28B*), recentemente renomeada por interferon lambda 4 (*IFN-λ4*), responsável por codificar o interferon lambda 3 (*IFN-λ3*), está agrupado ao gene do interferon lambda 1 (*IFN-λ1*) e interferon lambda 2 (*IFN-λ2*) no cromossomo 19q13.13. O interferon lambda interage com seureceptor 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 viral (1) (Figura 1). Porém, fatores como a variação do genoma viral e a carga viral podem contribuir negativamente na resposta virológica, além da característica genética do hospedeiro em regiões específicas do cromossomo 19 (rs12979860 e rs8099917) (21).



Adaptado:Laidlaw&Dustin, 2014 (22)

Figura 1 - Mecanismo de ação do interferon lambda em indivíduos com hepatite C.

Estudos demonstram que a resposta imune intensa contra o HCV,na fase aguda da infecção, favorece o clareamento espontâneo da infecção. Entretanto, a variação nos genes envolvidos na resposta imune pode contribuir para a capacidade de clareamento viral (4).

As coinfecções com HIV ou HTLV podem alterar tanto o desenvolvimento da patogênese como alterar a resposta ao tratamento do HCV (23, 24). Esses achados não foram observados em outras infecções virais, tais como infecções por HBV e HIV (10), com exceção em pacientes com infecção aguda pelo HIV, que a resposta ao antirretroviral foi relacionada ao polimorfismo de base única (SNP) na posição rs12979860 do cromossomo 19 (6).

Outro exemplo foi um estudo realizado com voluntários portadores de HIV sob tratamento com antirretrovirais, o genótipo homozigoto selvagem CC foi associado a uma menor sobrevida quando comparado com o alelo mutado não-CC, demonstrando-se que o genótipo homozigoto selvagem CC pode influenciar o risco de mortalidade em pacientes infectados pelo HIV sob uso de terapia antiviral. O efeito pode ser relacionado com o aumento da viremia plasmática de HIV e a reconstituição imunológica alterada, possivelmente associada com a expressão de Interferon λ (9).

Em relação ao vírus da Hepatite B (HBV), estudos demonstraram que o alelo mutado em homozigoze T na posição rs12979680 do cromossomo 19 pode aumentar o risco de infecção pelo HBV na população chinesa e na população não asiática, em um modelo de genética aditiva. Não há associação entre os alelos da posição rs8099917 do cromossomo 19 e infecção pelo HBV em população chinesa e população asiática (13). Também associaram os polimorfismos genéticos à resposta ao tratamento para HBV (11), contudo, o polimorfismo não foi associado ao desfecho para doença (10).

Por outro lado, a maioria das infecções por HPV regride espontaneamente, e apenas uma pequena proporção de mulheres tem infecções persistentes que levam à malignidade. Isto sugere que existam interpolações entre a infecção por HPV e outros cofatores, certamente, durante o processo de carcinogênese do colo do útero, o que contribui sinergicamente para a susceptibilidade diferencial de um indivíduo para a malignidade.

Sem dúvida, fatores genéticos do hospedeiro representam um elemento importante envolvido em uma interação sinérgica, e as evidências acumuladas sugerem que polimorfismos em genes relacionados com a apoptosedesempenhamum papel importante na susceptibilidade genética para o câncer do colo do útero (14). Outro estudo mostrou forte correlação entre a expressão de HLA-C genótipo homozigoto selvagem CC na posição rs9264942 do cromossomo 6, sugerindo-se uma importante via imunogenética de controle de casos de desenvolvimento de cânceres associados a esse agente viral (15).

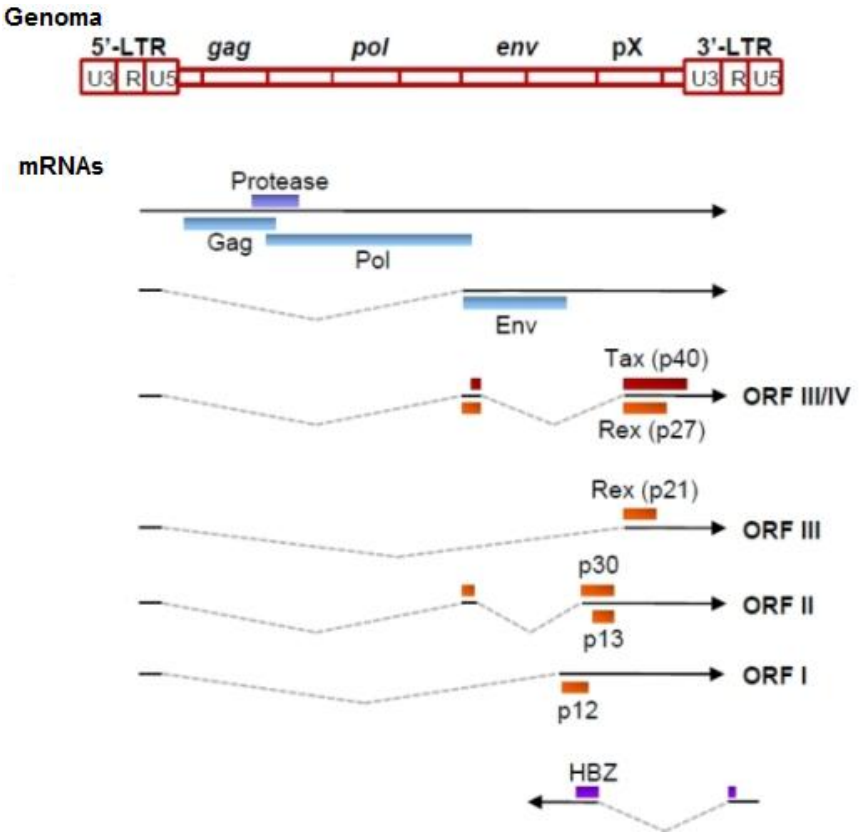
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO HTLV

O foco do presente estudo é o HTLV-1, que foi o primeiro retrovírus humano oncogênico causador de doença infecciosa (25). Pouco tempo depois, outro subtipo de HTLV, o HTLV-2, foi descrito em um tipo diferente de leucemia de células T(26), cujo papel na oncogênese continua a ser estabelecido (27). Mais recentemente, infecções com dois outros vírus relacionados, HTLV-3 e HTLV-4, foram relatados em alguns indivíduos na África Subsaariana, aparentemente, resultado de infecção zoonótica de primatas locais (28). A detecção da infecção pelo HTLV só foi possível a partir de 1983, quando foram introduzidos testes sorológicos para a avaliação da disseminação viral (29). No Brasil, estes testes foram introduzidos a partir de 1993 em todos os bancos de sangue (30).

Estima-se que de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo estejaminfectadas pelo HTLV-1 (31-33), todavia, a maioria delas permanece assintomática. Apesar da infecção pelo HTLV-1 ocorrer em diversas partes do 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 como observado na Bahia (34).

1.2 ESTRUTUTA VIRAL

O HTLV-1 é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, e subfamília *Orthoretrovirinae*, subfamílias 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 (26).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 , Rex, HBZ e as proteínas acessórias p12, p13 e p30, importantes para a infectividade viral, proliferação e imortalização das células e, ainda, podem ter influência sobre a patogênese (35-37) (Figura 2).



Adaptado:Qu, G, 2011 (38).

Figura 2- Representação esquemática do genoma do HTLV-1

1.3 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA

Apesar do HTLV-1 ter baixa morbidade, alguns indivíduos podem apresentar formas mais atenuadas ou incompletas da HAM/TSP (39).A HAM/TSP é definida como uma doença crônica que provoca a desmielinização progressiva na medula espinal, usualmente de início insidioso, que acomete de 1 a 2% dos portadores de HTLV-1. Está associada a um grau variável de disfunções esfincterianas e sensitivas, que afeta mais mulheres do que homens, geralmente na quarta e na quinta década de vida (40, 41). Estima-se que dez (exatamente 0,96%) de 1000 pacientes podem desenvolver HAM/TSP, após décadas de infecção e com idade de, aproximadamente, 43 anos (42, 43).

Muitos fatores têm sido estudados até momento, mas nenhum de fato se mostrou adequado para predizer esse desenvolvimento.

Deste modo, a interação entre vírus e hospedeiro é objeto de várias discussões nas últimas décadas, destacando-se fatores imunológicos do hospedeiro como principais desencadeadores no processo imunopatológico para HAM/TSP (44). Porém, os eventos imunológicos promovidos pelo HTLV-1 não estão bem esclarecidos. Acredita-se que a resposta celular desencadeada pelas células T $CD8^{+}$possa ser crucial para a progressão à HAM/TSP (45, 46).

A HAM/TSP é potencialmente considerada uma doença imune mediada, principalmente devido ao aumento decitocinas equimiocinas, em que se destaca pela elevação dos níveis de IFN-γ (47). Com isso, o acúmulo desses elementos na barreira hematocefálica induz danos na bainha de mielina, inicialmente uma leve inflamação e, ao longo dos anos, proporciona lesões irreversíveis, incluindo-se alterações mais sutis em torno de 30% dos indivíduos considerados inicialmente como assintomáticos (39).

A terapia com corticosteróides, preconizada por alguns grupos, tem sido utilizada para amenizar os sintomas da mielopatia, especialmente entre os pacientes em estágio inicial de doença, quando a inflamação é mais proeminente (48). Um dos possíveis mecanismos da terapia com corticosteróides é a diminuição da ativação celular, em especial as células T CD8+, que podem levar ao declínio da carga proviral de HTLV-1 (49).

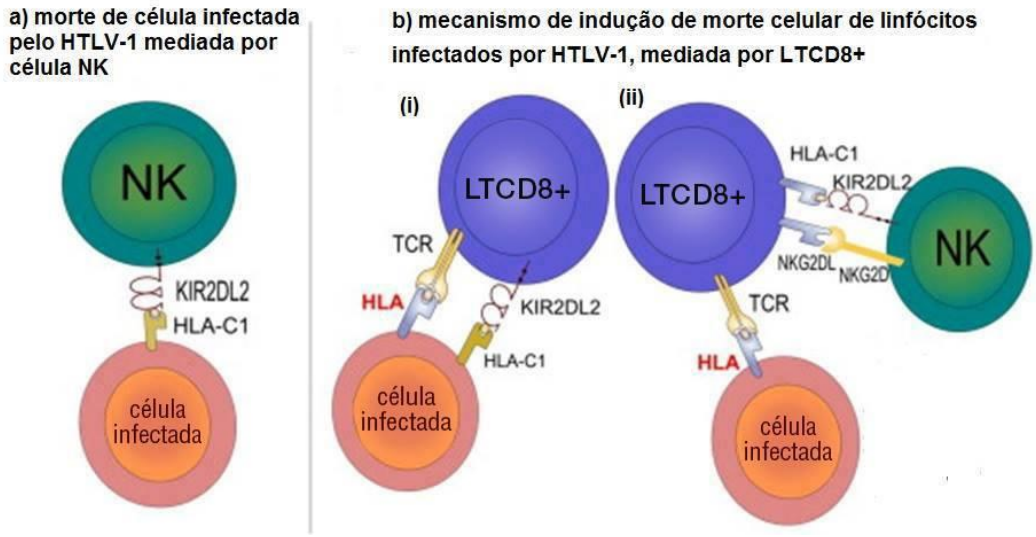
1.3 INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO

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 muito relevância. Por exemplo, indivíduos com HLA (antígeno leucocitário humano)classeItem maior susceptibilidade de evoluir para a doença que outros tipos de HLA(50), assim como citocinasinflamatórias como o IFN lambda, interlucina 15 (IL-15) e fator de necrose tumoral (TNF-α) (51).

