

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz — FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA EVANDRO
CHAGAS DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM
DOENÇAS INFECCIOSAS**

DORIS SCHOR

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS DO HLA
CLASSE I E II E DO POLIMORFISMO DOS GENES DE
CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

RIO DE JANEIRO

2013

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS DO HLA CLASSE I E II E DO POLIMORFISMO DOS GENES DE CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

DORIS SCHOR

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Maria José de Andrada-Serpa

RIO DE JANEIRO

2013

DORIS SCHOR

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS DO HLA
CLASSE I E II E DO POLIMORFISMO DOS GENES DE
CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Maria José de Andrada-Serpa

Banca examinadora

Abelardo de Queiróz-Campos Araújo - IPEC/Fiocruz

Ana Teresa Gomes Fernandes - IPEC/Fiocruz

Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto – UERJ

Marcus Tullius Teixeira da Silva – IPEC/Fiocruz

Maria da Glória Bonecini de Almeida – IPEC/Fiocruz

Dedicatória

Aos meus pais *in memoriam*

Ao meu filho

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui minha gratidão para:

Dra. Maria José de Andrada-Serpa pela orientação,

Luciane Pontes *in memoriam* ,

Isaac Lima da Silva Filho e Otávio de Melo Espíndola por todos os momentos no Laboratório,

Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções pela parceria,

Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ, pela cooperação,

Gustavo Milson Fabrício-Silva e Juliana Cardoso de Oliveira do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ, pela ajuda e orientação na realização da parte laboratorial e acolhimento.

Dr. Abelardo Queiroz- Campos Araújo pelo apoio no projeto da tese.

Dra. Maria da Glória Bonecini pela revisão, e pelo agradável convívio nas reuniões do IPEC fora da cidade.

Aos meus queridos familiares do Rio Grande do Sul, às amigas incondicionais Simone Poncy e Lucia de Larocque, às amigas Andreza Almeida e Albuquerque, Cristina Garcia dos Santos Silva e Diana Israel pela amizade construída ao longo desses anos, ao grupo de estudo e amigas, que me incentivam na busca da espiritualidade, professora Regina Szterenfeld, Mary Berezin, Regina Fuchs, Rachel Chueke ,Sprintza Laim e Suely Jurberg.

Embora muitas sejam as
folhas, a raiz é só uma;

Ao longo dos
enganadores dias da
mocidade,

Oscilaram ao sol minhas
folhas, minhas flores,

Agora posso murchar no
coração da verdade.

W.B. Yeats

Schor, D. **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS DO HLA CLASSE I E II E DO POLIMORFISMO DOS GENES DE CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**. Rio de Janeiro, 2013.117 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O vírus linfotrópico para células T humanas (HTLV-1) é o principal agente causador da Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) e da Leucemia da célula T do Adulto (LTA). A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática, somente 2 a 5% irão desenvolver uma das duas doenças. Fatores da interação HTLV-1/ hospedeiro estão envolvidos no risco de desenvolver doença. A lesão neurológica na PET/MAH parece ser consequência de uma reação inflamatória, desencadeada pelo reconhecimento de células infectadas por linfócitos T citotóxicos, com consequente liberação de citocinas e lesão medular. **OBJETIVO:** Identificar marcadores genéticos, que possam ajudar no prognóstico e tratamento dos pacientes portadores do HTLV-1. **MÉTODOS:** Nas amostras de 117 portadores do HTLV-1 assintomáticos e 171 pacientes com acometimento neurológico em acompanhamento na cidade do Rio de Janeiro, foram realizadas as tipificações dos genes do HLA Classe I e II, dos polimorfismos dos genes das citocinas *-308TNF- α* , *-174IL-6*, *+874IFN- γ* , *códon 10* e *25TGF- β 1* e *-1082 - 819-592IL-10*, e a quantificação da carga proviral. Os dados foram organizados em um banco de dados no programa SPSS. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para os polimorfismos das citocinas no sítio http://bioinfo.iconcologia.net/ubbweb/SNPStats_web, em relação ao HLA foram utilizadas as ferramentas disponíveis no sítio “Los Alamos HIV database tools”. As comparações entre os grupos foram realizadas através de tabelas de contingência 2x2 (qui-quadrado, exato de Fisher e *odds ratios*), valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** O alelo A*02 não influencia a condição clínica nem os níveis da carga proviral. Os alelos A*29 e B*44 foram mais frequentes entre os indivíduos assintomáticos e a sua presença influenciou os níveis da carga proviral sugerindo proteção ao desenvolvimento de doença neurológica. O alelo A*68 foi mais frequente entre os pacientes com doença neurológica, porém sua presença não influenciou nos níveis da carga proviral. O alelo C*04 foi mais frequente entre os portadores assintomáticos e não influenciou os níveis de carga proviral, já o alelo DRB1*03 predominou entre os pacientes com doença neurológica e a sua presença entre os indivíduos assintomáticos acarretou níveis mais elevados de carga proviral, sugerindo ser um possível fator de risco para o desenvolvimento de doença neurológica. Na análise do polimorfismo genético das citocinas, o polimorfismo de IL-10, com perfil fenotípico de baixo produtor da citocina foi mais frequente no grupo dos assintomáticos, enquanto que o fenótipo de produtor intermediário predominou entre os sintomáticos. O perfil fenotípico da população estudada foi caracterizado como: baixo produtor da citocina *-308TNF- α* , intermediário a alto produtor para códon 10 e códon 25 TGF- β , baixo a intermediário produtor para *-1082,-819,-592 IL-10*, alto produtor para *-174 IL-6* e baixo a intermediário produtor para *+874IFN- γ* .

Palavras chave: HTLV, PET/MAH, HLA, Citocina

Schor, D. **STUDY OF THE INFLUENCE OF HLA CLASS I AND II ALLELES AND THE POLYMORPHISM OF CYTOKINES GENES IN HTLV-1 INFECTION.** Rio de Janeiro, 2013.117 f. THESIS [PhD in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The human T cell lymphotropic virus (HTLV-1) is the main causing agent of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (HAM/TSP) as well as of Adult T Cell Leukemia (ATL). Most of the infected individuals remain asymptomatic, only 2 to 5 % end up developing either one of these diseases. Factors related to the HTLV-1/host interaction may be involved in the risk of developing the diseases. The neurological lesion in HAM/TSP may be the consequence of an inflammatory reaction, triggered by the recognition of infected cells by cytotoxic T lymphocytes, followed by the release of cytokines and central nervous system lesion. **OBJECTIVE:** This work aims to identify genetic markers, which may help in the prognosis and treatment of HTLV-1 patients. **Methods:** The polymorphism of the HLA Class I and II genes, as well as the *TNF- α* , *IL6*, *IFN- γ* , *TGF- β* and *IL-10* cytokine genes, and the proviral load were analysed in 117 asymptomatic HTLV-1 carriers and 171 HTLV-1 symptomatic carriers from Rio de Janeiro city. Data were organized into a database using SPSS. The Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated for cytokine polymorphisms using the site http://bioinfo.iconcologia.net/ubbweb/SNPStats_web. The tools available in the site “Los Alamos HIV database tools” were used to analyze the HLA polymorphisms. Comparisons between groups were made using 2x2 contingency tables (Fisher Exact test/ χ^2 and odds ratios), *p* values $p \leq 0,05$ were considered significant. **RESULTS and CONCLUSIONS:** The A*02 allele does not influence the clinical condition or the levels of proviral load. The alleles A*29 and B*44 were more frequent among asymptomatic individuals and their presence influenced the levels of proviral load, suggesting protection for the development of neurological disease. The A*68 allele was more frequent among patients with neurological disease, but did not influence the levels of proviral load. The C*04 allele presented a higher frequency in the asymptomatic carriers, and did not influence the proviral load levels. The DRB1*03 allele was more frequent among the symptomatic carriers. However the asymptomatic individuals that possess the DRB1*03 allele, have higher levels of proviral load, suggesting a possible risk factor for neurological disease. In the analysis of the genetic polymorphism of the cytokines, the IL-10 polymorphism, with a phenotypic profile of low cytokine production was more frequent in the asymptomatic group, while the intermediate producer phenotype predominated among the symptomatic. The phenotypic profile of the study population was characterized as low cytokine producer 308TNF- α -, intermediate to high producer for codon 10 and codon 25 TGF- β -, low to intermediate producer to -1082, -819, -592 IL-10, high producer for -174 IL-6 and low to intermediate producer to +874 IFN- γ .

Keywords: HTLV-1, HAM/TSP, HLA, Cytokine

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	A) Estrutura do HTLV-1; B) Organização genômica; C) RNAs mensageiros	3
Figura 2.	Dano por toxicidade direta induzida pelas células T CD8 ⁺ contra células da glia infectadas	12
Figura 3.	Teoria da autoimunidade	13
Figura 4.	Teoria do dano circunstante	14
Figura 5.	Diagrama esquemático de uma molécula de classe I do MHC	16
Figura 6.	Diagrama esquemático de uma molécula de classe II do MHC	17
Figura 7.	Mapa dos genes do antígeno leucocitário humano	18
Figura 8.	Localização cromossômica do gene de TNF- α	26
Figura 9.	Localização cromossômica do gene de IL-6.....	27
Figura 10.	Localização cromossômica do gene de IFN- γ	28
Figura 11.	Localização cromossômica do gene de TGF- β	29
Figura 12.	Localização cromossômica do gene de IL-10.....	30
Figura 13.	Formulário utilizado para interpretação da tipificação do HLA-Classe I.....	36
Figura 14.	Fotografia de gel após corrida eletroforética para tipificação dos alelos de citocinas.....	42
Figura 15.	Ficha de interpretação da tipificação das citocinas.....	43
Figura 16.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a condição clínica.....	48
Figura 17.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*02.....	50

Figura 18.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*29.....	51
Figura 19.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*68.....	52
Figura 20.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-B*44.....	54
Figura 21.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-C*04.....	56
Figura 22.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-DRB1*03.....	58
Figura 23.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos assintomáticos de acordo com a presença de HLA-DRB1*03.....	58
Figura 24.	Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos sintomáticos de acordo com a presença de HLA-DRB1*03.....	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Publicações referentes à associação entre polimorfismos de genes HLA e HTLV-1	21
Tabela 2.	Distribuição dos pacientes de acordo com a naturalidade e a condição clínica	46
Tabela 3.	Distribuição dos casos de acordo como diagnóstico neurológico e o gênero	47
Tabela 4.	Distribuição dos pacientes de acordo com a cor da pele e a condição clínica	47
Tabela 5.	Distribuição da provável via de infecção de acordo com a condição clínica	48
Tabela 6.	Distribuição dos alelos HLA-A de acordo com a presença de sintomatologia neurológica	49
Tabela 7.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*02	50
Tabela 8.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*29	51
Tabela 9.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*68	52
Tabela 10.	Distribuição dos alelos HLA-B de acordo com a presença de sintomatologia neurológica	53
Tabela 11.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*44	54
Tabela 12.	Distribuição dos alelos HLA-C de acordo com a presença de sintomatologia neurológica	55

Tabela 13.	Distribuição dos casos de acordo com a condição neurológica neurológica e a presença do alelo HLA-C*04	56
Tabela 14.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 de acordo com a presença de sintomatologia neurológica	57
Tabela 15.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DRB1*03	57
Tabela 16.	Frequência alélica do HLA-DQA nos pacientes de acordo com a condição clínica	59
Tabela 17.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DQA1*03	60
Tabela 18.	Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DQA1*05	60
Tabela 19.	Frequência alélica do HLA-DQB nos pacientes de acordo com a condição clínica	61
Tabela 20.	Distribuição alélica genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica (<i>TNFA-308</i>)	62
Tabela 21.	Distribuição alélica genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica (<i>IL6-174</i>)	62
Tabela 22.	Distribuição alélica genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica (<i>IFN+874</i>)	63
Tabela 23.	Distribuição alélica genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica (<i>TGF códons 10 e 25</i>)	64
Tabela 24.	Distribuição dos haplótipos de TGF- β dos códons 10T/C e 25G/C de acordo com a condição clínica	65

Tabela 25.	Distribuição alélica genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica (<i>IL10</i>)	66
Tabela 26.	Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos polimorfismos de <i>IL-10</i> de acordo com o gênero dos pacientes	67
Tabela 27.	Distribuição do genótipo do polimorfismo -1082 da <i>IL-10</i> de acordo com o gênero e a condição clínica dos pacientes.....	68
Tabela 28.	Distribuição dos haplótipos de <i>IL-10</i> (-1082G/A, -819C/T e -592C/A) de acordo com a condição clínica ..	68
Tabela 29.	Distribuição dos polimorfismos das citocinas de acordo com o nível de produção e a condição clínica	69

LISTA DE ABREVIATURAS

CD4⁺ - *cluster of differentiation 4 +*

CD8⁺ - *cluster of differentiation 8 +*

DNA - ácido desoxirribonucleico

GLUT-1 - transportador de glicose do tipo 1

HLA - Antígeno do leucócito humano/ *human leukocyte antigen*

HTLV-1 - vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1

IL- Interleucina

INF- γ - Interferon – gama

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LTA - Leucemia da célula T do adulto

LTR - *Long terminal repeat*

NK - *natural killer*

PCR - Reação em cadeia da polimerase/ *Polymerase chain reaction*

PET/MAH - Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1

RNA – ácido ribonucleico

SNPs - Polimorfismos únicos de nucleotídeos / *Single nucleotide polymorphisms*

SSO-PCR Reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos de sequência específica

SSP-PCR - Reação em cadeia da polimerase sequência específica /Single specific primer

TGF- β - Fator de crescimento transformador

Th 1, Th 2 - Célula T *helper* do tipo 1, 2

TNF α - Fator de Necrose Tumoral- alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O VÍRUS LINFOTRÓPICO PARA CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO-1	1
1.2. EPIDEMIOLOGIA	4
1.3. PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1 ...	8
1.3.1. LEUCEMIA DA CÉLULA T DO ADULTO	8
1.3.2. PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL (PET) / (MAH) MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1	11
1.3.2.1. TOXICIDADE DIRETA	11
1.3.2.2. REAÇÃO AUTOIMUNE	12
1.3.2.3. HIPÓTESE DO DANO CIRCUNSTANTE (<i>bystander</i>)...	13
1.4. OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	14
1.5. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)	14
1.5.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE HLA E DOENÇAS	19
1.5.2. ASSOCIAÇÃO HTLV-1 E ALELOS DO HLA	19
1.6. CITOCINAS.....	22
1.6.1. POLIMORFISMOS ÚNICOS DE NUCLEOTÍDEOS – SINGLE NUCLEOTIDE POLYMOPHISMS – SNPs e	

CITOCINAS	23
1.6.2. CITOCINAS E HTLV-1 COM ÊNFASE EM TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β e IL-10	23
1.6.3. FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α)	25
1.6.4. INTERLEUCINA 6 (IL-6)	26
1.6.5. INTERFERON GAMA (IFN- γ)	27
1.6.6. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR- β (TGF- β)	28
1.6.7. INTERLEUCINA 10 (IL10)	29
1.7. CARGA PROVIRAL (CPV)	30
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. GERAL	32
3.2. ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. TIPO DE ESTUDO	33
4.2. POPULAÇÃO ESTUDADA	33
4.3. CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO NA PESQUISA	33
4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	33
4.5. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	34

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL PARA HTLV-1	34
4.7. ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE HLA CLASSE I LOCUS A, B e C	35
4.7.1. REALIZAÇÃO DA SSP-PCR	37
4.7.2. ELETROFORESE	38
4.8. ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE HLA CLASSE II LOCUS DR e DQ	38
4.8.1. REALIZAÇÃO DA SSO-PCR	38
4.8.1.1. AMPLIFICAÇÃO	38
4.8.1.2. ELETROFORESE E VISUALIZAÇÃO DO GEL.....	39
4.8.1.3. DESNATURAÇÃO/NEUTRALIZAÇÃO	39
4.8.1.4. HIBRIDIZAÇÃO	40
4.8.1.5. MARCAÇÃO	40
4.8.1.6. AQUISIÇÃO DE DADOS	40
4.9. ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DE TNFA - 308G/A, IL6 -174G/C, IFNG +874A/T, TGFB códon 10T/C e 25G/C e IL10 -1082A/G, -819C/T, -592A/C ...	41
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	45
5.1. AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DOS PORTADORES DE HTLV-1	48

5.2. TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS HLA	49
5.2.1. CONDIÇÃO CLÍNICA	49
5.3. AVALIAÇÃO DOS SNPs EM GENES LIGADOS ÀS CITOCINAS	61
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	80
8. BIBLIOGRAFIA	81
ANEXO	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO PARA CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO- 1

O vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), foi o primeiro retrovírus descrito em seres humanos e associado à uma doença maligna. Nos anos 70, no Japão, foram descritos casos de leucemia com características epidemiológicas de doença infecciosa (Uchiyama et al., 1977). O HTLV-1 foi isolado primeiramente de um paciente com linfoma cutâneo (Poiesz et al., 1980), que em seguida, foi caracterizado como leucemia/linfoma de células T do adulto (LTA). Posteriormente, o HTLV-1 foi associado a uma mielopatia crônica progressiva denominada de paraparesia espástica tropical (PET) nas regiões tropicais (Caribe), ou mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH) nas regiões temperadas (Japão) (Gessain et al., 1985, Osame et al., 1986). Atualmente, outras doenças foram descritas como também associadas à infecção pelo HTLV-1 tais como: uveítes (Mochizuki et al., 1992), polimiosite (Morgan et al., 1989, Vernant et al., 1990) e dermatite “infectiva” (LaGrenade et al., 1990, Tsukasaki et al., 1994, Araújo et al., 1995, Lenzi et al., 2003, Silva et al., 2009).

