



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE  
HUMANO DA GLUT1: CORRELAÇÃO COM A  
INFEÇÃO PELO HTLV-1**

**GISELLE CALASANS DE SOUZA COSTA**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2008**



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE  
HUMANO DA GLUT1: CORRELAÇÃO COM A  
INFECÇÃO PELO HTLV-1**

**GISELLE CALASANS DE SOUZA COSTA**

*Dissertação apresentada ao Centro de  
Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação  
Oswaldo Cruz/BA, como requisito para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa.*

Orientador: Prof. Dr Luiz Carlos Júnior Alcântara

**Salvador - Bahia – Brasil  
2008**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
**Josefa e Américo**, pelo amor e  
incentivo constantes em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

- Meus pais, **Josefa e Américo**, pelo amor e incentivo incondicionais, sem os quais essa realização não seria possível.
- **Anderson**, pela paciência, carinho e apoio. Por me acompanhar durante esta caminhada.
- Meu irmão **Diego**, por me fazer tentar ser uma pessoa mais paciente.
- Meu orientador **Luiz Carlos Alcântara**, pela oportunidade e confiança indispensáveis para meu crescimento profissional. E pelas risadas também!
- **Sandra Rocha Gadelha**, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo exemplo de caráter e de profissionalismo.
- **Dr. Galvão**, pelo exemplo de lutas e conquistas a ser seguido.
- Meus amigos **Giordana, Kléber e Aninha**, que, mesmo de longe, sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim. A amizade de vocês significa muito para mim!
- Minhas amigas **Evla, Cissa e Anne**, por me apoiarem e me ajudarem a seguir esse caminho. Obrigada pelas noites em claro!
- Meus amigos do laboratório: **Táisa, Ci, Giraya, Thaís, Ró, Mamá, Fabi's e Marcela K** por me mostrarem que o trabalho pode vir acompanhado de muita confiança, amizade, cumplicidade, carinho e risadas. Trabalhar com vocês me faz mais feliz!
- Menina **Aline**, pelo carinho, pela atenção e pelos “ouvidos”.

- **“Galera” do LASP**, por proporcionar um ambiente de trabalho agradável.
  
- Pessoal da secretaria: **Lindinha (Dona Eugênia), Rodrigo, Cláudio e Dona Beth**, pela disposição e pela ajuda sempre bem-vinda.
  
- **Angelina e Kyioko** pelos ensinamentos constantes.
  
- **Sônia** do Centro de HTLV por estar sempre presente, resolvendo todos os problemas e dando apoio aos pacientes.
  
- **Noilson e Filipe**, pela realização dos testes sorológicos e moleculares e **Viviana** pela quantificação da Carga Proviral.
  
- **Rochele Azevedo, Simone Kashima e Dimas Tadeu** pela colaboração.
  
- **Glória Teixeira e Maurício Barreto** pela idealização e realização do trabalho que resultou nas amostras dos indivíduos soronegativos de Salvador.
  
- **Pacientes**, por se disponibilizarem a participar deste estudo e permitirem sua realização.
  
- **Equipe Multidisciplinar do Centro de HTLV**, pela troca de conhecimento.
  
- Todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!

*“As estrelas são todas iluminadas...*

*Não será para que cada um possa*

*um dia encontrar a sua?”*

**Antoine de Saint-Exupéry**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1). GLUT1 tem 12 $\alpha$ -hélices transmembranares.....	22
<b>Figura 2.</b> Modelo do mecanismo de transporte da glicose através da mudança entre o primeiro (1, 2 e 5) e o segundo (3 e 4) estados conformacionais de GLUT1.....	22
<b>Figura 3.</b> Polimorfismos estudados nas diferentes regiões do gene humano da GLUT1. Os polimorfismos destacados apresentaram associação com o desenvolvimento de nefropatia diabética em diferentes populações.....	24
<b>Figura 4.</b> Áreas endêmicas para o HTLV-1 no Brasil e no mundo.....	26
<b>Figura 5.</b> Desenho esquemático da estrutura do HTLV-1.....	27
<b>Figura 6.</b> Organização genômica do HTLV-1. (A): DNA proviral do HTLV. (B): Indicação dos genes e suas proteínas codificadas. (C): Principais mRNA do HTLV produzidos durante a transcrição.....	29
<b>Figura 7.</b> Ciclo de replicação do HTLV-1.....	31
<b>Figura 8.</b> As três vias de transativação por Tax.....	32
<b>Figura 9.</b> (A) Esquema do padrão de restrição para o fragmento digerido com a enzima <i>Xba</i> I. (B) Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, como exemplo da genotipagem para o polimorfismo <i>Xba</i> IG>T no gene da GLUT1 após RFLP com a enzima de restrição <i>Xba</i> I.....	43
<b>Figura 10.</b> (A) Esquema do padrão de restrição para o fragmento digerido com a enzima <i>Hae</i> III. (B) Gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, como exemplo da genotipagem para o polimorfismo <i>Hae</i> IIIT>C no gene da GLUT1 após RFLP com a enzima de restrição <i>Hae</i> III.....	44

<b>Figura 11.</b> Mediana da carga proviral do HTLV-1 em indivíduos assintomáticos, oligosintomáticos e com TSP/HAM, representada como cópias do HTLV-1 por $10^6$ células mononucleares e determinada por PCR quantitativo em tempo real. .....	48
<b>Figura 12.</b> Comparação dos genótipos do polimorfismo XbaIG>T com a mediana da carga proviral do HTLV-1. $p>0,05$ .....	49
<b>Figura 13.</b> Comparação dos genótipos do polimorfismo HaeIIIT>C com a mediana da carga proviral do HTLV-1. $p>0,05$ .....	49
<b>Figura 14.</b> Comparação dos genótipos do polimorfismo -2841A>T com a mediana da carga proviral do HTLV-1. $p>0,05$ .....	50
<b>Figura 15.</b> Resultado do seqüenciamento de 339pb da região promotora do gene da GLUT1, mostrando em destaque no círculo (no nucleotídeo e no cromatograma) a existência do genótipo heterozigoto G/T na posição 143 da região analisada que corresponde à posição -2807 no gene.....	55



## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1.** Caracterização dos pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com a idade e o gênero.....47
- Tabela 2.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e em indivíduos não-infectados de Salvador-BA.....51
- Tabela 3.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste, população de Salvador, descendentes de alemães da região Sul e Ameríndios da tribo Tiriyó.....52
- Tabela 4.** Frequências alélicas estatisticamente significantes observadas nas diferentes populações brasileiras estudadas para o polimorfismo XbaIG>T .....52
- Tabela 5.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo HaeIIIT>C em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e em indivíduos não-infectados de Salvador-BA.....53
- Tabela 6.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo HaeIIIT>C em indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste, população de Salvador, descendentes de alemães da região Sul e Ameríndios da tribo Tiriyó.....54
- Tabela 7.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -2841A>T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e em indivíduos não-infectados de Salvador-BA.....55
- Tabela 8.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em diferentes populações.....61

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A = Adenina

AKT = Proteína-serina/treonina quinase

ATLL = Leucemia/linfoma de células T do adulto

C = Citosina

cAMP = Adenosina Monofosfato Cíclico

CCRCC = Carcinoma renal de células claras

CPqGM/FIOCRUZ = Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz

CRE = Elemento responsivo ao cAMP

CREB= Elemento de ligação ao cAMP

d.f. = grau de liberdade

DNA = Ácido desoxirribonucléico

ELISA = Ensaio imunoenzimático

“*enhancers*” = Amplificadores da regulação gênica

*env* = Gene do envelope viral

G = Guanina

*gag* = Gene do grupo antigênico

GLUT = Transportador de glicose

gp21 (TM) = Glicoproteína 21 (Transmembranar)

gp46 (SU) = Glicoproteína 46 (Superfície)

hBEC = Células endoteliais do cérebro humano

HIF-1 = Fator de indução de hipóxia do tipo 1

HLA = Antígeno leucocitário humano

HRE = Elemento responsivo a hipóxia

HTLV-1 = Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1

IFN- $\gamma$  = Interferon  $\gamma$

IL-2 = Interleucina 2

IL-2R = Receptor da interleucina 2

IL-6 = Interleucina 6

IL-10 = Interleucina 10

IN = Integrase

kb = Quilo base

kDa = Quilo Dalton

LTR = Repetições terminais longas

mL = Mililitro

mRNA = RNA mensageiro

MPM = Marcador de peso molecular

NF- $\kappa$ B = Fator nuclear kappa B

nm = Nanômetro

OMDS = Escore de desabilidade motora de Osame

ORF = Fase aberta de leitura

p15 (NC) = Proteína 15 (Nucleocapsídeo)

p19 (MA) = Proteína 19 (Matriz)

p24 (CA) = Proteína 24 (Capsídeo)

pb = Pares de bases

PBMC = Células mononucleares do sangue periférico

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PI3K = Fosfatidil inositol 3-Cinase

*pol* = Gene da polimerase

“*primers*” = Sequência de oligonucleotídeos iniciadora da transcrição

px = Região que contém os genes reguladores *tax* e *rex*

*rex* = Gene regulador da transcrição

Rex = Proteína regulatória

RBD = Domínio de ligação ao receptor

RFLP = Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição

RNA = Ácido ribonucléico

SNP = Polimorfismo de um único nucleotídeo

SRE = Elemento responsivo ao soro

SRF = Fator responsivo ao soro

T = Timina

*tax* = Gene transativador

Tax = Proteína de transativação

TCR = Receptor de célula T

T CD4<sup>+</sup> = Linfócito T *cluster* D4 positivo

TNF-  $\alpha$  = Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TR = Transcriptase reversa

*Lista de Abreviaturas e Siglas*

TRE = Elementos conservados de resposta a Tax

TSP/HAM = Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1

USF = Fator de estimulação “*upstream*” ou a montante

VEGF = Fator de crescimento do endotélio vascular

**RESUMO****INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE HUMANO DA GLUT1:  
CORRELAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO HTLV-1****Giselle Calasans de Souza Costa****Orientador: Luiz Carlos Júnior Alcântara**

O HTLV-1 é o agente etiológico da Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) e da Leucemia/Linfoma das Células T do Adulto (ATLL). No entanto, o desenvolvimento de manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 ocorre em 2-4% da população infectada e ainda não se sabe por que esta infecção permanece assintomática na maioria dos portadores. Tem sido sugerido que o desfecho da infecção pode ocorrer devido a variações (mutações) em genes do hospedeiro e/ou do vírus. Recentemente, foi demonstrado que o HTLV é capaz de utilizar a glicoproteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1) para infectar linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre mutações em regiões regulatórias de genes humanos e manifestação de doença. Polimorfismos no gene da GLUT1 foram associados à susceptibilidade a nefropatia diabética, em pacientes com diabetes mellitus dos tipos 1 e 2 em diferentes populações. Com o objetivo de verificar possíveis correlações entre polimorfismos nas regiões regulatórias e codificante do gene humano da GLUT1 com o desenvolvimento de TSP/HAM, analisamos os polimorfismos -2841A>T, XbaIG>T e HaeIIIT>C em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e em indivíduos não-infectados de Salvador. Os SNPs XbaIG>T e HaeIIIT>C foram verificados por PCR/RFLP e o SNP -2841A>T, por sequenciamento. Além disso, a carga proviral do HTLV-1 foi quantificada por PCR quantitativo em tempo real. Com o intuito de verificar a frequência dos polimorfismos em GLUT1 na população brasileira com diferentes etnias, foi realizada a análise dos polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C em Ameríndios da tribo Tiryó; descendentes de europeus da região Sul do Brasil; descendentes de japoneses, descendentes de europeus e afro-descendentes da região Sudeste. As frequências genótípicas para os polimorfismos analisados estavam de acordo com o esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O polimorfismo HaeIIIT>C estava em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos XbaIG>T ( $\chi^2=37,555$ ,  $p=0,003$ , 4 d.f.) e -2841A>T ( $\chi^2=\infty$ ,  $p=0,000$ , 4

d.f.). A frequência do genótipo T/T do polimorfismo XbaIG>T foi mais elevada nos indivíduos assintomáticos e com TSP/HAM do que nos indivíduos oligosintomáticos. Em relação ao polimorfismo HaeIIIT>C, nós observamos uma maior frequência do genótipo T/C nos pacientes com TSP/HAM. Quanto ao polimorfismo -2841A>T, foi verificada uma distribuição similar dos genótipos analisados em todos os grupos estudados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas distribuições genótípicas e alélicas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HTLV-1, assim como em relação ao *status* clínico dos pacientes infectados pelo HTLV-1 nos polimorfismos XbaIG>T, HaeIIIT>C e -2841A>T. Em relação ao sequenciamento de 339pb da região promotora de GLUT1, foi observada uma nova mutação G>T na posição -2807 em 6 indivíduos (1 assintomático, 2 com TSP/HAM e 3 não-infectados), caracterizando esta mutação como um polimorfismo. Nossos resultados indicam que os polimorfismos XbaIG>T, HaeIIIT>C e -2841A>T, apesar de, possivelmente, estarem relacionados com a entrada de glicose na célula (XbaIG>T e -2841A>T) não estão relacionados com a infecção pelo HTLV-1 nem com o desenvolvimento de TSP/HAM, sugerindo que as diferentes atividades realizadas pela proteína GLUT1 (transporte de glicose e recepção do HTLV-1) são mediadas por diferentes domínios da mesma. Quanto ao estudo de base populacional, nós confirmamos que as frequências alélicas dos polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C variaram de acordo com a etnia.

**PALAVRAS-CHAVE:** HTLV-1, GLUT1, POLIMORFISMOS, TSP/HAM

**ABSTRACT****POLYMORPHISMS INVESTIGATION AT GLUT1 HUMAN GENE:  
CORRELATION WITH HTLV-1 INFECTION****Giselle Calasans de Souza Costa****Orientation by Luiz Carlos Júnior Alcântara**

The HTLV-1 is the etiological agent of Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated mielopathy (TSP/HAM) and Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). However, the development of HTLV-1 associated clinic manifestations occurs in 2-4% of the infected population and it is still an answered question why this infection remains asymptomatic at the most of the infected carriers. It has been suggested that the outcome of HTLV-1 associated disease manifestations may occur by individual and/or viral genetic variations (mutations). Recently, it was demonstrated that HTLV is able to use the Glucose transporter type 1 (GLUT1) to infect T CD4<sup>+</sup> lymphocytes. Many studies have demonstrating an association between mutations in regulatory regions of human genes and disease manifestations. Polymorphisms in the GLUT1 gene were associated with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with types 1 and 2 diabetes mellitus in different populations. To evaluate the role of GLUT1 gene polymorphisms in the development of TSP/HAM in HTLV-1 infected individuals, we had analyzed the -2841A>T, XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms in HTLV-1 infected and non-infected individuals from Salvador. The XbaIG>T and HaeIIIT>C SNP were analyzed by PCR/RFLP and the -2841A>T polymorphism, by sequencing. The proviral load of the HTLV-1 infected patients was analyzed by Real Time Quantitative PCR. We also analyzed the XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms in distinct Brazilian populations with different ethnic backgrounds: Amerindians from Tiriyo' tribe, European descendants from Brazil South region; Japanese descendants, Europeans descendants and African descendants from Southeast region. Genotypic frequencies of the polymorphisms analyzed were in agreement with the expected by the Hardy-Weinberg Equilibrium. The HaeIIIT>C polymorphism was in linkage disequilibrium with the XbaIG>T ( $\chi^2=37.555$ ,  $p=0.003$ , 4d.f.) and -2841A>T polymorphisms ( $\chi^2=\infty$ ,  $p=0.000$ , 4d.f.). T/T genotypic frequency of the XbaIG>T polymorphism was higher in asymptomatic and TSP/HAM individuals than in

oligosymptomatics. Concerned to the HaeIIIT>C polymorphism, we observed a higher frequency of the T/C genotype in TSP/HAM patients. In relation to the -2841A>T polymorphism, it was verified a similar distribution of the analyzed genotypes in all studied groups. Genotypic and allelic frequencies of the three sites analyzed did not differ significantly for controls and HTLV-1 infected individuals. There were no differences in genotypic and allelic distribution among patients for either the presence or absence of HTLV-1 associated clinic manifestations. In relation to the sequencing of 339 bp of GLUT1 promoter region, it was observed a new mutation G>T at -2807 position in 6 individuals (1 asymptomatic, 2 with TSP/HAM and 3 non-infected). Regarding the quantification of the provirus load according to GLUT1 genotypes, we did not observe any differences. These results suggest that the XbaIG>T, HaeIIIT>C and -2841A>T polymorphisms, although possibly related with cell glucose entry (XbaIG>T and -2841A>T), do not contribute to HTLV-1 infection and to the genetic susceptibility of TSP/HAM in Brazilian HTLV-1 infected individuals, suggesting that different activities performed by GLUT1 protein (glucose transport and HTLV-1 entry) are mediated by its different domains. Concerned to the population study, we confirmed that the allelic frequencies from the XbaIG>T and HaeIIIT>C are influenced by ethnicity among the six Brazilian ethnic groups studied.

**KEYWORDS:** HTLV-1, GLUT1, POLYMORPHISMS, TSP/HAM.



# SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1- TRANSPORTADOR DE GLICOSE DO TIPO 1(GLUT1) .....	21
2.2- VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1(HTLV-1) .....	25
<b>3- OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4- JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>5- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
5.1- DESENHO EXPERIMENTAL .....	39
5.2- CASUÍSTICA.....	40
Definição dos grupos de estudo .....	41
Critérios de seleção .....	41
5.3- ANÁLISE LABORATORIAL .....	42
Diagnóstico laboratorial .....	42
Extração de DNA .....	42
Análise dos SNPs no gene humano da GLUT1 .....	42
Análise do polimorfismo XbaIG>T .....	43
Análise do polimorfismo HaeIIIT>C .....	44
Análise do polimorfismo -2841A>T .....	45
Detecção da carga proviral do HTLV-1 .....	45
5.4- ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
<b>6- RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>7- DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>

<b>8- CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>9-APOIO.....</b>	<b>62</b>
<b>10-REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>11-APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>
APÊNDICE 1- MANUSCRITO N <sup>o</sup> . 1 .....	71
APÊNDICE 2- MANUSCRITO N <sup>o</sup> . 2.....	83
APÊNDICE 3- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA .....	97
<b>12-ANEXO.....</b>	<b>100</b>

## 1- INTRODUÇÃO

Já foi demonstrado que o Vírus Linfotrófico de Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1) está associado a algumas patologias como, por exemplo, Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986), Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL) (Yoshida *et al.*, 1982), uveíte (Mochizuki *et al.*, 1992), dermatite infecciosa (Gonçalves *et al.*, 2003), ceratoconjuntivite sicca (Merle *et al.*, 1996), artrite reumatóide (Motokawa *et al.*, 1996) e Síndrome de Sjögren (Eguchi *et al.*, 1992). Além disso, a infecção por este vírus é endêmica em diferentes regiões geográficas do mundo, como sudoeste do Japão (prevalência de até 37%), ilhas do Caribe (prevalência em torno de 6%), África (prevalência de até 15%) e América do Sul (Goubau *et al.*, 1990; Figueroa *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 1996). No Brasil (média da prevalência de 1,0%), Salvador é a cidade que apresenta a mais alta prevalência (1,8% na população geral) (Dourado *et al.*, 2003).

O desenvolvimento das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 ocorre apenas em uma pequena proporção de indivíduos infectados (2-4%). Ainda não se sabe por que esta infecção pode permanecer assintomática na maioria dos indivíduos, bem como por que alguns indivíduos desenvolvem doenças relacionadas. Tem sido sugerido que o desfecho da infecção pode ocorrer devido a variações (mutações) em genes do hospedeiro e/ou do vírus.

A carga proviral do HTLV-1 tem sido considerada um importante fator para o desenvolvimento de TSP/HAM. Interessantemente, entretanto, alguns indivíduos assintomáticos apresentam carga proviral tão alta quanto à de indivíduos com TSP/HAM. A comparação entre indivíduos assintomáticos com elevada e baixa carga proviral demonstrou que células T CD4<sup>+</sup> de pacientes assintomáticos com baixa carga proviral produzem menores níveis das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa) e IFN- $\gamma$  (Interferon gama) que as células de indivíduos assintomáticos com elevada carga proviral (Nishimura *et al.*, 2000), sugerindo que, além da carga proviral, a baixa produção destas citocinas juntamente com outros fatores como forma de infecção, polimorfismos virais e do hospedeiro, também devem influenciar a sintomatologia da infecção (Furukawa *et al.*, 2003).

Em 2005, a proteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1) foi identificada como tendo um importante papel na entrada do HTLV-1 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, podendo funcionar como uma proteína receptora para este vírus (Coskun & Sutton, 2005). O aumento da expressão da GLUT1 na membrana celular poderia facilitar a entrada do vírus na célula e a transmissão do mesmo, pelo contato célula-célula; podendo levar a um aumento na carga proviral e, posteriormente, ao desenvolvimento de TSP/HAM.

Tem sido sugerido que polimorfismos em promotores gênicos podem resultar no aumento da expressão da proteína (Woo *et al.*, 1998; Licastro *et al.*, 2003). Polimorfismos no gene da GLUT1, que modulam a expressão do gene, podem ser analisados como possíveis candidatos que afetam a produção da proteína GLUT1 e sua expressão na membrana da célula, alterando a susceptibilidade à infecção pelo vírus. Dessa forma, polimorfismos localizados em regiões regulatórias (incluindo a região promotora) e codificante do gene humano da GLUT1 poderiam explicar as diferentes manifestações de doenças associadas ao HTLV-1 e a permanência do estado assintomático na maioria dos indivíduos infectados. De fato, alguns polimorfismos já foram associados com susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças relacionadas à funcionalidade da proteína GLUT1 (Ng *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005). Entretanto, não existem estudos descritos na literatura que tratem da análise destes polimorfismos em GLUT1 no contexto da infecção pelo HTLV-1 e no desenvolvimento das patologias associadas a ele.