Além da possibilidade do polimorfismo de citocinas, outros fatores genéticos podem estar implicados na patogênese da mielopatia. Entre vários genes que poderiam estar relacionados, destaca-se o HLA e os receptores do tipo imunoglobulina de células *Natural Killer* (KIR). Esses genes possuem *loci* altamente polimórficos, que interagem entre si, porém seus SNPs e principais variantes ainda não foram identificados. Moléculas de HLA-C, ligantes para receptores *KIR2DL*, possuem um dimorfismo funcional relevante para determinar a especificidade KIR. Como exemplo, cita-se o grupo de alelos do *HLA-C 1* (*HLA-C1*), identificado por Ser77/Asp80 de domínio alfa 1, que são ligantes para os inibidores de *KIR2DL2 e KIR2DL3* e a ativação de *KIR2DS2 (52)*. Enquanto, os alelos do HLA-C grupo 2 (*HLA-C2*), identificados por Asp77/Lys80, são reconhecidos pelo *KIR2DL1* tendo ação inibitória e ativando *KIR2DS1(52)*. Por sua vez, o *KIR2DL3* e o seu ligante, *HLA-C1* tem sido associado com um aumento da probabilidade de resposta virológica sustentada ao tratamento do HCV induzida pelo tratamento com interferon peguilado alfa e ribavirina (53-55). Essa associação pode ser atribuída à diferença de células *Natural Killer* (NK) e a ativação da função celular no contexto da mesma interação KIR/HLA (56, 57).

Deste modo, um modelo do mecanismo de inibição do KIR associado ao HLA foi proposto, atribuindo-se a associação típicas entre KIR-HLA, ativando-se diretamente as células NK (58), demonstrado na figura 3.

Entretanto, outro estudo observou que o *KIR2DL2* não tem impacto sobre a carga proviral ou a HAM/TSP (59), porém o efeito protetor de peptídeos de HBZ poderia estar envolvido nessa interação (figura 3 a). Por ouro lado, existe uma associação entre os receptores inibitórios de KIR e os LTCD8+, desencadeando uma redução de ativação morte celular e proteção por exaustão (figura 3 a(i)), outra hipótese seria que os receptores inibitórios de KIR poderiam atuar sobre as células reduzindo a morte de células NK ativadas (figura 3 b (ii)) (58).



Adaptado : Cook, L. B., et al, 2013 (58)

Figura 3- Mecanismo de interação entre o receptor de *KIR2DL2* e as células NK na resposta imune celular contra células infectadas pelo HTLV-1

Entre outros fatores genéticos, os mais bem estudados têm sido os haplótipos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) classe 1 (*HLA-A, HLA-B, HLA-C*) do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que codificam para glicoproteínas expressas na superfície de quase todas as células nucleadas, e cuja maior função é a apresentação de peptídeos antigênicos a linfócitos TCD8. A eficácia da resposta imune específica para HTLV-1, especialmente a resposta de linfócitos T citóxicos (CTL) CD8+, tem sido demonstrada como sendo a chave para controlar a carga proviral do HTLV-1 (60). A evidência mais convincente de um papel protetor de CTLs do hospedeiro surgiu da observação, em uma população no sul do Japão, de que a presença de um dos dois genes HLA de classe 1, *HLA-A*02* ou *HLA-Cw*08*, esteve associada com uma carga proviral mais baixa e menor prevalência de HAM/TSP (50, 61).

Alguns alelos HLA específicos têm sido associados à proteção, enquanto outros foram correlacionados com risco aumentado de

desenvolvimento de HAM/TSP. Os genes das moléculas MHC Classe 2 (*HLA-DR, HLA-DP,* e*HLA-DQ*) codificam para glicoproteínas expressas em células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), sendo sua principal função a apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos TCD4+ (auxiliares).

Vale ressaltar que podem ocorrer diferenças na frequência de alelos HLA em diferentes populações e variações no efeito protetor de certos alelos HLA de acordo com a etnia (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos níveis de susceptibilidade/proteção para HAM/TSP associadosaos alelos HLA.

Alelos HLA	Japoneses	Brasileiros	Iranianos	Espanhóis	Afro-Caribenhos (Martinica)	Afro-Caribenhos (Londres)	Jamaicanos
A*02	***	**	--	--	--	***	--
Cw*08	***	--	--	--			
A*24	↓↓		--		--		
B*07	↓↓	↓	--	↓↓	--		--
B*5401	↓↓	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
DRB1*0101	↓	--	↓	↓↓	--		--
DRB1*11	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	--	--

*** efeito protetor; ** tendência a efeito protetor; ↓↓ susceptibilidade; ↓ susceptibilidade apenas em HLA-A*02-negativos; -- sem efeito associado; ⊘ HLA não prevalente. HLA= antígeno leucocitário humano.

O resultado de efeito protetor para *HLA-A*02* na HAM/TSP visto em japoneses foi relatado em uma pequena amostra de 29 indivíduos de Londres, dos quais 27 eram de origem caribenha e dois caucasianos (61), todavia, no Brasil também observado (62, 63). Por lado, em outras populações, tais como indivíduos afro-caribenhos oriundos da Martinica (64), jamaicanos (65), espanhóis (66) ou iranianos (67, 68) não foram encontradas associações.

Ao contrário da expressão de *HLA-A*02* e *HLA-Cw*08*, que estava associada a um efeito protetor, observou-se que *HLA-DRB1*0101* e *HLA-B*5401* apresentavam associação com um aumento na susceptibilidade para HAM/TSP (50, 61).Para o *HLA-DRB1*0101*, no entanto, a associação com a susceptibilidade à doença torna-se evidente na ausência do efeito protetor de *HLA-A*02* (61), enquanto *HLA-B*5401* esteve independentemente associado à susceptibilidade para a doença e, entre indivíduos com HAM/TSP, foi

associado com um aumento significativo na carga proviral (61). *HLA-22, HLA-Cw82* e *HLA-DR1* também estiveram, em população no sul do Japão, associados a risco mais elevado para HAM/TSP (69). No Irã, além de *HLA-A*02*, também *HLA-Cw*08* e *HLA-A*24* não estiveram associados a menor risco de HAM/TSP ou carga proviral mais baixa(67, 70).

No Brasil, *HLA-Cw*08* não apresentou efeito protetor e *HLA-B*07* apresentou susceptibilidade para HAM/TSP apenas em pacientes negativos para *HLA-A*02*(63). Em outros países, como a Espanha, não foi encontrada associação entre a presença de alelos protetores (*HLA-A*02* e/ou *HLA-Cw08*) e HAM/TSP ou diferenças significativas na carga proviral do HTLV-1 quando comparados indivíduos com ou sem estes alelos; no entanto, HAM/TSP foi significativamente associada *HLA-B*07* e *HLA-DRB1*0101*(66). O alelo *HLA-B*5401* não foi encontrado nas populações destes países (Tabela 1), pois é visto quase exclusivamente em indivíduos do leste asiático(71).

Entre os alelos associados a risco, o *HLA-DRB1*0101* também esteve associado com susceptibilidade para HAM/TSP na população do Irã e, assim como entre os japoneses, esse efeito foi observado apenas em indivíduos *HLA-A*02* negativos, não ocorrendo em indivíduos *HLA-A*02*-positivos (67). A associação de *HLA-DR*11* com HAM/TSP, previamente descrita em pacientes japoneses, foi observada no Brasil apenas (62) além do *HLA-Cw*07* correlacionado a HAM/TSP somente na ausência de *HLA-A*02*(63).

Vale ressaltar que a resposta imune parece ser um fator crucial na patogênese da HAM/TSP. Por exemplo, o estudo mostrou que os pacientes com HAM/TSP apresentaram maiores níveis de IFN-gama em comparação com pacientes assintomáticos(47). Além disso, o perfil do polimorfismo no SNP rs12979860 do cromossomo 19 induz a produção de IFN-lamba 3, e uma resposta imune a infecção por HTLV-1, levando a um dano neuronal na medula espinhal (1, 72).

Além de características genéticas, como alguns haplótipos de HLA, descritas anteriormente como envolvidas na patogênese da HAM/TSP (50), fatores pró-inflamatórios (49) desempenham importante papel nessa patogênese. Neste sentido, os polimorfismos na *IFN-λ4* são influenciados pela

ascendência genética. Da mesma forma, entre os pacientes crônicos do HCV, aqueles que carregavam o alelo mutado em homozigoze G no rs8099917 do cromossomo 19, tiveram menor expressão de RNA mensageiro de *IFN-λ4* nas células mononucleares (21).

Como foi relatado recentemente, genes estimulados por interferons, provavelmente regulam a expressão de citocinas que pode ser diferente no tecido infectado e, ainda, entre os tipos de células dentro do fígado e da medula espinal (73). Sabe-se que o*IFN-λ4* 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, que leva a um efeito semelhante ao protetor e menores interações entre inibitórios KIR e HLA-C (74). Assim, a *IFN-λ4* 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 patogênese da HAM/TSP.

Supõe-se que os polimorfismos nos genes da *IFN-λ4*, KIR e HLA-C, possam desencadear uma cascata antiviral por meio da via JAK-STAT. Desse modo pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da HAM/TSP, devido, à sua semelhança com outras doenças imunomediadas como, por exemplo, a Hepatite C (54, 75). Em estudo anterior, demonstrou-se que existe uma associação entre um polimorfismo da *IFN-λ4* (na posição rs8099917 do cromossomo 19), especificamente no alelo mutado em homozigoze GG, aumentando-se em sete vezes o risco de desenvolver HAM / TSP(16). Entretanto, ainda não está claro que esse polimorfismo, por si só, pode desencadear o desenvolvimento de HAM/TSP.

Alguns parâmetros, como elevada carga proviral de HTLV-1(76), a constante linfoproliferação espontânea *in vitro (77)*, aumento das células T $CD8^+$ específicos e altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1, tanto no soro quanto no liquor (78), parecem também associados com à presença da HAM/TSP (79, 80). Esses marcadores são utilizados por muitos pesquisadores para a avaliação da evolução clínica dos pacientes infectados ao longo do tempo. A princípio, acreditava-se que células T $CD4^+$ do sangue periférico

representavam o alvo primário para a infecção pelo HTLV-1. Atualmente, sabe-se que outras populações celulares também são susceptíveis à infecção pelo HTLV-1, como as células NK por exemplo (81).