A infecção pelo HTLV-1 atinge cerca de 10-20 milhões de pessoas em todo o mundo (De Thé et al., 1996), entretanto, a maioria permanece assintomática sem evidências de doença clínica. O HTLV-1 é um retrovírus complexo que pertence à subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero Deltaretrovirus (Fields, 2007). Os retrovírus são semelhantes em sua morfologia, organização genômica e ciclo de replicação. A partícula viral mede de 80 a 140 nm de diâmetro em microscopia eletrônica e é composta por 30–35% de lipídeos derivados da membrana, 60% de proteínas e 2% de RNA. O genoma do HTLV-1 tem aproximadamente 9 kb de comprimento (Figura 1), e contém os genes estruturais: *gag*, que codifica as proteínas estruturais do capsídeo e nucleocapsídeo, *pol* que codifica enzimas como transcriptase reversa, integrase, e protease, e *env* que codifica as proteínas do envelope (gp46 e gp21). Juntamente com os genes estruturais, existe na porção terminal 3', uma região que inicialmente por não se conhecer sua função foi chamada de *pX*. Esta região codifica

proteínas reguladoras: a proteína Tax (p40) que tem a função de ativar a replicação viral, além de ter a capacidade de transativar a transcrição de numerosos genes celulares, e a proteína Rex, que está envolvida no processamento e migração do RNAm viral para o citoplasma. Na região *pX*, estão codificadas proteínas virais acessórias não estruturais como p12, que é clivada dando origem a proteína p8, e que possuem efeitos antagônicos. A proteína p12 é encontrada no retículo endoplasmático e modula a ativação e proliferação de células T, diminui a expressão de moléculas MHC classe I, contribuindo para que as células infectadas escapem das células T citotóxicas e, também, promove a propagação do vírus célula a célula (Nakano et al., 2012, Edwards et al., 2011). A proteína p8 migra para a membrana plasmática induzindo a anergia das células T, promove o contato entre as células, aumentando a transmissão e transferência do vírus para células vizinhas (Van Prooyen et al., 2010). Outras proteínas expressas na superfície das células infectadas, também estão envolvidas no contato célula a célula, facilitando a transmissão do vírus como GLUT-1 /transportador de glicose do tipo 1 (Manel et al., 2003), proteoglicanos de heparan sulfato (Tanaka et al., 2012) e neuropilina-1 (Jin et al. 2010). A proteína p13 é predominantemente encontrada na membrana interna das mitocôndrias das células infectadas, mudando sua morfologia e alterando a produção de energia com indução de apoptose celular (Silic-Benussi et al., 2010, Biasiotto, et al., 2010), e também é encontrada no núcleo interagindo com Tax e diminuindo sua expressão (Andresen et al., 2011). A proteína não estrutural p30 é expressa e encontrada no núcleo e nucléolo celular, mediando processos celulares como progressão do ciclo celular, reparo do DNA e exportação de RNAm (Edwards et al., 2011). A proteína p21 é encontrada no citoplasma e sua função ainda não foi elucidada. Transcritos de p21 são expressos constitutivamente em linhagens de células infectadas com o HTLV-1 e em culturas primárias de células mononucleares de portadores de HTLV-1 e pacientes com LTA (Benerman et al., 1992, Nakano et al., 2012). A proteína HBZ assim como Tax, interage com fatores celulares modulando a transcrição dos genes da célula e do vírus (Yasunaga & Matsuoka, 2011).

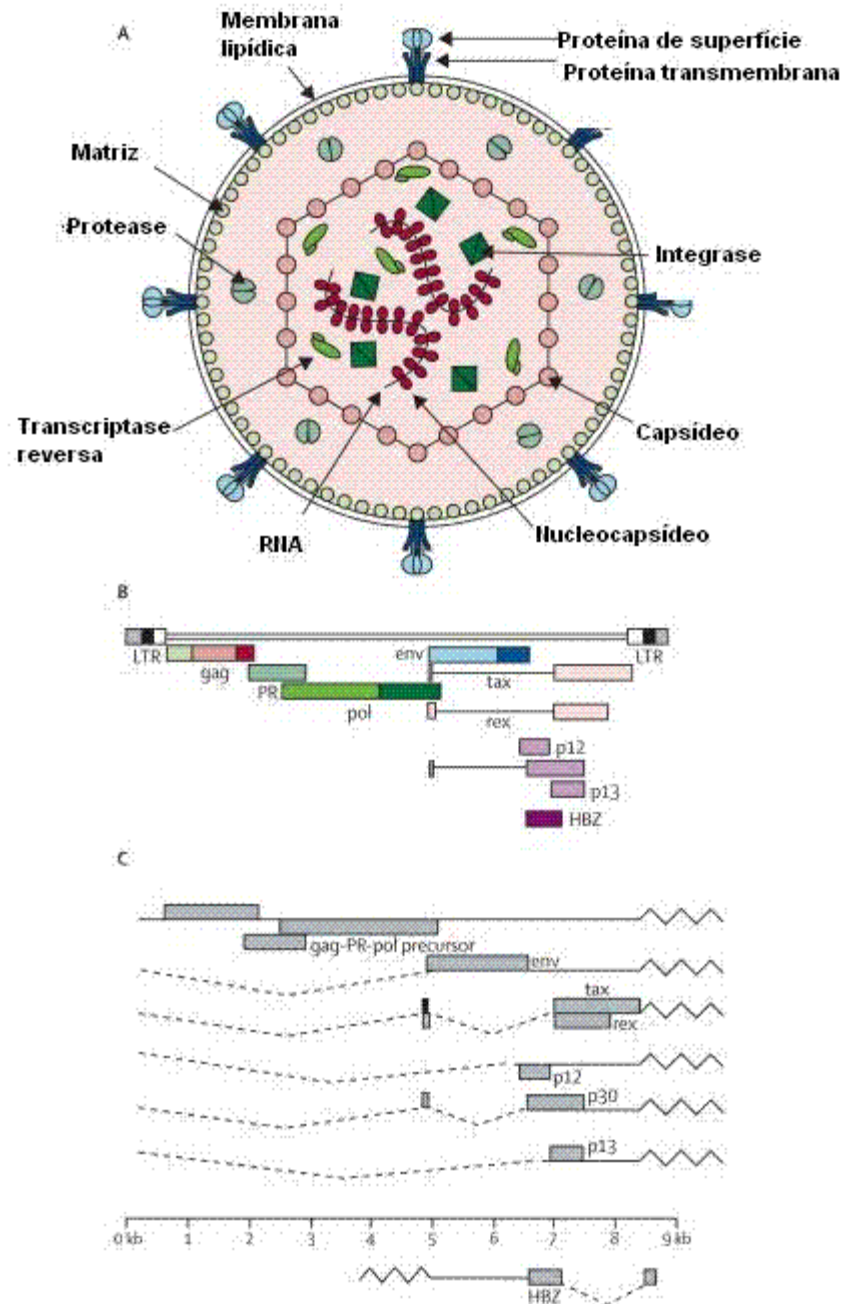


Figura 1: A) Estrutura do HTLV-1; B) Organização genômica; C) RNAs mensageiros (adaptado de Verdonck et al., 2007)

Os retrovírus têm um ciclo de replicação complexo. Seu material genético é formado por duas moléculas idênticas de RNA, que são circundadas por uma cápsula protéica interna e uma membrana lipídica, onde estão as glicoproteínas do

envelope, que se ligam ao receptor GLUT-1 na membrana da célula durante a infecção. Após entrar na célula, a cápsula protéica do vírus é quebrada e o genoma de RNA serve como molde para a transcriptase reversa, sendo copiado para formar uma molécula de DNA. A transcriptase reversa possui três atividades diferentes: a) DNA polimerase RNA dependente, b) RNase H e c) DNA polimerase DNA dependente, por esta razão consegue sintetizar uma fita dupla de DNA a partir do molde de RNA. A dupla fita recém-formada de DNA se circulariza, e sequências específicas localizadas na região LTR do retrovírus dirigem a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, formando o DNA proviral. Após a integração, sequências do DNA viral são transcritas produzindo um RNA complementar. Parte desse RNA funciona como RNA mensageiro e é traduzido, utilizando a maquinaria de síntese de proteínas da célula hospedeira para formar outras partículas virais. A outra parte forma o RNA genômico que é empacotado formando novas partículas virais, que brotam da célula hospedeira sem provocar lise celular (Fields, 2007).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar do HTLV-1 ser um vírus altamente conservado, análises genômicas das regiões consideradas hipervariáveis – região do gene do envelope (*env*) e repetições terminais longas (LTR) sub-classificam as cepas de HTLV-1 isoladas nas diversas regiões do mundo (Slattery et al., 1999). Até o momento sete genótipos do HTLV-1 são conhecidos (Gessain, 2011):

- 1- O subtipo A ou subtipo Cosmopolita é o mais disperso geograficamente. Está presente em muitas áreas e em diversas populações humanas. É o subtipo mais comumente encontrado no Japão, nas Américas, Caribe, Norte, Oeste e Sul da África, Oriente Médio e Índia e em algumas ilhas do Pacífico. Além disso, é o subtipo encontrado na Europa, região não endêmica para o HTLV-1, especialmente entre os imigrantes provenientes de áreas altamente endêmicas (principalmente do Caribe e do oeste da África). Apesar da ampla distribuição geográfica, esta cepa viral apresenta uma divergência muito

baixa. Entretanto quando é feito a análise filogenética da região LTR, mutações específicas, dividem em quatro subgrupos: Transcontinental (Miura et al., 1994), Japonês, oeste (Mahieux et al., 1997) e norte da África (Gasmi et al., 1994).

- 2- O segundo genótipo corresponde ao subtipo B ou subtipo da África Central (protótipo EL), descrito em 1985 em um paciente do Zaire com LTA (Mahieux et al., 1997).
- 3- O terceiro genótipo é o subtipo C ou da Melanésia, descrito primeiramente em indivíduos de Papua–Nova Guiné e Ilhas Salomão. O genótipo C, o mais variante do HTLV-1 também foi descrito em aborígenes da Austrália e moradores das ilhas Vanuatu, Arquipélago de Novas Hébridas (Cassar et al., 2007).
- 4- O último subtipo importante é o genótipo D. Inicialmente descrito em três indivíduos, sendo dois pigmeus, na parte ocidental da África Central (Mahieux et al., 1997). Representa uma pequena proporção das cepas virais em relação ao subtipo B, mais frequente nesta região.
- 5- Os outros genótipos do HTLV-1, E, F e G, têm sido caracterizados em habitantes da África Central. Sua frequência e distribuição geográfica ainda não são bem estudadas (Salemi et al., 1998, Wolfe et al., 2005).

Há pelo menos 30 anos, a prevalência do HTLV-1 no mundo é estimada entre 10 a 20 milhões de indivíduos infectados (de Thé et al., 1996). Estes dados são subestimados, uma vez que a maioria provém de estudos realizados entre doadores de banco de sangue, não caracterizando a distribuição na população como um todo. As taxas de soro prevalência também variam de acordo com a região demográfica da população, sua condição sócio-demográfica e comportamento de risco. Na população japonesa no período entre 2006 e 2007, a prevalência foi de 0,32% em doadores de sangue (Satake et al., 2012), porém, quando avaliada por região, o sudoeste do Japão apresenta 37% (Yamaguchi, 1994, Mueller et al., 1996), no Caribe, acima de 6% (Murphy et al., 1991), e também nos países africanos, acima de 5%, na África Ocidental (Dumas et al., 1991), e na Costa do Pacífico, região de

Tumaco, na Colômbia que apresentam alta prevalência de PET/MAH (Maloney et al., 1989; Trujillo et al., 1992). Verificou-se a existência de focos endêmicos na América Central e em vários países da América do Sul: Brasil, Equador, Venezuela, Guianas e Argentina (Gonçalves et al., 2010).

No Brasil, desde a década de 80, diversos trabalhos mostram a presença do HTLV-1 em nosso meio (Kitagawa et al., 1986; Andrada-Serpa et al., 1988; Andrada-Serpa et al., 1989; Cortes et al., 1989; Lee et al., 1989.). Dispõe-se, no momento, de dados epidemiológicos de diversas regiões do Brasil, porém, considerando as dimensões continentais do país e as respectivas etnias do seu território – expressão de surtos migratórios ocorridos no passado – observa-se que estes dados variam de acordo com a região e a origem étnica de seus habitantes. Desta forma, a Bahia – local que concentra um número maior de indivíduos de cor negra apresenta uma prevalência mais elevada, em torno de 1,8% em doadores de sangue (Galvão-Castro et al., 1997). Da mesma forma, Kitagawa e colaboradores em 1986, ao estudarem imigrantes japoneses, originários de Okinawa, em Campo Grande (MS), verificaram uma alta prevalência de infecção: 13% entre os isseis e de 8% nos nisseis. Para corroborar estes dados, Ferreira e colaboradores (1995), ao estudar 17.063 doadores de sangue em São Paulo, encontraram uma soro-prevalência de 0,15%, sendo a origem asiática, o maior fator de risco para a infecção. No Rio de Janeiro estes números se mostram mais elevados, 0,33% em doadores de sangue e em Recife, a prevalência é de 0,33% igual à do Rio (Galvão-Castro et al., 1997).

No Rio de Janeiro, em torno de 48% das mielopatias de origem desconhecida são devidas à infecção pelo HTLV-1, assim como 14,2% de 134 familiares de pacientes com PET/MAH estão infectados pelo vírus (Andrada-Serpa et al., 1993; Araújo et al., 1994). No Brasil, um estudo realizado com 163 pacientes portadores de PET/MAH, no período entre março de 1994 e abril de 1995, envolvendo cinco centros de três regiões do país, demonstrou que 93,2% dos pacientes eram das regiões nordeste (46,6%) e sudeste (46,6%) sendo que o sul do país apresentou 6,8% dos casos (Araújo et al., 1998). Outro estudo transversal foi realizado em bancos de sangue em 27 capitais brasileiras no período de 1995 a 2000 (Catalan-Soares et al., 2005). As taxas de prevalência média variaram de 0,4/1.000 em

Florianópolis, na região sul, até uma taxa 25 vezes maior, 10,0/1.000 em São Luís, na região nordeste.

Em relação à LTA no Brasil, foram estudados 150 casos entre janeiro de 1994 e janeiro de 1998 (Pombo de Oliveira et al., 1999), distribuídos regionalmente do seguinte modo: nas regiões Sul e Sudeste, 28% dos casos no Rio de Janeiro, 14,6% em São Paulo, 4,6% em Minas Gerais, 1,3% no Rio Grande do Sul, 0,6% no Paraná; nas regiões Norte e Nordeste, 16,6% dos casos na Bahia, 16% em Pernambuco, 3,3% no Pará, 2,6% no Ceará, 4% na Paraíba, 2% no Rio Grande do Norte, 2% em Alagoas, 2% em Sergipe, Maranhão e Piauí. Isto demonstra que a ocorrência de LTA predomina nas regiões onde há uma soro prevalência maior do HTLV-1.

A transmissão do HTLV-1 é dependente da presença de célula e ocorre por três vias principais: a) da mãe para o recém-nato, b) através de contato sexual, c) por transfusão de sangue e pelo uso de seringas contaminadas. A transmissão de mãe para filho representa a principal forma de transmissão em regiões endêmicas e ocorre principalmente pelo leite materno, aproximadamente 15-25% das crianças amamentadas por mães HTLV-1 positivas adquirem a infecção (Ribeiro et al., 2012). A infecção também pode ser transmitida via transplacentária ou no momento do parto (Hino et al., 2011).