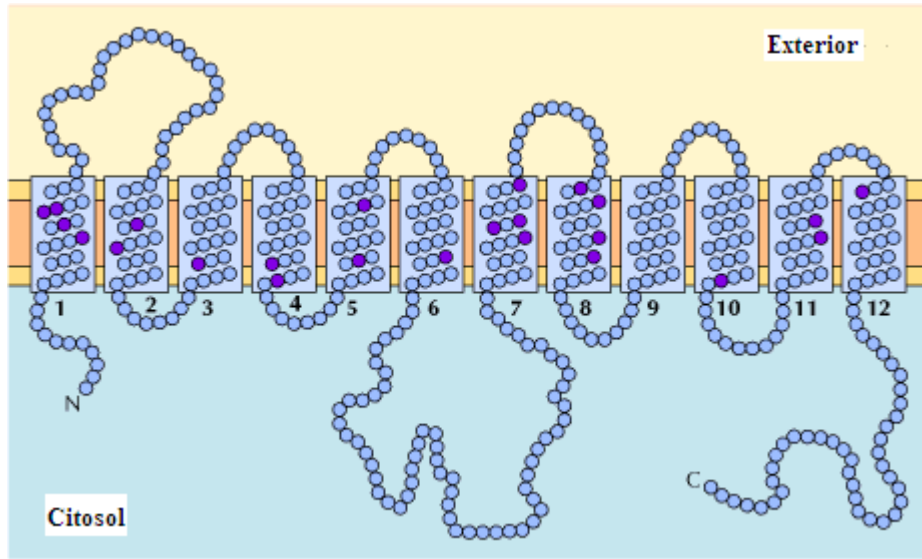
O estudo de polimorfismos nas regiões regulatórias e codificante do gene da GLUT1 associados com a carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 podem ser úteis para a compreensão do mecanismo de infecção do vírus e do desenvolvimento das manifestações clínicas associadas.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

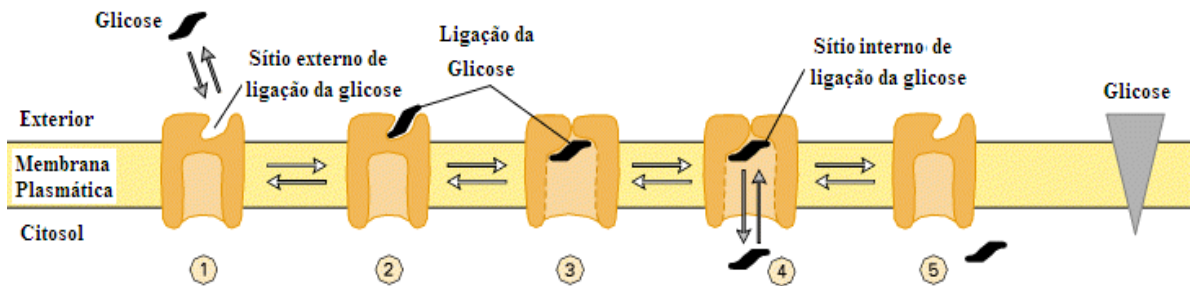
### 2.1- TRANSPORTADOR DE GLICOSE DO TIPO 1 (GLUT1)

Todas as células de mamíferos, geralmente, utilizam a glicose sanguínea como sua principal fonte de energia e a entrada desta molécula é garantida através da atividade dos transportadores de glicose (GLUT). Tais transportadores constituem uma família de 13 membros que têm como função permitir a difusão facilitada da glicose basal de acordo com seu gradiente de concentração através da membrana plasmática celular. A classe I da família de transportadores de glicose é formada pelos membros GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT8 e GLUT14 (Darnel *et al.*, 1990). A maioria das células de mamíferos expressa GLUT1 em sua membrana plasmática, incluindo, dentre estas, os linfócitos T, onde a proteína GLUT1 é o principal transportador de glicose. Entretanto, GLUT1 não é expresso em células T humanas quiescentes. Sua expressão é induzida através da ativação do receptor de célula T (TCR), um processo associado ao aumento do metabolismo de glicose (Manel *et al.*, 2005; Swainson *et al.*, 2005). Os demais transportadores são expressos em células glomerulares, do túbulo renal, células mesangiais e/ou podócitos (Brosius & Heilig, 2005).

O transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1) é uma proteína integral de membrana, uniporte (transporta apenas glicose e açúcares com estrutura similar a glicose), de 45kDa, composta por 12 domínios  $\alpha$ -hélice transmembranares, que delineam 6 “loops” extracelulares. Estas  $\alpha$ -hélices transmembranares contêm, predominantemente, aminoácidos hidrofóbicos, porém, possuem também resíduos de aminoácidos polares no interior da proteína, que formam o sítio de ligação da glicose (Figura 1). A atividade de transporte de glicose da GLUT1 é conferida através da mudança entre dois estados conformacionais: no primeiro, o sítio de ligação da glicose é exposto na parte extracelular da membrana; no segundo, o sítio de ligação da glicose é exposto na parte intracelular. A figura 2 demonstra a seqüência de eventos que ocorrem durante o transporte unidirecional da glicose do lado externo da célula para o citosol. GLUT1 também apresenta a capacidade de catalisar o movimento da glicose do citosol para o exterior da célula (Lodish *et al.*, 2000).



**Figura 1-** Estrutura do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1). GLUT1 tem 12  $\alpha$ -hélices transmembranares. Os resíduos de aminoácidos polares localizados na bicamada fosfolipídica estão representados como círculos azuis escuro (adaptado de Bell *et al.*, 1993).



**Figura 2-** Modelo do mecanismo de transporte da glicose através da mudança entre o primeiro (1, 2 e 5) e o segundo (3 e 4) estados conformacionais de GLUT1 (adaptado de Lodish *et al.*, 2000).

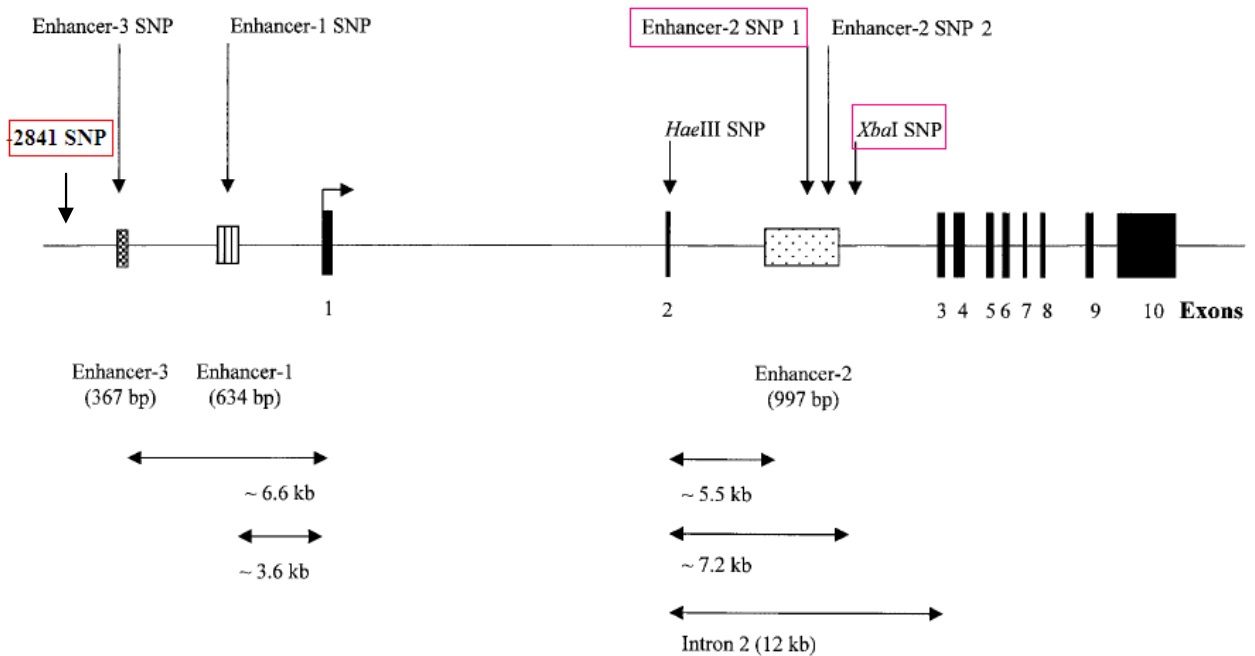
O gene da GLUT1 localiza-se no cromossomo 1p31 e consiste de aproximadamente 35.000 pb (pares de bases) distribuídos em 10 éxons. A expressão deste gene é regulada em diferentes tipos celulares por estímulos, como hipoglicemia, hipóxia, exposição prolongada à insulina e TNF- $\alpha$ . Tem sido sugerido que, sob condições de estresse, a necessidade de energia é maior e o aumento da produção de GLUT1 é, então, providencial para a adaptação celular. A regulação da transcrição do gene da GLUT1 envolve elementos que incluem um promotor e dois “enhancers”. Estes elementos apresentam sítios potenciais para ligação de vários fatores de transcrição,

incluindo Elemento Responsivo ao Soro (SRE), Elemento Responsivo ao cAMP (CRE), Sítios de ligação a proteína ativada 1 (AP-1) e o Fator de Indução de Hipóxia do tipo 1 (HIF-1) (Kozlovsky *et al.*, 1997).

O HIF-1 é um ativador transcricional que media as mudanças de expressão de diversos genes em resposta à concentração celular de oxigênio. HIF-1 é formado pelas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , sendo que a concentração da subunidade HIF-1 $\beta$  permanece inalterada sob condições de hipóxia. Em contrapartida, HIF-1 $\alpha$  é mantida em baixos níveis nas células normais através da degradação da proteína pela via ubiquitina-proteossomo, caso o nível da proteína HIF-1 $\alpha$  seja aumentado sob condições de hipóxia. Este mecanismo permite a estabilização de HIF-1 $\alpha$  nestas células e sua translocação para o núcleo, onde ela formará dímeros com HIF-1 $\beta$  (Hayashi *et al.*, 2004). A expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  é aumentada em células cancerosas de humanos e está associada a uma baixa resposta ao tratamento e aumento da mortalidade do paciente (Tomita *et al.*, 2007). Em condições de estresse celular, HIF-1 liga-se ao Elemento Responsivo à Hipóxia (HRE), localizado a -3.000 pb do promotor de GLUT1. Esta ligação recruta e estabiliza outros fatores de transcrição para a região promotora de GLUT1, aumentando a expressão deste gene (Okino *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre polimorfismos nas regiões regulatórias (incluindo a região promotora) e codificantes de genes humanos e manifestação de doença (Nishimura *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2002; Licastro *et al.*, 2003). O polimorfismo -2841A>T na região promotora do gene da GLUT1 foi associado à susceptibilidade a nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus do tipo 1 e ao tipo mais comum de Carcinoma da Célula Renal (CCRCC) (Page *et al.*, 2005; Hodgkinson *et al.*, 2005). Este polimorfismo localiza-se próximo a sítios de ligação a fatores de transcrição, incluindo HIF-1 $\alpha$ , o que poderia influenciar esta ligação e afetar a transcrição do gene da GLUT1. Uma substituição de G para T que cria o sítio de restrição para a enzima *Xba*I na posição +22999 no íntron 2 do gene da GLUT1 tem sido estudado como fator de risco a nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus dos tipos 1 e 2 em diferentes populações (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Grzeszczak *et al.*, 2001; Hodgkinson *et al.*, 2005). Apesar de intrônico, este polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) tem sido identificado como um marcador de susceptibilidade a nefropatia diabética. Este efeito pode ocorrer por ligação a outro SNP ainda não identificado ou por um mecanismo ainda desconhecido (Page *et al.*,

2005). Em 2002, Ng e colaboradores identificaram três regiões no gene humano da GLUT1 que exibiam similaridade na seqüência aos elementos “enhancers” homólogos de ratos e camundongos e encontraram quatro novos polimorfismos nestas regiões: SNP *enhancer1*, SNP1 *enhancer2*, SNP2 *enhancer2* e SNP *enhancer3*. Destes, apenas o SNP1 *enhancer2*, localizado no sítio de ligação ao fator estimulatório USF, foi associado ao desenvolvimento de nefropatia diabética em pacientes caucasianos com diabetes mellitus do tipo 1. Além disso, este estudo também verificou a existência de um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos SNP1 *enhancer2* e XbaI G>T (Figura 3).



**Figura 3-** Polimorfismos estudados nas diferentes regiões do gene humano da GLUT1. Os polimorfismos destacados apresentaram associação com o desenvolvimento de nefropatia diabética em diferentes populações (adaptado de Ng *et al.*,2002).

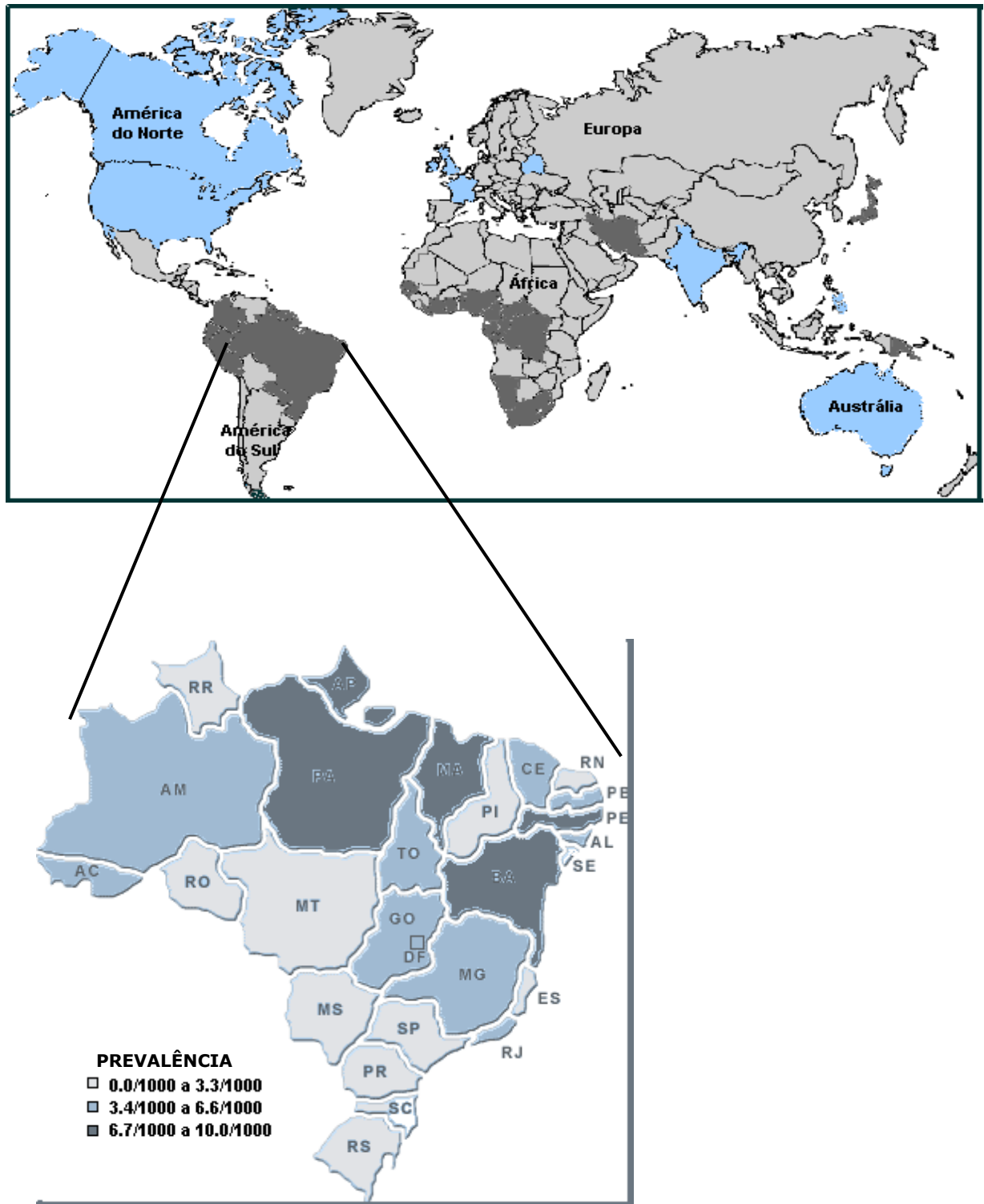


## 2.2- VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)

Em 1980, o primeiro retrovírus humano descrito, causador do linfoma cutâneo de células T, foi isolado de cultivos celulares e denominado de Vírus Linfotrópico de Células-T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1) (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982). O vírus foi inicialmente descrito como agente etiológico da leucemia/linfoma de células-T do adulto (ATLL) no Japão, sendo, subseqüentemente, encontrado em diferentes partes do mundo. A ATLL foi a primeira doença humana identificada como sendo causada por um retrovírus.

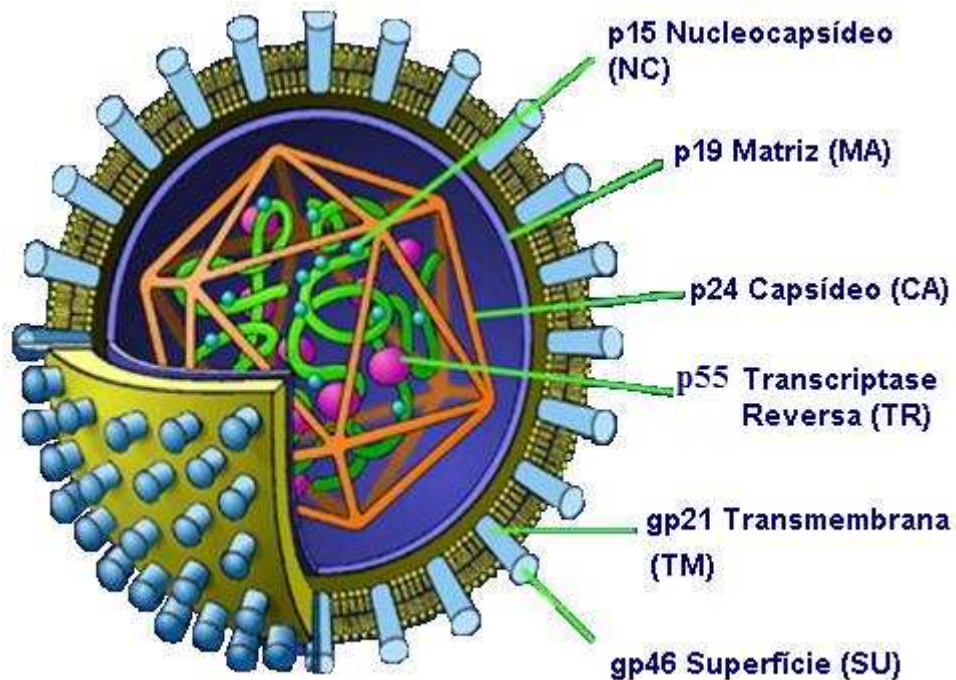
O HTLV-1, posteriormente, foi relacionado também a uma síndrome neurológica denominada Paraparesia Espástica Tropical (TSP), na Martinica, por Gessain e colaboradores em 1985 e a uma mielopatia progressiva com características similares a TSP, na ilha de Kiushu, no sudoeste do Japão, chamada Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM) por Osame e colaboradores em 1986. Após a demonstração de que as duas patologias tinham características clínicas semelhantes (Ijichi *et al.*, 1992), concluiu-se que a HAM e a TSP constituíam enfermidades únicas, sendo denominada TSP/HAM.

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (de Thé & Kazanji, 1996), mas as taxas de soroprevalência diferem de acordo com a área geográfica, a composição sócio-demográfica da população estudada e os comportamentos de risco individuais. Além do sudoeste do Japão, outros locais apresentam endemicidade para o vírus: ilhas do Caribe, África e determinados locais na América do Sul. No Brasil, graças a sua grande área geográfica, a infecção pelo HTLV-1 não está distribuída uniformemente e suas maiores prevalências são observadas nos estados da Bahia (1,8%), Belém (1,61%), Maranhão (1,0%) e Pernambuco (0,82%) (Figura 4). (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Dourado *et al.*, 2003; Catalan-Soares *et al.*, 2005).



**Figura 4** – Áreas endêmicas para o HTLV-1 no Brasil e no mundo (adaptado de Proietti *et al.*, 2005 e Catalan-Soares *et al.*, 2005).

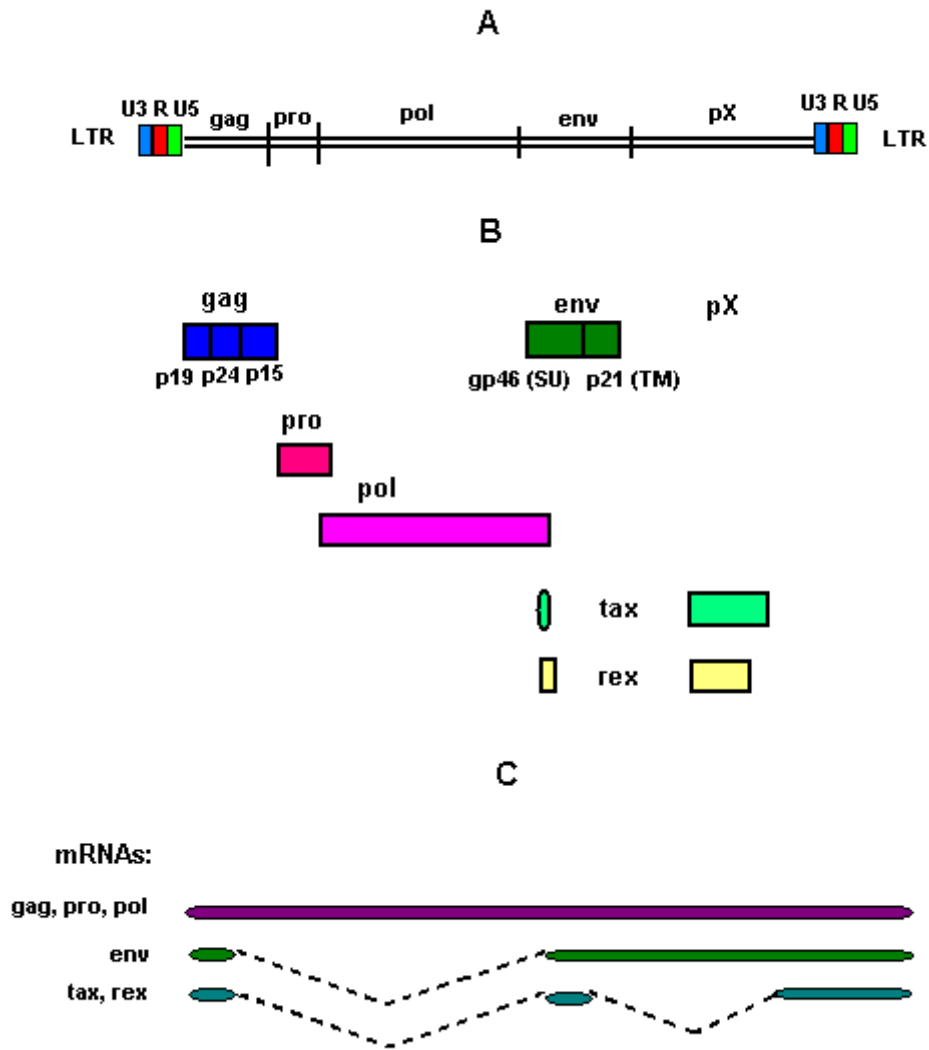
O HTLV-1 apresenta uma estrutura morfológica composta por um nucleocapsídeo icosaédrico central de 80-100nm de diâmetro circundado por um envelope circular. O envelope, por sua vez, é composto por uma proteína de superfície (SU) extracelular, denominada gp46, e uma proteína transmembrana (TM), denominada gp21, que atravessa a membrana viral e ancora a SU. O core interno é constituído por três proteínas: a proteína do nucleocapsídeo (NC) ou p15, a proteína do capsídeo (CA) ou p24 e a da matriz (MA) ou p19. Esta estrutura abriga, no seu interior, o genoma viral composto por duas fitas de RNA (8-9 kilobases) às quais estão associadas outras proteínas importantes no processo de integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira (transcriptase reversa –TR e integrase –IN) e no desenvolvimento do papel catalítico antes do ciclo de replicação viral (protease e RNaseH). (Figura 5).