Neste contexto, estas células proliferam espontaneamente e expressam várias citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão que poderiam favorecer a migração direcionada dos linfócitos T $CD4^+$ infectados, do sangue periférico para o sistema nervoso central (SNC) (82, 83). Outros fatores também podem estar contribuindo com a desmielinização da HAM/TSP,como a expressão viral, a desregulação da expressão de citocinas, a produção de anticorpos específicos anti-HTLV-1 e infiltração de linfócitos T $CD8^+$citotóxicos (CTL) e macrófagos ativados no SNC(84). Estudos prévios demonstraram uma correlação entre carga proviral de HTLV-1 e a frequência de linfócitos T $CD8^+$, efetores e de memória específicos anti-Tax em pacientes com HAM/TSP. Esses dados sugeriram que a resposta mediada por CTLsTax específicas estaria ligada diretamente aos níveis de carga proviral (76).

As células T $CD8^+$ apresentam reservatório celular adicional para o HTLV-1 "*in vivo".* Além disso, por meio da citometria de fluxo, mostrou-se que os linfócitos T $CD8^+$ são células que, predominantemente, se expandem durante a estimulação espontânea *in vitro* (85). Issosugere que a resposta mediada pelas CTLs específicas não seria o único evento responsável pela alta carga proviral, sendo que a expansão celular poderia serum fator importante na contribuição da elevação da carga proviral no sangue periférico e no SNC durante a doença neurológica.

Em um modelo proposto, o evento inicial da progressão da HAM/TSP teria a participação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1b, IL-6, INF-γ, TNF-α, e IL-15. Essas citocinas produzidas por células T, macrófagos e microglias ativadas, seriam de grande importância na desmielinização neuronal (82). Assim, embora a maioria dos trabalhos sugira que o estabelecimento de um padrão de resposta imune citotóxica esteja associado ao desenvolvimento da HAM/TSP, outros autores sugerem que mecanismos inerentes à imunidade humoral também podem estar na patogênese da HAM/TSP (86). Deste modo, a ativação persistente de elementos da resposta imune, tais como a

estimulação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, a expressão de moléculas de adesão e receptores na superfície de linfócitos, monócitos e a produção de fatores solúveis como citocinas e quimiocinas, favorecem a migração direcionada de células infectadas ou não para o sistema nervoso central (87).

Apesar da complexidade, o entendimento das interações hospedeiro *versus* HTLV-1 é de fundamental importância para avaliar prognóstico clínico dos portadores assintomáticos, visto que as atuais opções de diagnósticos e tratamento não são adequadas, até o momento, para determinar o risco de progressão para HAM/TSP (48).

Até hodiernamente, poucos marcadores têm sido avaliados na prática clínica, geralmente por isolados grupos de pesquisadores, com resultados contraditórios, eelevado custo. A carga proviral, ainda, é utilizada como principal marcador relacionado ao vírus, que indica uma correlação com a HAM/TSP e tempo de progressão de doença (88, 89). Por sua vez, a linfoproliferação (90) indica a ativação do sistema imune, principalmente em dermatites pelo HTLV-1, mas apresenta questões de complexidade de sua realização e uso de materiais radioativos, o que dificulta a realização deste ensaio em laboratórios de rotina, e em larga escala. Outro ponto fundamental e pouco explorado seriaa avaliação de alguns fatores genéticos do hospedeiro, que poderiam identificar pontos importantes na interação HTLV-1 e o hospedeiro. Assim, este trabalho visa estabelecer conexões entre algumas áreas do conhecimento, que possam ter interligação ente os fatores virais, imunológicos e genéticos, que poderiam contribuir para a elucidação da patogênese da HAM/TSP.

2 OBJETIVO

Estudar a associação entre alguns marcadores virais, genéticos e imunológicos relacionados ao desenvolvimento de HAM/TSP em pacientes infectados por HTLV-1.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Definir o perfil de distribuição de polimorfismo de IFN-λ4, KIR e HLA-C em indivíduos infectados por HTLV-1;
b) Investigar a associação entre o desfecho para HAM/TSP e os polimorfismos de genes de *IFN-λ4*, KIR e HLA-C.
c) Avaliação da carga proviral do HTLV-1, linfoproliferação e perfil dos polimorfismos genéticos e sua correlação como marcadores de prognóstico para HAM/TSP.

3 MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ALVO

Os voluntários foram recrutados a partir do ambulatório de HTLV do Instituto de infectologia "Emílio Ribas" (IIER). No período de junho de 1997 até junho de 2016, 674 indivíduos foram confirmados infectados por HTLV-1 e compuseram a coorte de HTLV-1 do IIER, sendo 498 assintomáticos e 149 com HAM/TSP. Um total de 247 voluntários portadores de HTLV-1 foi recrutado para este estudo, no período de janeiro de 2014 à junho de 2016.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo nº 2012/133 (anexo B), e do Instituto de Infectologia “Emilio Ribas” nº 13/2011 (anexo C) e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo nº 356/12 (anexo D).

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados indivíduos adultos com idade superior a 18 anos, positivospara HTLV- 1 em acompanhamento regular no ambulatório.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Excluiu-se os voluntários que possuem mielopatias não relacionadas ao HTLV-1, iletrados e/ou incapacitados por distúrbios mentais para compreender o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), mulheres grávidas, portadores de outras coinfecções virais (HIV e HBV).

3.5 GRUPOS ESTUDADOS

Os participantes foram classificados de acordo com o seu o grau de incapacidade neurológica, determinada por um ou mais neurologistas, cegos para o status de HTLV. Após isso,o cálculo amostral foi realizado, indicando um número de 200 voluntários para um IC 95%. Foram selecionados por conveniência um total de 247 voluntários, divididos em dois grupos:

- Grupo 1: 160 indivíduos assintomáticos; e

- Grupo 2:87 pacientes com HAM/TSP.

3.6 ALGORITMO LABORATORIAL

Os testes sorológicos para triagem dos casos positivos para HTLV foram realizados no laboratório clínico no Instituto de infectologia Emilio Ribas, no setor de imunologia, utilizando o teste GOLD ELISA HTLV-1/2® (Teste imunoenzimático), e o teste de para *Western Blot* (WB) da *MP Diagnostics*, HTLV Blot 2.4®, conforme as instruções dos respectivos fabricantes. As amostras, após a confirmação por WB, foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) no Instituto de Medicina Tropical, onde a reação da cadeia de polimerase qualitativo (*Nested* PCR) foi 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) (91)

Após a confirmação, foram realizadas as coletas de material biológico para o estudo pela equipe do laboratório clínico do IIER, e encaminhado ao LIM-56, onde foram realizados os ensaios laboratoriais. A padronização das técnicas de genotipagem de KIR foi realizada no laboratório do *Blood System Research Institute* em *San Francisco,* Califórnia (EUA).

3.6.1 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 –80ºC para o processamento posterior da triagem sorológica e testes confirmatórios. As células mononucleares foram obtidas pela separação do gradiente de concentração de *Ficoll-Hypaque* (*Sigma Chemicals, St Louis, MO*) e ficaram estocadas à –80º C para a realização de testes moleculares.

3.6.2Extração 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* por –80ºC.

3.6.3 Carga Proviral para HTLV-1

A carga proviral de HTLV-1 (PVL) foi quantificada utilizando a técnica de PCR em tempo real, usando iniciadores e sondas do gene da *pol* do vírus HTLV-1, que são os seguintes: SK110, SK111 e a sonda *TaqMan* interna para HTLV-1 (tabela 2).

A albumina humana foi utilizada como controle endógeno para normalizar a variação entre as diferenças na contagem de células mononucleares e durante a extração do DNA da amostra. Para esta quantificação, usou-se os iniciadores Alb-S,Alb-AS e a sonda de albumina Taq Man (92, 93), as sequências de todos os primes e sondas estão descritos na tabela 2.

Para um volume final da reação de 25-µl, um Mix de PCR para HTLV-1 ou DNA para albumina consistindo em 5µl DNA extraído, foram usados, iniciadores SK110 e SK11 ou Alb-S e Alb-AS (10nM de cada), 10 nM sonda para HTLV-1 e a mesma quantidade de sonda de albumina. Utilizou-se o máster mix TaqMan® Universal II (*AppliedBiosystems®, Foster City, CA, USA*). Para ambos, a amplificação foi realizada da seguinte forma: após um ciclo de 50ºC por dois minutos e um ciclo de 95ºC por 10 minutos. Tem-se um segundo bloco de amplificação, consistindo-se de 45 ciclos de repetição da seguinte forma: 15 segundos a 95ºC e um minuto a 60ºC. Para isso, utilizou-se o equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (*AppliedBiosystems®, Foster City, CA, EUA*).

Este protocolo possui um limite de detecção de cinco cópias de provírus em 10^4 células mononucleares. O número final de cópias foi estimado

pela interpolarização de um plasmídeo, utilizando-se 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 duplicatas. Os resultados foram expressos como quantidade de cópias de HTLV-1 DNA/10^4 PBMCs (92, 93).

Tabela 2- Sondas e iniciadores usados na quantificação da carga proviral de HTLV-1

Nome	**Sequências (5'- 3')**
Pol SK110	5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3'
Pol SK111	5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3'
Pol - HTLV-1Probe	5'-CTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3'
Alb-S	5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'
Alb-AS	5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3'
Albumina TaqMan	5'-FAMCCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCCTAMRA-3'

3.6.4 Ensaio de proliferação de células T

Para o ensaio de proliferação de células T (LPA), as células mononucleares de cada indivíduo foram cultivadas com meio RPMI enriquecido com soro AB (basal) e adição do mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Com a finalidade de avaliar a produção espontânea de citocinas, cada ensaio foi realizado em triplicata e acompanhado de cultura sem mitógeno (estímulo espontâneo), recebendo apenas meio de cultura enriquecido(94).Após 24 horas, a contagem celular foi realizada no equipamento MicroBetaTrilux 1450 (*Perkin Elmer*), a unidade foi expressa em contagem por minutos (CPM).

3.6.5 Genotipagem de *IFN-λ4*, HLA-C e KIR

A identificação da *IFN-λ4* (os SNPs nas posições rs12979860 e rs8099917 do cromossomo 19) e HLA-C (SNP na posição rs9264942 do cromossomo 6) foi realizada utilizando o sistema *TaqMan SNP Genotyping Assay*, seguindo as instruções do fabricante (*AppliedBiosystems, Foster City, EUA*)(15, 95). Já os polimorfismos do KIR (*KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2 e KIR2DS3*), o protocolo foi adaptado para utilização da técnica de PCR em

tempo real (qPCR), utilizando o sistema *SYBR Green* e *TaqMan*. As sequências de iniciadores descritos anteriormente, estão em destaque na tabela 3 (96, 97). 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.