A transmissão sexual também ocorre, sendo que a transmissão do homem para a mulher parece ser mais eficiente (Kajiyama et al., 1986; Kaplan et al., 1996). No Brasil, a transmissão sexual do HTLV-1 parece ser um importante fator de risco (Araújo et al., 1998). A transmissão por transfusão sanguínea está relacionada com o tipo do componente do sangue transfundido, assim como ao armazenamento desses componentes. Transfusão de plaquetas parece transmitir mais do que a de hemácias, por exemplo, possivelmente pela maior contaminação com linfócitos. O tempo de estocagem das hemácias reduz a possibilidade de transmissão, provavelmente, porque o linfócito morre durante o armazenamento (Manns et al., 1992). No Brasil, a transmissão por transfusão de componentes sanguíneos está controlada desde 1994, quando o Ministério da Saúde tornou obrigatória a realização de triagem sorológica para HTLV-1/2 nos bancos de sangue. A transmissão do HTLV-1 também ocorre entre usuários de drogas pelo compartilhamento de seringas contaminadas (Proietti et al., 2005).

1.3. PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

1.3.1. LEUCEMIA DA CÉLULA T DO ADULTO

A leucemia da célula T do adulto (LTA) se desenvolve numa pequena proporção de indivíduos infectados (1-5%), na maioria dos casos, a infecção foi adquirida por via vertical, isto é, a infecção ocorreu pela amamentação ou por via transplacentária. Este último dado sugere ser essencial para o desenvolvimento da doença maligna, um longo tempo de latência entre a infecção e a transformação celular, e ainda o contato do vírus com um sistema imune imaturo (Uchiyama, 1997).

A LTA é classificada em quatro subtipos clínicos: agudo, crônico, *smoldering* e linfomatoso, baseado no número de células T anormais no sangue periférico, no nível de desidrogenase láctica (LDH) no soro, nas lesões encontradas, assim como no curso clínico. A porcentagem relativa de cada tipo de LTA é 55% para o tipo agudo; 20% para o tipo linfomatoso; 20% para o tipo crônico; e 5% para o tipo *smoldering* (Shimoyama, 1991). O prognóstico da LTA é ruim. A média de sobrevivência é de seis meses para a forma aguda, 10 meses para a linfomatosa, e 24 meses para o tipo crônico. A maioria dos indivíduos infectados são portadores assintomáticos e são capazes de transmitir o vírus. A chance de desenvolver leucemia ao longo da vida é de 7,29% para homens e 3,78% para mulheres (Koga et al., 2010). A LTA geralmente ocorre na idade adulta, 20 a 30 anos após a infecção (Yamaguchi & Watanabe, 2002).

Alguns indivíduos manifestam alterações conhecidas como “pré-LTA” (Cann & Chen, 1996). Nestas condições, o diagnóstico é feito pela detecção de leucocitose e/ou linfócitos com morfologia anormal (Takatsuki et al., 1979, Gallart et al., 1983, Kinoshita et al., 1985). O HTLV-1 pode ser identificado nas células desses indivíduos através da reação em cadeia da polimerase e o provírus pode ser encontrado integrado no genoma dos linfócitos T CD4⁺ num padrão de integração mono ou oligoclonal. Este dado indica haver predomínio de uma população clonal de linfócitos que pode progredir para uma forma franca de LTA. Aproximadamente, 50% dos pacientes com “pré-LTA” sofrem regressão espontânea da linfocitose. Nos outros 50%, a linfocitose persiste podendo ou não progredir para outros estágios

(Imaizumi et al., 2005). As formas crônicas e *smoldering* são menos agressivas do que a forma aguda da doença, e se caracterizam clinicamente pela presença de lesões cutâneas, baixo nível de células leucêmicas circulantes e ausência de envolvimento visceral (Bittencourt et al., 2009). Na forma crônica, os pacientes apresentam um número mais elevado de células leucêmicas circulantes. Pacientes com ambas as formas (*smoldering* e crônica) podem progredir para a forma aguda num período de meses. As formas “pré-LTA”, *smoldering* e crônica, podem representar fases de transição no desenvolvimento do clone maligno que surge na forma aguda (Ikeda et al., 1993, Gessain, 2011). Na LTA aguda, o clone dominante de células malignas é evidenciado pela presença de um único rearranjo do gene do receptor de célula T (Jarret et al., 1986; Matsuoka et al., 1988), e por um ou poucos provírus arranjados de uma maneira oligoclonal na população de células tumorais (Hoshino et al., 1983; Seiki et al., 1984). Estes pacientes possuem uma elevada contagem de células brancas com linfócitos com morfologia característica “flower-cell”. Outros sintomas incluem linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e lesões da pele devido à infiltração de células leucêmicas. No soro desses pacientes destaca-se aumento da desidrogenase láctica (LDH) e hipercalcemia. A hipercalcemia parece estar relacionada com a produção de IL-1 α e do hormônio da paratireoide. A média de sobrevida nas LTA agudas é de 7,7 meses, mesmo com quimioterapia. (Katsuya et al., 2012).

A morfologia das células do sangue periférico é variável. Células típicas de LTA possuem núcleo lobulado, com grau de irregularidade variável. A histopatologia dos linfonodos dos pacientes com LTA também é heterogênea, não tendo correlação com o prognóstico. Em estudos imunológicos, as células leucêmicas apresentam heterogeneidade fenotípica para os marcadores de superfície. Entretanto, a maioria das LTA são CD4⁺ e com raras exceções, apresentam marcador CD8⁺. Uma característica das células tumorais é o alto nível de expressão de cadeia α do receptor de IL-2. Anormalidades cromossômicas são comuns nestas células (Fukuhara et al., 1983; Miyamoto et al., 1983, Sanada et al., 1985; Whang-Peng et al., 1985, Maruyama et al., 1990, Kawamura et al., 1997, Ohshima et al., 1998, Fujimoto et al., 1999.) e o grau de aberrações cromossômicas está relacionado com

a gravidade da doença, isto é, mais comum na forma aguda do que na crônica ou *smoldering*, sugerindo a possibilidade de evolução clonal durante a progressão da doença. Apesar de existirem anormalidades cromossômicas, a LTA não apresenta uma alteração cromossômica específica ou patognomônica. Através deste contexto, a transformação dos linfócitos T pelo HTLV-1 resulta no aparecimento de um “pool” de células infectadas que proliferam de forma mais intensa, as quais não são transformadas, mas com a evolução pode surgir um clone maligno desta população. Isto está relacionado com o longo período de latência entre a infecção e a manifestação da doença. Durante a fase aguda, quando os pacientes têm uma elevada linfocitose, o DNA proviral pode ser detectado por *Southern blot* e PCR invertido (Takemoto et al., 1994, Kamihira et al., 2005) e em geral é monoclonal com relação ao sítio de integração. Entretanto, o estudo da integração viral em diferentes pacientes com LTA demonstrou que esta integração é distinta e está presente em diferentes cromossomas não existindo um sítio de integração preferencial, sendo a integração do HTLV-1 randômica (Seiki et al., 1984, Doi et al., 2005), o que não proporciona dados para a compreensão do mecanismo de transformação, acredita-se que o mecanismo de trans-ativação gênica seja o principal responsável por este processo.

Uma característica das células tumorais é a pouca expressão de genes virais na célula transformada. Em geral, a concentração de RNAm viral é indetectável em células de pacientes com LTA, ou quando colocadas em cultura. (Franchini et al., 1984, Gessain et al., 1991). Com a descoberta da proteína HBZ (Gaudray et al. 2002), transcritos de HBZ têm sido detectados, tanto em células de pacientes com leucemia, como em linhagens de células de LTA através de RT-PCR (Satou et al., 2006). Após a infecção pelo HTLV-1 e com o provírus integrado randomicamente na célula do hospedeiro, a proteína Tax promove a proliferação das células infectadas, e é possível identificar clones através da técnica de PCR invertido, que se expandem nos portadores do vírus e está diretamente associado ao início da doença (Matsuoka, 2005).

1.3.2. PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (PET) / (MAH) MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1

Em 1985/86, verificou-se que pacientes com PET na Martinica (Gessain et al., 1985) e pacientes com mielopatia no sudoeste do Japão tinham anticorpos contra o HTLV-1 (Osame, et al., 1986). Em estudos comparativos, foi demonstrado que essas duas doenças eram idênticas (OMS 1989). Em 1989, em uma conferência patrocinada pela OMS, foi consenso a designação PET/MAH em referência a doença neurológica, que permanece até hoje (Osame & Igata, 1989, Osame, 1990).

A prevalência de PET/MAH foi estimada ser de um em 1464 indivíduos soropositivos, e o período de infecção até a instalação da doença varia de meses a décadas. A idade média de instalação da doença é de 43 anos, e a ocorrência do sexo masculino para o feminino é de 1:2,9 (Uchiyama, 1997).

As principais características neurológicas de PET/MAH são: espasticidade das extremidades inferiores, distúrbios urinários, fraqueza progressiva nos membros inferiores. Os pacientes apresentam anticorpos anti-HTLV-1 no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR), linfócitos com núcleos lobulados e um moderado aumento de proteínas no LCR podem ser encontrados. O prognóstico da PET/MAH não é ruim, a evolução é arrastada e, em geral, a principal causa de morte é por infecção secundária, a mais frequente é infecção urinária que evolui para septicemia (Uchiyama, 1997). O desenvolvimento da incapacidade neurológica ocorre durante o primeiro ou segundo ano do curso da doença, indicando o início de uma possível fase inflamatória e um estágio degenerativo (Araújo, Silva, 2006).

Em relação a patogenia da mielopatia, três hipóteses foram formuladas:

1.3.2.1. TOXICIDADE DIRETA

Células gliais infectadas, apresentam antígenos virais em sua superfície. Linfócitos T citotóxicos CD8⁺, que são específicos contra antígenos HTLV-1 (principalmente proteína Tax), atravessam a barreira hematoencefálica, atacam as células infectadas do sistema nervoso central, com consequente liberação de citocinas (Figura 2).

Teoria da toxicidade direta

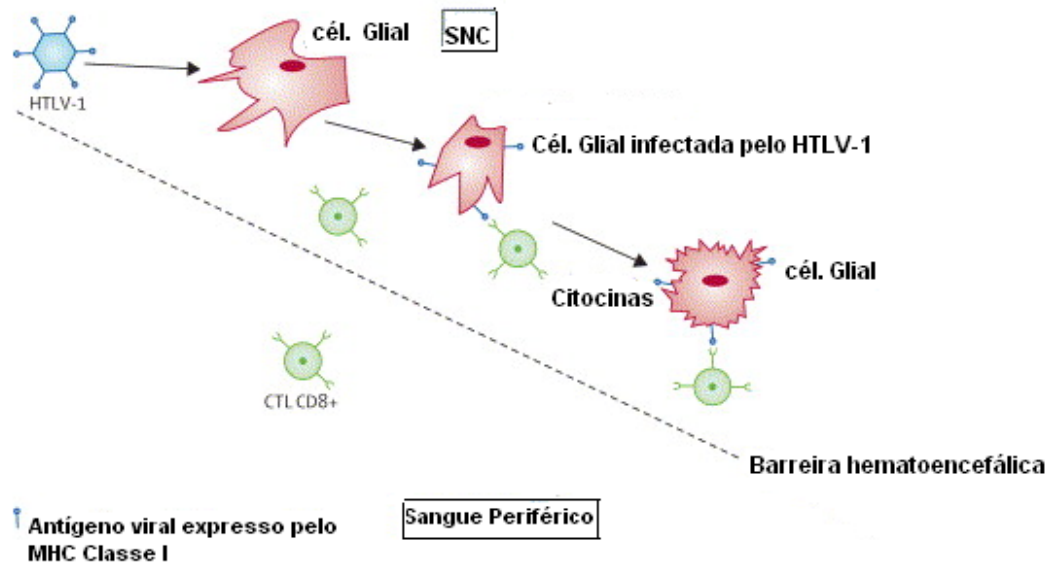


Figura 2. Dano por toxicidade direta induzida pelas células T CD8+ contra células da glia infectadas, adaptado de Araújo & Silva, 2006.

1.3.2.2. REAÇÃO AUTOIMUNE

Proteínas expressas pelas células gliais seriam confundidas com antígenos virais, ocasionando uma resposta autoimune com consequente morte destas. O mimetismo molecular é caracterizado por uma resposta imune entre um antígeno externo que tem reação cruzada com um antígeno do hospedeiro, causando doença: anticorpos contra a proteína Tax reagem contra um antígeno próprio do hospedeiro, por exemplo, a proteína ribonuclear A1 (hnRNP-A1), que é uma proteína intracelular neuronal. Estes anticorpos têm sido detectados no soro, líquido, e sistema nervoso central. Eles podem atravessar a barreira hematoencefálica e causar inflamação (Lee et AL., 2005). Portanto, o mimetismo molecular entre a proteína Tax e a proteína hnRNP-A1, poderia ser responsável pelo estado neurológico crônico da PET/MAH (Levin et al., 2002), como demonstrado na Figura 3.

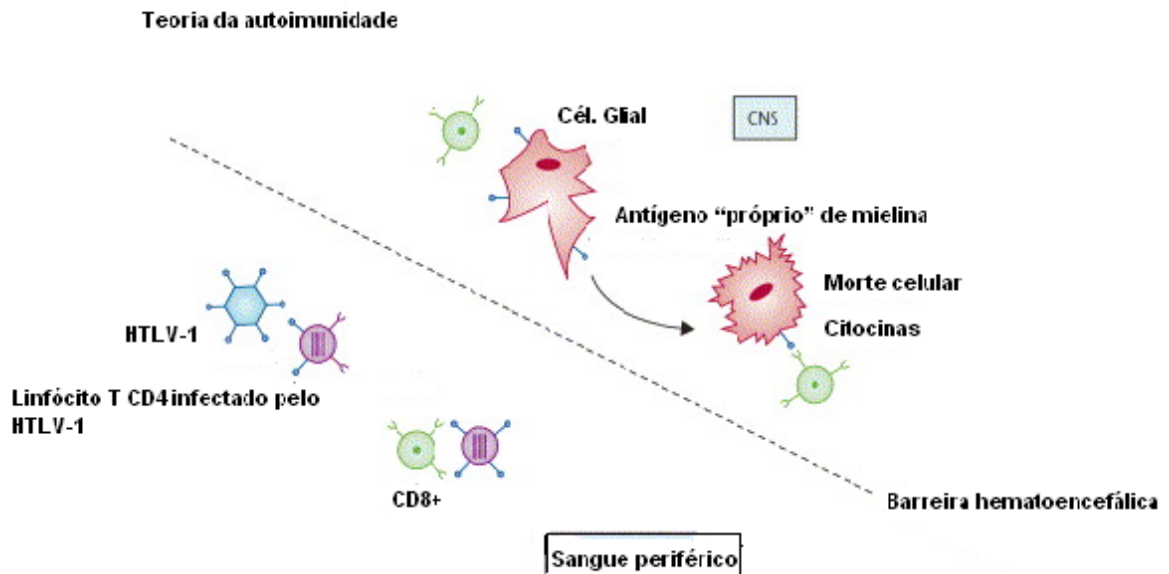


Figura 3. Teoria da autoimunidade, adaptado de Araújo & Silva, 2006

1.3.2.3. HIPÓTESE DO DANO CIRCUNSTANTE (*bystander*)

Esta hipótese sugere que o IFN- γ secretado pelas células T CD4⁺ infectadas, e o reconhecimento destas pelos linfócitos T CD8⁺ no sistema nervoso central induz a produção de outras citocinas, como TNF- α que é mielinotóxica, juntamente com as alterações hemodinâmicas e as interações mediadas pelas moléculas de adesão, entre os linfócitos circulantes e as células endoteliais que contribuiriam para a localização do dano na medula espinhal (Figura 4).

Teoria do Dano Circunstante (bystander)

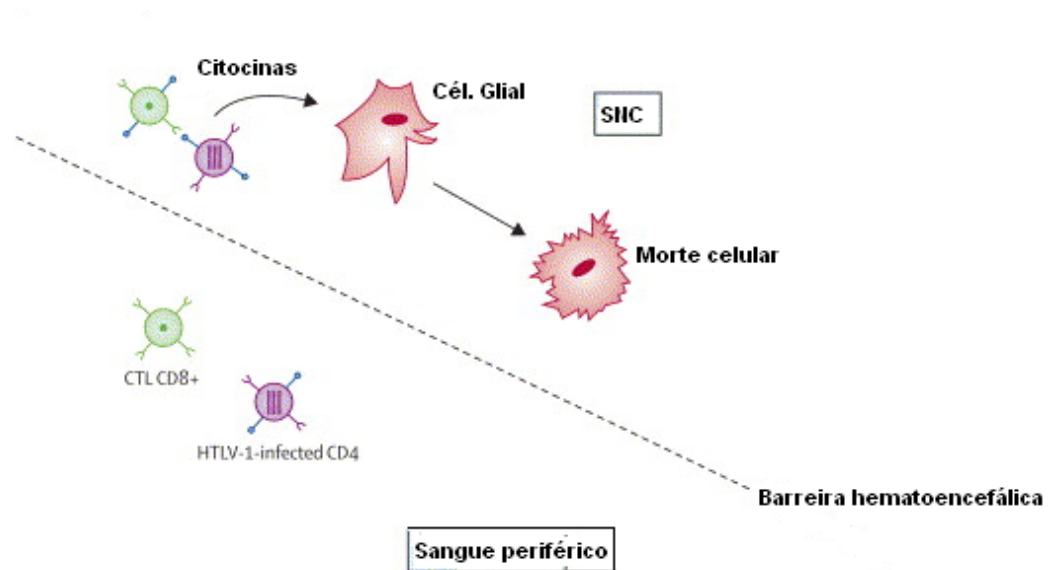


Figura 4. Teoria do dano circunstante adaptado de Araújo & Silva, 2006.