**Figura 5** – Desenho esquemático da estrutura do HTLV-1 (adaptado de <http://www.cxbio.com/tuijian/HTLV>).

O genoma do HTLV-1 é composto por duas fitas simples de RNA, com uma organização semelhante a outros retrovírus, consistindo de quatro genes codificantes: *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase), *env* (envelope) e *tax/rex* (transativador/regulador da expressão) (Figura 6A). As extremidades do genoma proviral são flanqueadas por duas regiões repetidas, chamadas de LTR (“Long Terminal Repeats”), cujas seqüências são essenciais para a integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro e também para a regulação transcricional do genoma do HTLV. As regiões LTR contêm as seqüências não-codificantes U5 e U3 nas extremidades 5’ e 3’, respectivamente, e a seqüência repetitiva R em ambas as extremidades (Figura 6A). No processo de transcrição, três mRNA são produzidos:

- 1- O mRNA genômico, utilizado para a síntese dos produtos dos genes *gag* e *pol*, transcritos da junção U3-R na extremidade LTR5’ até a junção R-U5 na extremidade LTR3’ (Figura 6B e 6C).
- 2- Um mRNA sub-genômico, sintetizado a partir de uma única etapa de processamento e que codifica do produto do gene *env* (Figura 6B e 6C).
- 3- Um segundo mRNA sub-genômico, duplamente processado através da remoção de dois íntrons, que codifica as proteínas regulatórias Tax e Rex com, pelo menos, quatro fases de leitura aberta (ORF – do inglês, “Open Read Frame”) (Figura 6B e 6C).



**Figura 6** – Organização genômica do HTLV-1. (A): DNA proviral do HTLV. (B): Indicação dos genes e suas proteínas codificadas. (C): Principais mRNA do HTLV produzidos durante a transcrição (adaptado de Cann & Chen, 1996).

O ciclo de multiplicação do HTLV-1 é semelhante ao dos demais retrovírus, dependente da presença da transcriptase reversa e sendo caracterizado pela existência de 5 etapas (Figura 7):

1<sup>a</sup>. Etapa – A partícula viral liga-se ao seu receptor na membrana celular através do domínio de ligação ao receptor (RBD) localizado na glicoproteína de superfície (SU) (Battini *et al.*, 2003; Coskun & Sutton, 2005).

2<sup>a</sup>. Etapa – A proteína transmembrana (TM), após a ligação da SU ao receptor, apresenta mudanças conformacionais que são importantes para a fusão com a membrana e introdução do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (Battini *et al.*, 2003; Coskun & Sutton, 2005).

3<sup>a</sup>. Etapa – A fita simples de RNA é reversamente transcrita em um DNA de fita dupla pela transcriptase reversa. Durante a transcrição, o RNA molde é removido pela atividade da RNase H da enzima transcriptase reversa. A Integrase, então, insere o DNA viral no núcleo da célula hospedeira. Esse processo marca o fim da fase inicial do ciclo de multiplicação do vírus e inicia a fase tardia, mediada por enzimas do hospedeiro (Seiki *et al.*, 1984).

4<sup>a</sup>. Etapa – Ocorre a síntese do RNA viral tendo como molde o DNA proviral integrado no genoma do hospedeiro. A síntese de RNA viral leva à formação de um transcrito primário, que é processado para formar os mRNA e o RNA genômico. As proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir dos mRNA. Este passo é regulado pelas proteínas virais Tax e Rex (Seiki *et al.*, 1984).

5<sup>a</sup>. Etapa – Por último, a partícula viral é montada e, por brotamento, o vírus é liberado da superfície celular pronto para infectar novas células (Cann & Chen, 1996).

Tem sido sugerido que a transcrição do provírus integrado do HTLV-1 é iniciada pela ativação da resposta imune, pelo estresse celular e pelas vias de transdução de sinal intracelular e estes mecanismos podem ativar a expressão do vírus latente (Andrews *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2005).

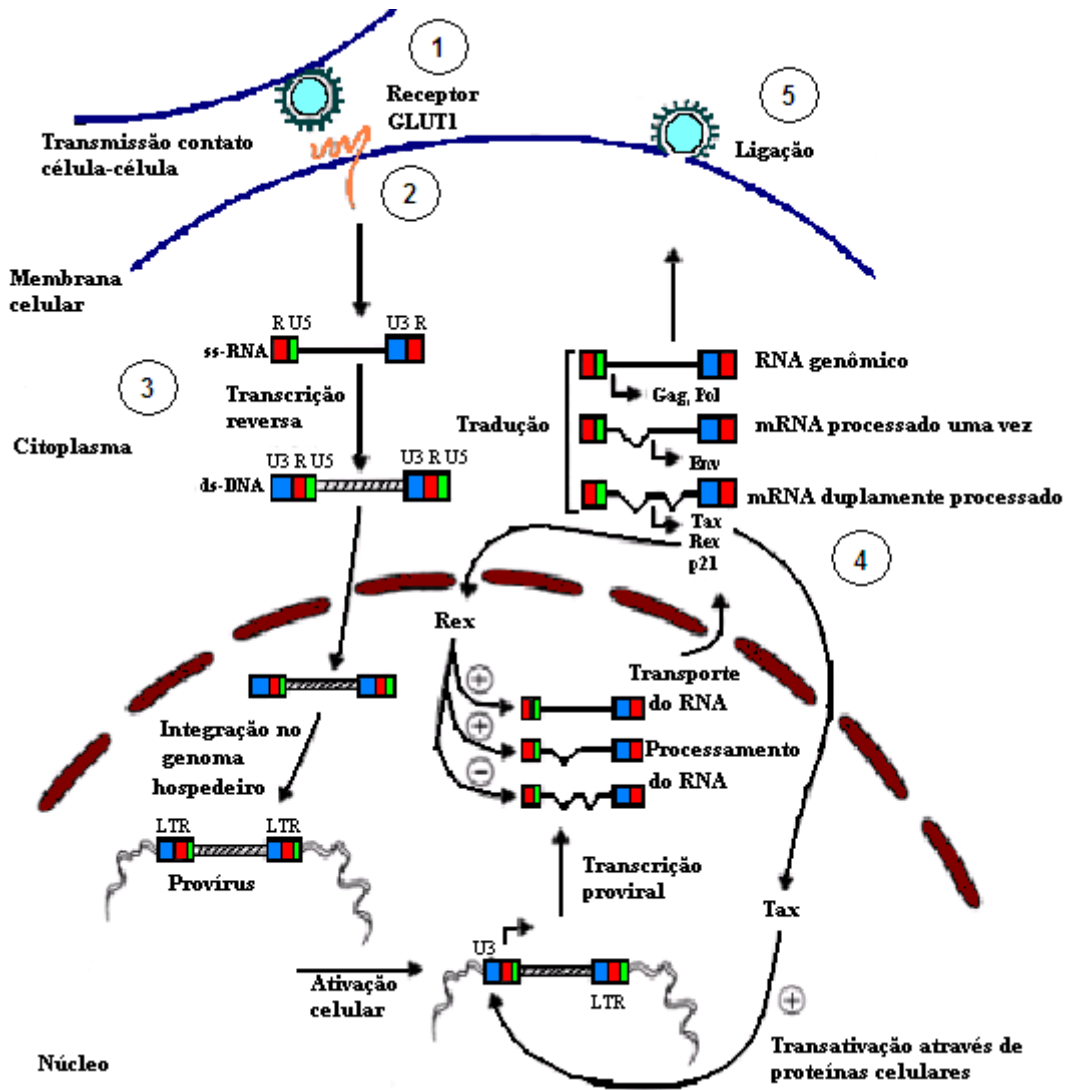
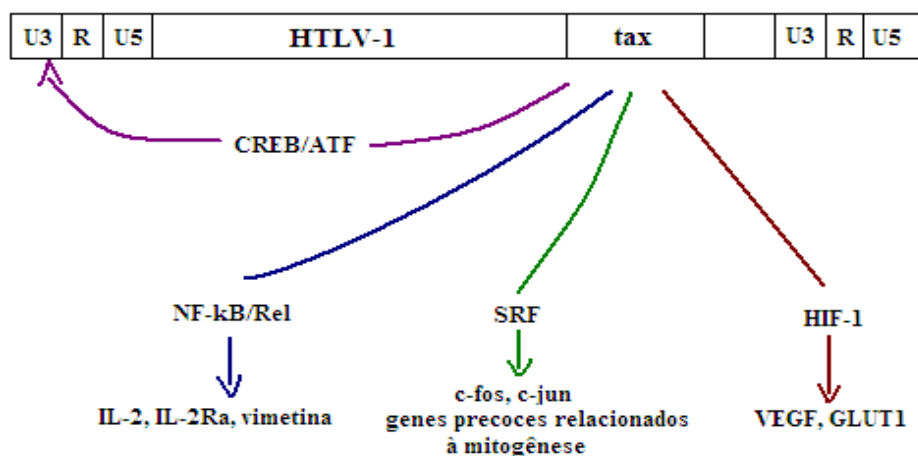


Figura 7- Ciclo de replicação do HTLV-1 (adaptado de Alcântara, 2002)

O HTLV-1 tem tropismo por células T CD4<sup>+</sup>, entretanto, ele apresenta a capacidade de infectar outras células não-T, incluindo monócitos e linfócitos B (Richardson *et al.*, 1990; Ijichi *et al.*, 1992). Dados sugerem que o HTLV-1 é um vírus pouco replicativo e que a replicação viral *in vivo* ocorre mais devido à expansão clonal das células infectadas via mitose do que via transcrição reversa (Wattel *et al.*, 1995; Cimarelli *et al.*, 1996). O HTLV-1 é transmitido célula-célula utilizando uma “sinapse virológica” induzida, ou seja, o vírus facilita a junção das células infectadas com a não-infectada promovendo a passagem viral, através do acúmulo de proteínas virais e celulares (Bangham *et al.*, 2003). A infecção, transformação e imortalização das células-T *in vivo* e posterior expansão monoclonal das células infectadas são as causas da ATLL em pacientes com HTLV-1 (Cann & Chen, 1996).

Dentre as proteínas virais, Tax é uma fosfoproteína de 40kDa, que é essencial para a replicação do HTLV-1 e para a transformação celular. Esta proteína estimula a expressão dos genes virais, através de sua interação com fatores celulares e com a região U3 da LTR do genoma proviral, a qual contém elementos conservados de resposta a Tax (TRE). Na patogênese do HTLV-1, a proteína regulatória Tax viral funciona como o principal agente no desenvolvimento das diferentes doenças associadas à infecção pelo vírus. Na ATLL, a capacidade transativadora de Tax leva ao descontrole do processo de proliferação celular (Yoshida M., 2001). Na TSP/HAM, a proteína Tax capacita às células infectadas a transporem a barreira hemato-encefálica, desencadeando, dessa forma, uma resposta inflamatória local crônica, a qual está diretamente relacionada com desenvolvimento desta patologia (Cavrois *et al.*, 2001).

Além de regular a expressão de genes da LTR viral, Tax interage com fatores de transcrição celulares (CREB/ATF, NF- $\kappa$ B, SRF, entre outros) e moléculas de sinalização para estimular ou reprimir a expressão de genes celulares. Esta proteína viral também induz o aumento da expressão de várias citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação de células-T, fatores de transcrição, como HIF-1 (Fator de Indução de Hipóxia do tipo 1), e proto-oncogenes. Além dessa atividade transativadora, Tax é capaz de reprimir a expressão, ou mesmo inativar, um conjunto de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, podendo inibir o reparo do DNA e os eventos de morte celular programada (para revisão ver Franchini, 1995) (Figura 8).



**Figura 8** - As três vias de transativação por Tax. (adaptado de Franchini, 1995).



Embora este vírus tenha sido convincentemente associado a doenças, como TSP/HAM e ATLL, a grande maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática (96-98%). Ainda não se sabe por que isto ocorre e ainda porque alguns indivíduos desenvolvem TSP/HAM, uma síndrome neurológica, enquanto outros desenvolvem ATLL. Assim, as diversas manifestações clínicas podem depender do tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro para os antígenos do HTLV-1, bem como do local ou órgão no qual a reação inflamatória predominantemente acontece. Fatores relacionados a variantes genéticas do vírus, como variação na seqüência do gene *tax* (Furukawa *et al.*, 2000; Sabouri *et al.*, 2005), fatores do hospedeiro, como certos antígenos leucocitários humanos (HLA) (Sonoda *et al.*, 1992; Jeffery *et al.*, 1999) e polimorfismos em genes de citocinas, como IL-6, IL-10 e IL-2, bem como fatores ambientais, como idade, modo de transmissão e características étnicas (Miller *et al.*, 1994; Vine *et al.*, 2002; Gadelha *et al.*, 2005; Sabouri *et al.*, 2005), têm sido sugeridos como importantes na manifestação de doença em indivíduos infectados.

A observação de que o genótipo G/C do polimorfismo -174 da Interleucina 6 (IL-6) está associado com o aumento da carga proviral e a diminuição nos níveis de osteocalcina nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos de Salvador-BA sugere que estes pacientes podem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de osteoporose ou osteopenia no futuro, indicando que fatores genéticos do hospedeiro podem estar envolvidos com o desenvolvimento de patologias (Gadelha *et al.*, 2007 *Submetido*).

A carga proviral do HTLV-1 representa o número de cópias de DNA proviral integrado no genoma de uma determinada proporção de células (Ho *et al.*, 1989). Foi demonstrado que o aumento do número de células infectadas com o vírus, depois de um longo período de latência, é considerado um importante marcador para o desenvolvimento de TSP/HAM (Jeffery *et al.*, 2000) e que uma elevada carga proviral é característica de pacientes com TSP/HAM, quando estes são comparados aos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos (Nagai *et al.*, 1998; Sabouri *et al.*, 2005). Além disso, Sabouri e colaboradores (2005) demonstraram que pacientes Iranianos assintomáticos apresentaram uma carga proviral maior do que pacientes assintomáticos do Japão e que a variação dos subtipos de *tax* (*tax A* e *tax B*) também estava relacionada com o desenvolvimento de TSP/HAM.

Em 2005, Coskun e Sutton demonstraram que a expressão da proteína transportadora de glicose do tipo 1 (GLUT1) na membrana celular confere aumento na susceptibilidade ao HTLV-1. Foi, então, demonstrado que o HTLV-1 é capaz de utilizar a molécula de GLUT1 para entrar no linfócito T CD4<sup>+</sup>. A proteína GLUT1, apesar de sua expressão em toda a célula, está especificamente concentrada em regiões móveis da membrana e em áreas de contato célula-célula. O contato célula infectada-célula não-infectada e movimentos orientados do citoesqueleto parecem ser requeridos para a infecção viral. Isto sugere que o receptor do envelope do HTLV-1 se associa com o citoesqueleto. Tem sido sugerido que a infecção pelo HTLV-1 é facilitada pela formação de uma “sinapse virológica”, que acumula proteínas estruturais do HTLV-1 e marcadores de ativação de células T, entre células infectadas e não-infectadas (Bangham *et al.*, 2003). Em 2007, Afonso e colaboradores verificaram o aumento da expressão de GLUT1 nos infiltrados da neurópila (conjunto de fibras nervosas situadas na zona ganglionar que influenciam as sinapses interneuronais) em pacientes com TSP/HAM e que a expressão de GLUT1 nas células endoteliais do cérebro humano (hBEC) possibilitou a fusão destas células com linfócitos infectados pelo HTLV-1. O aumento da densidade da GLUT1 na superfície celular durante a sinapse pode explicar porque a transmissão célula-célula é muito mais eficiente que a infecção livre de célula.

Recentemente, Tornita e colaboradores (2007) demonstraram que a proteína Tax do HTLV-1, em células primárias de ATLL, através de sua atividade transativadora, induz a ligação do fator de transcrição HIF-1 ao DNA celular e, através do aumento da expressão da subunidade  $\alpha$  de HIF-1, induz sua atividade transcricional via ativação da sinalização de PI3K/AKT. Este aumento da expressão de HIF-1 $\alpha$ , poderia, dessa forma, facilitar a ligação de HIF-1 ao HRE no promotor de GLUT1, aumentando a expressão da proteína GLUT1 na célula infectada pelo vírus.

Tem sido sugerido que polimorfismos em promotores gênicos podem resultar no aumento da expressão das proteínas codificadas pelos mesmos (Woo *et al.*, 1998; Licastro *et al.*, 2003). Mutações nas regiões regulatórias e codificante do gene da GLUT1 que têm potencial para modular a expressão do gene, seja por localizarem-se em sítios de ligação de fatores de transcrição, seja por estarem em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos verdadeiramente funcionais, podem influenciar a expressão da proteína GLUT1 na célula e a susceptibilidade à infecção pelo HTLV-1. Entretanto, não existem estudos que tratam da associação entre polimorfismos no gene

de GLUT1 e a infecção pelo vírus. O aumento da expressão da GLUT1 na membrana celular poderia facilitar a entrada do vírus na célula e a transmissão do mesmo, via contato célula-célula, podendo levar a um aumento na carga proviral e, posteriormente, ao desenvolvimento da TSP/HAM. Dessa forma, polimorfismos nessas regiões poderiam explicar as diferentes manifestações de doenças associadas ao HTLV-1 e a permanência do estado assintomático na maioria dos indivíduos infectados.

O estudo dos polimorfismos nas regiões regulatórias e codificante do gene da GLUT1 associados com a carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, podem ser úteis para a compreensão do mecanismo de infecção do vírus e do desenvolvimento das manifestações clínicas associadas.

### 3- OBJETIVOS

**Geral:** Verificar possíveis associações entre polimorfismos nas regiões regulatórias e codificante do gene humano da GLUT1 com a infecção pelo HTLV-1 e com o desenvolvimento de TSP/HAM.

**Específicos:**

- Verificar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C nas regiões regulatória e codificante do gene humano da GLUT1 em indivíduos soronegativos de Salvador-Ba; Ameríndios da tribo Tiryiό; descendentes de europeus da região Sul; afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste.
- Verificar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos XbaIG>T, -2841A>T e HaeIIIT>C nas regiões regulatórias e promotora do gene humano da GLUT1 em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não-infectados de Salvador-BA.
- Quantificar a carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 do estudo.
- Correlacionar os polimorfismos detectados no gene humano da GLUT1 com a infecção pelo HTLV-1, com o desenvolvimento da doença neurológica e com a carga proviral.

## 4-JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HTLV-1 é endêmica em diferentes regiões geográficas do mundo, sendo Salvador a cidade do Brasil com a mais alta prevalência (1,8% na população geral) (Dourado *et al.*, 2003). O desenvolvimento das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1, entretanto, ocorre apenas em uma pequena proporção de indivíduos infectados (2-4%). O motivo da infecção pelo HTLV-1 resultar em uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos, bem como porque alguns indivíduos desenvolvem TSP/HAM e outros ATLL, uveíte ou dermatite infectiva são questionamentos importantes e que precisam ser respondidos. Tem sido sugerido que o desfecho da infecção pode ser devido a variações (mutações) em genes virais e/ou do hospedeiro. Um estudo realizado por Gadelha e colaboradores demonstrou uma associação entre o genótipo G/C do polimorfismo -174 da Interleucina 6 (IL-6) com o aumento da carga proviral do HTLV-1 e a diminuição nos níveis de osteocalcina nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos de Salvador-BA, sugerindo que os pacientes que apresentam tal genótipo podem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de osteoporose ou osteopenia no futuro e indicando o envolvimento de fatores genéticos do hospedeiro com o desenvolvimento de patologias (Gadelha *et al. Submetido*).

A carga proviral do HTLV-1 tem sido considerada um importante fator para o desenvolvimento de TSP/HAM. Interessantemente, entretanto, alguns indivíduos assintomáticos apresentam carga proviral tão alta quando indivíduos com TSP/HAM. A análise destes indivíduos, com *status* clínico diferente e mesma carga proviral, demonstrou que células de pacientes assintomáticos produzem menores níveis das citocinas inflamatórias: TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) (Nishimura *et al.*, 2000), sugerindo que esta baixa produção seria importante para a manutenção do estado assintomático, e que outros fatores, além da carga proviral, também devem influenciar a sintomatologia da infecção (Furukawa *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que pacientes Iranianos assintomáticos apresentaram uma carga proviral maior do que pacientes assintomáticos do Japão e que a variação dos subtipos de tax (tax A e tax B) também estava relacionada com o desenvolvimento de TSP/HAM (Sabouri *et al.*, 2005).

Polimorfismos no gene humano da GLUT1 (proteína utilizada pelo HTLV-1 para infectar linfócitos T CD4<sup>+</sup>) localizados nas regiões regulatórias (incluindo a região promotora) e codificantes podem ser analisados como possíveis candidatos que afetam a produção da proteína e sua expressão na célula, alterando a susceptibilidade à infecção pelo vírus. De fato, alguns SNPs já foram associados com susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças relacionadas à funcionalidade da proteína GLUT1 (Ng *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005). Essas são importantes razões para estudar polimorfismos no gene da GLUT1, e sugerir que diferenças entre assintomáticos e indivíduos com TSP/HAM podem ser, pelo menos em parte, resultado destas mutações. Entretanto, não existem estudos descritos na literatura que tratem da análise destes SNPs em GLUT1 no contexto da infecção pelo HTLV-1 e no desenvolvimento das patologias associadas a ele.

Uma vez verificada uma associação entre esses polimorfismos e o desenvolvimento de TSP/HAM, temos como perspectiva determinar o papel funcional e biológico dos mesmos. É possível que SNPs no gene da GLUT1, *per si*, não venham a explicar a doença, mas a identificação da influência coletiva dos vários polimorfismos e sua interação poderá nos ajudar na melhor compreensão da patogenia do HTLV-1 e auxiliar na predição de tratamentos e técnicas de prevenção mais adequadas. Além disso, polimorfismos no gene humano da GLUT1 ainda não foram estudados na população brasileira com diferentes contribuições étnicas.