Tabela 3- Lista de *iniciadores* e sonda do polimorfismo do KIR

Nome	**Sequências (5' – 3')**	**Metodologia**
KIR2DL2F53	AGG GGG AGG CCC ATG AAT	SYBR Green
KIR2DL2R85	AGT GGG TCA CTC GAG TTT GAC C	SYBR Green
KIR2DS2F66	TTC TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	SYBR Green
KIR2DS2R67	GAT GAC GAT GTC CAG AGG GT	SYBR Green
KIR2DS3F68	TCC TAT GAC ATG TAC CAT CTA TCC AC	SYBR Green
KIR2DS3R69	GAA GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	SYBR Green
KIR2DL3R	GCA GGA GAC AAC TTT GGA TCA	TaqMan
KIR2DL3F	CCC TCA GGA GGT GAC ATA TG	TaqMan
KIR2DL3P	FAM-AGA GGC CCA AGA CAC CCC CAA CAG A-BHQ1	TaqMan

3.6.6 Controle de Qualidade dos Dados

A coleta de dados foi realizada pelo pesquisador principal com auxílio dos residentes e médicos do ambulatório de HTLV do Instituto de Infectologia "Emilio Ribas". 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 foram tabulados no banco de dados eletrônico RedCap (98).

3.6.7 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 foi utilizado o teste t para os que tiveram distribuição normal. Os gráficos foram realizados no software *GraphPad Software 5.0 (La Jolla, CA, EUA)*, utilizando o teste t para comparar os grupos. Utilizou-se 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),na análise univariada foram incluídas no modelo multivariado de regressão logística. Para realizar estes testes, utilizou-se o software *STATA 11 (StataCorp. 2009. Stata: Release11. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP, TX, EUA)*.

4 RESULTADOS

No período de junho de 1997 até junho de 2016, 674 indivíduos foram confirmados infectados por HTLV-1 e compuseram a coorte de HTLV-1 do IIER, sendo 498 assintomáticos e 149 com HAM/TSP. No total, 247 voluntários portadores de HTLV-1 foram recrutados para este estudo no período de janeiro de 2014 a junho de 2016. Os voluntários foram classificados em dois grupos, segundo seu quadro clínico, sendo o primeiro grupo composto por 160 voluntários assintomáticos, com idade média de 53 anos; 61,9% destes eram mulheres, que se autorrelatavam brancos na sua maioria (tabela 4). O segundo grupo foi composto por 87 voluntários com HAM/TSP, de idade média de 59 anos, na maioria do sexo feminino (63,3%) e 59,04% se autorreferiram ser brancos (tabela 4).

Na tabela 4, mostram-se os resultados demográficos de importância neste estudo. Pode-se notar uma predominância do gênero feminino, (2/3) nos dois grupos, porém,tal dado não teve significância estatística (p=0,835). Os pacientes com HAM/TSP apresentaram idade em média maior que os assintomáticos, sugerindo que a idade aumenta em 3,7% o risco para desenvolver HAM/TSP a cada ano (p=0,001). A etnia foi avaliada segundo os critérios do IBGE, onde os indivíduos autorrelatam sua cor de pele. Apesar do predomínio de brancos, não houve diferença significativa entre os dois grupos avaliados.

Tabela 4- Análise univariada das variáveis sócio-demográficas dos voluntários portadores de HTLV-1

Variáveis	Total N(%)	AssintomáticosN(%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%CI)	Valor de p
Gênero	247 (100)	160 (100)	87 (100)	0,94 (0,55 – 1,62)	0,835
Masculino	93 (37,7)	61 (38,1)	32 (36,8)		
Feminino	154 (62,3)	99 (61,9)	55 (63,3)		
Idade **Media (±DP)**	54 (±13,91)	53 (±14,32)	59 (±12,12)	**1,037 (1,0155 - 1,059)**	**0,001**
Etnia*	235 (100) *	151 (100)	83 (100)		0,835
Brancos	131 (55,6)	82 (54,3)	49 (59,04)		
Negros	85 (36,1)	62 (41)	33 (39,76)	0,901 (0,519 - 1,563)	0,712
Asiáticos	8 (3,3)	7 (4,6)	1 (1,2)	0,24 (0,028 - 2,025)	0,191

*Etnia : 13 voluntários não relataram sua cor de pele

Os dados laboratoriais estão descritos na tabela 5, onde se pode observar que a contagem basal de linfoproliferação foi mais elevada no grupo HAM/TSP (p=0,0001), como era esperado. A cada mil células divididas aumenta o risco para HAM/TSP em torno de 0,5%. Por sua vez, a carga proviral de HTLV-1 não foi um marcador importante para HAM/TSP (p=0,196).

Em relação aos marcadores genéticos avaliados, observa-se um diferente cenário: a *IFN-λ4* no SNP da posição rs12979860 do cromossomo não apresentou correlação com o desfecho. Ao contrário, o SNP da posição rs8099917 do cromossomo foi associado ao desfecho no alelo mutado em homozigoze GG (p=0,032). Tanto os polimorfismos no HLA-C e os marcadores de KIR, não foram associados nem para risco nem proteção a HAM/TSP.

Tabela 5- Análise univariada das variáveis laboratoriais dos voluntários portadores de HTLV-1

Variáveis	Total N(%)	Assintomáticos N(%)	HAM/TSP N(%)	OR (95%IC)	Valor de p
Linfoproliferação **Média (±DP)**	10302 (±11446)	**7826 (±8524)**	**14595 (±14318)**	**1,000055 (1,000027 - 1,000084)**	**0,0001**
CargaProviral de HTLV-1 **(nº de cópias/10^4 PBMC)**	246 (100)	160 (100)	87 (100)	1,54 (0,80 – 2,95)	0,196
≤200	201 (81,7)	134 (83,8)	67 (67,8)		
>200	46 (18,3)	26 (16,2)	20 (32,2)		
IFN-λ4					
rs12979860	**247 (100)**	**160 (100)**	**87 (100)**		
CC	97 (39,3)	69 (43,2)	28 (32,2)	1,00	
CT	118 (47,8)	74 (46,2)	44 (50,6)	1,46 (0,82 – 2,61)	0,194
TT	32 (12,9)	17 (10,6)	15 (17,2)	2,17 (0,96 – 4,94)	0,064
rs8099917	**245 (100)**	**159 (100)**	**86 (100)**		
TT	160 (65,31)	105 (67,04)	55 (63,95)	1,00	
GT	67 (27,34)	47 (29,56)	20 (23,25)	0,81 (0,43 – 1,51)	0,509
GG	18 (7,35)	**7 (4,40)**	**11 (12,8)**	**3 (1,1011 – 8,1729)**	**0,032**
HLA-C					
rs9264942	**241 (100)**	**154 (100)**	**87 (100)**		
TT	99 (41,1)	69 (44,8)	30 (34,5)	1,00	
CT	102 (42,3)	60 (38,9)	42 (48,3)	1,61 (0,89 – 2,8)	0,109
TT	40 (17,6)	25 (16,3)	15 (17,2)	1,38 (0,63 – 2,98)	0,82
KIR					
KIR2DL2	**245 (100)**	**158 (100)**	**87 (100)**	1,09 (0,58 – 2,05)	0,778
Positivo	189(77,14)	121 (76,6)	68 (78,2)		
Negativo	56 (22,86)	37(23,4)	19 (21,8)		
KIR2DL3	**244 (100)**	**157 (100)**	84 (100)	1,65 (0,83 – 3,25)	0,147
Positivo	188 (77,05)	118 (75,2)	70 (83,3)		
Negativo	53 (22,96)	39 (24,8)	14 (16,7)		
KIR2DS2	**246 (100)**	**159 (100)**	87(100)	1,69 (0,98 – 2,91)	0,055
Positivo	141 (57,32)	84 (52,8)	57 (65,5)		
Negativo	105 (42,68)	75 (47,2)	30 (34,5)		
KIR2DS3	**240 (100)**	**153 (100)**	87 (100)	0,75 (0,44 – 1,28)	0,297
Positivo	110 (45,83)	74 (48,4)	36 (41,1)		
Negativo	130 (54,17)	79 (51,6)	51 (58,6)		

No modelo multivariado, entraram todas as variáveis que apresentaram p<0,2 na análise univariada descrita nas tabelas 4 e 5. A idade foi avaliada de modo contínuo, e foi associada à HAM/TSP (p=0,019),ou seja, os indivíduos de maior idade apresentaram maior risco para de desenvolvimento da doença.

Outro dado importante que se pode destacar foi a linfoproliferação basal, que se manteve fortemente associada ao desfecho, mostrando que um pequeno aumento pode elevar o risco para doença (OR=1,000047). Por sua vez, os marcadores genéticos,assim como o gênero, apesar de serem usados no modelo, não foram associados ao desfecho.

Tabela 6-Análise multivariada das variáveis associadas a HAM/TSP

Variáveis	***OR (95% IC)***	***Valor de p***
Idade (continua)	**1,028 (1,0044 – 1,0520)**	**0,019**
Gênero feminino	0,85 (0,426 – 1,72)	0,664
Carga Proviral de HTLV-1 (>200 cópias/10^4 PBMC)	1,23 (0,64 – 2,37)	0,524
LPA (continuo)	**1,000047 (1,000016 – 1,000079)**	**0,003**
IFN-λ4		
rs12979860		
CC	1,00	
CT	1,66 (0,80 – 3,43)	0,170
TT	1,84 (0,62 – 5,40)	0,267
rs8099917		
TT	1,00	
GT	0,51 (0,23 – 1,12)	0,097
GG	2,13 (0,67 – 6,70)	0,195
HLA-C		
rs9264942		
TT	1,00	
CT	1,57 (0,76 - 3,24)	0,220
TT	1,23 (0,48 – 3,12)	0,661
KIR		
KIR2DS2		
Positivo	1,00	
Negativo	1,44 (0,75 – 2,77)	0,263

Realizou-se uma análise, seguindo-se o modelo de alelos dominantes e recessivos dos polimorfismos da *IFN-λ4*e do HLA-C, em que se observou que no modelo dominanteque nenhuma das variáveis estudadas foram associadas ao desfecho para HAM/TSP (tabela 7).

Tabela 7-Análise univariadado modelo dominante dos polimorfismos de *IFN-λ4*e HLA-C associados à HAM/TSP

Polimorfismo	**Total N(%)**	**Assintomáticos N(%)**	**HAM/TSP N(%)**	**OR (95%CI)**	**Valor de p**
IFN-λ4					
rs12979860					
CC	97 (39)	69 (43,2)	28 (32,2)	1,00	
CT/TT	150 (61)	91 (56,8)	59 (67,8)	1,59 (0,92 – 2,76)	0,094
rs8099917					
TT	160 (65)	105 (66)	55 (63,9)	1,00	
GT/GG	85 (35)	54 (34)	31 (36,1)	1,09 (0,63 – 1,89)	0,33
HLA-C					
rs9264942					
TT	99 (41)	69 (44,8)	30 (34,5)	1,00	
CT/CC	142 (59)	85 (55,2)	57 (65,5)	1,54 (0,89 - 2,65)	0,119

Por outro lado, no modelo recessivo, o SNP da posição rs8099917 do cromossomo 19 foi associado como fator de proteção a HAM/TSP (p=0,021), dados apresentados na tabela 8, entretanto, os outros polimorfismos não foram associados ao desfecho.