1.4. OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

Doenças inflamatórias como uveíte, artrite e polimiosite, dermatite infecciosa, têm sido associadas ao HTLV-1 (Osame, et al., 1997). Outras alterações neurológicas (ONA), que incluem déficits cognitivos, neuropatia periférica, e esclerose amiotrófica lateral (Leite et al., 2003), também têm sido associadas ao HTLV-1. Estudos demonstraram que a carga proviral está aumentada nos pacientes ONA em relação aos portadores assintomáticos (Silva et al., 2007).

1.5. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE - MHC

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês *Major histocompatibility complex*) é um aglomerado de genes que codificam moléculas com importante função na resposta imune. Nele está contido uma família de genes, que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA), e são os genes mais

polimórficos já descritos, contendo centenas de alelos (Gruen et al., 1997). O MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6 na parte distal 6p21.3 e abrange cerca de quatro megabases. Está dividido em duas regiões clássicas, classe I e classe II, e entre estas duas classes encontra-se a classe III. As moléculas do MHC classe I e II codificam genes cujos produtos são expressos como proteínas integrais transmembrana na superfície da maioria das células nucleadas, onde atuam no reconhecimento e na apresentação de antígenos (Vandiedonck et al., 2009).

As moléculas de classe I do MHC estão presentes em todas as células nucleadas e se ligam aos peptídeos para os apresentarem aos linfócitos T CD8⁺. A estrutura da molécula HLA classe I consiste em três cadeias polipeptídicas α_1 , α_2 , e α_3 que é expressa na superfície de uma célula em associação com a cadeia β_2 – microglobulina, uma subunidade que não é codificada pelo MHC. A cadeia α possui uma região citoplasmática, e uma região transmembrana que possui aminoácidos hidrofóbicos, pelos quais a molécula é ancorada na membrana celular, um domínio altamente conservado do tipo imunoglobulina α_3 , ao qual se liga CD8⁺, e uma região de ligação ao peptídeo altamente polimórfica formada a partir dos domínios α_1 e α_2 . A β_2 - microglobulina se associa com a cadeia α e auxilia a manter a conformação apropriada da molécula (Figura 5).

Seis genes codificam moléculas de classe I: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G. Entre estas HLA-A, HLA-B e HLA-C são as mais importantes e as mais polimórficas (Gruen & Weissman, 1997). Conforme dados retirados on line: os alelos HLA classe I são em torno de 6725 (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

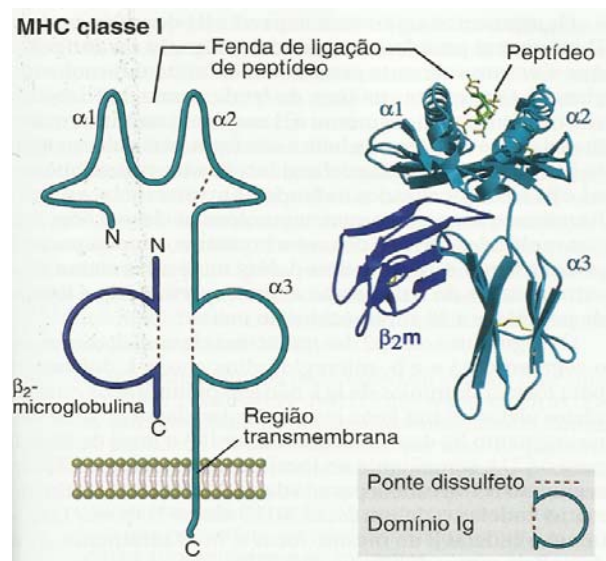


Figura 5 – Estrutura da molécula MHC da classe I, (ABBAS, 2008)

As moléculas de classe II do MHC estão presentes em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (APCs) e se ligam aos peptídeos para os apresentarem aos linfócitos T $CD4^+$. A molécula de classe II do MHC possui duas cadeias polipeptídicas (α e β). Ambas as cadeias possuem, uma região citoplasmática e uma região transmembrana contendo aminoácidos hidrofóbicos, pelos quais a molécula é ancorada na membrana celular, um domínio $\alpha 2$ altamente conservado e um domínio $\beta 2$, também altamente conservado, ao qual se liga $CD4^+$, e uma região de ligação ao peptídeo, altamente polimórfica formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$.

No MHC há cinco *loci* que codificam moléculas de classe II, cada um deles contendo um gene para uma cadeia α e pelo menos um gene para uma cadeia β . Os *loci* são designados como HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, e HLA-DO. Dentre esses, HLA-DP, HLA-DQ, e HLA-DR são os mais importantes e os mais polimórficos.

Conforme dados retirados on line: os alelos HLA classe II são em torno de 1771 (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

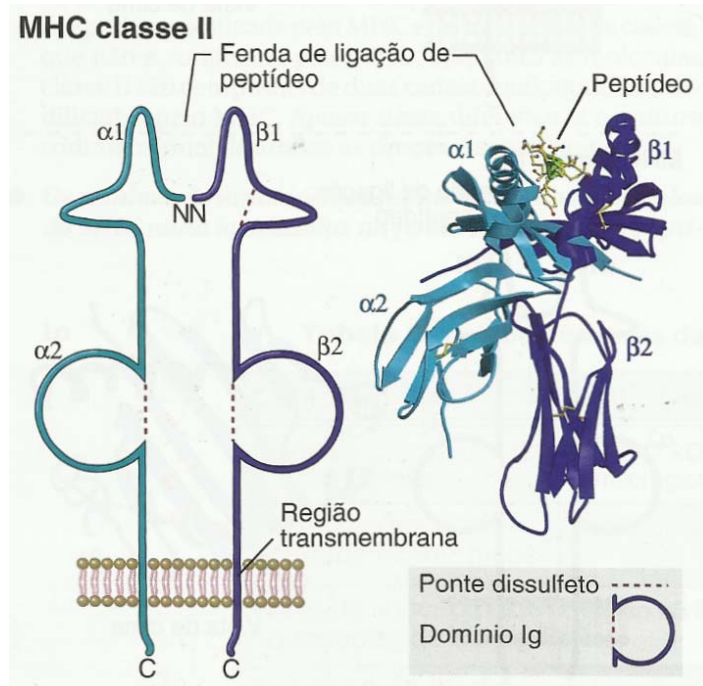


Figura 6 - Diagrama esquemático de uma molécula da classe II do MHC. (ABBAS, 2008)

A região HLA classe III contém genes, cuja maioria está envolvida na regulação da resposta imune humoral (Vandiedonck et al., 2009), e na reação inflamatória através de genes que codificam o fator de necrose tumoral (TNF) (Bayley et al., 2004), a proteína de choque térmico e componentes da cascata do complemento (Figura 7).

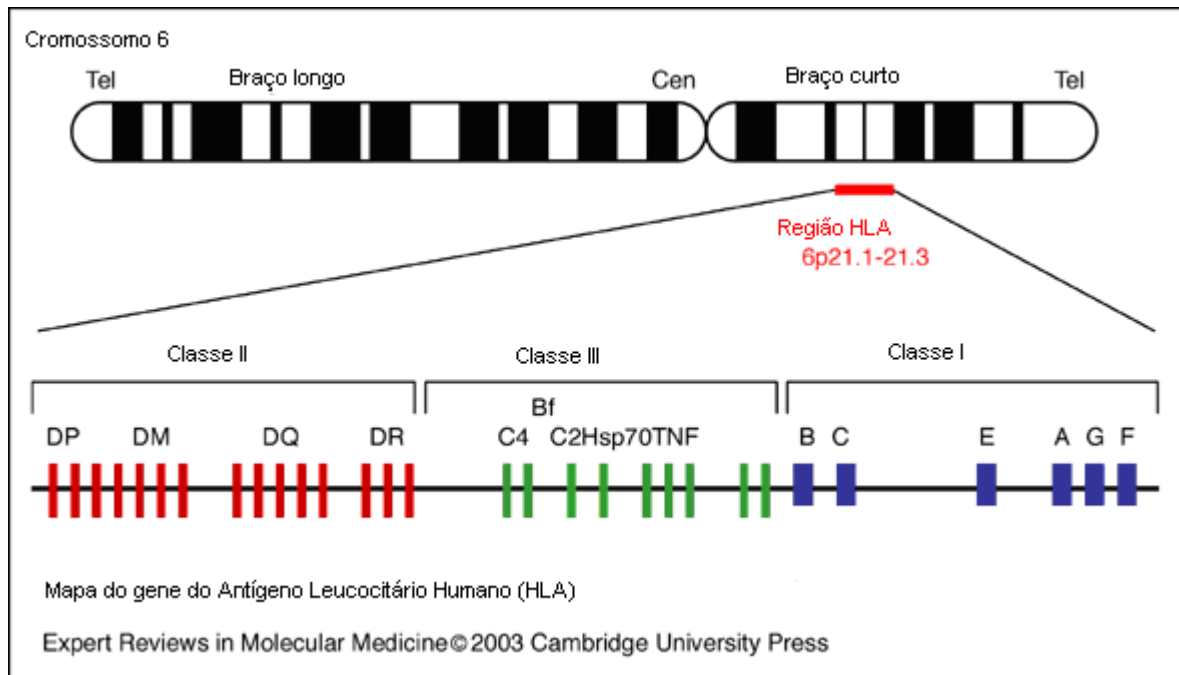


Figura 7 - Mapa dos genes do antígeno leucocitário humano – HLA Mapa dos genes da região de antígenos leucocitários humanos (HLA). A região HLA ocupa 4×10^6 nucleotídeos no cromossomo 6p21.1 to p21.3, com os genes classe II, classe III and classe I localizados do centrômero (Cen) ao telômero (Tel). As moléculas de Classe I tem a função de restringir e mediar respostas imunes contra antígenos endógenos e alvos virais aos linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos. Enquanto as moléculas HLA classe II estão envolvidas na apresentação de antígenos exógenos para células T $CD4^+$. As moléculas da região HLA classe III, contém muitos genes que codificam proteínas não relacionadas com a imunidade mediada por células, mas modulam e regulam respostas imunes de outra maneira, incluem (TNF) fator de necrose tumoral, proteína do choque térmico e proteínas do complemento (C2, C4). Adaptado de Narinder K. Mehra and Gurvinder Kaur http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup002.htm

No braço curto do cromossomo 6 onde está localizado o MHC, estão distribuídos em três regiões distintas os genes que codificam os antígenos HLA. Os três loci da classe I (HLA-A, -B e -C) estão juntos numa região, e os três *loci* classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) estão em outra região no cromossomo 6. A combinação dos alelos dos seis loci, é herdada em conjunto e é denominada de haplótipo. Os seis alelos de Classe I são expressos juntos na superfície das células e são co-dominantes. O mesmo acontece com os alelos de classe II.

Inúmeros estudos têm demonstrado que os genes do sistema HLA estão associados a mais de 500 doenças autoimunes ou provocadas por agentes externos. Cerca de 4% da população em países industrializados são afetados por doenças autoimunes. A predisposição para o desenvolvimento destas doenças é muitas vezes o resultado de uma combinação em rede de vários alelos do sistema HLA. Desta forma, a caracterização alélica do sistema HLA pode ser usada para identificar indivíduos com elevado risco de desenvolver determinadas doenças assim como auxiliar no seu diagnóstico. (Thorsby, 1997, Thorsby & Lie, 2005).

1.5.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE HLA E DOENÇAS

A associação HLA/doença mais marcante documentada é do alelo HLA-B*27 e a Espondilite Anquilosante (Brewerton et al., 1973, Schlosstein et al., 1973). Desde então muitas associações têm sido feitas principalmente na área de doenças infecciosas. A extrema variabilidade do *loci* HLA clássico frente à vasta gama de agentes patogênicos, acarretou pesquisas associando alelos HLA tanto na susceptibilidade, quanto na resistência a doenças. O estudo populacional é o método de escolha para determinar se ocorre uma predisposição genética para o acometimento de doenças, onde a frequência do antígeno ou alelo dos pacientes não aparentados é comparada com aquela verificada em indivíduos que não apresentam a mesma doença ou em indivíduos sadios. Inúmeros artigos científicos relatando a associação positiva e negativa entre MHC/HLA-doenças infecciosas já foram publicados (Blackwell et al., 2009).

1.5.2. ASSOCIAÇÃO HTLV-1 E ALELOS DO HLA

Para se entender porque a maioria dos indivíduos portadores do HTLV-1 permanece assintomática, e, na dificuldade de identificação precoce dos indivíduos acometidos que possuem maior risco de desenvolver doença, vários estudos foram realizados para se determinar a associação entre polimorfismos do HLA e a

ocorrência de HLA/HTLV. Estes estudos ora identificaram alelos associando à resistência, ora à susceptibilidade, em diversas populações (Tabela 1).

País e Ano	PET/MAH Assintomáticos	LTA	PET/MAH/TSP	HLA/LTA	Efeito	Referência
Japão, 1988	27	12	A11Bw54Cw1DR4DQw3,A24Bw54Cw1DR4DQ-,A24Bw7DR1DQw1	A26Bw62Cw3DR5DQw3,Aw33B44Cw-DRw6DQw1	Haplótipos associados a PET/MAH e LTA	Usuku et al., 1988.
Índios nativos da América do Sul, Região dos Andes e Orinoco, 1995	Não informado	Não informado			Andes:DRB1*-DQB1*-0403-0302,08020402,0901-0303,1406-0302,0407-0302	Fujiyoshi et al., 1995.
Japão, 1996	Não informado	Não informado	DRB1-DQB1 0101-0501, 0803-0601, 1502-0601	DRB1-DQB1 0901-0303, 1501-0602, 1401-0602, 1401-0503		Sonoda et al., 1996.;
Estudo multicentrico: Japão,Irã, Índios nativos da América do Sul, negros sul africanos, 1996			DRB1*-DQB1*0101-0501	DRB1*DQB1* 0901-03032	Segregadores	Sonoda et al., 1996.
População negra afro-caribenha e afro-americana, 1996		25		A36,B18, DR53	Alelos associados com LTA	White et al., 1996.
Japão, 1999	232/201		A*02, B*0702,Cw0702, DRB1*0101		Protetor e Susceptibilidade	Jeffery et al., 1999.
Japão, 2000	233/202		A*02,Cw*08/ B*54		Proteção e Susceptível	Jeffery et al., 2000.
Japão, 2001	148/152	124	A*24, Cw*07, B*07	A*26, Cw*08, B*4002, B*4006, B*4801	Alelos associados com PET/MAH-LTA	Yashiki et al., 2001.
Japão, 2002	229/202		A*02, Cw*08		Proteção	Vine et al., 2002.
Brasil, 2003	71/		DR11	A26, DR8	Associação	Borducchi et al., 2003
Irã, 2005	58/74		A*02, Cw04, DRB1*0101		Sem associação	Sabouri et al., 2005.
Japão, 2006	/190		A*02, Cw*08,TNF-a-863A/C,SDF-1+801G/A		Associação	Nose et al. 2006.
Jamaica, 2007	59/190	56	DRB1*1503DQB1*0602	A*03, DQB1*0501	Associação	Goedert et al., 2007.
Irã, 2007			DRB1*01 Cw*08		Risco	Rafatpanah et al., 2007.
Brasil, 2009	09/1984		A*02,Cw*08/B*07, Cw*08, B*5401		Proteção/Risco	Catalan et al., 2009.
Martinica, 2010	123/85		A*02, DRB1*01, DRB1*11, DRB1*15		Sem Associação	Deschamps et al., 2010.
Peru, 2010	71/94		A*02, Cw*08,TNF-a-863A/C,SDF-1+801G/A		Sem Associação	Talledo et al., 2010.
Aborígenes da Argentina, 2011	/23 -60 negativos		A*02,A*68		Associação	Berini et al., 2011.
Japão, 2011	Não informado		A*24		Risco	Ryuji et al., 2011.
Peru, 2011	56/114		A*02		Associação	Talledo et al., 2011.