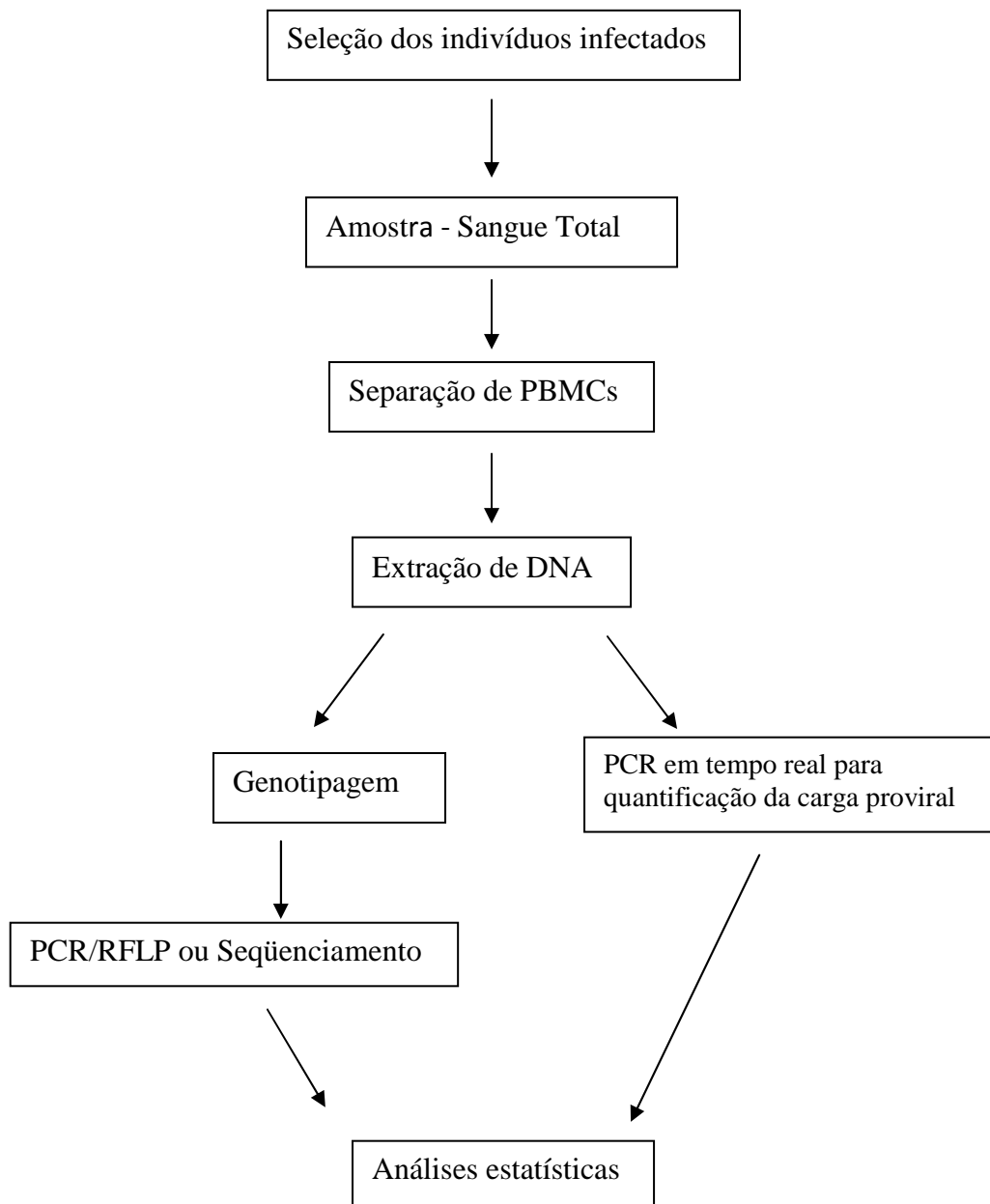
## 5- MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1- DESENHO EXPERIMENTAL

-Tipo de Estudo: Corte Transversal

-Tipo de Amostra: de conveniência

#### Desenho Esquemático da Metodologia



## 5.2- CASUÍSTICA

As amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são provenientes do Centro de HTLV/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências/CPqGM-FIOCRUZ, Salvador-Bahia e da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, São Paulo. Foram estudadas 244 amostras, das quais 136 de pacientes assintomáticos (77 de Salvador e 59 de Ribeirão Preto), 18 de pacientes oligosintomáticos (pacientes com sintomas relacionados ao HTLV-1, porém sem TSP/HAM de Salvador) e 90 de pacientes com TSP/HAM (42 de Salvador e 48 de Ribeirão Preto). Os indivíduos portadores de HTLV-1 foram informados sobre os procedimentos e condutas quanto à coleta do material biológico e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 3).

Como controle, foram avaliados 102 indivíduos soronegativos, não aparentados, para o HTLV-1, representativos da população geral de Salvador. Esta cidade foi colonizada, principalmente, por africanos e europeus resultando em uma população com maior contribuição genética africana e européia. Estas amostras foram coletadas de áreas sentinelas da cidade de Salvador, compreendendo bairros de classe média e principalmente áreas do subúrbio da cidade, para avaliação das condições de saneamento básico antes e depois da implantação do projeto Bahia Azul (Dourado *et al.*, 2003). Nestas áreas sentinelas há uma maior prevalência de indivíduos de cor preta e mulata, além de possuírem uma baixa renda mensal. A amostragem controle utilizada é de conveniência, proveniente do projeto de saneamento básico, Bahia-Azul, da cidade de Salvador. Tais amostras estão estocadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Bahia e os indivíduos doadores das mesmas não têm sua identidade conhecida (amostras anônimas não vinculadas).

Para realizar o estudo de base populacional, foi analisado um total de 85 amostras de Ameríndios da tribo Tiriyo do norte do Brasil, coletadas para um estudo anterior realizado por Shindo e colaboradores em 2002; 56 amostras de indivíduos descendentes de europeus (alemães), provenientes do banco de sangue de Joinville (Estado de Santa Catarina), região Sul (coletadas para estudo prévio de Grimaldi e colaboradores, 2002); 41 amostras de indivíduos descendentes de japoneses, 44 amostras de descendentes de europeus e 42 amostras de afro-descendentes. As amostras



dos 3 últimos grupos são provenientes da Fundação Hemocentro Ribeirão Preto (São Paulo), região Sudeste do Brasil, e os critérios estabelecidos para seleção foram baseados em uma ascendência familiar pura nas duas gerações precedentes, ou seja, foram selecionados os indivíduos que informaram ter os quatro avós do mesmo grupo étnico e na ausência de parentesco entre eles (Abe-Sandes. 2002).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (Anexo 1)

### **Definição dos grupos de estudo:**

**Pacientes com TSP/HAM:** diagnóstico de TSP/HAM, de acordo com o Escore de desabilidade motora de Osame (OMDS). Quadro clínico: fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores, distúrbios esfinterianos, sinais sensitivos objetivos pobres ou ausentes, síndrome tetrapiramidal.

**Oligossintomáticos:** pacientes HTLV-1 positivos relatando algumas das seguintes manifestações neurológicas: fraqueza muscular proximal, mialgias, disfunção esfinteriana, disfunção erétil, constipação intestinal, urgência/incontinência/retenção urinária, porém não preenchendo os critérios para TSP/HAM, de acordo com o OMDS.

**Assintomáticos:** indivíduos HTLV-1 positivos sem qualquer manifestação de sintomas relacionados à infecção pelo vírus.

**Soronegativos:** indivíduos da população de Salvador com sorologia negativa para HTLV-1, provenientes do projeto de saneamento básico, Bahia-Azul; indivíduos afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses provenientes da região Sudeste (Ribeirão Preto); Ameríndios da tribo Tiryó do Norte do Brasil e descendentes de europeus (alemães) da região Sul (Joinville).

### **Critérios de Seleção**

#### **Critérios de inclusão:**

Pacientes HTLV-1 positivos atendidos no Centro de HTLV com *status* clínico definido.

**Critérios de exclusão**

Recusa em participar do estudo.

**5.3- ANÁLISE LABORATORIAL****Diagnóstico Laboratorial**

As amostras dos indivíduos infectados e não-infectados pelo HTLV-1 utilizadas neste estudo foram triadas para anticorpos anti-HTLV-1/2 por ELISA (HTLV-1 rp21, enhanced, EIA, Cambridge Biotech Corporation) e aquelas repetidamente reativas foram confirmadas e discriminadas entre HTLV-1 e HTLV-2 através do Western Blot (HTLV-1 Blot 2.5, Genelabs Diagnostics, Singapore). O diagnóstico para o HTLV foi realizado no Centro de HTLV/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências/CPqGM-FIOCRUZ, Salvador-Bahia e na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, São Paulo.

**Extração de DNA**

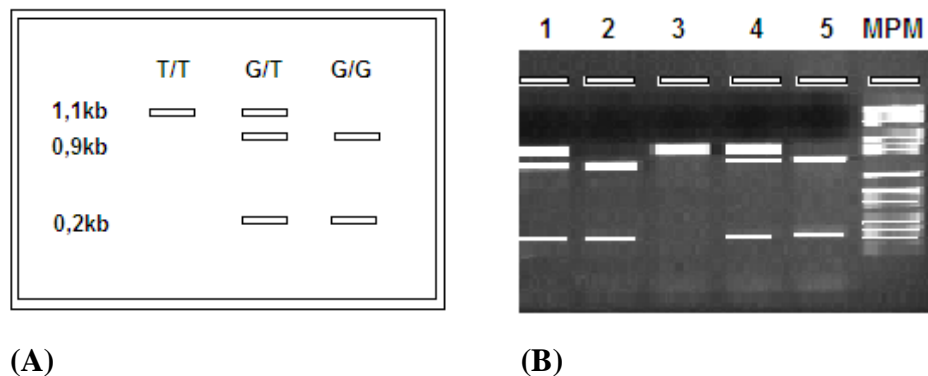
As amostras de DNA de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram extraídas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e separadas após a coleta de 10 ml sangue total com tubo *vacutainer* (Labnew Ltda. SP – BRA). As amostras de sangue (10ml) dos indivíduos soronegativos já se encontravam estocadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Bahia. A extração do DNA foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio (Panasci *et al.*, 1977).

**Análise dos SNPs no Gene Humano da GLUT1**

Para genotipar as amostras, foram estudados um SNP (XbaIG>T) na região regulatória da GLUT1, um SNP (-2841A>T) na região promotora da GLUT1 e um SNP(HaeIIIT>C) na região codificante.

### - Análise do Polimorfismo XbaIG>T

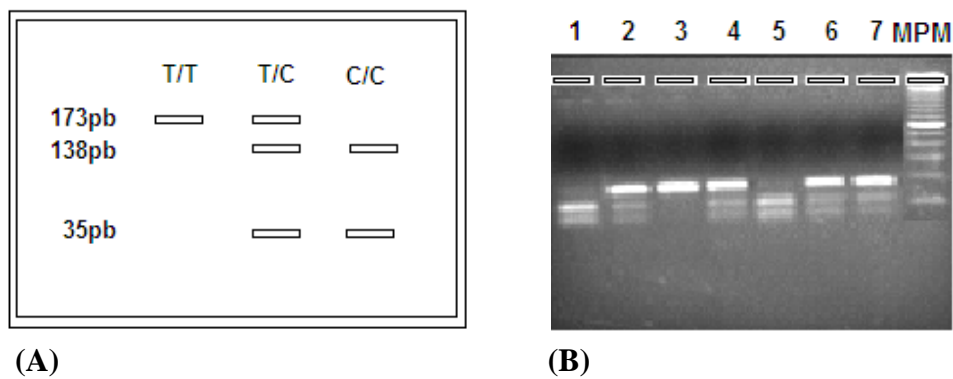
A análise do polimorfismo XbaIG>T foi realizada através da amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os “primers” 5’TGTGCAACCCATGAGCTAA3’(F) e 5’CCTGGTCTCATCTGGATTCT3’(R). Os parâmetros de termociclagem foram: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos (Ng *et al.*, 2002). Os produtos da PCR de 1,1Kb foram então digeridos utilizando a enzima de restrição XbaI a 37°C durante a noite. O polimorfismo XbaIG>T caracteriza-se por uma substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) na posição +22999 no íntron 2 do gene da GLUT1 que abole o sítio de reconhecimento da enzima de restrição XbaI. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1,2%, podendo haver fragmentos de 1,1kb, referente ao genótipo homozigoto mutante (T/T); 0,9kb e 0,2kb, referentes ao genótipo homozigoto selvagem (G/G); 1,1kb, 0,9kb e 0,2kb, referindo-se ao genótipo heterozigoto (G/T) (Figura 9). Foram analisados 244 indivíduos infectados pelo HTLV-1, dos quais 136 eram pacientes assintomáticos, 18 oligosintomáticos e 90 com TSP/HAM; 102 indivíduos soronegativos de Salvador-BA; 85 Ameríndios da tribo Tiryó; 56 descendentes de europeus (alemães) da Região Sul; 41 descendentes de japoneses, 44 descendentes de europeus e 42 afro-descendentes da região Sudeste.



**Figura 9-** (A) Esquema do padrão de restrição (RFLP) para o fragmento digerido com a enzima XbaI. (B) Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio, como exemplo da genotipagem para o polimorfismo XbaIG>T no gene da GLUT1 após RFLP com a enzima de restrição XbaI. **Amostras 1 e 4:** fragmentos de 1,1kb, 0,9kb e 0,2kb equivalentes ao genótipo heterozigoto (G/T); **2 e 5:** bandas de 0,9kb e 0,2k referentes ao genótipo homozigoto selvagem (G/G); **3:** fragmento de 1,1kb equivalente ao genótipo homozigoto mutante (T/T); **MPM:** marcador de peso molecular de 100pb.

### - Análise do Polimorfismo *HaeIII*>C

O polimorfismo *HaeIII*>C foi verificado através da realização da PCR utilizando os seguintes “primers”: 5’CTCCCAGACACGCCTATAACAGT3’ (F) e 5’GGCTGGTGTCCATAAGCCAACG3’ (R). Os parâmetros de termociclagem utilizados foram: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 66°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto da PCR de 173pb foi submetido à RFLP utilizando a enzima de restrição *HaeIII* a 37°C durante a noite, conforme descrito previamente na literatura (Ng *et al.*, 2002). Este polimorfismo caracteriza-se por uma substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) na posição +15339 no éxon 2 do gene de GLUT1, criando o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *HaeIII*. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 2,0%, podendo haver fragmentos de 173pb, referindo-se ao genótipo homozigoto selvagem (T/T); 138pb e 35pb, referentes ao genótipo homozigoto mutante (C/C); 173pb, 138pb e 35pb, referindo-se ao genótipo heterozigoto (T/C) (Figura 10). Foi analisado um total de 614 amostras para este polimorfismo (136 indivíduos assintomáticos, 18 oligosintomáticos, 90 com TSP/HAM, 102 indivíduos não-infectados de Salvador-BA, 85 indivíduos da tribo Tiriyó, 56 descendentes de europeus da região Sul e 41 descendentes de japoneses, 44 descendentes de europeus e 42 afro-descendentes da região Sudeste).



**Figura 10** – (A) Esquema do padrão de restrição para o fragmento digerido com a enzima *HaeIII*. (B) Gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, como exemplo da genotipagem para o polimorfismo *HaeIII*>C no gene da GLUT1 após RFLP com a enzima de restrição *HaeIII*. **Amostras 1 e 5:** fragmentos de 138pb e 35pb equivalentes ao genótipo homozigoto mutante (C/C); **2, 4, 6 e 7:** bandas de 173pb, 138pb e 35pb referentes ao genótipo heterozigoto (T/C); **3:** fragmento de 173pb equivalente ao genótipo homozigoto selvagem (T/T); **MPM:** marcador de peso molecular de 100pb.

***-Análise do Polimorfismo -2841A>T***

O polimorfismo -2841A>T consiste da substituição de uma adenina (A) para uma timina (T) na posição -2841 na região promotora do gene da GLUT1. Sua análise foi realizada por Sequenciamento. Os produtos da PCR de 339pb amplificados com os “*primers*” 5’GCTGAGAATGGCCTTCCCTCAAT3’(F) e 5’GTCTGCCTTACTCAGCCCATGGGTC3’(R) foram purificados usando o kit “QIAquick PCR Purification” da QIAGEN (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Posteriormente, as seqüências e os eletroferogramas gerados a partir do seqüenciador automático 3100 ABI Prism foram analisados utilizando o programa SeqScape software (Applied Biosystems). As variações nas seqüências foram confirmadas nos programas BioEdit (Hall TA, 1999) e GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997). Foi seqüenciado um fragmento de 339pb de um total de 180 amostras (53 assintomáticos, 18 oligosintomáticos, 54 TSP/HAM e 55 soronegativos da população geral de Salvador) utilizando os mesmos “*primers*” da PCR.

**Detecção da Carga Proviral do HTLV-1**

A carga proviral do HTLV-1 em PBMC de indivíduos infectados foi determinada através da PCR quantitativa em tempo real utilizando o sistema TaqMan através do aparelho ABI Prism 7700 (PE-Applied Biosystems). O princípio da TaqMan PCR em tempo real é baseado na clivagem de uma sonda interna anelada à seqüência-alvo através da atividade exonucleásica 5’-3’ da Taq polimerase durante a fase de extensão. A clivagem da sonda libera, então, uma fluorescência que é medida em tempo real. A quantificação do DNA da albumina humana foi realizada em paralelo em todas as amostras com o intuito de determinar a quantidade de DNA celular presente e foi utilizada como controle interno para normalizar as variações existentes em decorrência das diferenças na contagem de PBMC e/ou extração de DNA. Todas as amostras de pacientes foram amplificadas em duplicata e o valor médio do número de cópias foi utilizado para quantificar o DNA do HTLV-1 e da albumina. A quantidade de provirus foi calculada pela taxa de (número de cópias do gene *pol* do HTLV-1)/(número de cópias do gene da albumina humana) X 2 X 10<sup>6</sup>. Foram utilizados os “*primers*” TAX1 (5’CGGATACCCIGTCTACGTGTTT3’) e TAX2 (5’CTGAGCIGAIACGCGTCCA 3’) e a sonda TAX3 (6FAM-ATCACCTGGGACCCCATCGATGGTAMRA) para amplificação do DNA proviral (Dehée *et al.*, 2002).

#### **5.4- ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Nas análises dos polimorfismos, as frequências alélicas foram estimadas por contagem direta dos alelos. A concordância das frequências genotípicas com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e observação da existência de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foram testadas utilizando o Genepop v3.4 (Raymond & Rousset, 1995). A análise de associação entre estes polimorfismos e TSP/HAM foi avaliada pelo cálculo de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher. A diferença da mediana da carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney U e pelo teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Duns. Um valor de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo.

## 6- RESULTADOS

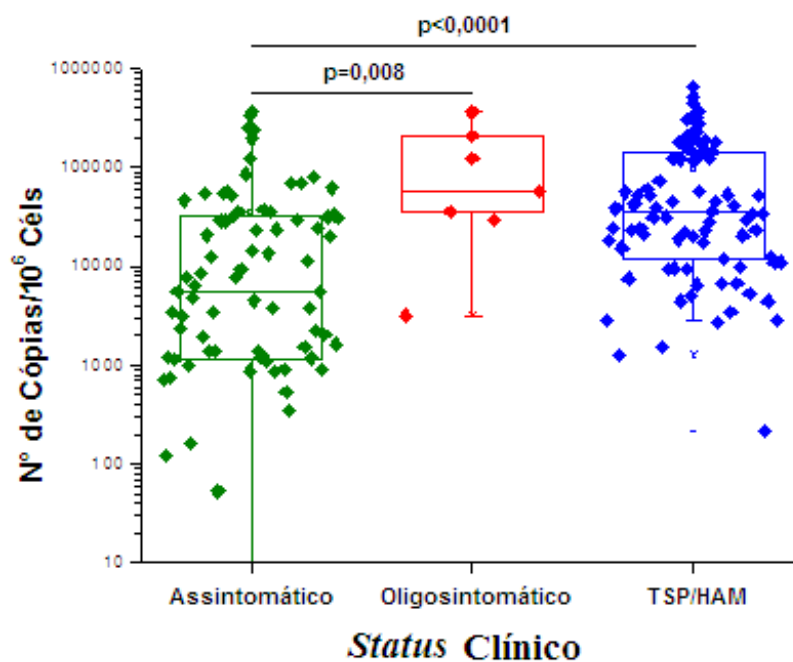
A metodologia e os resultados detalhados deste estudo estão contidos nos manuscritos anexados (manuscritos 1 e 2). A população estudada compreendeu indivíduos portadores do HTLV-1 provenientes do Centro de HTLV/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências/CPqGM-FIOCRUZ, Salvador-Bahia e da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, São Paul; indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 representativos da população geral de Salvador; afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste; indivíduos da tribo Tiriyo e descendentes de europeus (alemães) da região Sul, totalizando 614 amostras genotipadas para os polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C e 180 amostras para o polimorfismo -2841A>T do gene da GLUT1. Todas as análises foram realizadas separadamente nas populações de indivíduos infectados pelo HTLV-1 de Salvador e de Ribeirão Preto. Não foram verificadas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas quando estas populações foram estratificadas ( $p>0,05$ ). Por esse motivo, compilamos as populações de indivíduos portadores de HTLV-1, provenientes de Salvador e de Ribeirão Preto, em um único grupo. As amostras de indivíduos infectados, com dados relativos à carga proviral, idade e gênero disponíveis, foram classificadas de acordo com o *status* clínico e os pacientes foram, então, caracterizados em relação à idade e gênero (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização dos pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com a idade e o gênero

<i>Status</i> Clínico	n	Média da idade (Min-Max)	Gênero n (%)	
			M	F
<b>Assintomático</b>	98	40 (2-64)	33 (33,7)	65 (66,3)
<b>Oligosintomático</b>	7	45 (30-53)	3 (42,9)	4 (57,1)
<b>TSP/HAM</b>	88	52 (15-74)	30 (34,0)	58 (66,0)
<b>Total</b>	193	45,7	66 (34,2)	127 (65,8)

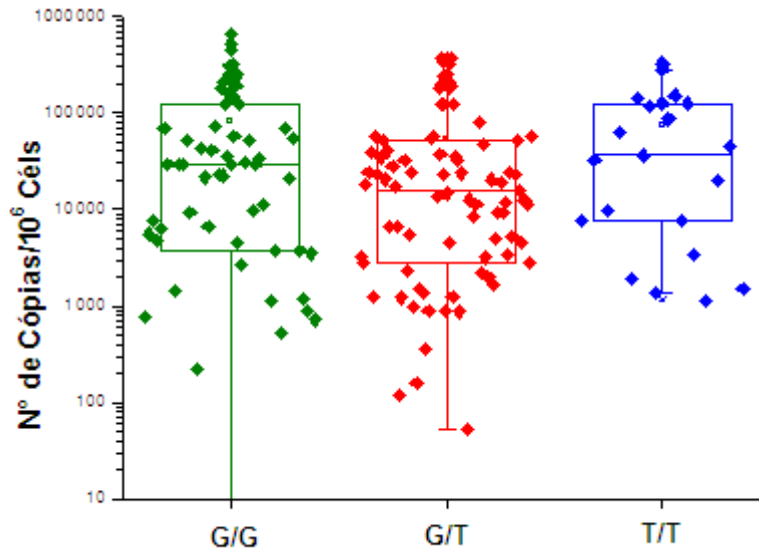
n= número de amostras; M= gênero masculino; F= gênero feminino

A quantificação da carga proviral foi realizada em 178 amostras das 193 com dados de idade e gênero disponíveis (85 assintomáticos, 86 com TSP/HAM e 7 oligosintomáticos). As demais amostras (n=15) não tiveram a quantificação da carga proviral realizada, pois os pacientes diagnosticados para o HTLV-1 não retornaram ao Centro de referência de HTLV, em Salvador, para a coleta de sangue destinada para esta finalidade. A mediana da carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos assintomáticos foi de  $5.460 \times 10^6$  ( $\log_{10}=3,74$ ), nos indivíduos oligosintomáticos foi de  $56.696 \times 10^6$  ( $\log_{10}=4,75$ ) e nos pacientes com TSP/HAM foi de  $35.466,5 \times 10^6$  ( $\log_{10}=4,55$ ). A carga proviral nos indivíduos assintomáticos foi significativamente menor do que nos pacientes oligosintomáticos ( $p=0,008$ ) e com TSP/HAM ( $p<0,0001$ ). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significante quando a mediana da carga proviral do HTLV-1 foi comparada entre os pacientes oligosintomáticos e com TSP/HAM ( $p=0,3627$ ) (Figura 11). A comparação das medianas das cargas provirais nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com os genótipos dos polimorfismos estudados não revelou diferença estatisticamente significante (Figuras 12, 13 e 14).