Tabela 8-Análise univariadado modelo recessivo dos polimorfismos de IFN-λ4e HLA-C associados à HAM/TSP

Polimorfismo	**Total N(%)**	**Assintomáticos N(%)**	**HAM/TSP N(%)**	**OR (95%CI)**	**Valor de p**
IFN-λ4					
rs12979860					
TT	32 (13)	17 (10,6)	15 (17,2)	1,00	
CC/CT	215 (87)	143 (89,4)	72 (82,8)	0,57 (0,26 – 1,20)	0,143
rs8099917					
GG	18 (7,4)	7 (4,4)	11 (12,7)	1,00	
TT/GT	227 (92,6)	**152 (95,6)**	**75 (87,3)**	**0,31 (0,11 - 0,84)**	**0,021**
HLA-C					
rs9264942					
CC	40 (16,6)	25 (16,2)	15 (17,2)	1,00	
TT/CT	201 (83,4)	129 (83,8)	72 (82,8)	0,93 (0,46 – 1,87)	0,840

No modelo dominante, nenhuma variável foi associada no modelo multivariado ao desfecho, como era esperado. Entretanto, no modelo recessivo, observa-se associação ao desfecho no SNP da posição rs8099917 do cromossomo 19 (OR =0,31, IC =0,105 – 0,961), sendo um fator protetor relevante para HAM/TSP. As outras variáveis que foram associadas à HAM/TSP foram a LPA (p= 0,001) e a idade (p=0,027), mantendo-se como fatores de risco significantes para HAM/TSP.

Tabela 9- Análise multivariada no modelo recessivo dos polimorfismos de *IFNλ4*e HLA-C associados à HAM/TSP

Variáveis	***OR (95% IC)***	***Valor de p***
Idade (continua)	**1,026 (1,002 – 1,049)**	**0,027**
LPA (continuo)	**1,000054 (1,000025 – 1,000083)**	**0,001**
rs8099917		
GG	1,00	
TT/GT	**0,31 (0,105 – 0,961)**	**0,042**

A carga proviral do HTLV-1 é um importante marcador utilizado. Nográfico 1 (a), utilizando um modelo estatístico de variáveis contínuas, observa-se uma relação entre o grupo de assintomáticos e grupo de sintomáticos. Outro relevante marcador avaliado foi à contagem basal de

linfoproliferação, que mostrou uma forte associação entre o estado assintomático comparada ao desfecho para HAM/TSP (gráfico 1 b). O risco de doença se manteve elevado, possivelmente poderia ser considerado como o melhor marcador imunológico para HAM/TSP até o presente momento.

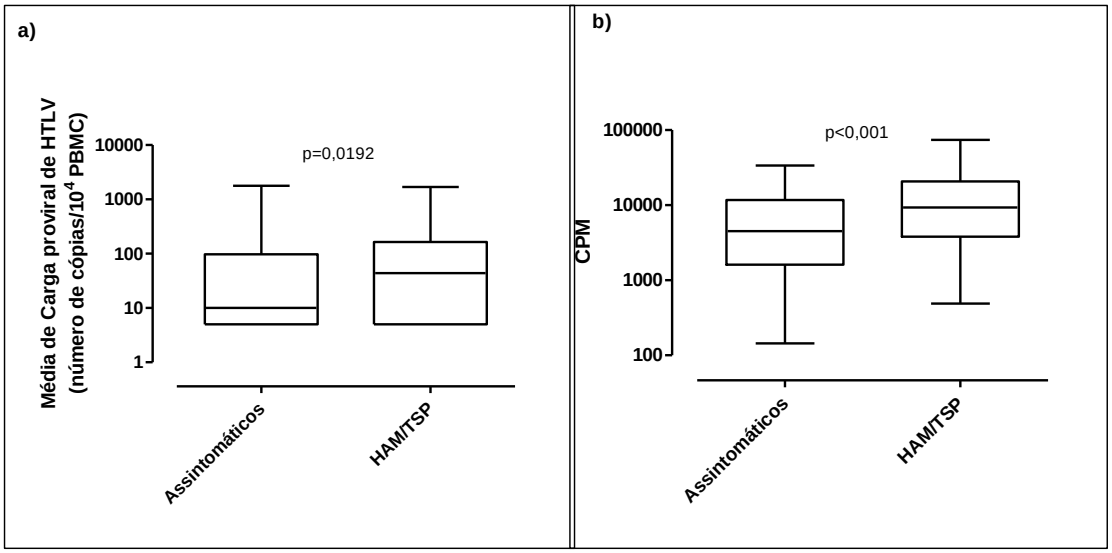


Gráfico 1- Marcadores virais e imunológicos de risco elevado para HAM/TSP

As Tabelas 10 e 11 apresentam as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de DNA nos voluntários avaliados. O equilíbrio de Hardy Weimberg foi calculado com intuito de avaliarmos se as frequências encontradas não estavam fora do esperado em uma população em panmixia (99). Verifica-se que todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio entre o grupo de indivíduos assintomáticos, não apresentando diferenças do valor esperado, estatisticamente significantes (Tabelas 10).

Tabela 10- Frequências alélicas e distribuição genotípica do no grupo de indivíduos assintomáticos

Frequências Genotípicas					Frequências Alélicas		
Genótipo	**Observado**	**Esperado**	χ^2	**p**	**Alelo**	**Observado**	**Frequência**
	n	**n**					
IFN-λ4							
rs12979860	**160**	160					
CC	69	70,33	0,19	0,66	C	106	0,663
CT	74	71,50			T	54	0,337
TT	17	18,17					
rs8099917	**159**	159					
TT	105	106,4	0,56	0,45	T	128,5	0,8182
GT	47	47,30			G	30,5	0,1818
GG	7	5,3					
HLA-C							
rs9264942	**154**	154					
CC	69	63,57	3,53	0,06	C	99	0,6425
CT	60	70,74			T	55	0,3575
TT	25	19,69					

Na tabela 11, verifica-se que os polimorfismos de *IFN-λ4* no SNP da posição rs12979860 no cromossomo 19 e do HLA-C no SNP na posição rs9264942 no cromossomo 6estavam em equilíbrio entre o grupo de indivíduos com HAM/TSP, não apresentando diferenças estatisticamente significantes. Todavia, o polimorfismo de *IFN-λ4* no SNP da posição rs8099917do cromossomo19 está em desequilíbrio (p=0,0006).

Tabela 11-Frequências alélicas e distribuição genotípica do no grupo de indivíduos com HAM/TSP.

Frequências Genotípicas					Frequências Alélicas		
Genótipo	**Observado**	**Esperado**	χ^2	**P**	**Alelo**	**Observado**	**Frequência**
	n	**n**					
IFN-λ4							
rs12979860	**87**	87					
CC	28	28,8	0,11	0,74	C	50	0,575
CT	44	42,5			T	37	0,425
TT	15	15,7					
rs8099917	**86**	86					
TT	55	49,15	**11,6**	**0,0006**	T	65	0,756
GT	20	31,7			G	21	0,244
GG	11	5,15					
HLA-C							
rs9264942	**87**	87					
CC	30	29,9	0,02	0,96	C	51	0,586
CT	42	42,2			T	36	0,414
TT	15	14,9					

5 DISCUSSÃO

A infecção pelo HTLV-1 apresenta amplo aspecto,que pode envolver desfechos inflamatórios e neoplásicos. Apesar da variedade de estudos nas últimas décadas para avaliar tais desfechos, pouco se sabe sobre o porque apenas uma fração dos indivíduos apresenta a doença neurológica, reconhecida na década de 80 como HAM/TSP (40, 41). Deste modo, um total de 247 portadores de HTLV-1 em seguimento regular em uma coorte em São Paulo foi recrutado. Alguns polimorfismos genéticos, marcadores imunológico e viral foram analisados no presente estudo. Destaca-se como principais resultados, a associação do polimorfismo de *IFN-λ4* no SNP rs8099917, a LPA e a idade,como fatores de risco a HAM/TSP.

A neuropatologia da HAM/TSP fornece evidências de que mecanismos imunes mediados desempenham um papel importante na patogênese da doença (95). Estudos anteriores compararam resposta imune, incluindo celular e humoral, em pacientes com HAM/TSP e em indivíduos assintomáticos. Por exemplo, o vírus induz uma resposta imunomediada, que pode levar a diferentes desfechos, como doença neurológica progressiva, que resulta na HAM/TSP e/ou dermatites infecciosas (100, 101).

Por outro lado, vários estudos têm indicado que a replicação viral, em especial de genes regulatórios como *Tax/rex* e HBZ, que podem contribuir também nessa patogênese. Em adição, outras regiões não regulatórias, como gag-pol, podem induzir resposta autoimune (102-104). Nesse sentido, foi analisada a carga proviral do gene *pol* nos pacientes deste estudo. Essa análise revelou, como esperado, que a PVL foi um fator independente para o desenvolvimento da HAM/TSP. Entretanto, quando associado a outras variáveis estudadas, esse poder estatístico perde sua força, o que poderia ser explicado pela influência de fatores, que geralmente não são estudados em conjunto nos diversos trabalhos publicados (105). Isso poderia se justificar pela ativação da IL-2 e seu receptor (IL-2r), além da indução das CTL, que poderiam inibir a replicação viral que desencadearia processos inflamatórios exacerbados. Esses fenômenos poderiam contribuir para o dano à membrana

de mielina, mecanismo básico para desenvolvimento da doença (81, 102, 106-108).

Outro fator importante avaliado neste trabalho foi o papel da LPA no desfecho clinico. Esse marcador foi uma das mais importantes observações no presente estudo, visto que houve uma elevação de risco para HAM/TSP, sendo que para cada incremento de mil células houve uma elevação de risco de 0,5%. Esse dado chama atenção pelo fato de que poucos estudos avaliaram esse marcador, principalmente, devida a sua complexidade de realização, elevado custo e difícil reprodutibilidade (94). O laboratório LIM-56 realiza este ensaio como rotina desde 1996, o que possibilitou a elaboração de um protocolo padronizado, com elevado grau de confiabilidade, que permite a avaliação da função de células como marcador de resposta imune *in vitro*. Esses achados podem contribuir tanto no diagnóstico diferencial de doença incipiente, quanto na avaliação prognóstica após uso de imunomodulares, em particular o uso de corticosteróides (48).

Apesar de poucos estudos avaliarem ativação celular *in vitro* como marcador de doença, como exposto acima, a LPA deveria ser avaliada longitudinalmente como marcador de progressão para HAM/TSP e também como marcador de resposta a terapias. Os trabalhos mais relevantes nesta linha mostraram que é sabido que os linfócitos de pessoas com HTLV-1 podem espontaneamente proliferar *in vitro* (109) e que a infecção em clones de células T levam a proliferação (110).