Tabela 1 - Publicações referentes à associação entre polimorfismos em genes do HLA e a HTLV/HLA

1.6. CITOCINAS

Citocinas são polipeptídeos produzidos pelas células do sistema imune inato e adaptativo em resposta a microrganismos infecciosos e outros antígenos, mediando e regulando reações imunes e inflamatórias.

Essas proteínas solúveis encontradas em concentrações de nanomolares ou picomolares regulam o crescimento, diferenciação e função de várias células e linhagens celulares. A maioria das citocinas cuja estrutura molecular está definida, é chamada por convenção, de interleucina. Entretanto, outras citocinas são produzidas em outras células, não somente nas células do sistema imune, e possuem outros nomes por motivos históricos.

A síntese de citocinas é iniciada pela transcrição de um gene como consequência de ativação celular. Como a transcrição da ativação é transitória, a síntese de citocinas é breve e auto limitada. As citocinas possuem ações pleiotrópicas e redundantes. Esta propriedade permite que a citocina atue com diversos efeitos biológicos, o que limita o uso terapêutico, pois pode resultar em efeitos adversos. A redundância refere-se à propriedade de várias citocinas possuírem os mesmos efeitos.

Uma citocina pode estimular a produção de outras em cascata, na qual a segunda ou terceira intervém no efeito biológico da primeira. Duas citocinas podem ainda antagonizar a ação de cada uma delas ou apresentar um efeito sinérgico. Também podem ter uma atuação local ou sistêmica.

Quando produzidas em resposta a um estímulo, as citocinas se ligam a receptores de alta afinidade nas células alvo. Quando agem na própria célula que as produzem, como a maioria das vezes, é denominado ação autócrina, e nas células adjacentes, ação parácrina. Quando são ativados um grande número de células dendríticas e macrófagos, são produzidas grandes quantidades de citocinas que atuam longe de onde foram secretadas, denomina-se ação endócrina (Abbas, 2008).

Estão classificadas em três categorias funcionais:

- a) mediadoras e reguladoras da imunidade inata: TNF, IL-1, quimiocinas, IL-12, IFNs tipo I, IL-10, IL-6, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27,
- b) mediadoras e reguladoras da imunidade adaptativa: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β , linfotóxina, IL-13, IL-17,
- c) estimuladoras de hematopoiese: c-Kit ligand, IL_7, IL_3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF (Abbas, 2008).

1.6.1. POLIMORFISMOS ÚNICOS DE NUCLEOTÍDEOS – SINGLE NUCLEOTIDE POLYMOPHISMS – SNPs e CITOCINAS

Os polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs) são variações de uma única base na sequência de um alelo no cromossomo. Os genes de regiões reguladoras de citocinas foram os primeiros genes não-HLA a serem estudados, e os SNPs na região promotora destes genes podem modificar os efeitos dos fatores de transcrição e a quantidade de citocina produzida (Wilson et al., 1997, Turner et al., 1997, Fishman et AL., 1998). Muitos estudos foram feitos relacionando os polimorfismos dos genes das citocinas à doenças. A partir de 1999 foi criado um banco de dados on-line “Cytokine Gene Polymorphism in Human Disease: on-line database” (Hollegaard et al., 2006) que visa identificar SNPs que possuem associação com alguma doença específica.

1.6.2. CITOCINAS E HTLV-1 COM ÊNFASE EM TNF- α , IL-6, IFN- γ , TGF- β e IL-10

Dentre inúmeros fatores biológicos que estão envolvidos na interação HTLV/hospedeiro, as citocinas têm sido estudadas com o objetivo de se compreender melhor o processo inflamatório que resulta em dano à medula espinhal. Alguns exemplos são citados abaixo:

Através de técnicas de imunohistoquímica, foi detectada a presença de IFN- γ e TNF- α na medula espinhal de pacientes autopsiados. (Umehara et al., 1994). Da mesma forma, experimentos *in vitro* com células de pacientes com PET/MAH e de portadores assintomáticos, demonstraram que os níveis de IFN- γ e TNF- α eram bem maiores nos indivíduos sintomáticos (Muniz et al., 2006). Outros experimentos também *in vitro* verificaram que, na cultura de células de pacientes com PET/MAH, o uso de minoxidina, um derivado da tetraciclina, que atua na inibição de macrófagos ativados, diminuiu significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , inibindo a proliferação espontânea de linfócitos (Enose-Akahata et al., 2012).

O HTLV-1 como agente causador de uveíte foi descrito por Mochizuki e colaboradores, através de dados clínicos, laboratoriais, e soro epidemiológicos (Mochizuki et al., 1992). A inflamação intra-ocular foi associada a produção de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , e IFN- γ produzidas pelas células T CD4⁺ infiltradas no tecido ocular (Kamoi et al., 2012).

A inflamação causada pelo HTLV-1 esta associada ao aumento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no líquido cefalorraquidiano, que migram e atravessam a barreira hematoencefálica (Hickey et al., 1991, Biddison et al., 1997). Na mielopatia, tanto os linfócitos infectados T CD4⁺ como T CD8⁺ infiltram a medula espinhal e o sangue periférico, e produzem citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-6, causando dano ao tecido do sistema nervoso central em pacientes (Kubota et al., 1998).

Culturas primárias de células microgliais humanas estimuladas pela proteína Tax, assim como macrófagos do sangue periférico, responderam com a produção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 (Dhib-Jalbut et al., 1994). Células dendríticas também responderam à proteína Tax extracelular, sofrendo ativação e maturação, e por consequência comprometendo a integridade da barreira hematoencefálica através da produção de citocinas como TGF- β , IFN- γ e quimiocinas, contribuindo para o dano observado no tecido do sistema nervoso central dos indivíduos com PET/MAH (Mostoller et al., 2004, Ahuja et al., 2006). A indução da produção das citocinas TNF- α , IFN γ e IL-12, também foi observada em

culturas de células dendríticas derivadas de monócitos quando estimuladas pela proteína Tax *in vitro* (Ahuja et al., 2007).

Com tantas evidências da atuação das citocinas na patogênese do HTLV-1, o estudo do polimorfismo dos genes que expressam a síntese destas proteínas, que atuam no processo inflamatório, pode ser útil como marcador de prognóstico para o paciente.

1.6.3. FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α)

É o principal mediador da resposta inflamatória aguda à um agente infeccioso, e responsável por muitas complicações sistêmicas em infecções graves. TNF- α está envolvido da mediação primária da resposta inflamatória e na patogênese de condições como choque séptico e doenças autoimunes. É uma das primeiras citocinas a serem produzidas no processo inflamatório e responsável pelo efeito em cascata na ativação de outras citocinas. O nome desta citocina deriva da sua identificação original como um fator do soro que causava necrose em tumores (Carswell et al., 1975). Também é chamada de TNF-alfa para diferenciar da TNF-beta, uma linfotóxina. TNF- α é expressa como um polipeptídeo com 17 kDA e se polimeriza em uma proteína circular de 51kD. As principais fontes celulares relacionadas à biossíntese de TNF- α são os macrófagos e monócitos, e os principais alvos são a ativação de células endoteliais (inflamação e coagulação), e ativação de neutrófilos. A citocina TNF- α também induz a síntese de outras proteínas denominadas proteínas da fase aguda, que mimetizam a ação de anticorpos como a proteína C reativa e lectina ligante de manose (MBL) (Janeway, 1997).

O gene da família TNF esta localizado no cromossomo 6, na região que codifica a classe III do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (Nedwin et al., 1985). Dependendo das concentrações de TNF- α , pode haver uma ação protetora em relação aos microrganismos através da ativação de diversos tipos celulares, ou quando sintetizado em grandes quantidades, uma ação tóxica como no choque séptico (Bradley, 2008).

O polimorfismo na região promotora do gene de *TNFA* (-308 G/A) foi descrito por Wilson e colaboradores, 1992, onde a substituição de guanina no alelo

TNFA (-308G) ou *TNF1* por adenina no alelo *TNFA* (-308A) ou *TNF2*, tem sido associado a alta produção da citocina em populações europeias. Vários estudos demonstraram associação de níveis elevados de TNF- α , com a presença do alelo *TNFA* (-308A), e um prognóstico desfavorável foi visto em doenças como a malária cerebral, onde indivíduos homocigotos para este alelo são sete vezes mais propensos a morrer ou ter graves complicações neurológicas (McGuire et al., 1994). Outras doenças também foram associadas a este alelo como o linfoma não Hodgkin (Warzocha et al., 1998), meningite (Nadel et al., 1996), lúpus sistêmico eritematoso (Wilson et al., 1994), hepatite B (Xia et al., 2011) e hanseníase (Cardoso et al., 2011).

Em ensaios *in vitro* onde se simulou a barreira hematoencefálica, os linfócitos infectados pelo HTLV-1 romperam esta barreira através de mudanças de sua permeabilidade, via secreção de IL-1 α e TNF- α , aumentando a migração dos linfócitos (Afonso et al., 2007). O gene de *TNFA* está localizado na região Classe III do braço curto do cromossomo 6 (Figura 8).

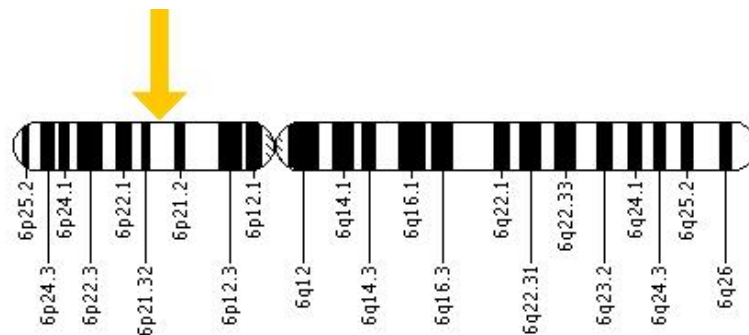


Figura 8 - Localização cromossômica do gene do *TNFA* (6p21.3) (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TNF>)

1.6.4. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A interleucina 6 é uma citocina com importante papel na defesa do hospedeiro, atua em uma diversidade de células e funções como diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, células endoteliais, no crescimento e diferenciação de células B, na formação de colônias de células precursoras (stem cell) hematopoiéticas, e na diferenciação neural. A citocina IL-6 não é constitutivamente expressa, mas sua expressão é consideravelmente aumentada

em resposta a estímulos, como infecções virais, endotoxinas, e outras citocinas como IL-1 e TNF- α , principalmente na fase aguda da doença. Alguns estudos sugeriram que a IL-6 e a proteína C reativa podem ser importantes ferramentas para avaliar uma inflamação sistêmica em diferentes condições patológicas (Póvoa, 2002, Duncan et al., 2003).

O gene que expressa *IL6* está localizado no cromossomo 7 (Figura 9), e foi demonstrado que o polimorfismo na região flanqueadora 5' do gene de *IL6* na posição -174 (G/C) interfere na transcrição e conseqüentemente na expressão de *IL-6* (Fishman et al., 1998).



Figura 9 - Localização cromossômica do gene da *IL6* (7p21) <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL6>

1.6.5. INTERFERON GAMA (IFN- γ)

IFN- γ faz parte da classe II de interferons. Atua principalmente como ativador de células efetoras do sistema imune, tanto da imunidade inata como na imunidade adaptativa mediada por células. É uma proteína homodimérica com 21-24kD. As principais fontes produtoras de IFN- γ são as células NK, células T CD4⁺ TH1 e T CD8⁺. Possui atividade anti-viral e imunomodulatória. A atividade antiviral é importante no início da infecção viral, e a atividade imunomodulatória ocorre nos estágios mais tardios da infecção (Schroder et al., 2004). Sua produção é dada pela ativação de células NK, e em maiores quantidades pelas células T efetoras. É através de IFN- γ , que células T auxiliares e células NK aumentam a atividade de macrófagos na sua função microbicida, também promove a diferenciação de células

T CD4⁺ *naive*, e inibe a diferenciação de células Th2. IFN- γ participa na resposta de anticorpos que participam na eliminação de micróbios por fagócitos, pela ativação direta de macrófagos por esta citocina. IFN- γ estimula a expressão de antígenos MHC classe I e II, ativa células endoteliais e potencializa a ação de TNF nestas células promovendo adesão de linfócitos T nos sítios de infecção (Abbas, 2008).

O gene de *IFNG* está localizado no cromossomo 12 e o polimorfismo no intron 1 +874 T/A foi associado com variações do nível de produção de IFN- γ (Naylor et al., 1983, Pravica et al., 2000).

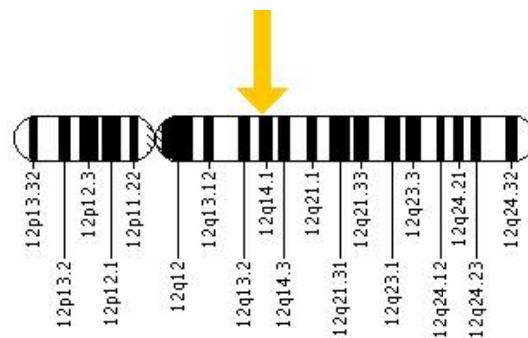


Figura 10 - Localização cromossômica do gene do *IFNG* (12q14) (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IFNG>)

1.6.6. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR- β (TGF- β)

TGF- β foi descrito primeiro como um produto de tumores, quando se observou que células com características normais, na presença de TGF- β cresciam em meio de cultura semi-sólido, uma característica das células malignas ou transformadas (de Larco et al., 1978). A citocina TGF- β faz parte de uma família de fatores de crescimento altamente pleiotrópicos, envolvidos na regulação de processos imunomodulatórios. As principais fontes celulares de TGF- β são as células T e plaquetas, mas também é sintetizado pelas células epiteliais, endoteliais, hematopoiéticas, neuronais e células do tecido conectivo. É uma proteína homodimérica com 25kD. Sua principal ação biológica é inibir a proliferação e ativação de linfócitos e outros leucócitos. Pode exercer tanto um papel anti-inflamatório como pró-inflamatório, dependendo da ocasião em que começa a ser

produzida, da quantidade produzida, e se tem ação sistêmica ou local. Faz parte de uma família de moléculas estreitamente relacionada, codificada por genes distintos, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. As células do sistema imune sintetizam principalmente TGF- β 1 (Abbas, 2008). Há um aumento de TGF- β em infecções virais como Influenza, HIV, Hepatite B e Hepatite C entre outros (Li et al., 2006). Em relação ao HTLV-1, estudos *in vitro* demonstraram que, TGF- β estimula a expressão de proteínas da membrana celular envolvidas na ligação e fusão do vírus como GLUT-1 e HTLV SU (Jones et al., 2005).

O gene que codifica para *TGFB* está localizado no cromossomo 19 (Figura 11).

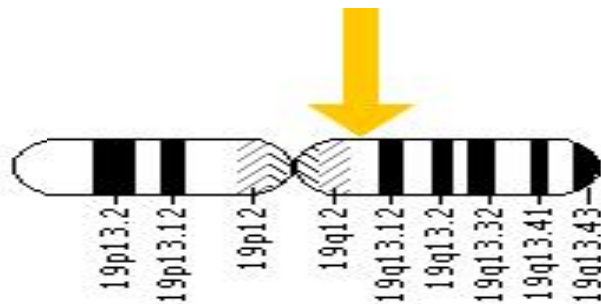


Figura 11 - Localização cromossômica do gene *TGFA* - 19q13. [http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGF- \$\beta\$ 1](http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGF-β1)

Os níveis de produção de TGF- β também estão associados ao polimorfismo gênico. De maneira geral podem ser descritos como alto, intermediário e baixo produtor da citocina, e de acordo com os alelos homocigotos: alta/alta e baixa/baixa, e heterocigoto alta/baixa. Os alelos altos produtores são *TGFB* codon 10 *T (Leu), codon 25 *G (Arg), (Perrey et al., 1998).

1.6.7. INTERLEUCINA 10 (IL10)

A citocina IL-10, inicialmente foi denominada de Fator Inibidor da Síntese de citocinas, por inibir a secreção de citocinas de clones de células T em cultura (Fiorentino et al., 1989). É uma proteína com 34-40kD, conhecida principalmente por sua atividade supressora de citocinas em macrófagos ativados e células dendríticas, portanto envolvida no controle da resposta imune inata e mediada por células,

contudo é sabido que outras células hematopoiéticas, tanto da resposta imune inata como adaptativa a produzem, como monócitos, células B, células T CD8⁺, células Th1, Th2, e células T reguladoras. Independente do tipo celular, IL-10 atua na resposta inflamatória, diminuindo a ação da resposta imune adaptativa, minimizando o dano local pelo agente infeccioso. IL-10 pode induzir o aumento da expressão de antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Go et al., 1990).

Alguns polimorfismos localizados na região promotora nas posições -1082A/G, -819T/C, e -592A/C do gene de *IL10* foram descritos em relação à quantidade de citocina produzida (Turner et al., 1997).