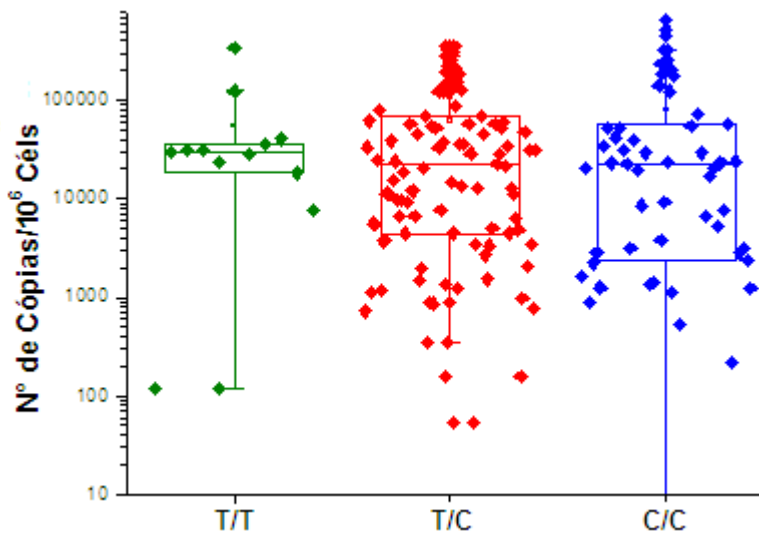


**Figura 11-** Mediana da carga proviral do HTLV-1 em indivíduos assintomáticos, oligosintomáticos e com TSP/HAM, representada como cópias do HTLV-1 por  $10^6$  células mononucleares e determinada por PCR quantitativo em tempo real.

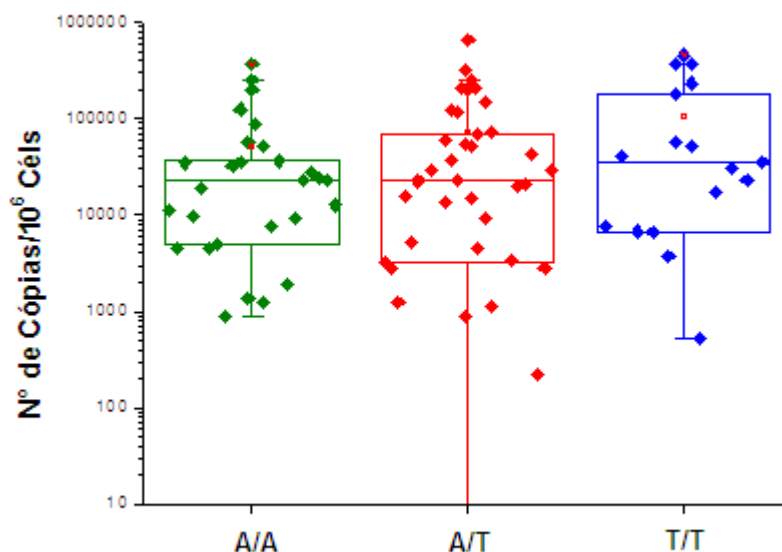




**Figura 12-** Comparação dos genótipos do polimorfismo XbaIG>T com a mediana da carga proviral do HTLV-1.  $p>0,05$



**Figura 13-** Comparação dos genótipos do polimorfismo HaeIIIT>C com a mediana da carga proviral do HTLV-1.  $p>0,05$



**Figura 14-** Comparação dos genótipos do polimorfismo -2841A>T com a mediana da carga proviral do HTLV-1.  $p>0,05$

A análise do polimorfismo XbaIG>T revelou uma frequência dos alelos G/T nos pacientes assintomáticos de 61,0%/39,0%, nos oligosintomáticos de 77,8%/22,2% e nos pacientes com TSP/HAM de 61,1%/38,9% (Tabela 2). Foi observado um aumento na frequência do alelo G nos indivíduos oligosintomáticos (77,8%) quando comparados aos pacientes com TSP/HAM (61,1%) ( $\chi^2=3,612$ ,  $p=0,057$ , 1d.f.) e assintomáticos (61,0%) ( $\chi^2=3,825$ ,  $p=0,056$ , 1d.f.) (Tabela 2). Foi observado também um aumento da frequência do genótipo T/T nos pacientes assintomáticos (11,8%) ( $\chi^2=5,113$ ,  $p=0,078$ , 2d.f.) e com TSP/HAM (13,3%) ( $\chi^2=4,199$ ,  $p=0,123$ , 2d.f.) quando comparados aos oligosintomáticos (5,6%) (Tabelas 2). As frequências alélicas e genotípicas não divergiram quando os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram comparados aos não infectados ( $\chi^2=2,004$ ,  $p=0,157$ , 1d.f. e  $\chi^2=2,387$ ,  $p=0,303$ , 2d.f., respectivamente) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e indivíduos não-infectados de Salvador-BA.

	Genótipos			Alelos		
	n	G/G	G/T	T/T	n (%)	n (%)
<b>Infectados<sup>d</sup></b>	244	89 (36,5)	126 (51,6)	29 (11,9)	304 (62,3)	184 (37,7)
<b>TSP/HAM<sup>a,c</sup></b>	90	32 (35,6)	46 (51,1)	12 (13,3)	110 (61,1)	70 (38,9)
<b>Assintomáticos<sup>b,c</sup></b>	136	46 (33,8)	74 (54,4)	16 (11,8)	166 (61,0)	106 (39,0)
<b>Oligosintomáticos<sup>a,b</sup></b>	18	11 (61,1)	6 (33,3)	1 (5,6)	28 (77,8)	8 (22,2)
<b>Soronegativos<sup>d</sup></b>	102	29 (28,4)	57 (55,9)	16 (15,7)	115 (56,4)	89 43,6)

<sup>a</sup>Frequência alélica Oligosintomático X TSP/HAM: p=0,057. <sup>b</sup>Frequência alélica Oligosintomático X Assintomático: p=0,056. <sup>c</sup>Frequência alélica Assintomático X TSP/HAM: p=0,099. <sup>d</sup>Frequência alélica Infectados X Soronegativos: p=0,157

Os resultados do estudo do polimorfismo XbaIG>T em diferentes populações brasileiras revelaram que as frequências alélicas e genótípicas variaram de acordo com a origem étnica da população estudada (Tabela 3). A maior frequência do alelo G foi observada nos descendentes de japoneses da região Sudeste (79,3%) e a menor na população de Ameríndios da tribo Tiriyó (52,4%). Nos Ameríndios, foi observada a maior frequência do genótipo homozigoto mutante (T/T) (28,3%) quando comparados aos demais grupos populacionais. As frequências alélicas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes estão mostradas na Tabela 4.

**Tabela 3.** Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste, população de Salvador, descendentes de alemães da região Sul e Ameríndios da tribo Tiriyó.

	n	Genótipos			Alelos	
		G/G	G/T	T/T	G	T
<b>População de Salvador</b>	102	29(28,0)	57(56,0)	16(16,0)	115(56,0)	89(44,0)
<b>Afro-Descendentes</b>	42	14(33,3)	22(52,4)	6(14,3)	50(59,5)	34(40,5)
<b>Descendentes de europeus</b>	44	27(61,4)	13(29,5)	4(9,1)	67(76,1)	21(23,9)
<b>Descendentes de alemães</b>	56	25(44,6)	24(42,9)	7(12,5)	74(66,1)	38(33,9)
<b>Descendentes de japoneses</b>	41	25(61,0)	15(36,6)	1(2,4)	65(79,3)	17(20,7)
<b>Ameríndios</b>	85	28(32,9)	33(38,8)	24(28,3)	89(52,4)	81(47,6)

**Tabela 4.** Frequências alélicas estatisticamente significantes observadas nas diferentes populações brasileiras estudadas para o polimorfismo XbaIG>T

Alelos	Valor de p
Ameríndios X Descendentes de alemães	0,022
Ameríndios X Descendentes de europeus	0,000
Ameríndios X Descendentes de japoneses	0,000
Descendentes de alemães X Descendentes de japoneses	0,044
Descendentes de europeus X Afro-descendentes	0,020
Descendentes de europeus X População de Salvador	0,001
Descendentes de japoneses X Afro-descendentes	0,006
Descendentes de japoneses X População de Salvador	0,000

Em relação ao polimorfismo HaeIIIT>C, foi observada uma diminuição não significativa na frequência do genótipo C/C e aumento do genótipo T/C entre os pacientes com TSP/HAM (54,4% e 40,2%, respectivamente) e os pacientes oligosintomáticos (50,0% e 38,9%, respectivamente) ( $\chi^2=0,822$ ,  $p=0,663$ , 2d.f.) e assintomáticos (67,2% e 25,7%, respectivamente) ( $\chi^2=5,426$ ,  $p=0,066$ , 2d.f.) (Tabela 5). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os indivíduos infectados pelo HTLV-1 e os soronegativos ( $\chi^2=1,490$ ,  $p=0,222$ , 1d.f.;  $\chi^2=5,111$ ,  $p=0,078$ , 2d.f., respectivamente) (Tabela 5) em relação às frequências alélicas e genotípicas. As frequências alélicas não divergiram significativamente entre os pacientes infectados pelo HTLV-1 ( $\chi^2=1,31$ ,  $p=0,519$ , 2d.f.) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo HaeIIIT>C em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e indivíduos não-infectados de Salvador-BA.

	Genótipos			Alelos	
	n	T/T	T/C	T	C
<b>Infectados<sup>d</sup></b>	250	17 (6,8)	80 (32,0)	114 (22,8)	386 (77,2)
<b>TSP/HAM<sup>a,c</sup></b>	92	5 (5,4)	37 (40,2)	47 (25,5)	137 (74,5)
<b>Assintomáticos<sup>b,c</sup></b>	140	10 (7,1)	36 (25,7)	56 (20,0)	224 (80,0)
<b>Oligosintomáticos<sup>a,b</sup></b>	18	2 (11,1)	7 (38,9)	11 (30,6)	25 (69,4)
<b>Soronegativos<sup>d</sup></b>	102	1 (1,0)	36 (35,3)	38 (18,6)	166 (81,4)

<sup>a</sup>Frequência alélica Oligosintomático X TSP/HAM:  $p=0,462$ . <sup>b</sup>Frequência alélica Oligosintomático X Assintomático:  $p=0,252$ . <sup>c</sup>Frequência alélica Assintomático X TSP/HAM:  $p=0,171$ . <sup>d</sup>Frequência alélica Infectados X Soronegativos:  $p=0,222$

Dentre os grupos de diferentes origens étnicas estudados, foi observada, tal qual o polimorfismo XbaIG>T, uma variação nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo HaeIIIT>C (Tabela 6). A menor frequência do alelo C foi observada na população de Ameríndios da tribo Tiriyo (51,8%) e a maior, na população de Afro-descendentes da região Sudeste (84,5%) (Tabela 6). Nos Afro-descendentes e nos

descendentes de japoneses, foi observada a menor frequência do genótipo homocigoto selvagem (T/T) (0%) quando comparados aos demais grupos populacionais. As frequências alélicas diferiram significativamente apenas entre os Ameríndios e as demais populações brasileiras analisadas ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 6.** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo HaeIII>C em indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 afro-descendentes, descendentes de europeus e descendentes de japoneses da região Sudeste, população de Salvador, descendentes de alemães da região Sul e Ameríndios da tribo Tiriyó.

	Genótipos			Alelos		
	n	T/T	T/C	C/C	T	C
<b>População de Salvador<sup>e</sup></b>	102	1(1.0)	36(35.0)	65(64.0)	38(18.6)	166(81.4)
<b>Afro-descendentes<sup>c</sup></b>	42	0(0.0)	13(30.9)	29(69.1)	13(15.5)	71(84.5)
<b>Descendentes de europeus<sup>b</sup></b>	44	3(6.8)	12(27.3)	29(65.9)	18(20.5)	70(79.5)
<b>Descendentes de alemães<sup>a</sup></b>	56	3(5.4)	23(41.1)	30(53.5)	29(25.9)	83(74.1)
<b>Descendentes de japoneses<sup>d</sup></b>	41	0(0.0)	20(48.8)	21(51.2)	20(24.4)	62(75.6)
<b>Ameríndios<sup>a,b,c,d,e</sup></b>	85	17(20.0)	48(56.5)	20(23.5)	82(48.2)	88(51.8)

<sup>a</sup>Frequências alélicas Ameríndios X Descendentes de alemães:  $p < 0,0001$ . <sup>b</sup>Frequências alélicas Ameríndios X Descendentes de europeus:  $p < 0,0001$ . <sup>c</sup>Frequências alélicas Ameríndios X Afro-descendentes:  $p < 0,0001$ . <sup>d</sup>Frequências alélicas Ameríndios X Descendentes de japoneses:  $p < 0,0001$ . <sup>e</sup>Frequências alélicas Ameríndios X População de Salvador:  $p < 0,0001$

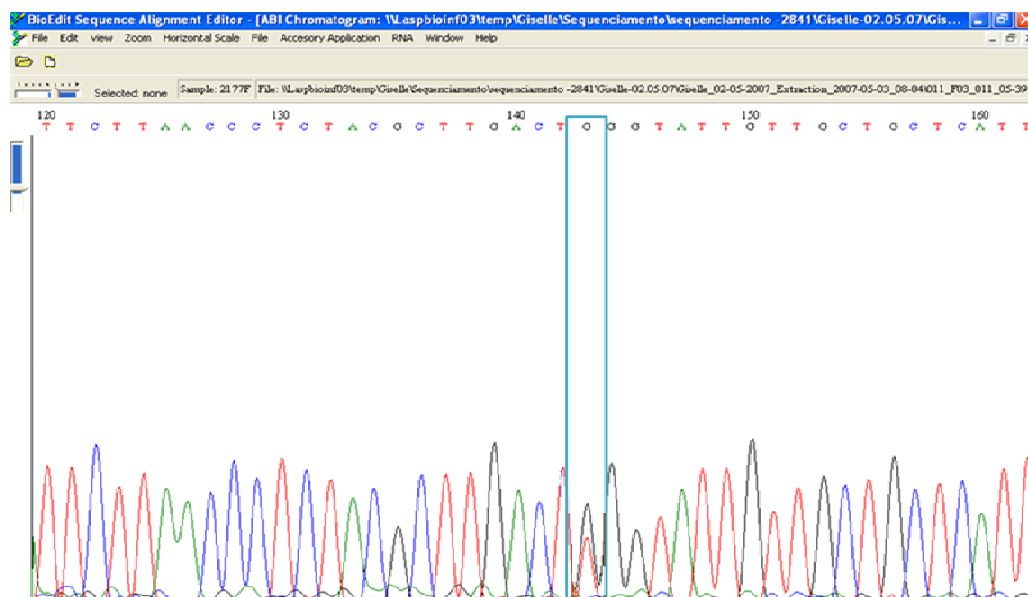
As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo -2841A>T não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram comparados aos indivíduos soronegativos ( $\chi^2=0,130$ ,  $p=0,719$ , 1d.f.;  $\chi^2=0,154$ ,  $p=0,926$ , 1d.f., respectivamente), assim como quando os pacientes com HTLV-1 foram comparados entre si ( $\chi^2=0,8$ ,  $p=0,670$ , 2d.f.;  $\chi^2=0,9$ ,  $p=0,924$ , 4d.f.,

respectivamente) (Tabela 7). O seqüenciamento de 339pb da região promotora do gene da GLUT1 de 180 amostras revelou a existência de uma nova mutação G>T na posição -2807 em 6 indivíduos analisados: 3 infectados pelo HTLV-1 (2 TSP/HAM e 1 assintomático) e 3 indivíduos não-infectados de Salvador-Ba (Figura 15).

**Tabela 7.** Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -2841A>T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, oligosintomáticos, com TSP/HAM e indivíduos não-infectados de Salvador-BA.

	Genótipos				Alelos	
	n	A/A	A/T	T/T	A	T
<b>-2841A&gt;T</b>	<b>n</b>	<b>A/A</b>	<b>A/T</b>	<b>T/T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>
<b>Infectados<sup>d</sup></b>	125	36 (28,8)	61 (48,8)	28 (22,4)	82 (52,6)	74 (47,4)
<b>TSP/HAM<sup>a,c</sup></b>	54	18 (33,3)	23 (42,6)	13 (24,1)	59 (54,6)	49 (45,4)
<b>Assintomáticos<sup>b,c</sup></b>	53	14 (26,4)	29 (54,7)	10 (18,9)	57 (53,8)	49 (46,2)
<b>Oligosintomáticos<sup>a,b</sup></b>	18	4 (22,2)	9 (50,0)	5(27,8)	17 (47,2)	19 (52,8)
<b>Soronegativos<sup>d</sup></b>	55	12 (21,8)	26 (47,3)	17 (30,9)	50 (45,5)	60 (54,5)

<sup>a</sup>Frequência alélica Oligosintomático X TSP/HAM: p=0,441. <sup>b</sup>Frequência alélica Oligosintomático X Assintomático: p=0,497. <sup>c</sup>Frequência alélica Assintomático X TSP/HAM: p=0,900. <sup>d</sup>Frequência alélica Infectados X Soronegativos: p=0,719



**Figura 15-** Resultado do seqüenciamento de 339pb da região promotora do gene da GLUT1, mostrando em destaque no retângulo (no nucleotídeo e no cromatograma) a existência do genótipo heterozigoto G/T na posição 143 da região analisada que corresponde à posição -2807 no gene.

## 7- DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre os polimorfismos nas regiões regulatórias (incluindo a região promotora) de genes humanos e manifestação de doença (Licastro *et al.*, 2003; Sabouri *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2002). Gadelha e colaboradores demonstraram que polimorfismos no gene da Interleucina 6 nas posições -174 e -634 estão associados com o desenvolvimento de TSP/HAM em indivíduos infectados pelo HTLV-1 de Salvador-BA e que o polimorfismo -174G>C está associado também com uma diminuição nos níveis de osteocalcina dos indivíduos assintomáticos de até 45 anos infectados pelo HTLV-1 (Gadelha *et al. Submetido*).

Polimorfismos no gene da GLUT1 foram associados à susceptibilidade a nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus dos tipo 1 e 2 em diferentes populações (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Grzeszczak *et al.*, 2001; Hodgkinson *et al.*, 2005). SNPs localizados nas regiões regulatórias do gene da GLUT1 que têm potencial para modular a expressão gênica por localizarem-se em sítios de ligação a fatores de transcrição ou por estarem diretamente relacionados a outros SNPs funcionais podem influenciar a expressão da proteína GLUT1 na célula, levando a uma alta ou baixa produção protéica. Estes diferentes fenótipos de produção da proteína podem estar relacionados à funcionalidade da mesma e afetar seu papel na membrana celular, seja em relação ao transporte de glicose, sua função primordial, seja em relação ao seu papel na entrada do HTLV-1 na célula. De fato, diversos estudos sugerem que tais polimorfismos no gene humano da GLUT1 afetam, direta ou indiretamente, a função de transporte de glicose da proteína e relacionam-se ao desenvolvimento de patologias associadas ao acúmulo ou falta de glicose na célula (Liu *et al.*, 1999; Grzeszczak *et al.*, 2001; Hodgkinson *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1998). Além disso, as frequências desses polimorfismos divergiram em populações com ascendências étnicas diferentes. Em relação à infecção pelo HTLV-1, não existem estudos descritos na literatura que tratem da associação entre SNPs no gene da GLUT1, a susceptibilidade à infecção pelo vírus e o desenvolvimento das doenças relacionadas. Embora a principal forma de replicação viral seja via expansão clonal, através de mitose sofrida pelas células infectadas, a transmissão célula-célula, através da formação de uma “sinapse virológica”, com a utilização da GLUT1 pelo vírus para entrada, na célula também ocorre. Tal “sinapse virológica” cria um reservatório onde o vírus fica protegido, durante sua transmissão da



célula infectada para a não-infectada, das células efectoras do sistema imune do hospedeiro. Como apenas um pequeno grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolve TSP/HAM ou ATLL, talvez possa existir uma diferença na atividade da proteína GLUT1, em conjunto com outros fatores virais e/ou do hospedeiro, entre aqueles que são susceptíveis ao desenvolvimento de doenças e aqueles que não são. Esta diferença pode ser causada por uma proteína variante ou por polimorfismos nas regiões regulatórias, promotora e codificante do gene envolvidas em sua expressão.