Células mononucleares (CD4+ e/ou CD8+) desses indivíduos podem, na sua maioria, exibir proliferação espontânea exacerbada (77, 111), como observado. A maioria dos estudos, até o momento, focou a avaliação de LPA em células T, com pouca atenção em outras subpopulações de linfócitos (81). Deste modo, a determinação de marcadores adicionais, especialmente genéticos, pode contribuir no manejo clínico dos pacientes.

Outro aspecto relevante avaliado no presente estudo foia possibilidade que a idade poderia influenciar o desfecho clínico. Em estudo anterior, foi observado que a maioria dos casos de HAM/TSP se iniciava na faixa etária de adultos jovens (112). No presente estudo, a idade média dos casos de

HAM/TSP foi de 59 anos, esse fato se deve, provavelmente, ao envelhecimento das pessoas que compõem a coorte. A possibilidade do uso de imunomoduladores como corticosteroides, pode atuar numa fase inflamatória, que no caso da HAM/TSP acontece até cinco anos do início dos primeiros sintomas (113). Portadores de HTLV-1 após 40 anos de idade apresentam menor risco de desenvolverà HAM/TSP, provavelmente devido a imunocenescência que ocorre nessa faixa etária (112). Esse aspecto é bem observado na esclerose múltipla, onde, o maior risco está nessa faixa etária inferior a 40 anos de idade para início dos primeiros sintomas(114).

Também foi avaliada a associação entre marcadores genéticos possivelmente envolvidos na patogênese da HAM/TSP. Alguns alelos foram estudos, que em avaliados anteriores se revelaram importantes em algumas infecções virais persistentes (16, 54, 115). Esses marcadores foram mostrados na Tabela 1. Outras características genéticas, como alguns haplótipos de HLA, foram descritas como envolvidas na patogênese da HAM/TSP(50) ou fatores pró-inflamatórios (49). Nesse sentido, este estudo revelou que o polimorfismo do HLA-C no SNP na posição rs9264942 no cromossomo 6, não foi associado ao desenvolvimento da HAM/TSP. Existe a possibilidade de que o vírus interaja com células T através do HLA tipo 1, sendo, portanto, importante na resposta antiviral.

Apesar dos resultados que avaliaram polimorfismo no HLA-C nos pacientes com HTLV-1, independente do status clinico, não mostraram associação de risco ou proteção.A eficácia da resposta imune específica para HTLV-1, especialmente a resposta de linfócitos T citóxicos (CTL) CD8+, tem sido demonstrada como sendo a chave para controlar a carga proviral do HTLV-1 (116). A evidência mais convincente de um papel protetor de CTLs surgiu da observação, em uma população no sul do Japão, de que a presença de um dos dois genes HLA de classe 1, *HLA-A*02* ou *HLA-Cw*08*, esteve associada com uma carga proviral mais baixa e menor incidência de HAM/TSP (50, 61).

Em relação ao perfil de polimorfismo de KIR estudado, apesar do *KIR2DS2* ter entrado no modelo multivariado, não se observou associação com o desfecho. Corroborando-se com os dados deste, estudo realizado na

população peruana não revelou associação entre esses genes (117). Por outro lado, outro estudo que avaliou o *KIR3DS1* (perfil não avaliado no presente estudo) em pacientes com HAM/TSP não encontrou associação com a carga proviral ou com o desfecho (118). Em contraste, a presença de *KIR2DL2* poderia indicar proteção para HAM/TSP quando associado ao *HLA-Cw*08* e *B*54* em populações europeias e japonesas, interferindo no controle de carga proviral (59). Esses resultados conflitantes podem ser explicados pela influência da ascendência genética, dado o contexto histórico da colonização brasileira, a população exibe características genéticas únicas, apresentando fenótipos de populações africanas, europeia e ameríndia (4).

Em estudo preliminar, a associação do polimorfismo da *IFN-λ4* no SNP da posição rs8099917 no cromossomo 19 (GG), foi independente ao desenvolvimento de HAM/TSP (16). Esses dados corroboram com o presente estudo, mostrando a importância desse polimorfismo como fator de risco envolvido na patogênese da HAM/TSP. Neste sentindo, no modelo recessivo, este se mostra um fator de proteção de evolução da doença, o que nos induz pensar que, de fato, estudos genéticos de mutações pontuais são importantes para avaliar as interações genéticas entre vírus *versus* hospedeiro (1). Até o presente não foi realizado esse tipo de ensaio em populações vivendo com HTLV-1, somente em isolados celulares infectados pelo vírus, com a finalidade de estudar polimorfismos virais (119, 120).

Vale ressaltar que a resposta imune parece ser um fator crucial na patogênese da HAM/TSP. Por exemplo, em estudos anteriores realizados, mostrou-se que os pacientes com HAM/TSP apresentaram maiores níveis de IFN-gama e quimiocinas (MIP-1α) em comparação com portadores assintomáticos(47). Nesse sentido, como foi relatado recentemente, genes estimulados por interferon regulam a expressão de outras citocinas, e esta regulação pode ser diferente no tecido infectado, e ainda entre os tipos de células dentro do fígado e da medula espinal (73). Sabe-se que a *IFN-λ4* atenua a produção da IL-13; e é também possível que essa citocina, produzida em pessoas com o alelo de proteção diminua a expressão desta, levando a um efeito semelhante ao protetor e menor interações entre inibitórios de gene do KIR e HLA-C (74). Assim, o *IFN-λ4* e outros três interferons, tais como *IL28A* ou *IL-29*, ativam a cascata antiviral via JAK-STAT. Esses fenômenos

imunológicos atuam, provavelmente sinérgica e mimeticamente aos interferons do tipo 1, o que pode contribuir para a patogênese imune da HAM/TSP.

Esses dados, quando analisados em conjunto, induzem a pensar que o tempo de doença e a classificação dos indivíduos devem ser repensados. Um exemplo recente desta observação refere-se a um estudo paralelo do grupo de neurociências do IIER e do grupo de imunovirologia do LIM-56, que acompanha indivíduos inicialmente assintomáticos que reavaliados por neurologistas mais detalhadamente, apresentaram sintomas sutis de distúrbios neurológicos, ainda não associados à HAM/TSP, em torno de 10% do total de casos (dados não publicados), que poderia sugerir diagnóstico precoce da doença ou uma forma de menor gravidade.

Nesta mesma direção, um grupo da Bahia, revelou que cerca de 30% dos indivíduos assintomáticos apresentavam alterações neurológicas denominadas como menores, que não preenchem os requisitos de classificação para HAM/TSP, sugerindo uma nova entidade clínica associada ao vírus (39). Entretanto, esses sintomas e sinais podem ser a possibilidade da detecção precoce da síndrome neurológica – HAM/TSP, na sua forma inicial de apresentação. Isso deveria ser objeto de estudo mais detalhado no futuro.

Vale ressaltar que esses dados em conjunto, explicam 8% dos fatores de progressão e de proteção para HAM/TSP. Destacamos ainda que o presente estudo limitou-se a estudar polimorfismos genéticos pontuais, e isso poderia explicar o fato de não encontrarmos mais associações que podem ter relevante associação ao desfecho para HAM/TSP. Desse modo, estudos genéticos multicêntricos envolvendo análise de exoma e maior número de casos de HAM/TSP, deveriam ser realizados com a finalidade de explorar melhor esse cenário, ainda inexplicado. O entendimento da patogênese pode oferecer marcadores de valor prognóstico importantes para o manejo clínico, além de contribuir para o achado de novas intervenções terapêuticas no futuro.

6 CONCLUSÃO

a) A distribuição dos polimorfismos do *IFN-λ4*, HLA-C e do KIR foi proporcional àquelas encontradas na população brasileira;
b) Os polimorfismos da *IFN-λ4* no SNP na região rs12979860 do cromossomo 19, o HLA-C no SNPna posição rs9264942 no cromossomo 6 e os marcadores de KIR, não foram associados nem para risco ou proteção à HAM/TSP;
c) No modelo recessivo, o polimorfismo da *IFN-λ4*no SNP na região rs8099917 do cromossomo 19 foi associada ao desfecho clínico, portanto, sendo um fator protetor relevante para HAM/TSP;
d) A carga proviral de HTLV-1 não foi um marcador importante na análise multivariada para HAM/TSP na amostra analisada;
e) A contagem basal de linfoproliferação foi associada ao risco para HAM/TSP, e se manteve associada nos modelos por análise multivariada, demonstrando ser um importante marcador de progressão da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

2. 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;461(7265):798-801.

3. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. Gastroenterology. 2010;139(6):1865-76.

4. 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;461(7262):399-401.

5. 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 coinfected with HCV and HIV in Brazil. J Antimicrob Chemother. 2012;67(2):509-10.

6. 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;207(4):651-5.

7. McLaren PJ, Coulonges C, Bartha I, Lenz TL, Deutsch AJ, Bashirova A, et al. Polymorphisms of large effect explain the majority of the host genetic contribution to variation of HIV-1 virus load. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(47):14658-63.

8. 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;25(2):269-71.

9. Parczewski M, Bander D, Leszczyszyn-Pynka M, Urbanska A, Socha L, Boron-Kaczmarska A. IL28B CC genotype is associated with higher all-cause mortality in antiretroviral-treated HIV-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 2012;28(12):1640-6.

10. 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;202(11):1749-53.

11. Stanzione M, Stornaiuolo G, Rizzo V, Pontarelli A, Gaeta GB. HBsAg seroconversion after pegylated interferon alfa 2a rescue in a lamivudine-resistant patient with HBeAg-negative chronic hepatitis B and favourable IL28-B genotype. Infez Med. 2016;24(2):144-6.

12. Tang S, Yue M, Wang J, Zhang Y, Yu R, Su J, et al. Associations of IFN-gamma rs2430561 T/A, IL28B rs12979860 C/T and ERalpha rs2077647 T/C polymorphisms with outcomes of hepatitis B virus infection: a meta-analysis. J Biomed Res. 2014;28(6):484-93.

13. Chen J, Wang W, Li X, Xu J. A meta-analysis of the association between IL28B polymorphisms and infection susceptibility of hepatitis B virus in Asian population. BMC Gastroenterol. 2015;15:58.

14. Tan SC, Ankathil R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. Tumour Biol. 2015;36(9):6633-44.

15. Vineretsky KA, Karagas MR, Kuriger-Laber JK, Waterboer T, Pawlita M, Nelson HH. HLA-C -35kb expression SNP is associated with differential control of beta-HPV infection in squamous cell carcinoma cases and controls. PloS one. 2014;9(8):e103710.

16. Assone T, de Souza FV, Gaester KO, Fonseca LA, Luiz Odo C, Malta F, et al. IL28B gene polymorphism SNP rs8099917 genotype GG is associated with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 carriers. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(9):e3199.

17. 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.

18. 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;55(1):e1-4.

19. 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.

20. Vallinoto AC, Santana BB, Sa KS, Ferreira TC, Sousa RC, Azevedo VN, et al. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Is Not Associated with SNP rs12979860 of the IL-28B Gene. Mediators Inflamm. 2015;2015:804167.

21. 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. Nat Genet. 2009;41(10):1100-4.