O gene que codifica para *IL10* esta localizado no cromossomo 1(Figura 12).

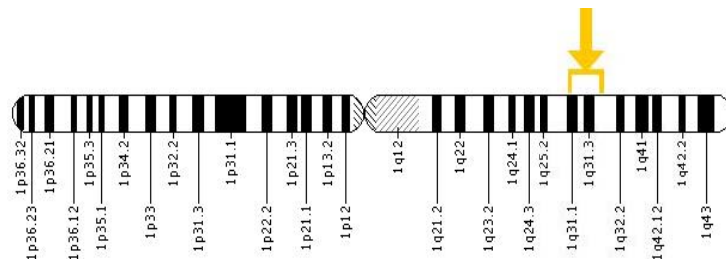


Figura 12 - Localização cromossômica do gene da *IL10* (1q31-p32). (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL10>)

1.7. CARGA PROVIRAL (CPV)

O número de células infectadas (carga proviral) parece ser um marcador de prognóstico para o desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-1. Dados obtidos por reação em cadeia da polimerase em tempo real mostraram que a mediana da carga proviral em indivíduos assintomáticos é de 0,5%, enquanto que em portadores de mielopatia é de 5,1% ($p= 0,0001$) (Silva et al., 2007). A carga proviral também pode detectar de forma precoce o surgimento de um clone maligno de linfócitos T CD4⁺, através do aumento significativo deste parâmetro. A avaliação sistemática da carga proviral possibilitou a detecção precoce de LTA em duas pacientes que eram portadoras assintomáticas da infecção (dados não mostrados).

2. JUSTIFICATIVA

A PET/MAH é uma doença crônica extremamente incapacitante, de progressão lenta, que se expressa por paraparesia espástica, alterações esfínterianas, dor lombar e disfunção erétil, sendo que tais manifestações podem ser acompanhadas de neuropatia periférica (Leite et al., 2004), alterações cognitivas (Silva et al., 2003) e disautonômicas (Alamy et al., 2001). Acredita-se que a lesão neurológica ocorra não devido à morte das células em decorrência da replicação viral ao nível do sistema nervoso central, e sim pela reação inflamatória desencadeada pelo reconhecimento de células infectadas por linfócitos T citotóxicos CD8⁺, com consequente liberação de citocinas e lesão medular (Hollsberg & Hafler, 1993).

Um dos maiores problemas de saúde pública relacionada às infecções pelo HTLV-1 é a dificuldade de identificação precoce dos indivíduos acometidos que estão evoluindo e/ou possuem maior risco de desenvolver doença, pois a intervenção terapêutica precoce pode melhorar o prognóstico. Portanto, a identificação de marcadores biológicos que identifiquem portadores assintomáticos com maior risco para desenvolver doenças associadas possibilitará um melhor acompanhamento clínico destes indivíduos, assim como o início precoce de medidas terapêuticas adequadas.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar se a presença ou ausência de determinados polimorfismos gênicos influenciariam no desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1.

3.2. ESPECÍFICOS

- a) Determinar os polimorfismos genéticos do HLA de classe I locus A, B e C e classe II locus DR e DQ em portadores de doença neurológica e em HTLV-1 e em portadores assintomáticos da infecção.
- b) Determinar os polimorfismos genéticos dos promotores dos genes das citocinas *TNFA*, *IL6*, *IFNG*, *TGFB* e *IL10*, e em portadores de mielopatia associada ao HTLV-1 e em portadores assintomáticos da infecção.
- c) Determinar a carga proviral do HTLV-1 em portadores de mielopatia e carreadores assintomáticos da infecção.
- d) Correlacionar os dados obtidos com o estado clínico dos indivíduos.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. TIPO DE ESTUDO

Foi conduzido um estudo caso-controle, sendo os casos, os pacientes com doença neurológica e os controles, os portadores assintomáticos da infecção.

4.2. POPULAÇÃO ESTUDADA

Da coorte de pacientes com infecção pelo HTLV, atendidos no Laboratório de Neuroinfecções do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, com aproximadamente 700 indivíduos, foram selecionados 288 indivíduos portadores de HTLV-1, sendo 171 pacientes portadores de doença neurológica e 117 indivíduos portadores assintomáticos em relação à infecção. O projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IPEC; Fiocruz, sob número 0012.0.009.000-08 em 28/04/2008.

4.3. CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO NA PESQUISA

Pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Aceitar participar do estudo através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Estar em acompanhamento clínico regular. Ter sorologia positiva para HTLV-1 por ELISA e Western blot e/ou reação em cadeia da polimerase. O diagnóstico de mielopatia associada ao HTLV-1 ser confirmado pelos critérios da OMS. Ausência de qualquer sintomatologia neurológica, hematológica ou de manifestação associada à infecção pelo HTLV-1, para os controles.

4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não aceitar participar do estudo.

4.5. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.

Cinco mililitros (5 ml) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo através de punção venosa, em tubos estéreis *Vacutainer*® com EDTA. Foi utilizado o kit comercial *Gentra*® Puregene, seguindo a orientação do fabricante. Foi retirada uma alíquota de sangue e colocada em tampão de lise de células vermelhas e homogeneizada por inversão várias vezes, após repouso à temperatura ambiente, foi centrifugada durante 20 segundos a 13–16,000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células brancas foi recolhido com tampão de lise de células brancas. Foi adicionado tampão de precipitação de proteínas e centrifugado durante 1 minuto a 13,000–16,000 x g. O sobrenadante foi colocado em presença de álcool isopropanol e homogeneizado várias vezes por inversão até o DNA se tornar visível. Novamente centrifugado durante 1 minuto a 13–16,000 x g, o sobrenadante descartado, e o *pellet* lavado com álcool 70%, centrifugado 1 minuto a 13–16,000 x g e ressuspenso com tampão de hidratação (10mM Tris/1mM EDTA).

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL PARA HTLV-1.

A amplificação foi realizada em termociclador para PCR em tempo real (SmartCycler) utilizando o Kit Taqman (Applied System). O fragmento amplificado foi a região *Tax*. Uma curva-padrão foi gerada utilizando o gene β -globina e o gene *Tax* da linhagem celular TARL-2, que contém uma única cópia do provirus de HTLV-1. A carga proviral em 10^4 células é calculada pela seguinte fórmula: [número de cópias do gene *Tax*/ (número de cópias do gene globina/2)] x 10^4 .

A técnica (Silva et AL., 2007), consiste no preparo de duas misturas de reagentes: 1) master mix TaqMan (1x) + sonda TaqMan SK-45 marcada no terminal 5' com FAM e TAMRA no 3' (5pmoles) com os iniciadores SK-43 (15pmoles) e SK-

44 (15pmoles) + água ultra pura qsp (lifetechnologies). 2) master mix TaqMan (1x) + sonda TaqMan Glo marcada no terminal 5' com FAM e TAMRA no 3' (5pmoles) + os iniciadores B-glo-F (50pmoles) e B-gloR (50pmoles) + água ultra pura qsp (lifetechnologies). A cada 20 μ l da mistura de reagentes foi acrescentado 5 μ l de DNA genômico na concentração de 40ng/ μ l. As reações foram feitas em duplicata e utilizado o equipamento Smart Cycler II (Cepheid). O limite de detecção é de uma cópia em 10⁴ células.

4.7. ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE HLA CLASSE I LOCUS A, B e C.

Foi utilizada a metodologia estabelecida pelo laboratório do Centro de Transplante de Órgãos da Universidade de Oxford (Bunce et al. 1995) em que através da utilização de múltiplos iniciadores (oligonucleotídeos) pelo método da Reação em cadeia da polimerase sequência específica/ “sequence specific primers–polymerase chain reaction” (SSP- PCR) consegue-se estabelecer simultaneamente o genótipo HLA classe I, isto é, para os loci A, B e C.

Preparo da placa de PCR:

Dez μ l de óleo mineral foi adicionado em todos os poços de uma placa de 96 poços, para posteriormente serem colocados 5 μ l da mistura de uma combinação de iniciadores (3,4 μ M) que codificam alelos HLA classe I, locus A, B e C, juntamente com o controle positivo. Na figura 13, está demonstrado o formulário, com a posição dos respectivos iniciadores de cada grupo alélico. Os iniciadores foram doados pelo Departamento de Imunologia, Imperial College School of Medicine St Mary's Campus, London. As placas foram armazenadas à -20°C.

HLA CLASS I 96-Well Plate 22.9.00

Sample identity

Date typed

TDMH

Machine ID

LINE	Port	Alleles detected	PM	EP Size	LINE	Port	Alleles detected	PM	BP Size
1		A*0101-04N5N-07	151	628	49		B*5705,5901-02/04-05	56	374
2		A*02011-014/02-15N16/171-172/18-22/25-27/29-32N33-43N44	3	489	50		B*5701-04/06-07	55	351
3		A*02011-14/04/08-07/09-10/14-15N18/171-172/18/20-21/24-26/28-32N33/36/39-43	1048	521	51		B*1801-10	57	458
4		A*03011-013/02/03N-04, 2418,3204	4	628	52		B*0809, 2714, 39061-062,5501-03/05/10, 5601/05, 5901, 7301	58	422
5		A*3601	2	630	53		B*1543,3917,4801, 5061-62/04, 5401-02, 5901-03/05/07/10, 5601-02/04, 8201-02, Cw*1507	59	383
6		A*2301-02/04-06, 2402101, 2402102/ 022/031-032/04-07/09N-11N13-19/17-18/20/22/23/25	5	464	54		B*5508, 5601-05, 8201-02, 8301	60	551
7		A*2301/03-06, 2413/16/18, 3007	6	557	55		B*5401-02, 5507	61	421
8		A*2402101,24021021, 24022, 031-032/05/07-09N/10-11N/14-15/17/20-21	945	504	56		B*2701-04/052-053/06-08/10/13-14/17/19-20=149bp, B*2701=150bp	62	149/150
9		A*2501-03, 2601/03/05/07-08/10-11N/12-14, 4301,6601-03	8	170	57		B*1558, 3701, 3803, 39021-022/08/13/23, 4502, 4807	64	422
10		A*2501-03,2601-06/08-11N/12-14, 3401-02,6601-03	9	440	58		B*1517, 2701-02/04/052-653/08/10/12-14/16-19, 3702, 4701-03	255	437
11		A*2501-03	10	400	58		B*2718, 3702, 4701-03	65	414
12		A*2601-02/04/07-11N/12-14,4301	11	400	66		B*7301	66	289
13		A*2609, 3103-04, 3401-02	13	170	61		B*4201-02	67	594
14		A*2502, 2613, 3401-02, 6601-02	14	419	62		B*4012, 4801/03-04/06-07, 8101	68	567
15		A*11011-012/02/04-06 =520bp, 11011-012/02-03/05-06, 2502, 2613, 660	225	520/552	63		B*1516-17	69	516
16		A*2901-04	152	466	64		B*4601-02	70	460
17		A*3001-04/06-09	18	561	66		B*1501101, 1501102N, 15012-013/02/04-08/111-112/12/14-15/19-21/25-	72	124
18		A*3101/2/03-05	184	198			27-28/30-35/38-40/42/44-45/48/50/55-56/58/60, 4021		
19		A*2503, 3201-05	153	259	66		B*1304, 1501101,1501102N, 15012-013/03-07/12/14/19-20/24-26N/27/32	73	421
20		A*3301/03-05	154	200			36/38-40/43/46-47/49-50/53-54/57/60, 3528, 4003/20, 4417, 4802		
21		A*7401-04	188	154	67		B*0709/11/17, 1503/18/23/29/47/49/51-52/54, 3525-26, 3907, 4802, 5603	74	486
22		A*2424, 2610, 68011-012/02/031-032/04-09/11N-12/15/17, 6901	226	468	68		B*0710, 1510/18/21/23/37/44/51-52, 3526, 3907, 3915	1440	415
23		A*8001	25	494	69		B*1512/19 = 638bp, 1514,4408, 5707 = 637bp	77	638/637
24		A*0101-4N/05N-07, 03011-13/02-03N/04-05, 11011-012/02-06, 2416-17, 31012/02/05, 3201-05, 3601, 6810/14, 7401-03, 8001	279	436	70		A*2501-03, 2601-06/08-11N/12-14, 3401, 6601-03, 68011-012/02/031-03	78	563
25		no definite matches - Bw4	1112	421	71		04-07/11N/12/15/17, B*1508/111-112/15/22/59, 3514, 5603		
26		no definite matches - Bw6	1113	404			B*0712/14/18, 1502/13/21/44, 3501-04/06-08/091-092/11-12/14-15/18-21	79	369
27		B*07021-23/03-08z/09-12/14-18, 4025, 4806, 8101	34	619	72		23-27/29/33-35, 4406/12, 5104, 5301-05, 8301		
28		B*07021-023/04-07/09/11-12/14-15/17-19, 4201-02, 5401-02, 5501-05/07-5601-05, 67011-12, 8201-02, 8301	189	480	73		B*1522/56, 1801-09/10, 3501-09/091-092/10-18/20-24/28-30-35, 3819, 7801/021-022/03-04	80	128
29		B*0705-06,4201-02, 5504/08, 5606, 6101	960	417	75		B*3610/3, 68/091-092/11/14-18/17-19/21/23-26/27/28-29/32-35, 5301-05=389bp, 3502 =390bp	81	389/390
30		B*07021-023/03-06/08-11/13/15-17/19/06/12/07/15-11, 14/05, 3903/14, 4301-02, 4801/04-07, 8101	1185	495	76		B*15012/09, 4026/28, 5605, 7801/021-022/03-04	82	400
31		B*0801-03/07-08N/09/11, 4406, 5108, 5120	38	543	77		B*1509, 51011-013/021-022/03-09/11N-12/13/14/16-21, 5605, 7801/021-0	84	451
32		B*0801-03/06-08N/09/11	155	608	78		B*2702, 4013/19, 5110/16		1064, 523
33		B*2704/06/10/18/20, 4005/15-16/23/26/28, 4901, 5001-02/04	37	635	79		B*15012, 4026/28, 52011-012/02		86, 440
34		B*4418, 4901, 5115, 5901	38	365	80		Cw*0102-04		86, 340
35		B*4415/18, 4501, 4901, 5001-02/04, 5402	39	800	81		Cw*02021-024/03, 1701-03		87, 522
36		B*1514, 4409, 4501-02, 5002, 8201-02, 8301	40	535	82		Cw*0302/031-032/041-042/05-06/08-09/11		88, 664
37		B*1546/53, 3519, 4003/08/18/20/24, 4405/17, 4402/031-032/04/07/08/11-13/16/20-21	160	481/480	83		Cw*04011-012/03-07, 1801-02		89, 331
38		B*4101-03	42	605	85		Cw*0501		90, 564
39		B*1546/53, 3519, 4002-06/08-09/11/13-16/18-20/24/26-29, 4101-03, 4402, 032/44/04-05z/07/09-18/20-21, 4501-02, 4701-03, 4901, 5001-02/04	43	566	86		Cw*0602-05		91, 297
40		B*1533, 40011-012, 4002-06/09-12/14-16/18-21/23-24/27/29, 4101-03, 480	44	465	88		Cw*07011-012/02-03/05z/06-07z/08z/09z/10z/14z		92, 1056
41		B*40011-012, 4002-04/06-11/13-14/16/18-20/23-25/27/29, 4418/21, 4701-	45	627	89		Cw*0704/11-12		96, 536
42		B*40011-012/07/25	46	607	90		Cw*0801-07 = 160bp only, Cw*0901-03/06 = 160 and 625bp		182, 160/625
43		B*1301-03, 1542	47	486	91		Cw*03031-032/11		99, 523
44		B*1401-04	48	389	92		Cw*12021-023		102, 538
45		B*1548, 3535, 39011/013-014/021-022/03-05/06/081-062/07-19/22-24, 670	50	507	93		Cw*1203/06		103, 446
46		B*3910/16-17/20, 67011-012	51	548	94		Cw*14021-022/03-04		104, 541
47		B*3801/05, 5119=508bp, 38021-022/03-04=498bp	172	498/508	95		Cw*0307, 15021-022/03-04/051-052/06/08-09		106, 318
48		B*1513, 4406, 5104, 5301-02/04, 5705, 5801/04-05	54	319	96		Cw*0203, 0307, 0404/06, 0604, 0707/09, 15021-022/03-04/051-052/06/09		107, 502
							Cw*1601		109, 513
							Cw*1502		110, 503
							Cw*02021-024, 0602-03, 12041-042/05		111, 502
							Cw*0104, 0602-03, 1203/041-042/05-07, 16041		1076, 214

Photo

Sample:

HLA-A

HLA-B

HLA-Cw

Comments

Figura 13 – Formulário utilizado para interpretação da tipificação do HLA-Classe I (técnica – SSP-PCR, Bunce et al., 1995).