Tem sido demonstrado que uma elevada carga proviral do HTLV-1 está associada com um aumento no risco da progressão da doença (Nagai *et al.*, 1998), progressão da desabilidade motora (Takenouchi *et al.*, 2003) e risco da transmissão sexual do HTLV-1 (Kaplan *et al.*, 1996). Em pacientes com TSP/HAM do Japão, a mediana da carga proviral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é dez vezes maior que em assintomáticos (Nagai *et al.*, 1998). No nosso estudo, nós observamos que a mediana da carga proviral do HTLV-1 foi menor nos indivíduos assintomáticos do que nos pacientes oligosintomáticos e com TSP/HAM, sugerindo que este aspecto da infecção pelo HTLV-1 está associado com o desenvolvimento de sintomas neurológicos. Além disso, nós também verificamos que os pacientes oligosintomáticos apresentaram a mediana da carga proviral mais elevada em relação aos pacientes com TSP/HAM. Este resultado pode ser explicado de acordo com o modelo proposto de evolução da carga proviral do HTLV-1 na patogênese da TSP/HAM (Grant *et al.*, 2002). Segundo este modelo, durante a infecção primária, a carga proviral seria alta no sangue periférico, com um pico momentâneo, seguido por uma queda que se manteria equilibrada sobre o período de latência clínica. Dependendo da efetividade da resposta imune do hospedeiro, a carga proviral poderia sair do equilíbrio e aumentar continuamente, associando-se ao aparecimento de sintomas relacionados à infecção viral, como o observado em pacientes oligosintomáticos. Após a instalação da TSP/HAM, a carga alcançaria um novo platô, mantendo-se relativamente estável ao longo da doença.

Este é o primeiro estudo na população brasileira em que foram analisados os polimorfismos no gene humano da GLUT1 em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e na população não-infectada, e correlacionados com a carga proviral em pacientes infectados pelo HTLV-1.

O polimorfismo HaeIIIT>C localiza-se no éxon 2 do gene de GLUT1 e não altera o aminoácido na proteína codificada. Nosso estudo não demonstrou uma associação entre as frequências genotípicas e alélicas deste polimorfismo e o risco aumentado de desenvolvimento de TSP/HAM e infecção pelo HTLV-1.

O polimorfismo -2841A>T está localizado próximo ao Elemento Responsivo a HIF no promotor de GLUT1, o qual apresenta a capacidade de aumentar a expressão de GLUT1 em condições de hipóxia (Hayashi *et al.*, 2004). Foi recentemente demonstrado que a proteína Tax viral media a ativação da transcrição de HIF-1 através da via de sinalização PI3K/AKT (Tornita *et al.*, 2007). Este mecanismo poderia induzir a expressão de GLUT1 em células infectadas pelo HTLV-1 e facilitar sua transmissão. Nosso estudo, por sua vez, não encontrou associação entre o polimorfismo -2841 e o desenvolvimento de doença neurológica em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Através do seqüenciamento da região de -2741 a -3080 do promotor de GLUT1, identificamos uma mutação de uma guanina (G) para uma timina (T) na posição -2807 em seis amostras analisadas, o que corresponde a 1,7% da população estudada, caracterizando esta mutação como um sítio polimórfico. A análise de ligação entre os polimorfismos estudados demonstrou existência de um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -2841A>T e HaeIIIT>C: na presença do alelo mutante C do polimorfismo HaeIIIT>C ocorre a ausência do alelo mutante T do polimorfismo -2841A>T.

O polimorfismo XbaIG>T tem sido associado, assim como o polimorfismo -2841, a susceptibilidade a nefropatia diabética. Estudos em populações de asiáticos e caucasianos da Inglaterra e da Polônia mostraram que o alelo T e o genótipo T/C apresentam uma forte associação com o desenvolvimento de nefropatia diabética e que afetam a entrada de glicose na célula (Liu *et al.*, 1999; Hodgkinson *et al.*, 2001; Grzeszczak *et al.*, 2001). Outros estudos em populações de caucasianos da Dinamarca e da Espanha não encontraram tal associação (Gutierrez *et al.*, 1998; Tarnow *et al.*, 2001). Nossos resultados, por sua vez, não demonstraram associação entre os alelos e os genótipos com o desenvolvimento de manifestações neurológicas em indivíduos infectados pelo HTLV-1. O polimorfismo XbaIG>T está localizado no íntron 2 do gene da GLUT1, dessa forma ele não causa uma mudança na seqüência da proteína. A divergência de associação encontrada entre este polimorfismo e susceptibilidade a nefropatia diabética pode ser explicada através da existência de desequilíbrio de ligação

entre os alelos do polimorfismo XbaIG>T e outro marcador da doença, o qual pode alterar a funcionalidade da proteína e afetar a entrada de glicose, sendo que o padrão deste desequilíbrio de ligação é diferente em diferentes populações. Em relação às amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1 analisadas no nosso estudo, foi observado um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C. Entretanto, como demonstrado anteriormente, ambos os polimorfismos não estão relacionados com o desenvolvimento de TSP/HAM e não podem ser estudados como marcadores desta patologia.

É importante salientar que diferenças na distribuição alélica de diferentes genes têm sido encontradas em diversos grupos étnicos (Cox *et al.*, 2001; Meenagh *et al.*, 2002). Alguns estudos realizados com o intuito de estimar a mistura étnica na população brasileira têm demonstrado que as diferentes regiões do Brasil variam em relação à contribuição de cada grupo na formação do *background* genético (Dornelles *et al.*, 1999; Gadelha *et al.*, 2005). O Brasil é um país que foi colonizado por representantes de diferentes grupos étnicos, tais como europeus, africanos e os ameríndios. A região Sul é composta predominantemente por descendentes de europeus. A região Norte, por sua vez, apresenta uma alta contribuição dos ameríndios e dos europeus e uma baixa contribuição genética dos africanos. No Nordeste, a mais importante contribuição para a formação do *background* genético da região é dos europeus e africanos.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que a frequência alélica de polimorfismos nas Interleucinas 6 (Gadelha *et al.*, 2005) e 10 (dados não publicados) variou entre as regiões brasileiras. Neste estudo, nós demonstramos uma diferença na distribuição dos polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C do gene da GLUT1 em seis grupos brasileiros com diferentes contribuições étnicas. A frequência do alelo XbaIG é altamente heterogênea em diferentes populações e sua maior prevalência foi observada nos descendentes de japoneses do Brasil sendo semelhante àquela observada previamente nos chineses e japoneses (Tabela 8). Este alelo apresentou uma frequência similar na população de Salvador e de Afro-descendentes da região Sudeste sendo este dado similar ao observado previamente em Afro-americanos (Pontiroli *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Hodgkinson *et al.*, 2001; Grzeszczak *et al.*, 2001) (Tabela 8).

A frequência do alelo XbaIT nos descendentes de europeus da região Sul foi maior do que o observado na região Sudeste. Este resultado pode ser explicado devido à

variação existente na frequência dos alelos do polimorfismo XbaIG>T nas diferentes populações européias (Tabela 8) e à colonização européia diferencial ocorrida nestas duas regiões brasileiras: o Sul apresentou uma predominância dos colonizadores europeus provenientes da Alemanha e o Sudeste foi predominantemente colonizado pelos Italianos (Tabela 8).

Quanto à diferença observada na frequência do alelo mutante T do polimorfismo XbaIG>T entre os Ameríndios da tribo Tiriyo (47,6%) e os descendentes de japoneses da região Sudeste (20,7%), é possível explicá-la através da existência de uma população estruturada formada devido à ocorrência de endogamia na tribo Tiriyo o que explicaria a elevada frequência deste alelo na população de Ameríndios.

Em relação ao polimorfismo HaeIIIT>C, nós também detectamos uma elevada heterogeneidade entre as amostras do Brasil e observamos uma diferença significativa na distribuição da frequência alélica entre a tribo Tiriyo e os outros cinco grupos estudados ( $p < 0,0001$ ). Esta última observação também pode ser explicada devido à existência de endogamia entre os indígenas, o que resultou em uma frequência similar dos alelos (T e C) estudados.

Poucos estudos têm analisado o polimorfismo HaeIIIT>C e todos foram realizados em europeus e japoneses. Nossas frequências genotípicas de descendentes de europeus e de japoneses da região Sudeste foram similares ao observado em estudos anteriores (Ng *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 1995).

Nossos resultados sugerem que os polimorfismos HaeIIIT>C, XbaIG>T e -2841A>T, apesar de, possivelmente, estarem relacionados com a entrada de glicose na célula (XbaIG>T e -2841A>T) podem não estar relacionados com a infecção pelo HTLV-1 nem com o desenvolvimento de TSP/HAM, sugerindo que as diferentes atividades realizadas pela proteína GLUT1 (transporte de glicose e recepção do HTLV-1) são mediadas por diferentes domínios da mesma. Dessa forma, torna-se necessário o estudo de outros SNP no gene humano da GLUT1 para verificar a existência de associação entre estes e o desenvolvimento de TSP/HAM.

**Tabela 8.** Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo XbaIG>T em diferentes populações

<b>XbaIG&gt;T</b>	<b>Genótipos (%)</b>			<b>Alelos(%)</b>	
	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>T/T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<b>Europeus (Inglaterra)<sup>a</sup></b>	20,2	57,7	22,1	49,0	51,0
<b>Europeus (Espanha)<sup>b</sup></b>	36,7	45,5	17,8	59,5	40,5
<b>Asiáticos (China)<sup>c</sup></b>	62,0	33,0	5,0	79,0	21,0
<b>Afro-americanos (Estados Unidos)<sup>d</sup></b>	31,0	48,3	20,7	55,0	45,0
<b>População de Salvador (Brasil)</b>	28,0	56,0	16,0	56,0	44,0
<b>Afro-descendentes (Brasil)</b>	33,3	52,4	14,3	59,5	40,5
<b>Descendentes de japoneses (Brasil)</b>	61,0	36,6	2,4	79,3	20,7
<b>Ameríndios (Brasil)</b>	32,9	38,8	28,3	52,4	47,6
<b>Descendentes de europeus (Brasil)</b>	44,6	42,9	12,5	66,1	33,9
<b>Descendentes de alemães (Brasil)</b>	61,4	29,5	9,1	76,1	23,9

*a:* Hodgkinson *et al.*, 2001. *b:* Grzeszczak *et al.*, 2001. *c:* Liu *et al.*, 1999. *d:* Pontiroli *et al.*, 1996.

## 8- CONCLUSÕES

- Os polimorfismos XbaIG>T, HaeIIIT>C e -2841A>T não estão associados com o desenvolvimento de TSP/HAM neste grupo de pacientes infectados pelo HTLV-1.
- Os polimorfismos estudados em GLUT1, na população analisada, não afetam a infecção pelo HTLV-1.
- O estudo do polimorfismo -2841A>T revelou a existência de um novo polimorfismo (-2807G>T) na população estudada de indivíduos infectados e não-infectados de Salvador-BA.
- O estudo dos polimorfismos XbaIG>T e HaeIIIT>C em grupos de diferentes etnias do Brasil demonstrou que as frequências alélicas para tais polimorfismos variaram de acordo com a etnia.

## APOIO

CAPES/CNPq – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

Ministério da Saúde do Brasil

Centro de HTLV/FBDC – Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências

## 9- REFERÊNCIAS

- Abe-Sandes, K. *Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y*. 2002. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. SP.
- Andrews JM, Oglesbee MJ, Trevino AV, Guyot DJ, Newbound GC, Lairmore MD. Enhanced human T-cell lymphotropic virus type 1 expression following induction of the cellular stress response. *Virology* 208:816-820, 1997.
- Afonso P, Ozden S, Ceccaldi PE, Prevost MC, Schmitt C, Lambert S, Gessain A, Pique C, Romero IA. Human brain endothelial cells express high levels of GLUT1 and support infection by HTLV. P-103.
- Bangham CR, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Igakura T. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713-1716, 2003.
- Battini JL, Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115: 449-459, 2003.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 268(26):19161-4, 1993.
- Brosius FC & Heilig CW. Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatr Nephrol* 20:447-451, 2005.
- Cann AJ, Chen ISY. Human T-cell leukemia virus types I and II. In Fields DMKBN, Howley PM, ed(s). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-raven Publisher, p. 1849-1879, 1996.
- Carneiro-Proietti AB; Ribas JG; Catalan-Soares BC; Martins ML; Brito-Melo GE; Martins-Filho OA, Pinheiro SR, Araújo AdeQ, Galvão-Castro B, De Oliveira MS, Guedes AC, Proietti FA. Infection and diseases caused by Human T lymphotropic virus type 1 and 2 in Brazil. *Ver Soc Brás méd Trop.*, Rio de Janeiro, Sep-Oct; 35(5), p.499-508, 2002.
- Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB & Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of HTLV-1/2: serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública*, 21:926-931, 2005.
- Cavrois M, Gessain A, Gout O, Wain-Hobson S & Wattel E. Common human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J Infec Dis.* 82:1044-1050, 2000.
- Cimarelli A, Duclos CA, Gessain A, Casoli C, Bertazzoni U. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. *Virology.* 223:362-364, 1996.

- Coskun AK & Sutton RE. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol* 79(7): 4150-4158, 2005.
- Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS et al. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 72:720-6, 2001.
- Darnel J, Lodish H, Baltimore D. *Molecular Cell Biology. 2<sup>nd</sup> Edition, New York, Scientific American Books Inc, 1990.*
- Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas J. Quantitation of HTLV-1 proviral load by TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods.* 102:37-51, 2002.
- de Thé G & Kazanji M. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 (1):191-198, 1996.
- Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvao-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador , Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34: 527-531, 2003.
- Eguchi K, Matsuoka N, Ida H. et al. Primary Sjögren's syndrome with antibodies to HTLV-1: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis.* 51:769-776, 1992.
- Franchini G. Review: molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 infection. *Blood* 86: 3619-3693, 1995.
- Figueroa J, Morris J, Brathwaite A, Ward E, Peruga A et al. Risk factors for HTLV-I among heterossexual STD clinic attenders. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology.* 9:81-88, 1995.
- Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type 1 in the tax gene and their association with different risks for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 182:1343-1349, 2000.
- Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tamaka Y. Different cytokine production in Tax-expressing cells between patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated and asymptomatic HTLV-1 carriers. *J. Infect. Dis.* 187(7): 1116-1125, 2003
- Gadelha SR, Alcântara LCJ, **Costa GCS**, Acosta AX, Rios DL, Kashima S, Covas D, Galvão-Castro B. Polymorphisms at interleukin-6 and interleukin-10 promoter: do they affect the risk of Human T Lymphotropic Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis? Submetido para publicação na *Human Biology*.



Gadelha SR, Boa-Sorte N, Silva-Santos AC, Campos CCC, Alcântara LCJ, **Costa GCS**, Galvão-Castro B. Risk factors associated to osteopenia in asymptomatic HTLV-1 infected individuals. Submetido para publicação na *Human Biology*.

Gadelha SR, Alcântara LCJ, **Costa GCS**, Rios DL, Galvão-Castro B. Ethnic Differences in the Distribution of Interleukin-6 Polymorphisms Among Three Brazilian Ethnic Groups. *Human Biology*. 77(4):509-514, 2005.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, Thé G. Antibodies to human T. lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 2:407-410, 1985.

Gessain A; Yanagihara R; Franchini G; Garruto RM; Jenkins CL; Ajdukiewick AB; Gallo RC; Gadjusek DC. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type 1 from isolated populations in Papua New Guinea and Solomon Islands. *Proc Natl Acad Sci*. 88:7694-7698, 1991.

Gonçalves D, Guedes AC, Proietti AB, Martins ML, Proietti FA, Lambertucci JR. Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for Human T-cell lymphotropic virus type-1. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68:562-565, 2003.

Goubau P, Carton H, Kazadi K, Muya K, Desmyter J. HTLV seroepidemiology in a central African population with high incidence of tropical spastic paraparesis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84:577-579, 1990.

Grant C, Barmak K, Alefantis T. et al. Human T-cell leukemia type 1 and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J. Cell Physiol*. 190:133-159, 2002.

Grimaldi R, Shindo N, Acosta A.X et al. Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum. Genet*. 111:102-104, 2002.

Grzeszczak W, Moczulski DK, Zychma M, Szczechowska E, Trautsolt W, Szydłowska I. Role of GLUT1 gene in susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes *Kidney International* 59: 631-636, 2001.

Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Broch M, Aguilar C, Llor C, Simon I, Richart C. GLUT1 gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus: genetic susceptibility relationship with cardiovascular risk factors and microangiopathic complications in a Mediterranean population. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 41:113-120. 1998.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 41:95-98, 1999.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto O, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-

- inducible factor 1<sub>α</sub> under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *Journal of Endocrinology*. 183:145–154, 2004.
- Ho D, Moudgil T, Alam M. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* 321(2):1621-1625, 1989.
- Hodgkinson AD, Page T, Millward BA, Demaine AG. A novel polymorphism in the 5' flanking region of the glucose transporter (GLUT1) gene is strongly associated with diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Dia Comp* 19: 65-69, 2005.
- Ijichi S, Ramundo MB, Takahashi H, Hall WW. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2). *Journal of Experimental Medicine*. 176:293-296, 1992.
- Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame E, Bangham CRM. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I associated myelopathy. *Proc. NATLL. Acad. Sci. USA*, 96:3848-53, 1999.
- Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL and 12 other authors. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12:193-201, 1996.
- Kozlovsky N, Rudich A, Potashnik R, Ebina Y, Murakami T, Bashan N. Transcriptional Activation of the *Glut1* Gene in Response to Oxidative Stress in L6 Myotubes. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(52):33367-33372, 1997.
- Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C, Olivieri F, Cavallone L, Giovaniotti S, Masliah E, Franceschi C. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging*. 24(7):921-6, 2003.
- Lin HC, Hickey M, Hsu L, Medina D, Rabson AB. Activation of human T cell leukemia virus type 1 LTR promoter and cellular promoter elements by T cell receptor signaling and HTLV-1 Tax expression. *Virology* 339:1-11, 2005.
- Liu Z, Guan T, Chen Z. Insulin receptor substrate-1 and glucose transporter gene polymorphisms in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 78(9):662-5, 1998.
- Liu ZH, Guan TJ, Chen ZH, Li LS. Glucose transporter (GLUT1) allele (XbaI-) associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney International* 55: 1843-1848, 1999.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell, JE. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co. 2000.
- Manel N, Battini JL, Sitbon M. Human T Cell Leukemia Virus Envelope Binding and Virus Entry Are Mediated by Distinct Domains of the Glucose Transporter GLUT1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(32):29025-29029, 2005.

- Meenagh A, Williams F, Ross OA, et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum. Immunol.* 63: 1055-1061, 2002.
- Merle H, Smadja D, Le Hoang P, et al. Ocular manifestations in patients with HTLV-1 associated infection – a clinical study of 93 cases. *Jpn J. Ophthalmol.* 40:260-270, 1996.
- Miller GJ, Lewis LL, Colman SM, et al. Clustering of human T lymphotropic virus type 1 seropositive in Montserrat, West Indies: evidence for an environmental factor in transmission of the virus. *J Infect Dis.* 170: 44-50, 1994.
- Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M, Araki S et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type 1: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis.* 166(4): 943-4, 1992.
- Motokawa S, Hasunuma T, Tajima K, et al. High prevalence of arthropathy in HTLV-1 carriers on a Japanese island. *Ann Rheum Dis.* 55:193-195, 1996.
- Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of Acq Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology.* 13:S2-S7, 1996.
- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W and 8 other authors. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J. Neurovirol* 4:586-593, 1998.
- Ng DP, Canani L, Araki S, Smiles A, Moczulski D, Warram JH, Krolewski AS. Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes.* 51(7):2264-2269, 2002.
- Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMB News.* 14:30, 1997.
- Nishimura M, Maeda M, Matsuoka M, Mine H, Saji H, Matsui M, Kuroda Y, Kawakami H, Uchiyama T. Tumor Necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type 1 associated myelopathy. *Hum. Immunol* 61(12): 1262-1269, 2000.
- Nishimura M, Matsuoka M, Maeda M, Mizuta I, Mita S, Uchino M, Matsui M, Kuroda Y, Kawakami H, Kaji R, Adachi A, Uchiyama T. Association between interleukin-6 gene polymorphism and human-T cell leukemia virus type 1 associated myelopathy. *Human Immunol* 63:696-700, 2002.
- Okino ST, Chichester CH, Whitlock JP. Hypoxia-inducible Mammalian Gene Expression Analyzed *in Vivo* at a TATA-driven Promoter and at an Initiator-driven Promoter. *The Journal of Biological Chemistry.* 273(37): 23837–23843, 1998.

- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* i:1031–1032, 1986.
- Page T, Hodgkinson, Ollerenshaw M, Hammonds JC, Demaine AG. Glucose transporter polymorphisms are associated with clear-cell renal carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*.163: 151-155, 2005.
- Panasci LC, Green D, Fox P, Schein P. A Phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA, and protein from a single tissue sample. *Anal Biochem*. 83 (2):677-88, 1977.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JA, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 77:7415-7419, 1980.
- Pontiroli, AE, Capra F, Veglia F. et al. Genetic contribution of polymorphism of the GLUT1 and GLUT4 genes to the susceptibility to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in different populations. *Acta Diabetol*. 33(3):193-7, 1996.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares B, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068, 2005.
- Raymond M. & Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86:248-249, 1995.
- Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of Virology*. 64:5682-5687, 1990.
- Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SEF, Usuku K, Bangham CRM, Osame M. Polymorphism in the Interleukin-10 Promoter Affects Both Provirus Load and the Risk of Human T Lymphotropic Virus Type I- Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *J. Infec Dis* 190: 1279-85, 2004.
- Sabouri AH, Saito M, Usuku K, 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*; 8:509-513, 2005.
- Seiki M, Hattori S & Yoshida M. *Proc Natl Acad Csi*. 79: 6899-6902. 1982.
- Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV-I provirus genome into Adult t-cell leukemia cells. *Nature*. 309:640-642, 1984.
- Sherman MP, Saksena NK, Dube DK, Yanagihara R, Poiesz BJ. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type 1 (HTLV-1) derived from sequence analysis of a new HTLV-1 variant from Papua New Guinea. *J. Virol*; 66:2556-2563, 1992.

Shindo N, Alcantara LC, Van Dooren S et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:71-77, 2002.

Sonoda S, Yashiki, Fujiyoshi T. Immunogenetics factors involved in the patogénesis of adult T-cell leukemia and HTLV-I associated myelopath. In Takatsuki K, Hinuma Y & Yoshida M (ed), Advances in adult T-cell leukemia and HTLV-I research. *Gann Monograph Cancer Research*. 39:81-93, 1992.

Swainson L, Kinet S, Manel N, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4+ CD8+ human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci*. 102(36):12867-12872, 2005.

Tao T, Tanizawa S, Matsutani A et al. HepG2/erythrocyte glucose transporter (GLUT1) gene in NIDDM: a population association study and molecular scanning in Japanese subjects. *Diabetologia* 38(8): 942-7, 1995.

Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 9:29-35, 2003.

Tarnow L, Grarup N, Hansen T, Parving H, Pederson O. Diabetic microvascular complications are not associated with two polymorphisms in the GLUT1 and PC-1 genes regulating glucose metabolism in Caucasion type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 16:1653-1656, 2001.