22. Laidlaw SM, Dustin LB. Interferon lambda: opportunities, risks, and uncertainties in the fight against HCV. Front Immunol. 2014;5:545.

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

24. 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;51(6):325-9.

25. 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;77(12):7415-9.

26. 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;218(4572):571-3.

27. Ciminale V, Rende F, Bertazzoni U, Romanelli MG. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. Front Microbiol. 2014;5:398.

28. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology. 2005;2:30.

29. Blattner WA, Saxinger CW, Gallo RC, Jr. HTLV-I, the prototype human retrovirus: epidemiologic features. Prog Clin Biol Res. 1985;182:223-43.

30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 163, de 3 de dezembro de 1993. Diário Oficial da União, Brasília, 06 dez. 1993.

31. Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. Leukemia. 2003;17(1):26-38.

32. Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). J Emerg Med.. 2000;18(1):109-19.

33. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol. 2012;3:388.

34. 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;37(2):242-3.

35. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz.. 2006;101(3):273-6.

36. 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;229(4714):675-9.

37. 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 research. 2011;39(Database issue):D70-4.

38. Qu Z, Xiao G. Human T-cell lymphotropic virus: a model of NF-kappaB-associated tumorigenesis. Viruses. 2011;3(6):714-49.

39. Tanajura D, Castro N, Oliveira P, Neto A, Muniz A, Carvalho NB, et al. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected Individuals Without HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study.Clin Infect Dis. 2015;61(1):49-56.

40. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet. 1985;2(8452):407-10.

41. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet. 1986;1(8488):1031-2.

42. Osame M. [Diagnosis and treatment of HTLV-I associated myelopathy]. Nihon Naika Gakkai zasshi. 1990;79(3):261-5.

43. Uchiyama T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. Annu Rev Immunol. 1997;15:15-37.

44. Assone T, Paiva A, Fonseca LA, Casseb J. Genetic Markers of the Host in Persons Living with HTLV-1, HIV and HCV Infections. Viruses. 2016;8(2).

45. Tokura Y, Ito T, Kawakami C, Sugita K, Kasuya A, Tatsuno K, et al. Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1)-associated lichenoid dermatitis induced by CD8+ T cells in HTLV-1 carrier, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia/lymphoma. J Dermatol. 2015;42(10):967-74.

46. Goncalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. Inflamm Allergy Drug Targets. 2008;7(2):98-107.

47. 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;70(4):403-7.

48. Croda MG, de Oliveira AC, Vergara MP, Bonasser F, Smid J, Duarte AJ, et al. Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort. J Neurol Sci. 2008;269(1-2):133-7.

49. 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). J Neuroimmunol. 2007;188(1-2):138-42.

50. 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;165(12):7278-84.

51. 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;163(7):4064-72.

52. Verheyden S, Ferrone S, Mulder A, Claas FH, Schots R, De Moerloose B, et al. Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. Cancer Immunol Immunother. 2009;58(6):855-65.

53. Singh P, Dass JF. A multifaceted computational report on the variants effect on KIR2DL3 and IFNL3 candidate gene in HCV clearance. Mol Biol Rep. 2016;43(10):1101-17.

54. Suppiah V, Gaudieri S, Armstrong NJ, O'Connor KS, Berg T, Weltman M, et al. IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study. PLoS medicine. 2011;8(9):e1001092.

55. Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gomez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, et al. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. Human immunology. 2005;66(11):1106-9.

56. Lunemann S, Martrus G, Holzemer A, Chapel A, Ziegler M, Korner C, et al. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C *03:04 and modulate NK cell function. J Hepatol. 2016;65(2):252-8.

57. Romero V, Azocar J, Zuniga J, Clavijo OP, Terreros D, Gu X, et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. Mol Immunol. 2008;45(9):2429-36.

58. Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B. HTLV-1: persistence and pathogenesis. Virology. 2013;435(1):131-40.

59. Seich Al Basatena NK, Macnamara A, Vine AM, Thio CL, Astemborski J, Usuku K, et al. KIR2DL2 enhances protective and detrimental HLA class I-mediated immunity in chronic viral infection. PLoS Pathog. 2011;7(10):e1002270.

60. Rafatpanah H, Farid Hosseini R, Pourseyed SH. The Impact of Immune Response on HTLV-I in HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). Iran J Basic Med Sci. 2013;16(3):235-41.

61. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(7):3848-53.

62. Borducchi DM, Gerbase-DeLima M, Morgun A, Shulzhenko N, Pombo-de-Oliveira MS, Kerbauy J, et al. Human leucocyte antigen and human T-cell lymphotropic virus type 1 associated diseases in Brazil. Br J Haematol. 2003;123(5):954-5.

63. Catalan-Soares BC, Carneiro-Proietti AB, Da Fonseca FG, Correa-Oliveira R, Peralva-Lima D, Portela R, et al. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. Med Microbiol Immunol. 2009;198(1):1-3.

64. Deschamps R, Bera O, Belrose G, Lezin A, Bellance R, Signate A, et al. Absence of consistent association between human leukocyte antigen-I and -II alleles and human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis risk in an HTLV-1 French Afro-Caribbean population. Int J Infect Dis. 2010;14(11):e986-90.

65. Goedert JJ, Li HC, Gao XJ, Chatterjee N, Sonoda S, Biggar RJ, et al. Risk of human T-lymphotropic virus type I-associated diseases in Jamaica with common HLA types. Int J Cancer. 2007;121(5):1092-7.

66. Trevino A, Vicario JL, Lopez M, Parra P, Benito R, Ortiz de Lejarazu R, et al. Association between HLA alleles and HAM/TSP in individuals infected with HTLV-1. J Neurol. 2013;260(10):2551-5.

67. Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. J Gen Virol. 2005;86(Pt 3):773-81.

68. Rafatpanah H, Pravica V, Faridhosseini R, Tabatabaei A, Ollier W, Poulton K, et al. Association between HLA-DRB1*01 and HLA-Cw*08 and outcome following HTLV-I infection. Iran J Immunol. 2007;4(2):94-100.

69. Bangham CR, Hall SE, Jeffery KJ, Vine AM, Witkover A, Nowak MA, et al. Genetic control and dynamics of the cellular immune response to the human T-cell leukaemia virus, HTLV-I. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999;354(1384):691-700.

70. Taghaddosi M, Rezaee SA, Rafatpanah H, Rajaei T, Farid Hosseini R, Narges V. Association between HLA Class I Alleles and Proviral Load in HTLV-I Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraperesis (HAM/TSP) Patients in Iranian Population. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(3):264-7.

71. Imanishi T, T. Akaza, A. Kimura, K. Tokunaga, and T. Gojobori. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. HLA.; 1992. p. 1065.

72. 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 . 1997;11 Suppl 3:73-5.

73. 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(Pt 2):382-8.

74. 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 Immun. 2007;8(3):254-61.

75. Mozer-Lisewska I, Zwolinska K, Kowala-Piaskowska AE, Bura M, Rozplochowski B, Pauli A, et al. Genetic (KIR, HLA-C) and Some Clinical Parameters Influencing the Level of Liver Enzymes and Early Virologic Response in Patients with Chronic Hepatitis C. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2016;64(1):65-73.

76. Nagai M, Yamano Y, Brennan MB, Mora CA, Jacobson S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. Ann Neurol. 2001;50(6):807-12.

77. Sakai JA, Nagai M, Brennan MB, Mora CA, Jacobson S. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T cells. Blood. 2001;98(5):1506-11.

78. Greten TF, Slansky JE, Kubota R, Soldan SS, Jaffee EM, Leist TP, et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients.Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(13):7568-73.

79. Akizuki S, Nakazato O, Higuchi Y, Tanabe K, Setoguchi M, Yoshida S, et al. Necropsy findings in HTLV-I associated myelopathy. Lancet. 1987;1(8525):156-7.

80. Kitze B, Usuku K, Yamano Y, Yashiki S, Nakamura M, Fujiyoshi T, et al. Human CD4+ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) env gp21 restricted by HLA DRB1*0101. Clin Exp Immunol. 1998;111(2):278-85.

81. Norris PJ, Hirschkorn DF, DeVita DA, Lee TH, Murphy EL. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. Virulence. 2010;1(1):19-28.

82. 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(2):133-59.

83. Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, Tanaka Y, Kiyomatsu Y, Nagai M, et al. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol. 1999;5(3):241-8.

84. Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature. 1990;348(6298):245-8.

85. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. Blood. 2000;95(4):1386-92.

86. Casseb J, Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LM, Olah I, Smid J, et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007;49(4):231-3.

87. Yamano Y, Sato T. [Pathophysiology, treatment and biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)]. Nihon Rinsho. 2013;71(5):870-5.

88. Starling AL, Martins-Filho OA, Lambertucci JR, Labanca L, de Souza Pereira SR, Teixeira-Carvalho A, et al. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Acta Trop. 2013;125(1):75-81.

89. Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araujo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic

carriers, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. Clin Infect Dis. 2007;44(5):689-92.

90. Okajima RMO. Avaliação da correlação da carga proviral do HTLV-1 e da quantificação das células CD4+ e CD8+ entre pacientes soropositivos assintomáticos, pacientes soropositivos com dermatoses e pacientes com HAM/TSP São Paulo: USP; 2012.

91. Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada Vergara MP, da Silva Duarte AJ, Casseb J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. J Med Virol. 2007;79(2):182-7.

92. 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;102(1-2):37-51.

93. 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;38(11):1643-7.

94. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 1996;54(1):7-12.

95. 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. J Hepatol. 2011;54(5):866-71.

96. Ashouri E, Ghaderi A, Reed EF, Rajalingam R. A novel duplex SSP-PCR typing method for KIR gene profiling. Tissue Antigens. 2009;74(1):62-7.

97. Koehler RN, Walsh AM, Moqueet N, Currier JR, Eller MA, Eller LA, et al. High-throughput genotyping of KIR2DL2/L3, KIR3DL1/S1, and their HLA class I ligands using real-time PCR. Tissue Antigens. 2009;74(1):73-80.

98. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. J Biomed Inform. 2009;42(2):377-81.

99. Hardy GH. Mendelian Proportions in a Mixed Population. Science. 1908;28(706):49-50.

100. Okajima R, Casseb J, Sanches JA. Co-presentation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and adult-onset infective dermatitis associated with HTLV-1 infection. Int J Dermatol. 2013;52(1):63-8.

101. Okajima R, Oliveira AC, Smid J, Casseb J, Sanches JA, Jr. High prevalence of skin disorders among HTLV-1 infected individuals independent of clinical status. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(11):e2546.

102. Fung MM, Chu YL, Fink JL, Wallace A, McGuire KL. IL-2- and STAT5-regulated cytokine gene expression in cells expressing the Tax protein of HTLV-1. Oncogene. 2005;24(29):4624-33.

103. Belrose G, Gross A, Olindo S, Lezin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. Blood. 2011;118(9):2483-91.

104. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Retrovirology. 2009;6:19.