Para a realização da SSP-PCR, água deionizada e autoclavada foi utilizada em todas as preparações dos reagentes. Foram preparadas, uma solução dez vezes concentrada de Tampão Base (670mM Tris Base pH8.9, 166mM Sulfato de Amônio- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% Tween 20), uma solução de dNTPs a 100mM e uma solução de MgCl a 25mM. Todas as soluções foram aliquotadas e congeladas a -20°C . A mistura principal ou *TDMH* (*taq polimerase reaction buffer/ tris buffer, dNTPs, magnésio e H₂O*) foi constituída de MgCl₂ a 1,9mM, TampãoBase 10x, dNTP_{mix} a 100mM, MgCl₂ a 25mM, 25ng de DNA, Taq polimerase a 5U/ μl e água em quantidade suficiente para 800 μl .

4.7.1 REALIZAÇÃO DA SSP-PCR

Oito μl da mistura principal (*TDMH*) foram colocados em todos os poços com uma pipeta automática. Após vedar a placa com adesivo, esta foi colocada em um termociclador MJ Research PT-200 com o seguinte programa:

Passo	Temperatura °C	Tempo-min	Nº de ciclos
1	96°C	0,041666667	1
2	96°C	00:25	5
	70°C	00:45	
	72°C	00:30	
3	96°C	00:25	21
	65°C	00:45	
	72°C	00:30	
4	96°C	00:25	4
	55°C	00:50	
	72°C	0,0625	
5	4°C	Infinito	1

4.7.2. ELETROFORESE

Adicionam-se 10 µl de corante *Orange G* a 0,125% em todos os orifícios da placa. Um volume de 22 µl foi aplicado no gel de agarose a 1%, preparado em tampão TBE + brometo de etídeo (1 µg/ µl). Corrida a 150v por 18 minutos.

O gel foi fotografado com sistema fotográfico Polaroid.

4.8. ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE HLA CLASSE II LOCUS DR e DQ.

Foi realizada a técnica *SSO-PCR* (Reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos de sequência específica) utilizando-se sistema comercial DNA LABType® SSO que fornece sondas de oligonucleotídeos específicos para a sequência ligada a micro-esferas fluorescentes, para identificação de alelos do HLA em amostras de DNA genômico. As amostras de DNA previamente amplificadas através de reação de PCR convencional utilizando oligonucleotídeos grupo específico e posteriormente expostas a sondas que, em caso de pareamento são identificadas em sistema de analisador de fluxo, LABScan™ 100. A análise foi realizada com software fornecido com o *Kit*, além das sondas e os controles positivos. Estas tipagens foram realizadas em cooperação com o Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

4.8.1. REALIZAÇÃO DA SSO-PCR

4.8.1.1. AMPLIFICAÇÃO

A técnica consiste em uma pré-amplificação do DNA alvo utilizando-se iniciadores específicos para o grupo de alelos. Seguindo instruções do *kit* (*Invitrogen*

Life Technologies, CA, EUA) foi preparada a mistura de amplificação para cada reação:

- 6,9 μ l D-mix + 2,0 μ l iniciador de amplificação (10mM) + 0,1 μ l Taq polimerase (5U/ μ l). O DNA foi adicionado na concentração de 20ng. O material foi submetido a um termociclador com a programação fornecida pelo fabricante, mostrado abaixo.

Programa de PCR LABType® SSO

PASSO	Temperatura°C	Tempo -min	Nº de ciclos
1	96°C	03:00	1
2	96°C	00:20	5
	60°C	00:20	
	72°C	00:20	
3	96°C	00:10	30
	60°C	00:15	
	72°C	00:20	
4	72°C	10:00	1
5	4°C	Infinito	

4.8.1.2. ELETROFORESE E VISUALIZAÇÃO DO GEL

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE (5,4g Tris-base; 2,75g de ácido bórico; 2ml de solução de EDTA 0,5M; água destilada q.s.q 1 litro) com 10 μ L de Sybr Safe (*Invitrogen Life Technologies, CA, EUA*). O gel foi submetido à eletroforese durante 6 minutos a aproximadamente 150V. As bandas de material amplificado foram visualizadas sob a luz ultravioleta.

4.8.1.3. DESNATURAÇÃO/NEUTRALIZAÇÃO

Dois e meio μl do produto de cada amostra amplificada foram transferidos para uma placa de 96 poços limpa, e foi acrescentado em cada poço, tampão de Desnaturação (1,5 μl) e após 10 minutos adicionou-se o tampão de neutralização (2,5 μl).

4.8.1.4. HIBRIDIZAÇÃO

Em cada poço foi adicionado 19 μl da mistura de hibridização (17 μl de tampão de hibridização e 2 μl de microesferas). A placa foi submetida ao agitador vortex em baixa velocidade para homogeneização e incubada num termociclador a 60°C durante 15 minutos. Para a etapa de lavagem foi adicionado 50 μl do tampão de lavagem e centrifugado a 1000-1300 x g a 4°C durante 5 minutos por três vezes. A placa foi invertida para eliminação do sobrenadante.

4.8.1.5. MARCAÇÃO

Foi adicionado 25 μl da solução SAPE (0,25 μl de SAPE + 24,75 μl de tampão SAPE), submetido ao agitador magnético e 5 minutos de incubação a 60°C. Após foi colocado 50 μl de tampão de lavagem, e repetido o procedimento descrito acima. Foi adicionado mais 65 μl para ressuspender o sedimento e transferido para a placa de leitura, modelo ELISA.

4.8.1.6. AQUISIÇÃO DE DADOS

A placa de ELISA com o material hibridizado foi levada a uma plataforma XY, acoplada ao aparelho LABScan 100 Luminex, que detecta as fluorescências emitidas pelas microesferas.

A interpretação dos resultados obtidos no Luminex foi realizada por um leitor treinado, com o auxílio do software HLA Fusion 2.0 (*One Lambda, Canoga Park, CA, USA*), que analisa as microesferas com hibridização positiva na amostra, compara com uma planilha de padrões fornecida pelo fabricante e estabelece a tipificação HLA.

4.9. ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DE *TNFA* -308G/A, *IL6* -174G/C, *IFNG* +874A/T, *TGFB* códons 10T/C e 25G/C e *IL10* -1082A/G, -819C/T, -592A/C

Foi utilizada a técnica de SSP-PCR disponível em kit comercial *Cytokine Genotyping Tray* (One Lambda Inc. Canoga Park, CA, EUA), que permite estudar polimorfismos em diversos genes simultaneamente. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A placa de tipificação utilizada é revestida com oligonucleotídeos iniciadores de sequência específica para amplificação dos genes *TNFA*, *TGFB*, *IL10*, *IL6* e *IFNG*, e do gene que codifica a β -globina (controle interno). Em cada orifício da placa, foram adicionadas 10 μ l da seguinte mistura: dNTP-tampão (*D-mix*, fornecido com o *kit*), taq polimerase (5U/ μ l), amostra de DNA (20ng). A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) com o seguinte programa de ciclagem para amplificação (*One Lambda*):

Nº de ciclos	Passo	Temp (°C)	Tempo (seg)
1	1	96°C	00:130
	2	63°C	00:60
9	1	96°C	00:10
	2	63°C	00:60
20	1	96°C	00:10
	2	59°C	00:50
	3	72°C	00:20
Fim	1	4°C	∞

Após o processo da PCR, os fragmentos foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% e visualizado com marcação de brometo de etídeo exposto à luz ultravioleta. Após fotografar o gel, os resultados foram anotados

em formulário próprio fornecido pelo fabricante e interpretados de acordo com a presença ou ausência de um fragmento específico amplificado (Figuras 14 e 15).

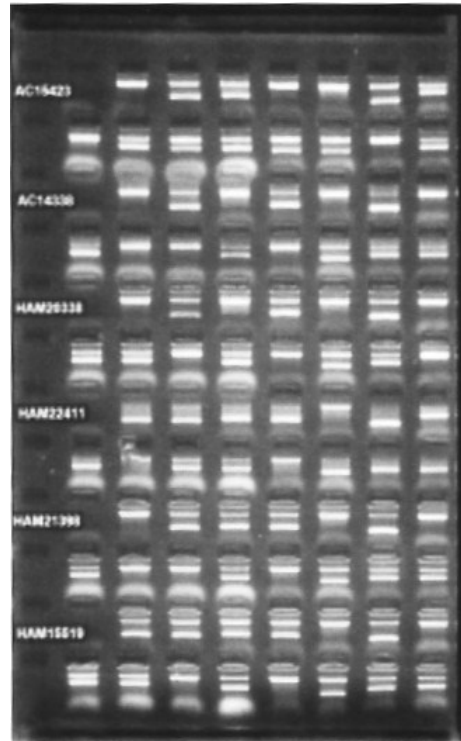


Figura 14 – Fotografia de um gel de agarose, após corrida eletroforética de tipificação dos alelos de citocinas utilizando *Kit* comercial Cytokine Genotyping Tray (*One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA*).

WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray, Lot 3

Cat. # CYTGEN

Name: _____ Patient Male
 Donor Female

Sample I.D. _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

Disease _____ Relationship to Patient _____

TNF- α Results _____
TGF- β Results _____
IL-10 Results _____
IL-6 Results _____
IFN- γ Results _____

Tray Exp. Date _____
Tray Lot # _____
D-mix Lot #/Batch # _____

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
RESULTS (mark positive locations)																
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	200	200	200	200	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY	Neg Ctrl	TNF- α promoter -308A	TNF- α promoter -308G	TGF- β codon 10T	TGF- β codon 10C	TGF- β codon 25C	TGF- β codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-692C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN- γ intron 1 +874T	IFN- γ intron 1 +874A
TNF- α																
G/G (low)																
G/A (high)																
A/A (high)																
T/T G/G (high)																
T/C G/G (high)																
T/C G/C (intermediate)																
C/C G/C (intermediate)																
T/T G/C (intermediate)																
C/C G/C (low)																
C/C C/C (low)																
T/T C/C (low)																
T/C C/C (low)																
IL-10																
GCC/GCC (high)																
GCC/ACC (intermediate)																
GCC/ATA (intermediate)																
ACC/AGC (low)																
ACC/ATA (low)																
ATA/ATA (low)																
IL-6																
G/G (high)																
G/C (high)																
C/C (low)																
T/T (high)																
IFN- γ																
T/A (intermediate)																
A/A (low)																

Test Performed by _____ Date _____
Read by _____ Date _____
Reviewed by _____ Date _____

One-Lambda, Inc. 21001 Kettlebridge St., Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 Rev. 990629.3

Figura 15 – Ficha de interpretação da Tipificação das Citocinas fornecido pelo fabricante *Kit* comercial Cytokine Genotyping Tray (*One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA*).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em um banco de dados no programa *Statistics Packadge for Social Science (SPSS)* versão 16 para *windows*. As frequências alélicas e genotípicas foram avaliadas por frequência simples. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para os polimorfismos das citocinas no programa *on line* disponível no sítio http://bioinfo.iconcologia.net/ubbweb/SNPStats_web, em que se comparou as frequências alélicas observadas com as esperadas. Em relação ao HLA foram utilizadas as ferramentas disponíveis no sítio <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tools-links.html> (*Los Alamos HIV database tools*). Para a distribuição genotípica dos polimorfismos das citocinas foi verificado o melhor modelo de herança para os dados obtidos, estes dados foram comparados ao modelo padrão de codominância. Foi aplicado os critérios de informação Akaike (AIC) para a seleção do modelo, sendo escolhido o de menor índice AIC, para isto foi utilizado o programa *on line* SNPSTATS. As análises de estatística descritivas

foram realizadas no SPSS, os dados quantitativos com distribuição normal foram avaliados pelas médias e percentis e para os dados com distribuição anormal utilizou-se teste de não paramétrico de Mann-Whitney. A comparação das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas foi feita pelo teste de qui-quadrado de Pearson, quando o número de observações foi inferior a 20 em alguma categoria, foi utilizada a correção de Fisher para as tabelas 2 por 2 e o método de Bonferroni para corrigir as análises com múltiplas comparações. Valores de p iguais ou menores do que 0,05 foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

Os 288 indivíduos incluídos neste estudo foram divididos em dois grupos, 117 indivíduos assintomáticos e 171 indivíduos sintomáticos. Os pacientes foram predominantemente originários do Estado do Rio de Janeiro (68,7%). A tabela 2 apresenta a distribuição dos casos de acordo com a sua origem e a condição clínica. Não ocorreu diferenças significativas entre os casos e os controles em relação a naturalidade dos pacientes. A idade média dos pacientes é de 54,3 anos, variando de 13 a 84,4 anos, intervalo interquartilico de 16,5 anos, sendo de 52,4 anos para os indivíduos assintomáticos e 55,6 anos para os sintomáticos.

O tempo médio de acompanhamento dos pacientes foi de 101,2 meses, variando de zero a 221,9 meses, intervalo interquartilico 104,6, sendo de 115,6 meses para os indivíduos assintomáticos e de 91,6 meses para os sintomáticos.

Tabela 2. Distribuição dos pacientes de acordo com a naturalidade e a condição clínica.

Naturalidade	Assintomático		Sintomático	
	N	(%)	N	(%)
Rio de Janeiro	85	(72,6)	113	(66,1)
Bahia	4	(3,4)	8	(4,7)
Ceará	1	(0,9)	4	(2,3)
Minas Gerais	7	(6,0)	8	(4,7)
Paraíba	4	(3,4)	8	(4,7)
Pernambuco	2	(1,7)	6	(3,5)
Maranhão	1	(0,9)	4	(2,3)
Espirito Santo	5	(4,3)	5	(2,9)
Rio Grande do Norte	1	(0,9)	1	(0,6)
Pará	2	(1,7)	3	(1,8)
Santa Catarina			1	(0,6)
Amazonas			1	(0,6)
Piauí			1	(0,6)
Alagoas	3	(2,6)	2	(1,2)
Sergipe			5	(2,9)
Goiás	1	(0,9)		
São Paulo	1	(0,9)	1	(0,6)
Total		117		171

A tabela 3 apresenta os diagnósticos neurológicos de acordo com o gênero dos pacientes, observa-se que 40,6% são indivíduos assintomáticos, 56,9% portadores de mielopatia, 1% casos de polineuropatia isolada, 0,7% casos de bexiga neurogênica isolada e polimiosite. Não observamos diferença estatística quanto a distribuição das alterações neurológicas entre os gêneros.

Tabela 3. Distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico neurológico e o gênero.

Condição neurológica	Gênero		Total
	Masculino N (%)	Feminino N (%)	
Assintomático*	53 (44,5)	64 (37,9)	117 (40,6)
Mielopatia*	61 (51,3)	103 (60,9)	164 (56,9)
Polineuropatia isolada	3 (2,5)	-	3 (1,0)
Bexiga neurogênica isolada	1 (0,8)	1 (0,6)	2 (0,7)
Polimiosite	1 (0,8)	1 (0,6)	2 (0,7)
Total	119	169	288

*Teste Qui-Quadrado de Pearson assintomáticos x mielopatas $\chi^2 = 1,86$ e $p = 0,17$

Os indivíduos foram distribuídos de acordo com a cor da pele em branca e não branca, essa classificação foi feita por autodeterminação. A tabela 4 apresenta a distribuição de acordo com a condição clínica, não houve diferenças entre os dois grupos.

Tabela 4. Distribuição dos pacientes de acordo com a cor da pele e a condição clínica.

Cor da pele	Assintomático		Sintomático		χ^2	p
	N	(%)	N	(%)		
Branca	63	(53,8)	83	(48,8)	0,70	0,40
Não Branca	54	(46,2)	87	(51,2)		
Total	117		170			

*Teste Qui-Quadrado de Pearson Razão de chance: 0,82; IC 95% (0,50 – 1,35)

Os pacientes foram classificados epidemiologicamente de acordo com a provável via de infecção do HTLV-1, e a distribuição das vias de infecção pela condição clínica encontra-se na Tabela 5. Não houve diferença entre os dois grupos ($p = 0,18$). A via de infecção mais frequente foi a sexual, seguida pela amamentação e transfusão de sangue. O uso de drogas injetáveis só foi observado em oito pacientes. Todos os casos classificados como transfusão de sangue, foram indivíduos que receberam transfusão antes do controle sistemático do sangue, isto é, antes de 1993.

Tabela 5. Distribuição da provável via de infecção de acordo com a condição clínica.