Tomita M, Semenza GL, Michiels C, Matsuda T, Uchihara JN, Okudaira T, Tanaka Y, Taira N, Ohshiro K, Mori N. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Biochemical Journal* (Immediate Publication), 2007.

Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR. Polygenic control of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) provirus load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect. Dis.*, 186(7):932-939, 2002.

Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal Expansion of Human T-Cell Leukemia Virus Type I- Infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of Virology*. 69:2863-2868, 1995.

Woo P, Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376, 1998.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 79:2031-2035, 1982.

Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol*. 19:475-495, 2001.

Yoshikawa T, Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, Tanaka T, Yamaguchi M, Shigeta H, Ogata M, Nakamura N. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 19: 1000-1005, 2002.

## APÊNDICE 1

### **Differences in the distribution of XbaIG>T and HaeIIIT>C GLUT1 polymorphisms among Brazilian ethnic groups**

COSTA<sup>1</sup> G. C. S., ALCANTARA<sup>1,2</sup> L. C. J., AZEVEDO<sup>3</sup> R., MURICY<sup>1,2</sup> G., KASHIMA<sup>3</sup> S. H., COVAS<sup>3</sup> D. T., GALVÃO-CASTRO<sup>1,2</sup> B., GADELHA<sup>1,2</sup> S. R.

<sup>1</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Banco de Sangue Regional de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

**RUNNING HEAD: SNPs at GLUT1 gene in Brazilian populations**

**KEY WORDS: GLUT1, POLYMORPHISMS, BRAZILIAN POPULATIONS.**

Corresponding author:

Sandra Rocha Gadelha

Present adress: Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil.

Campus Prof Soane Nazaré de Andrade, Km 16 - Rodovia Ilhéus/Itabuna, Ilhéus, Bahia, Brasil - 45650-000.

Telephone # 55 73 36805267. E-mail: [srgmello@uesc.br](mailto:srgmello@uesc.br).

**ABSTRACT**

GLUT is the major glucose transporter in mammalian cells. Single nucleotide polymorphisms (SNP) at GLUT1 promoter and regulatory regions have been associated to the risk of developing nephropathy in different type 1 and type 2 diabetic populations. It has been demonstrated that differences in allelic and genotypic frequencies of GLUT1 gene (SLC2A1) polymorphisms occur among different populations. Thus, ethnic differences in distribution of GLUT1 gene polymorphisms may be an important factor in determining gene-disease association. In this study, we investigated the XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms in six different Brazilian populations: 102 individuals from Salvador population (Northern Brazil), 56 European descendants from Joinville (South Brazil), 85 Indians from Tiriyó tribe (North Brazil) and 127 samples from Southern Brazil: 44 from European descendants, 42 from African descendants and 41 from Japanese descendants. Genotype frequencies from both sites did not differ significantly from those expected under the Hardy-Weinberg equilibrium. We verified that the allele frequencies of both polymorphisms were heterogeneous in these six Brazilian ethnic groups.



## INTRODUCTION

Mammalian cells usually require blood glucose as their major energy source and this molecule is transported into the cell by the glucose transporters (GLUT). These transporters constitute a family of 13 members that facilitate basal glucose transport into cells. GLUT1, a member of the class I family of glucose transporters together with GLUT2, GLUT3, GLUT4 and GLUT14, is a uniport carrier that passively facilitates glucose transport across membranes. GLUT1 is widely expressed, being the main glucose transporter in the brain, placenta and erythrocytes (Brosius & Heilig, 2005). The GLUT1 gene is located on chromosome 1 at 1p31 and single nucleotide polymorphisms (SNP) in its promoter and regulatory regions have been implicated in the risk of developing nephropathy in different type 1 and type 2 diabetic populations (Hodgkinson et al., 2005; Gutierrez et al., 1998; Grzeszczak et al., 2001; Liu et al., 1999; Liu et al., 1998). In addition, it was previously demonstrated that differences in allelic and genotypic frequencies of GLUT1 gene polymorphisms occur among different populations (Hodgkinson et al., 2005; Gutierrez et al., 1998; Grzeszczak et al., 2001; Liu et al., 1999; Liu et al., 1998). This ethnic diversity may be an important factor in determining gene-disease association (Brosius & Heilig, 2005).

Brazil is a South-American nation characterized by the admixture of several ethnic groups as Portugueses, Africans, indigenous tribes, and a variety of others European immigrants. It became an ethnic, genetic and cultural diverse nation (Alves-Silva et al., 2000; Callegari-Jacques & Salzano, 1999). However, the contribution of these different ethnic groups varies among the different regions of Brazil (Domelles et al., 1999).

Because variations in GLUT1 polymorphisms have been associated to disease susceptibility among various ethnic groups, and because there is no information about GLUT1 polymorphisms in Brazilians, we investigated the distribution of the XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms at GLUT1 gene in distinct Brazilian populations with different ethnic backgrounds.

## MATERIALS AND METHODS

**Populations studied:** We examined 370 genomic DNA samples from distinct populations of Brazil that were collected between 1997 and 2002 as part of previous studies: 102 samples from the general population of Salvador/Bahia (Teixeira et al., 2002), approximately 80% of which have mixed Portuguese and African ancestry (Azevedo et al., 1982), representing the Brazilian Northern region; 56 European descendants from Joinville/Santa Catarina blood center (South Brazil) (Grimaldi et al., 2002); 85 samples from the Indians from Tiriyó tribe, who live in North Brazil along the border of Suriname (Shindo et al., 2002) and 127 samples from Southern Brazil (São Paulo state): 44 samples collected from European descendants, 42 from African descendants and 41 from Japanese descendants. In the last group, the criteria established for their selection was based on the pure familial ascendancy in the two preceding generations and absence of kinship among them (Abe-Sandes. 2002).

**DNA extraction and single nucleotide polymorphism detection:** Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using a proteinase K treatment followed by a phenol-chloroform method. The analysis of the XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms was performed through PCR amplification followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using primers and PCR conditions described by Ng et al. (2002). The XbaIG>T polymorphism consists of a G-to-T substitution, which abolishes a recognition site for the *XbaI* restriction enzyme. The resulting digested fragments were separated by gel electrophoresis on a 1.2% agarose gel and scored under ultraviolet light. The HaeIIIT>C polymorphism consists of a C-to-T substitution that creates a recognition site for the *HaeIII* restriction enzyme. The fragments were electrophoresed on a 2.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

**Statistical Methods:** The allelic frequencies were estimated by direct allele counting. The conformity with Hardy-Weinberg equilibrium and existence of linkage disequilibrium were tested using the Genepop v.3.4 (Raymond & Rousset, 1995). The heterogeneity between population samples was evaluated by Fisher's exact test or by  $\chi^2$  test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

The distribution of GLUT1 polymorphisms frequencies in the six populations studied is shown in Table 1. Genotypic and allelic frequencies from the analyzed sites did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium, except from the XbaIG>T polymorphism on the Amerindians from Tiriyó tribe ( $p=0.0459$ ). We observed a strong linkage disequilibrium between the HaeIIIT>C and XbaIG>T polymorphisms in Salvador population ( $p=0.00016$ ) and European descendants from South Brazil ( $p=0.0152$ ). The allele frequencies of the XbaIG>T ( $p<0.001$ ) and HaeIIIT>C ( $p<0.001$ ) polymorphisms differed among the regional Brazilian populations: the Indians from Tiriyó tribe presented the lowest XbaIG allele frequency (52.4%) and the Japanese descendants had the highest XbaIG allele frequency (79.3%). A similarly heterogeneous pattern was observed in the HaeIIIT>C polymorphism frequencies. The HaeIIIT allele was found in the lowest frequency in the European descendants from Southern Brazil (15.5%) and in the highest frequency in the Tiriyó tribe (48.2%) (Table 1).

The allele frequencies of the XbaIG>T polymorphism differed significantly among populations as showed in the table 2. In relation to the HaeIIIT>C polymorphism, we only observed a significant difference in the allelic frequency distribution between Tiriyó tribe and the other five groups studied ( $p<0.0001$ ).

## DISCUSSION

Many studies that estimate the ethnic admixture in the Brazilian people have shown that the contribution of each ethnic group in the gene pool formation varies according to the Brazilian regions (Dornelles et al., 1999). Brazil was colonized by representatives of different ethnic groups, such as Europeans, Africans and the autochthonous Amerindians. The South is predominantly composed by European descendents. The Germany influence, for example, was important in Joinville, city located in Santa Catarina State. The North region shows a high contribution from both the Amerindians and Europeans, and a lower contribution of Africans. In the Northern Brazil, the most important contribution to the gene pool region is from European and African, and there is a smaller influence of Amerindians, as showed in the city of

Salvador (capital of the state of Bahia) (Salzano & Freire-Maia, 1967). In this study, we show a different distribution of the XbaIG>T and HaeIIIT>C GLUT1 polymorphisms in different Brazilian populations.

Differences in the distribution of SNP can be observed in populations with different ethnic backgrounds (Cox et al., 2001; Meenagh et al., 2002). Our previous studies have also shown that allelic frequency of polymorphisms in the Interleukins 6 (Gadelha et al., 2005) and 10 (data not shown) varies among Brazilian regions.

Previous results have shown that the XbaIG allele frequency is highly heterogeneous among different populations (Table 3). The higher frequency of XbaIG allele in the Japanese descendants from Brazil is consistent with those observed previously in the Chinese and Japanese populations (Table 3). This allele showed a similar frequency in the African descendants from Southern Brazil and Salvador population (Table 1). These data are consistent with those observed previously in African-American populations (Table 3).

The XbaIT allele frequency in the European descendants from South Brazil is higher than that observed in the European descendants from Southern Brazil (Table 1). This result can be due to the variation existent in the allele frequency of the XbaIG>T polymorphism in the different European populations (Table 3) and to the different European colonization occurred in these two regions: the South had a predominance of the German colonizers and the Southern was predominantly colonized by the Italians.

Concerning the difference in the allelic frequency of the XbaIG>T polymorphism observed between Indians from Tiriyó tribe and Japanese descendants (Table 1), it can be explained by the practice of endogamy in the Tiriyó tribe.

In relation to the HaeIIIT>C polymorphism, we also detected a great heterogeneity among Brazilian samples and a significant difference in the allelic frequency distribution between Indians from Tiriyó tribe and the other five groups studied. This last observation may also be due to the practice of endogamy in the Tiriyó tribe resulting in similar frequencies of both alleles (T and C) analyzed.

Few studies have investigated the HaeIIIT>C gene polymorphism and they all were carried out in European and Japanese populations. Our genotype frequencies of the

European and Japanese descendants from the Southern Brazil were similar to those observed in previous studies (Ng et al., 2002; Tao et al., 1995).

GLUT1 gene polymorphisms have been associated with development of nephropathy in different type 1 and type 2 diabetic populations and differences in allelic and genotypic frequencies of GLUT1 gene polymorphisms occur among different populations (Hodgkinson et al., 2005; Gutierrez et al., 1998; Grzeszczak et al., 2001; Liu et al., 1999; Liu et al., 1998; Pontiroli et al., 1996). In this study, we confirmed that the polymorphic GLUT1 gene alleles are influenced by ethnicity among the different groups studied. Our results are consistent with those obtained in other populations with the same ethnic background. However, it still remains to be proven that differences in the XbaIG>T and HaeIIIT>C GLUT1 allele distributions among ethnic groups contribute to population variance in diseases susceptibility.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). We thank Maurício Barreto, Gloria Teixeira, Ozenilda Carvalho and Ivo Brito for providing the samples from Salvador general population, Joinville and Tiriyó, respectively.

#### REFERENCES

- Abe-Sandes, K. Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y (2002) Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. SP.
- Alves-Silva, J., Santos, M., Guimaraes, P. E., et al. (2000). The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 444-461.
- Azevedo, E. S., Fortuna, C. M., Santos, M. G., et al. (1982). Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. *Hum Biol.* 54 (2), 329-341.
- Brosius, F. C. & Heilig, C. W. (2005) Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 20, 447-451.

Callegari-Jacques, S. M. & Salzano, F. M. (1999) Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciência Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 51, 166-174.

Cox, E. D., Hoffmann, S. C., DiMercurio, B. S., et al. (2001) Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 72, 720-6.

Dornelles, C. L., Callegari-Jacques, S. M., Robinson, W. M., et al. (1999) Genetics, surnames, grandparents' nationalities, and ethnic admixture in Southern Brazil: Do the patterns of variation coincide? *Genet. Mol. Biol.* 22, 151-161.

Gadelha, S. R., Alcântara, L. C. J., Costa, G. C. S., et al. (2005) Ethnic differences in the distribution of interleukin-6 polymorphisms among three Brazilian ethnic groups. *Hum Biol.* 77(4), 509-514.

Grimaldi, R., Shindo, N., Acosta, A. X., et al. (2002). Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum. Genet.* 111, 102-104.

Grzeszczak, W., Moczulski, D. K., Zychma, M., et al. (2001) Role of GLUT1 gene in susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Kidney Int.* 59, 631-636.

Gutierrez, C., Vendrell, J., Pastor, R., et al. (1998) GLUT1 gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus: genetic susceptibility relationship with cardiovascular risk factors and microangiopathic complications in a Mediterranean population. *Diabetes Res Clin Pract.* 41, 113-120.

Hodgkinson, A. D., Page, T., Millward, B. A., et al. (2005) A novel polymorphism in the 5' flanking region of the glucose transporter (GLUT1) gene is strongly associated with diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabet Complication* 19, 65-69.

Liu, Z. H., Guan, T. J., Chen, Z. H. (1998) Insulin receptor substrate-1 and glucose transporter gene polymorphisms in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 78(9), 662-5.

Liu, Z. H., Guan, T. J., Chen, Z. H., et al. (1999) Glucose transporter (GLUT1) allele (XbaI-) associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 55, 1843-1848.

Meenagh, A., Williams, F., Ross, O. A., et al. (2002) Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum. Immunol.* 63, 1055-1061.

Ng, D. P., Canani, L., Araki, S., et al. (2002) Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes.* 51(7), 2264-2269.

Pontiroli, A. E., Capra, F., Veglia, F., et al. (1996) Genetic contribution of polymorphism of the GLUT1 and GLUT4 genes to the susceptibility to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in different populations. *Acta Diabetol.* 33(3), 193-7.

Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.* 86, 248-249.

Salzano, F. M. & Freire-Maia, N. (1967) Imigração e Miscigenação. In: *Populações Brasileiras: Aspectos demográficos, genéticos e antropológicos.* (Eds. Companhia Editora Nacional. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo-Brasil), pp. 32-39.

Shindo, N., Alcantara, L. C., Van Dooren, S., et al. (2002) Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 18, 71-77.

Tao, T., Tanizawa, Y., Matsutani, A., et al. (1995) HepG2/erythrocyte glucose transporter (GLUT1) gene in NIDDM: a population association study and molecular scanning in Japanese subjects. *Diabetologia* 38(8), 942-7.

Teixeira, M. G., Barreto, M. L., Costa, M. C. N., et al. (2002) Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. *Cadernos de Saúde Pública* 18 (5), 1189-95.

**Table 1:** Genotypic and allelic frequencies of *XbaI* and *HaeIII* polymorphisms in Brazilian Populations.

<b>XbaI</b> G>T	<b>Genotypes</b>			<b>Alleles</b>	
	<b>G/G(%)</b>	<b>G/T(%)</b>	<b>T/T(%)</b>	<b>G(%)</b>	<b>T(%)</b>
<b>African descendants</b> <sup>a</sup>	14(33.3)	22(52.4)	6(14.3)	50(59.5)	34(40.5)
<b>Salvador Population</b> <sup>b</sup>	29(28.0)	57(56.0)	16(16.0)	115(56.0)	89(44.0)
<b>European descendants</b>					
South region <sup>c</sup>	25(44.6)	24(42.9)	7(12.5)	74(66.1)	38(33.9)
Southeast region <sup>d</sup>	27(61.4)	13(29.5)	4(9.1)	67(76.1)	21(23.9)
<b>Japanese descendants</b> <sup>e</sup>	25(61.0)	15(36.6)	1(2.4)	65(79.3)	17(20.7)
<b>Indians</b> <sup>f</sup>	28(32.9)	33(38.8)	24(28.3)	89(52.4)	81(47.6)
<b>HaeIII</b> T>C	<b>T/T(%)</b>	<b>T/C(%)</b>	<b>C/C(%)</b>	<b>T(%)</b>	<b>C(%)</b>
<b>African descendants</b> <sup>a</sup>	0(0.0)	13(30.9)	29(69.1)	13(15.5)	71(84.5)
<b>Salvador Population</b> <sup>b</sup>	1(1.0)	36(35.0)	65(64.0)	38(18.6)	166(81.4)
<b>European descendants</b>					
South region <sup>c</sup>	3(5.4)	23(41.1)	30(53.5)	29(25.9)	83(74.1)
Southeast region <sup>d</sup>	3(6.8)	12(27.3)	29(65.9)	18(20.5)	70(79.5)
<b>Japanese descendants</b> <sup>e</sup>	0(0.0)	20(48.8)	21(51.2)	20(24.4)	62(75.6)
<b>Indians</b> <sup>f</sup>	17(20.0)	48(56.5)	20(23.5)	82(48.2)	88(51.8)

*a, d, e:* Descendants from Ribeirão Preto city, São Paulo state (Southeast of Brazil). *b:* Salvador population from Salvador city, Bahia state (Northeast of Brazil). *c:* European descendants from Joinville city, Santa Catarina state (South of Brazil). *f:* Indians from Tiryó tribe, Roraima state (North of Brazil).



**Table 2.** *p Value of the allelic frequencies of XbaIG>T polymorphism in the studied Brazilian populations*

Alleles	p Value*
Indians X European descendants (South region)	0.022
Indians X European descendants (Southeast region)	<0.0001
Indians X Japanese descendants	<0.0001
European descendants (South region) X Japanese descendants	0.044
European descendants (Southeast region)X African descendants	0.020
European descendants (Southeast region)X Salvador population	0.001
Japanese descendants X African descendants	0.006
Japanese descendants X Salvador population	<0.0001

\*Allelic frequencies with statistical significance (p Value <0,05)

**Table 3.** Genotypic and allelic frequencies of *Xba*I G>T polymorphism in European, Oriental and African-American populations

<b>Xba</b> I G>T	Genotypes (%)			Alleles(%)	
	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>T/T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<b>European</b>					
England <sup>a</sup>	20.2	57.7	22.1	49.0	51.0
Poland <sup>b</sup>	43.0	42.0	15.0	64.4	35.6
Italians <sup>d</sup>	46.5	45.2	8.3	69.0	31.0
<b>Chinese<sup>c</sup></b>	62.0	33.0	5.0	79.0	21.0
<b>Oriental<sup>d</sup></b>	68.9	27.0	4.1	82.0	18.0
<b>African-American<sup>d</sup></b>	31.0	48.3	20.7	55.0	45.0

*a*: Hodgkinson et al., 2001. *b*: Grzeszczak et al., 2001. *c*: Liu et al., 1999. *d*: Pontiroli et al., 1996.

## APÊNDICE 2

### **Polymorphisms at GLUT1 gene are not associated with the development of TSP/HAM in Brazilian HTLV-1 infected individuals and discovery of a new polymorphism at GLUT1 gene**

Giselle Calasans Souza Costa<sup>±</sup>, Rochele Azevedo<sup>§</sup>, Sandra Rocha Gadelha<sup>±</sup>, Simone Haddad Kashima<sup>§</sup>, Gabriel Muricy<sup>¥</sup>, Viviana Nila Olavarria<sup>±</sup>, Dimas Tadeu Covas<sup>§</sup>, Bernardo Galvão-Castro<sup>±, ¥</sup>, Luiz Carlos Júnior Alcantara<sup>±, ¥</sup>

*Author's affiliation: <sup>±</sup> Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil; <sup>§</sup>Hemocentro de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil; <sup>¥</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brasil.*

Institution where the analysis were performed:

*Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil*

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara

Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil.

Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brasil – 40296-610.

Telephone # 55 71 31762255; Fax # 55 71 31762300 . E-mail: [lalcan@bahia.fiocruz.br](mailto:lalcan@bahia.fiocruz.br)

*Shortened title: SNPs at GLUT1 gene in HTLV-1 Brazilian patients.*

**ABSTRACT**

The development of HTLV-1 associated clinic manifestations, like TSP/HAM and ATLL, occurs in 2-4% of the infected population and it is still unclear why this infection persists asymptomatic in most of the infected carriers. Recently, it was demonstrated that HTLV uses the Glucose transporter type 1 (GLUT1) to infect T-CD4<sup>+</sup> lymphocytes and that single nucleotide polymorphisms (SNP) in the GLUT1 gene are associated with diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus in different populations. These polymorphisms could contribute to a higher GLUT1 protein expression at cellular membrane, facilitating the HTLV entry and its transmission cell by cell. This fact could result in a higher provirus load, and, consequently, in the development of TSP/HAM. To evaluate the role of GLUT1 gene polymorphisms in the development of TSP/HAM in HTLV-1 infected individuals, the XbaIG>T, HaeIIIT>C and -2841A>T sites were analyzed by PCR/RFLP or sequencing in 244 infected individuals and 102 normal controls. Besides, proviral load of the HTLV-1 infected patients was analyzed by Real Time Quantitative PCR. Genotypic and allelic frequencies of the three sites did not differ significantly between controls and HTLV-1 infected individuals. There was no difference in genotypic and allelic distributions among patients as to the presence or absence of HTLV-1 associated clinic manifestations. Regarding the quantification of the provirus load, we observed a significant reduction in the asymptomatic individuals compared with the oligosymptomatic and TSP/HAM individuals. These results suggest that XbaIG>T, HaeIIIT>C and -2841A>T SNP do not contribute to HTLV-1 infection neither to the genetic susceptibility of TSP/HAM in Brazilian HTLV-1 infected individuals.

**Key-words:** HTLV-1, GLUT1, polymorphisms

## INTRODUCTION

The *Human T-cell Lymphotropic Virus* (HTLV) was discovered in 1980 [Yoshida et al., 1982; Poiesz et al., 1980]. This virus is associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) [Poiesz et al., 1980] and tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (TSP/HAM) [Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986]. The HTLV-1 infection is endemic in different geographic regions, including Japan, Africa and South America. In Brazil, the city of Salvador, capital of the state of Bahia, has the highest HTLV-1 seroprevalence (1.76% in general population and 1,35% in blood donors) [Dourado et al., 2003; Galvão\_Castro et al., 1997].

The development of HTLV-1 associated clinic manifestations occurs in a small number of infected individuals (2-4%). Besides TSP/HAM and ATLL, HTLV-1 infection has been associated to uveitis [Mochizuki et al., 1992], arthritis [Kitajima et al., 1989], polymyositis [Morgan et al., 1989] and infective dermatitis [LaGrenade et al., 1990]. It is unclear why HTLV-1 infection remains asymptomatic in most of the infected carriers, while others infected individuals present a broad spectrum of disease manifestations.