105. Yasuma K, Matsuzaki T, Yamano Y, Takashima H, Matsuoka M, Saito M. HTLV-1 subgroups associated with the risk of HAM/TSP are related to viral and host gene expression in peripheral blood mononuclear cells, independent of the transactivation functions of the viral factors. J Neurovirol. 2016;22(4):416-30.

106. Casoli C, Vicenzi E, Cimarelli A, Magnani G, Ciancianaini P, Cattaneo E, et al. HTLV-II down-regulates HIV-1 replication in IL-2-stimulated primary PBMC of coinfected individuals through expression of MIP-1alpha. Blood. 2000;95(9):2760-9.

107. Mori K, Sadamasu K, Tabei Y, Monma K, Hirata I, Sekine H, et al. [Increased IL-2 and sIL-2R in sera of infants with HTLV-I infection from mother]. Kansenshogaku Zasshi. 1998;72(1):17-24.

108. Toledo-Cornell C, Santos S, Orge G, Glesby MJ, Carvalho EM. Soluble IL-2 receptor and beta-2 microglobulin as possible serologic markers of neurologic disease in HTLV-1 infection. J Med Virol. 2014;86(2):315-21.

109. Usuku K SS, Osame M, Yashiki S, Takahashi K, Matsumoto M, Sawada T, Tsuji K, Tara M, Igata A. HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. Ann Neurol. 1988(23 Suppl (S143-150)).

110. Popovic M, Flomenberg N, Volkman DJ, Mann D, Fauci AS, Dupont B, et al. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. Science. 1984;226(4673):459-62.

111. Prince HE, Lee H, Jensen ER, Swanson P, Weber D, Fitzpatrick L, et al. Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human T-lymphotropic virus infection. Blood. 1991;78(1):169-74.

112. Casseb JO, C. P. A. Low Risk of Tropical Spastic Paraparesis/Human T Lymphotropic Virus Type 1–Associated Myelopathy Development among Persons Aged 150 Years. Clin Infect Dis. 2008:1.

113. Araujo AQ, Leite AC, Dultra SV, Andrada-Serpa MJ. Progression of neurological disability in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). J Neurol Sci. 1995;129(2):147-51.

114. Tur C TA. Early accurate diagnosis crucial in multiple sclerosis. Vet Pathol. 2015;259(1785):21-7, 2-3.

115. De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, Zignego AL, Izzo F, et al. Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases. PloS one. 2015;10(2):e0117420.

116. Melamed A, Laydon DJ, Al Khatib H, Rowan AG, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8(+) T cells in natural infection. Retrovirology. 2015;12:91.

117. Talledo M, Lopez G, Huyghe JR, Verdonck K, Adaui V, Gonzalez E, et al. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. J Med Virol 2010;82(3):460-6.

118. O'Connor GM, Seich Al Basatena NK, Olavarria V, MacNamara A, Vine A, Ying Q, et al. In contrast to HIV, KIR3DS1 does not influence outcome in HTLV-1 retroviral infection. Hum Immunol. 2012;73(8):783-7.

119. Melamed A, Laydon DJ, Gillet NA, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection. PLoS Pathog. 2013;9(3):e1003271.

120. Taylor JM, Ghorbel S, Nicot C. Genome wide analysis of human genes transcriptionally and post-transcriptionally regulated by the HTLV-I protein p30. BMC genomics. 2009;10:311.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde

Protocolo nº.:232/2012

O (a) Sr(a) foi selecionado(a) e está sendo **CONVIDADO(A)** para participar da pesquisa intitulada: **Determinação do Perfil do Polimorfismo da IFN-Γ4 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 IFN-Γ4 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 irá 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 HAM/TSP (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 HAM/TSP (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 junho de 2016.

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 destruídoapós 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 e 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

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP
CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406
E-mail: comitedeetica-iier@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 C

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 D

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
cep.fm@usp.br - 3061-8004

RESUMO DOS ARTIGOS PUBLICADOS

viruses

MDPI

Review

Genetic Markers of the Host in Persons Living with HTLV-1, HIV and HCV Infections

Tatiane Assone [1,2,*], Arthur Paiva [2], Luiz Augusto M. Fonseca [3] and Jorge Casseb [1,2,*]

1 Laboratory of Dermatology and Immune deficiencies, Department of Dermatology, University of São Paulo Medical School, LIM56, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 500, 3rd Floor, Building II, São Paulo, SP, Brazil
2 Institute of Tropical Medicine of São Paulo, São Paulo, Brazil; arthurmpaiva@usp.br
3 Department of Preventive Medicine, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; augustom@hcnet.usp.br
* Correspondence: tatianeassone@usp.br (T.A.); jcasseb@usp.br (J.C.); Tel.: +55-11-3061-7194 (T.A. & J.C.); Fax: +55-11-3081-7190 (T.A. & J.C.)

Academic Editor: Louis M. Mansky
Received: 24 September 2015; Accepted: 15 January 2016; Published: 3 February 2016

Abstract: Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are prevalent worldwide, and share similar means of transmission. These infections may influence each other in evolution and outcome, including cancer or immunodeficiency. Many studies have reported the influence of genetic markers on the host immune response against different persistent viral infections, such as HTLV-1 infection, pointing to the importance of the individual genetic background on their outcomes. However, despite recent advances on the knowledge of the pathogenesis of HTLV-1 infection, gaps in the understanding of the role of the individual genetic background on the progress to disease clinically manifested still remain. In this scenario, much less is known regarding the influence of genetic factors in the context of dual or triple infections or their influence on the underlying mechanisms that lead to outcomes that differ from those observed in monoinfection. This review describes the main factors involved in the virus–host balance, especially for some particular human leukocyte antigen (HLA) haplotypes, and other important genetic markers in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and other persistent viruses, such as HIV and HCV.

Keywords: HTLV-1; HIV-1; HCV; genetic factors

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

IL28B Gene Polymorphism SNP rs8099917 Genotype GG Is Associated with HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 Carriers

Tatiane Assone[1,2]*, Fernando Vieira de Souza[3], Karen Oliveira Gaester[1,2], Luiz Augusto Marcondes Fonseca[4], Olinda do Carmo Luiz[4], Fernanda Malta[2], João Renato Rebello Pinho[2], Fernanda de Toledo Gonçalves[5], Alberto Jose da Silva Duarte[1], Augusto Cesar Penalva de Oliveira[3], Jorge Casseb[1,2]*

1 Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências, Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Instituto de Doenças Infecciosas "Emilio Ribas" (IIER) de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Laboratório de Imuno-hematologia e Hematologia Forense – LIM40, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Sao Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: The polymorphisms of IL28B have been 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) are associated with HAM/TSP.

Methods: The study included 229 subjects, classified according to their neurological status in two groups: Group I (136 asymptomatic HTLV-1 carriers) and Group II (93 HAM/TSP patients). The proviral loads were 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 polymorphisms were independently associated with HAM/TSP outcome in rs12979860 genotype CT (OR = 2.03; IC95% = 0.96–4.27) and in rs8099917 genotype GG (OR = 7.61; IC95% = 1.82–31.72).

Conclusion: Subjects with SNP rs8099917 genotype GG and rs12979618 genotype CT 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 such 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.

Citation: Assone T, Souza FVd, Gaester KO, Fonseca LAM, Luiz OdC, et al. (2014) IL28B Gene Polymorphism SNP rs8099917 Genotype GG Is Associated with HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 Carriers. PLoS Negl Trop Dis 8(9): e3199. doi:10.1371/journal.pntd.0003199

Editor: Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário, Brazil

Received March 28, 2014; **Accepted** August 18, 2014; **Published** September 18, 2014

Copyright: © 2014 Assone et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by CNPq:134001/2011-7, FAPESP:2010/07076-4, FAPESP: 2012/23397-0. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of this manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jcasseb10@gmail.com (JC); tatianeassone@usp.br (TA)

These authors contributed equally to this work.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

SUBJECT AREAS:
INFECTIOUS DISEASES
VIRAL GENETICS

Received
7 April 2014

Accepted
12 August 2014

Published
17 October 2014

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C. (jcasseb10@gmail.com) or K.G. (karengaester@usp.br)

Human papillomavirus infection in oral fluids of HIV-1-positive men: prevalence and risk factors

Karen Gaester[1,2], Luiz A. M. Fonseca[3], Olinda Luiz[3], Tatiane Assone[1,2], Adriele Souza Fontes[1,2], Fernando Costa[1,2], Alberto J. S. Duarte[1,2] & 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.

Human papillomavirus is one of the most common sexually transmitted diseases worldwide. The natural history of oral HPV infection is unclear, and its risk factors have not been explored. Immunocompromised individuals, as exemplified by HIV patients, are at high risk for HPV-related diseases. The mean of this study is to determine the prevalence ofHPV in the oral tract of HIV-1-positive male subjects and its association with risk factors. A total of 283 oral wash samples from HIV-1-positive men were tested. The oral fluid samples were used for DNA extraction and conventional PCR amplification; HPV genotyping was performed by hybridization. HPV genotyping revealed that nine samples (3.5%) were positive for HPV DNA; the major high-risk HPV types identified were 51 and 66. Worldwide studies have shown a variable prevalence of oral HPV. The diversity of genotypes and the high prevalence of multiple infections in HIV-infected subjects can be better explained by the effects of HIV-induced immunosuppression. The most important risk factors are unprotected sexual intercourse, but other factors for this infection have been described elsewhere including smoking, age and HIV-positive serostatus. In this study, smoking was the most important risk factor for acquiring oral HPV in HIV-1-infected subjects in Brazil.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

High frequency of deficient consumption and low blood levels of 25-hydroxyvitamin D in HIV-1-infected adults from São Paulo city, Brazil

Received: 14 October 2014
Accepted: 12 June 2015
Published: 10 August 2015

Stephanie Hael Sales[1], Sandra Maria Matta[1], Daniela Cardeal da Silva[2], Tatiane Assone[2], Luiz Augusto M. Fonseca[3], Alberto J. S. Duarte[1] & Jorge Casseb[1,2]

Micronutrient deficiency is common in patients with HIV/AIDS, usually caused by mal-absorption and/or drug interactions. 25-hydroxyvitamin D is of fundamental importance for the homeostasis of musculoskeletal health. The current study aimed to evaluate the nutritional status of HIV-infected subjects in order to make their nutritional diagnoses, including their vitamin D blood levels, and to estimate their consumption of vitamin D. The study included 98 HIV-1-infected subjects, followed at University of São Paulo Medical School - HC-FMUSP. We performed a nutritional evaluation, along with the determination of patients' serum 25-hydroxyvitamin D and calcium concentration, biochemical analyses, and an anthropometric assessment. In the medical interview a 24-hour food recall was used (R24) to estimate daily calorie intake, macronutrients, calcium, and vitamin D. A high level of vitamin D deficiency was observed in our patients: 83.4% of them had levels below 30 ng/ml; they also presented an increased risk of cardiovascular disease, along with a high consumption of dietary fat. Factors related to the virus itself and to the use of antiretroviral drugs may have contributed for the low vitamin D levels seen in our HIV-1-infected patients.