It was recently discovered that HTLV envelope binding and virus entry occur by a direct interaction with the glucose transporter type 1 (GLUT1), demonstrating that HTLV is able to use GLUT1 to infect T-CD4<sup>+</sup> lymphocytes [Manel et al., 2005; Coskun and Sutton, 2005]. In 2005, Coskun and Sutton showed that GLUT1 expression increases the susceptibility to HTLV. It has been suggested that cell-to-cell HTLV transmission is facilitated by a virologic synapse formation that accumulates HTLV structural proteins and T-cell activation markers between infected and non-infected cells [Bangham et al., 2003].

A G-to-T substitution at position +22999 in intron 2 of the GLUT1 gene and an A-to-T substitution at position -2841 in the promoter region of the same gene have been associated with susceptibility to diabetic nephropathy (DN) in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus in different populations [Liu et al., 1998; Gutierrez et al., 1998; Liu et al., 1999; Grzeszczak et al, 2001; Hodgkinson et al, 2005].

Single nucleotide polymorphisms (SNP) at regulator and promoter regions of the GLUT1 gene, which have the potential to modulate the gene expression by localizing at

transcription factors binding sites or by linkage disequilibrium with others functional polymorphisms, could influence the GLUT1 protein expression in the cell and therefore HTLV infection susceptibility. However, there are no studies in the literature focused on the association of polymorphisms at GLUT1 gene with virus infection or manifestations. Related to SNP, the increase of GLUT1 expression in the cell membrane could facilitate the virus entry and its cell-to-cell transmission, leading to a higher provirus load, and, consequently, to TSP/HAM development. In this context, GLUT1 gene polymorphisms could explain the different HTLV-1 associated diseases manifestations and the permanence of the asymptomatic status at the most of the infected individuals.

To examine the role of GLUT1 gene polymorphisms in the development of TPS/HAM in HTLV-1 infected individuals, the XbaIG>T, HaeIIIT>C and -2841A>T sites were analyzed in infected and non-infected individuals. Additionally, the provirus load of HTLV-1 was also quantified in infected patients and compared with the genotypic and allelic frequencies.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design and population**

244 DNA samples from HTLV-1 infected individuals were examined: 137 were attended at the HTLV Center/Medicine School of Bahia and Public Health/ Foundation for Science Development, Salvador, Bahia, Brazil (77 asymptomatics, 18 oligosymptomatics and 42 TSP/HAM) and 107 were attended at Hemocenter Foundation of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil (59 asymptomatics and 48 TSP/HAM). A total of 102 DNA samples from non-infected individuals was randomly selected from the Salvador general population [Dourado et al., 2003] to obtain control frequencies. The local ethical committee approval was obtained. All subjects provided written informal consent. The study group was classified according to their HTLV-1 clinical manifestations and infection. These are summarized as follows:

*TSP/HAM patients* - HTLV-1 infected individuals with TSP/HAM diagnosis based on Osame's Motor Disability Score (OMDS): slowly progressive paraparesis caused by a symmetrical myelopathy involving predominantly the pyramidal tracts [Osame et al., 1986].

*Oligosymptomatic patients* - HTLV-1 infected individuals with some neurological manifestations but not fitting to the TSP/HAM criterion based on OMDS.

*Asymptomatic patients* - HTLV-1 infected individuals without any clinical manifestations associated to HTLV-1 infection.

*Non-infected individuals* - HTLV-1 non-infected individuals from Salvador general population.

### **DNA extraction and single nucleotide polymorphism detection.**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using a proteinase K treatment followed by a phenol-chloroform method. The analyses of the XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms were performed through PCR amplification followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using primers and PCR conditions described by [Ng et al. 2002]. The resulting digested fragments from XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms were separated by gel electrophoresis on a 1.2% and 2,0% agarose gel, respectively and scored under ultraviolet light. The -2841A>T polymorphism analysis was performed in 180 samples (53 asymptomatics, 18 oligosymptomatics, 54 TSP/HAM and 55 normal controls) by sequencing using the following primers 5'GCTGAGAATGGCCTTCCCTCAAT3' and 5'GTCTGCCTTAC-TCAGCCCATGGGTC3'. The measurement of the provirus load was performed in PBMC of 177 HTLV-1 infected patients by Quantitative Real Time PCR using the primers TAX1 (5'CGGATACCCIGTCTACGTGTTT3') and TAX2 (5'CTGAGCIGAIACGCGTCCA3') and the probe TAX3 (6FAM-ATCACCTGGGACCCCATCGATGG- TAMRA).

### **Statistical Methods**

The allelic frequencies were estimated by direct allele counting. The conformity with Hardy-Weinberg equilibrium and existence of linkage disequilibrium were tested using the Genepop v.3.4 [Raymond & Rousset, 1995]. The heterogeneity between population samples was evaluated by Fisher's exact test or by  $\chi^2$  test. Mann-Whitney U test was used to compare the median HTLV-1 provirus load in infected patients. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

The studied population included HTLV-1 infected individuals from the cities of Salvador and Ribeirão Preto, Brazil and HTLV-1 non-infected individuals from the general population of Salvador. All analyses were performed separately in the HTLV-1 infected individuals from Salvador and Ribeirão Preto. There were no differences in genotypic and allelic frequencies when these populations were stratified (data not shown). For this reason, the HTLV-1 infected individuals from Salvador and Ribeirão Preto were studied in the same group.

The distribution of GLUT1 gene polymorphisms in 244 HTLV-1 infected individuals and 102 normal controls is shown in Table 1. Genotypic frequencies of the analyzed sites did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium ( $p=0.167$ ,  $\chi^2=23.64$ ). A strong linkage disequilibrium was observed when infected and non-infected individuals were compared together or as separated groups between the HaeIII>C polymorphism and XbaI>T ( $\chi^2=37.870$ ,  $p=0.001$ ) and -2841A>T ( $\chi^2=\alpha$ ,  $p<0.0001$ ) polymorphisms. The median HTLV-1 provirus load was compared between TSP/HAM, oligosymptomatic and asymptomatic patients. The HTLV-1 provirus load was significantly smaller in asymptomatic carriers than in oligosymptomatic ( $p=0.008$ ) and TSP/HAM ( $p<0.0001$ ) patients. However, this result was not observed when oligosymptomatic and TSP/HAM individuals ( $p=0.1489$ ) were compared (data not shown). When the median provirus load was compared in HTLV-1 infected individuals with the genotypes from the analyzed polymorphisms, no statistically significant difference was observed (Figure 1).

There were no differences in GLUT1 XbaI>T, HaeIII>C and -2841A>T genotypic and allelic distributions between HTLV-1 infected and non-infected individuals (Table 1). No associations between the investigated polymorphisms and HTLV-1 associated diseases manifestations were observed (Table 2). Inclusion of asymptomatic and oligosymptomatic patients in the Non-TSP/HAM group did not alter the results: no differences in genotypic and allelic frequencies between TSP/HAM and Non-TSP/HAM patients were observed (data not shown).

In relation to the sequencing of the region corresponding to the -2841A>T polymorphism, a novel G-to-T substitution at -2807 position was found in 6 studied



samples: 3 HTLV-1 infected individuals (2 TSP/HAM and 1 asymptomatic) and 3 non-infected individuals.

## DISCUSSION

Many studies have demonstrated an association between polymorphisms at regulator and promoter regions of human gene and disease manifestation [Yoshikawa et al, 2002; Licastro et al, 2003; Sabouri et al, 2004]. GLUT1 gene polymorphisms have been associated to susceptibility to diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus types 1 and 2 in different populations [Liu et al., 1998; Liu et al, 1999; Grzeszczak et al, 2001; Hodgkinson et al, 2005]. Single nucleotide polymorphisms (SNP) at GLUT1 gene could influence the GLUT1 protein expression in the cell, leading to a high or low protein production. These different phenotypes of protein production could be related to its functionality and affect its activity at cell membrane, related to glucose transport (GLUT1 primordial function) or to HTLV entry. In fact, some studies suggest that these GLUT1 human gene polymorphisms affect, direct or indirectly, the protein glucose transport function and are related to the development of pathologies associated to the glucose accumulation or absence in the cell [Liu et al., 1998; Liu et al, 1999; Grzeszczak et al, 2001; Hodgkinson et al, 2005]. In relation to HTLV-1 infection, this is the first study that analyzes SNP in GLUT1 gene, the virus infection susceptibility and the development of associated diseases. As only a subset of HTLV-1 infected individuals develops TSP/HAM or ATLL, perhaps a difference could exist in the GLUT1 protein activity, together with viral and carriers factors, between those who are susceptible to disease development and those who are not. This difference can be caused by a protein variant or by a polymorphism in the regulatory part of the gene involved in its expression.

It has been previously demonstrated that high HTLV-1 proviral load is associated with an increased risk of progression to disease [Nagai et al., 1998], progression of motor disability [Takenouchi et al., 2003] and risk of sexual transmission of HTLV-1 [Kaplan et al., 1996]. In TSP/HAM patients from Japan, the median provirus load in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is more than ten times higher than in asymptomatics [Nagai et al., 1998]. In this study, it was observed that the median HTLV-1 provirus load is smaller in asymptomatic carriers than in oligosymptomatic and TSP/HAM

patients, suggesting that this aspect of HTLV-1 infection is associated with the development of neurological symptoms.

The HaeIIIT>C polymorphism is localized in the exon 2 of GLUT1 gene and it does not cause any aminoacid change. These results did not demonstrate an association between allelic and genotypic frequencies of this polymorphism and the risk of TSP/HAM development.

The -2841A>T polymorphism is localized next to a HIF-responsive element in the GLUT1 promoter that has the capacity to up-regulate GLUT1 expression in hypoxic conditions [Hayashi et al., 2004]. It has been recently demonstrated that Tax (HTLV-1 regulatory protein) mediates the HIF-1(Hypoxia-inducible factor-1) transcriptional activation by PI3K(Phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT signaling pathway [Tomita et al., 2007]. This mechanism could induce GLUT1 expression in HTLV-1 infected cells and facilitate its transmission. In this study, no association between -2841A>T polymorphism and TSP/HAM development was observed. The novel -2807G>T mutation was observed in 1.7% of the population studied, characterizing this mutation as a polymorphic site.

The XbaIG>T polymorphism has been associated to susceptibility to diabetic nephropathy in different populations. The observed results did not demonstrate any difference in genotypic and allelic frequencies between HTLV-1 infected and non-infected individuals and between HTLV-1 infected patients with different clinic status. The association of XbaIG>T polymorphism and diabetic nephropathy has been suggested to be caused by linkage disequilibrium with other functional disease marker, since this polymorphism occurs in the intron 2 of GLUT1 gene and does not cause a protein modification. In this study, a strong linkage disequilibrium of XbaIG>T and HaeIIIT>C polymorphisms was observed. However, as previously shown, both polymorphisms are not associated with TSP/HAM development in our population and they can not be used as markers of this pathology.

These results suggest that the XbaIG>T, HaeIIIT>C and -2841A>T polymorphisms at GLUT1 gene, although probably related to glucose entry in the cell (XbaIG>T and -2841A>T polymorphisms), are not associated with HTLV-1 infection or with the

TSP/HAM development, suggesting that different activities of the GLUT1 protein (glucose transport and HTLV entry) are mediated by its distinct domains.

### ACKNOWLEDGMENT

This work was partially supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). The authors are grateful to Noilson Lázaro de Souza Gonçalves and Elisabeth Deliège for technical assistance. We thank Maurício Barreto and Gloria Teixeira for the study design of the non-infected individuals and to Ceuci Nunes for the clinical evaluation.

### REFERENCES

- Bangham CR, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Igakura T. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton . *Science* 299: 1713-1716.
- Coskun AK & Sutton RE. 2005. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol* 79(7): 4150-4158.
- Dourado I., Alcantara L.C., Barreto M.L., da Gloria Teixeira M., Galvao-Castro B. 2003. HTLV-I in the general population of Salvador , Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34: 527-531.
- Galvão-Castro B., Loures L., Proietti F., et al. 1997. Distribution of Human T-Cell Lymphotropic Virus type 1 among blood donors: a nation-wide Brazilian study. *Transfusion* 37: 42.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, Thé G. 1985. Antibodies to human T lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 2:407-410.
- Grzeszczak W, Moczulski DK, Zychma M, Szczechowska E, Trautsolt W, Szydłowska I. 2001. Role of GLUT1 gene in susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes *Kidney Int* 59: 631-636.
- Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Broch M, Aguilar C, Llor C, Simon I, Richart C. 1998. GLUT1 gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus: genetic susceptibility relationship with cardiovascular risk factors and microangiopathic complications in a Mediterranean population. *Diabetes Res Clin Pract*. 41:113-120.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. 2004. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *Journal of Endocrinol.* 183: 145-154.

Hodgkinson AD, Page T, Millward BA, Demaine AG. 2005. A novel polymorphism in the 5' flanking region of the glucose transporter (GLUT1) gene is strongly associated with diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabet Complications* 19: 65-69.

Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL and 12 other authors. 1996. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12:193-201.

Kitajima, I., I. Maruyama, Y. Maruyama, S. Ijichi, N. Eiraku, Y. Mimura, and M. Osame. 1989. Polyarthritis in human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Arthritis Rheum.* 32:1342-1344.

LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, and W. Blattner. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336:1345-1347.

Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C, Olivieri F, Cavallone L, Giovanietti S, Masliah E, Franceschi C. 2003. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging.* 24(7):921-6.

Liu Z, Guan T, Chen Z. 1998. Insulin receptor substrate-1 and glucose transporter gene polymorphisms in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 78(9):662-5.

Liu ZH, Guan TJ, Chen ZH, Li LS. 1999. Glucose transporter (GLUT1) allele (XbaI-) associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 55: 1843-1848.

Manel N, Battini JL, Sitbon M. 2005. Human T Cell Leukemia Virus Envelope Binding and Virus Entry Are Mediated by Distinct Domains of the Glucose Transporter GLUT1. *J Biol Chem.* 280(32):29025-29029.

Mochizuki, M., K. Yamaguchi, K. Takatsuki, T. Watanabe, S. Mori, and K. Tajima. 1992. HTLV-I and uveitis. *Lancet* 339:1110.

Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char. 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 2(8673):1184-7.

Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. 1998. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J. Neurovirol* 4:586-593.

Ng DP, Canani L, Araki S, Smiles A, Moczulski D, Warram JH, Krolewski AS. 2002. Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 51(7):2264-2269.

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

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JA, Gallo RC. 1980. 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 USA*. 77:7415-7419.

Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86:248-249.

Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SEF, Usuku K, Bangham CRM, Osame M. 2004. Polymorphism in the Interleukin-10 Promoter Affects Both Provirus Load and the Risk of Human T Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *J. Infect Dis* 190: 1279-85.

Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. 2003. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 9:29-35.

Tomita M, Semenza GL, Michiels C, Matsuda T, Uchihara J, Okudaira T, Tanaka Y, Taira N, Ohshiro K, Mori N. 2007. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Biochemical J*. [Epub ahead of print]

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:2031-2035.

Yoshikawa T, Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, Tanaka T, Yamaguchi M, Shigeta H, Ogata M, Nakamura N. 2002. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetic Med* 19: 1000-1005.

Figure 1- HTLV-1 provirus load of HTLV-1 infected individuals. Median HTLV-1 copy numbers per  $10^6$  PBMC determined by quantitative PCR are shown. The HTLV-1 provirus load did not differ between the genotypes from each polymorphic site analyzed.

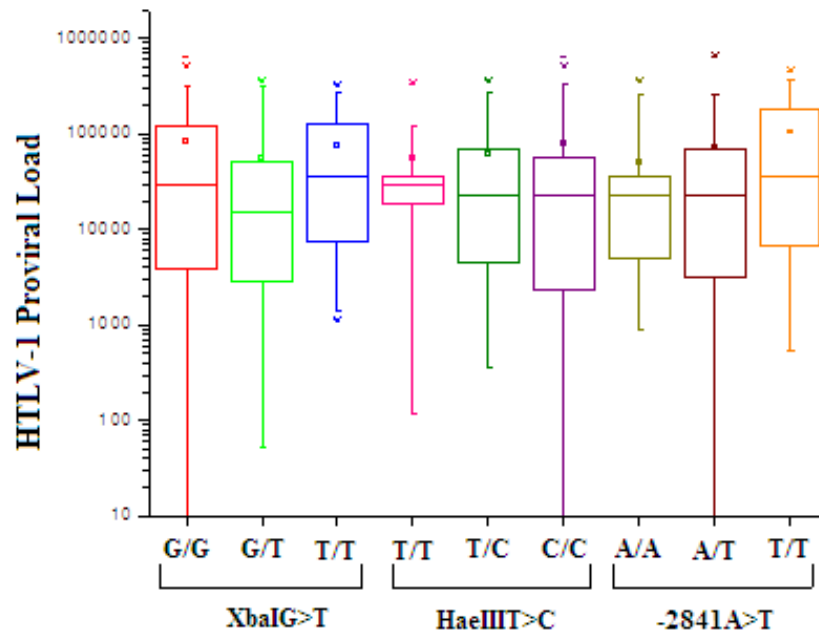


Table 1. Genotypic and allelic frequencies of the XbaI, HaeIII and -2841 polymorphisms in HTLV-1 infected and non-infected individuals.

	Genotypes				Alleles	
	N	G/G(%)	G/T(%)	T/T(%)	G(%)	T(%)
<b>XbaIG&gt;T<sup>a</sup></b>						
Infected individuals	244	89(36.5)	126(51.6)	29(11.9)	304(62.3)	184(37.7)
Non-infected individuals	102	29(28.4)	57(55.9)	16(15.7)	115(56.4)	89(43.6)
<b>HaeIIIT&gt;C<sup>b</sup></b>						
Infected individuals	244	17(7.0)	80(32.8)	147(60.2)	114(23.4)	374(76.6)
Non-infected individuals	102	1(1.0)	36(35.3)	65(63.7)	38(18.6)	166(81.4)
<b>-2841A&gt;T<sup>c</sup></b>						
Infected individuals	125	36(28.8)	61(48.8)	28(22.4)	133(53.2)	117(46.8)
Non-infected individuals	55	12(21.8)	26(47.3)	17(30.9)	50(45.5)	60(54.5)

<sup>a</sup>Allelic frequencies: p=0.157. <sup>b</sup>Allelic frequencies: p=0.222. <sup>c</sup>Allelic frequencies: p=0.719.

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of the XbaI, HaeIII and -2841 polymorphisms in HTLV-1 infected individuals (asymptomatics and TSP/HAM).

		Genotypes			Alleles	
<b>XbaIG&gt;T</b>	<b>N</b>	<b>G/G(%)</b>	<b>G/T(%)</b>	<b>T/T(%)</b>	<b>G(%)</b>	<b>T(%)</b>
Asymptomatic <sup>a</sup>	136	46(33.8)	74(54.4)	16(11.8)	166(61.0)	106(39.0)
TSP/HAM <sup>a</sup>	90	32(35.6)	46(51.1)	12(13.3)	110(61.1)	70(38.9)
<b>HaeIIIT&gt;C</b>	<b>N</b>	<b>T/T(%)</b>	<b>T/C(%)</b>	<b>C/C(%)</b>	<b>T(%)</b>	<b>C(%)</b>
Asymptomatic <sup>b</sup>	136	10(7.3)	36(26.5)	90(66.2)	56(20.6)	216(79.4)
TSP/HAM <sup>b</sup>	90	5(5.6)	37(41.1)	48(53.3)	47(26.1)	133(73.9)
<b>-2841A&gt;T</b>	<b>N</b>	<b>A/A(%)</b>	<b>A/T(%)</b>	<b>T/T(%)</b>	<b>A(%)</b>	<b>T(%)</b>
Asymptomatic <sup>c</sup>	53	14(26.4)	29(54.7)	10(18.9)	57(53.8)	49(46.2)
TSP/HAM <sup>c</sup>	54	18(33.3)	23(42.6)	13(24.1)	59(54.6)	49(45.4)

<sup>a</sup>Allelic frequencies: p=0.099. <sup>b</sup>Allelic frequencies: p=0.171. <sup>c</sup>Allelic frequencies: p=0.900..



## APÊNDICE 3



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE ADMINISTRAÇÃO

CENTRO MÉDICO DE BROTAS

COORDENADORIA GERAL

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

---

**Projeto de Pesquisa:** "Correlação dos polimorfismos genéticos no HTLV-1 e nos Genes Humanos de IL-6, IL-2, IL-2R $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e GLUT1, e análises funcionais destes polimorfismos com o desenvolvimento de TSP/HAM"

**Pesquisadores responsáveis:** Dr. Bernardo Galvão Castro-Filho (CREMEB 10527) e Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara (Laboratório Avançado de Saúde Pública – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – 3176-2255).

#### Propósito e revisão Geral

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) de um projeto de pesquisa sobre o HTLV-1. Para isto estudaremos algumas características herdadas com o objetivo de entender melhor o mecanismo utilizado pelo vírus durante a infecção.

O ambulatório de HTLV da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – é coordenado pelo Dr. Bernardo Galvão, médico, CREMEB. Neste ambulatório, o(a) Sr(a) terá todo o atendimento necessário para o seu caso, como várias especialidades médicas, laboratório e fisioterapia sem nenhum custo para o(a) Sr(a).

Para os indivíduos que concordarem em participar desta pesquisa será aplicado um questionário para coleta de dados pessoais e realizada a coleta de 10 ml de sangue utilizando material apropriado (tubos e agulhas estéreis e descartáveis). Essa coleta poderá provocar desconforto temporário causado pela picada da agulha, queimor, e, muito raramente, hematoma e infecção. O material coletado será processado e analisado no Laboratório Avançado de Saúde Pública da FIOCRUZ. Todos estes dados serão mantidos em sigilo e somente a equipe de saúde terá conhecimento.

Após a investigação laboratorial, os médicos assistentes serão comunicados sobre os resultados das análises, os quais repassarão aos participantes os esclarecimentos necessários. Gostaríamos ainda de esclarecer que a não concordância em participar deste estudo não implicará em nenhum prejuízo referente ao seu acompanhamento médico.

Este estudo possibilitará um maior conhecimento sobre como age o vírus no seu organismo, ajudando a entender porque alguns indivíduos desenvolvem TSP/HAM e outros não. Assim, essas informações poderão oferecer melhor orientação quanto à prevenção e estratégias de tratamento.

#### **-Consentimento**

Eu recebi uma cópia desse consentimento e tenho o direito de negar ou desistir de participar desse estudo em qualquer momento sem nenhum prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu \_\_\_\_\_, R.G. \_\_\_\_\_

reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar deste estudo, e estou ciente de:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que serei submetido;

2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Salvador, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

Testemunha 1: \_\_\_\_\_

Testemunha \_\_\_\_\_