Provável via de infecção	Assintomático		Sintomático		χ^2	<i>p</i>
	N	(%)	N	(%)		
Sexual	51	(43,6)	67	(39,2)	4,98	0,29
Transfusão de sangue	9	(7,7)	22	(12,9)		
Uso de drogas injetáveis	1	(0,9)	7	(4,1)		
Amamentação	28	(23,9)	36	(21,1)		
Ignorada	28	(23,9)	39	(22,8)		
Total	117		171			

5.1. AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DOS PORTADORES DE HTLV-1

A figura 16 apresenta a quantificação da carga proviral nos dois grupos de pacientes. Observamos diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,0001$). O grupo dos sintomáticos (mediana de 7,01% e intervalo interquartil de 6,51%) apresentou valores bem mais altos que os assintomáticos (mediana de 1,63%, intervalo interquartil de 5,38%).

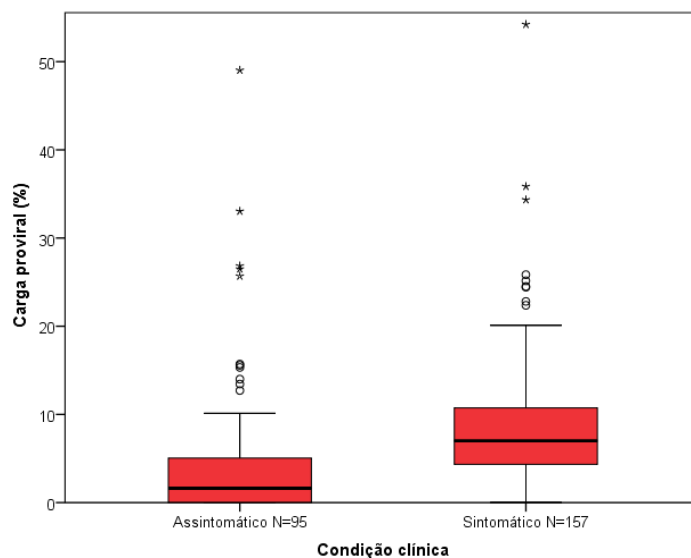


Figura 16 - Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a condição clínica. (Mann-Whitney $p=0,0001$)

5.2. TIPIFICAÇÃO DOS ALELOS HLA

5.2.1. CONDIÇÃO CLÍNICA

Foram tipados os alelos HLA-A, B, C. Para o locus A, a Tabela 6 mostra a distribuição de acordo com a condição clínica dos pacientes, o alelo A*02 foi o mais frequente nos dois grupos, 19,6% e 18,2% para assintomáticos e sintomáticos respectivamente.

Tabela 6. Distribuição dos alelos HLA-A de acordo com a presença de sintomatologia neurológica.

Alelo	Assintomático N (%)	Sintomático N (%)	Total N (%)	p*
A*01	16 (7,6)	17 (5,2)	33 (6,2)	0,27
<u>A*02</u>	<u>41 (19,6)</u>	<u>59 (18,2)</u>	<u>100 (18,8)</u>	<u>0,73</u>
A*03	21 (10,0)	27 (8,3)	48 (9,0)	0,54
A*11	12 (5,7)	22 (6,8)	34 (6,4)	0,72
A*23	11 (5,2)	20 (6,2)	31 (5,8)	0,71
A*24	24 (11,4)	31 (9,6)	55 (10,3)	0,47
A*25	-	1 (0,3)	1 (0,2)	-
A*26	7 (3,3)	15 (4,6)	22 (4,1)	0,51
A*29	14 (6,7)	9 (2,8)	23 (4,3)	0,04
A*30	16 (7,6)	19 (5,9)	35 (6,6)	0,47
A*31	5 (2,4)	11 (3,4)	16 (3,0)	0,61
A*32	3 (1,4)	10 (3,1)	13 (2,4)	0,26
A*33	6 (2,9)	12 (3,7)	18 (3,4)	0,81
A*34	5 (2,4)	3 (0,9)	8 (1,5)	0,27
A*36	6 (2,9)	2 (0,6)	8 (1,5)	0,06
A*66	4 (1,9)	7 (2,2)	11 (2,1)	0,99
A*68	13 (6,2)	50 (15,4)	63 (11,8)	0,001
A*74	5 (2,4)	8 (2,5)	13 (2,4)	0,99
A*80	-	1 (0,3)	1 (0,2)	-
Total	209	324	533	

Em negrito os alelos com frequência diferente entre os dois grupos e sublinhados os mais frequentes. * Teste de Fischer

Não houve diferença significativa entre a distribuição do alelo A*02 nos dois grupos de pacientes ($p=0,43$ RC: 0,82; IC 95% (0,49 – 1,35)), como demonstrado na Tabela 7, assim como não observamos influência deste alelo nos níveis de carga proviral, Figura 17 ($p=0,206$).

Tabela 7. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*02.

Condição Clínica	HLA-A*02		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	54 (56,8)	111 (61,7)	165 (60,0)	0,60	0,43
Assintomático	41 (43,2)	69 (38,3)	110 (40,0)		
Total	95	180	275		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 0,82; IC 95% (0,49 – 1,35)

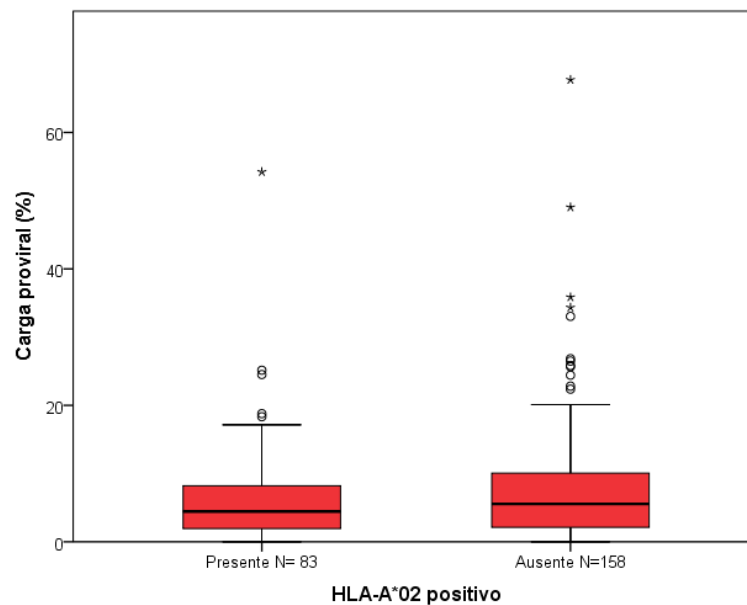


Figura 17. Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*02. ($p=0,206$ Mann-Whitney)

O alelo HLA-A*29 (Tabela 8) foi mais frequente entre os indivíduos assintomáticos ($p=0,03$, RC 0,39; IC 95% (0,16-0,94)), e sua presença influencia os

níveis da carga proviral. Os indivíduos HLA-A*29 positivos apresentam uma carga proviral significativamente menor do que os pacientes que não apresentam este alelo ($p=0,015$) (Figura 18).

Tabela 8. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*29.

Condição Clínica	HLA-A*29		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	9 (39,1)	157 (62,1)	166 (60,1)	4,62	0,03
Assintomático	14 (60,9)	96 (37,9)	110 (39,9)		
Total	23	253	276		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 0,39; IC 95% (0,16 – 0,94)

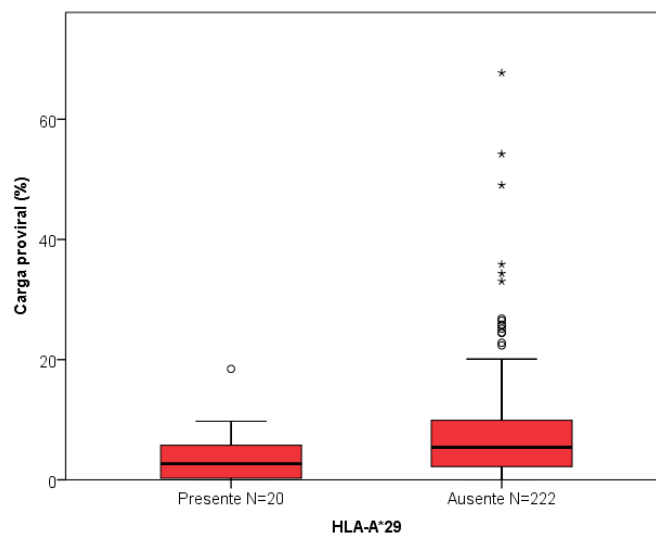


Figura 18 - Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*29. ($p=0,015$ Mann-Whitney)

O alelo HLA-A*36 apresenta diferença significativa na distribuição entre assintomáticos e sintomáticos, entretanto não valorizamos este resultado devido a

baixa frequência geral deste alelo (1,5%) sendo seis (2,9%) indivíduos assintomáticos e dois (0,6%) sintomáticos.

Em relação ao alelo HLA-A*68, observamos diferença significativa na sua distribuição entre os dois grupos de pacientes ($p=0,001$; RC:2,93; IC 95% (1,50 – 5,76)), tabela 9. O alelo HLA-A*68 está mais frequente entre os indivíduos sintomáticos, entretanto a sua presença não influencia os níveis de carga proviral ($p=0,207$) (Figura 19).

Tabela 9. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-A*68.

Condição Clínica	HLA-A*68		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	47 (78,3)	119 (55,1)	166 (60,4)	10,58	0,001
Assintomático	13 (21,7)	97 (44,9)	110 (39,9)		
Total	61	219	280		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 2,93; IC 95% (1,50 – 5,76)

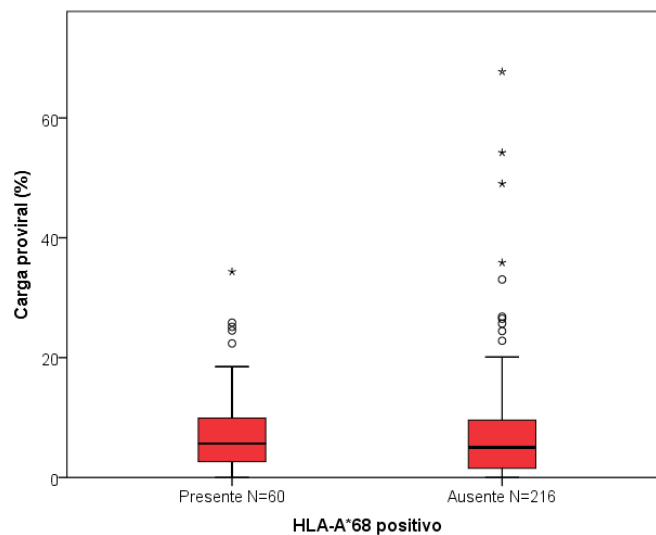


Figura 19. Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-A*68. ($p=0,207$ Mann-Whitney)

A análise dos valores de carga proviral de acordo com a presença ou ausência dos alelos HLA-A*02 ($p=0,93$ e $p=0,16$), HLA-A*29 ($p=0,19$ e $p=0,43$) e

HLA-A*68 ($p=0,94$ e $p=0,75$), nos grupos individualmente de assintomáticos e de sintomáticos, não apresentou diferença significativa.

A Tabela 10 mostra a distribuição dos alelos HLA-B nos dois grupos de pacientes. O alelo HLA-B*35 foi o mais frequente sendo encontrado em 10,8% e 11,6% dos indivíduos assintomáticos e sintomáticos respectivamente.

Tabela 10. Distribuição dos alelos HLA-B de acordo com a presença de sintomatologia neurológica.

Alelo	Assintomático N (%)	Sintomático N (%)	Total N (%)	p^*
B*07	8 (4,3)	10 (5,3)	18 (4,8)	0,81
B*08	11 (5,9)	15 (7,9)	26 (6,9)	0,54
B*13	2 (1,1)	1 (0,5)	3 (0,8)	0,62
B*14	7 (3,8)	8 (4,2)	15 (4,0)	0,99
B*15	15 (8,1)	19 (10,0)	34 (9,1)	0,59
B*18	7 (3,8)	12 (6,3)	19 (5,1)	0,35
B*27	4 (2,2)	3 (1,6)	7 (1,9)	0,72
<u>B*35</u>	<u>20 (10,8)</u>	<u>22 (11,6)</u>	<u>42 (11,2)</u>	<u>0,87</u>
B*37	4 (2,2)	-	4 (1,1)	-
B*38	2 (1,1)	7 (3,7)	9 (2,4)	0,17
B*39	2 (1,1)	3 (1,6)	5 (1,3)	0,99
B*40	6 (3,2)	8 (4,2)	14 (3,7)	0,79
B*41	3 (1,6)	3 (1,6)	6 (1,6)	1
B*42	8 (4,3)	3 (1,6)	11 (2,9)	0,14
B*44	20 (10,8)	10 (5,3)	30 (8,0)	0,05
B*45	2 (1,1)	5 (2,6)	7 (1,9)	0,45
B*48	4 (2,2)	7 (3,7)	11 (2,9)	0,54
B*49	5 (2,7)	4 (2,1)	9 (2,4)	0,75
B*50	7 (3,8)	8 (4,2)	15 (4,0)	0,99
B*51	15 (8,1)	10 (5,3)	25 (6,7)	0,31
B*52	3 (1,6)	8 (4,2)	11 (2,9)	0,22
B*53	7 (3,8)	5 (2,6)	12 (3,2)	0,57
B*55	3 (1,6)	-	3 (0,8)	-
B*56	-	1 (0,5)	1 (0,3)	-
B*57	13 (7,0)	9 (4,8)	22 (5,9)	0,39
B*58	2 (1,1)	6 (3,2)	8 (2,1)	0,28
B*81	4 (2,2)	1 (0,5)	5 (1,3)	0,21
B*82	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (0,5)	1
Total	185	189	374	

Em negrito os alelos com frequência diferente entre os dois grupos e sublinhados os mais frequentes. * Teste exato de Fischer

Houve uma frequência maior do alelo B*44 no grupo de indivíduos assintomáticos ($p=0,038$; RC: 0,42; IC 95% (0,18 – 0,96)). A tabela 11 e a figura 20 mostram a distribuição deste alelo em relação à condição clínica e a influência nos valores da carga proviral. A presença do alelo HLA-B*44 diminui de forma significativa os níveis de carga proviral ($p=0,05$).

Tabela 11. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-B*44.

Condição Clínica	HLA-B*44		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	10 (33,3)	90 (53,9)	100 (50,8)	4,30	0,038
Assintomático	20 (66,7)	77 (46,1)	97 (49,2)		
Total	30	167	197		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 0,42; IC 95% (0,18 – 0,96)

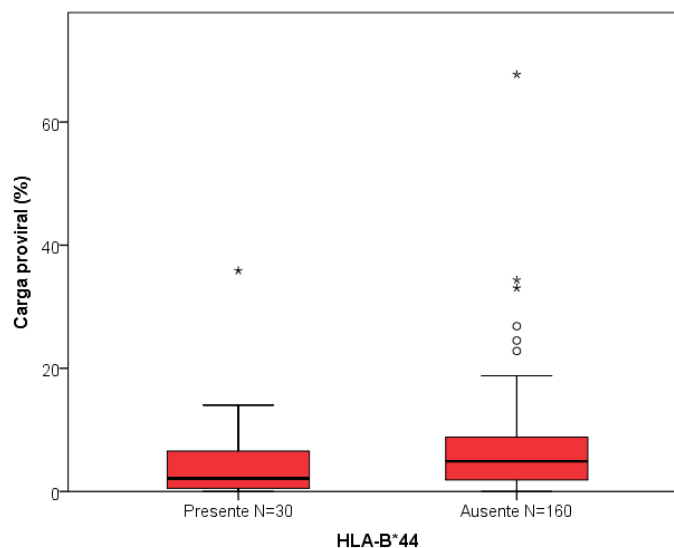


Figura 20. Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença do alelo HLA-B*44. ($p=0,05$ Mann-Whitney)

A análise dos valores da carga proviral de acordo com a presença do alelo HLA-B*44, nos grupos individualmente de assintomáticos ($p=0,48$) e de sintomáticos ($p=0,09$), não apresentou diferença significativa.

A tabela 12 mostra a distribuição dos alelos do locus HLA-C, onde se observa que os alelos HLA-C*04 e C*07 são os mais frequentes nos dois grupos de pacientes.

Tabela 12. Distribuição dos alelos HLA-C de acordo com a presença de sintomatologia neurológica.

Alelo	Assintomático N (%)	Sintomático N (%)	Total N (%)	p^*
C*01	3 (1,8)	2 (1,7)	5 (1,5)	0,99
C*02	20 (11,9)	16 (10,1)	36 (11,0)	0,72
C*03	16 (9,5)	16 (10,1)	32 (9,8)	1
C*04	41 (24,4)	19 (11,9)	60 (18,3)	0,004
C*05	6 (3,6)	8 (5,0)	14 (4,3)	0,59
C*06	18 (10,7)	18 (11,3)	36 (11,0)	0,86
<u>C*07</u>	<u>28 (16,7)</u>	<u>35 (22,0)</u>	<u>63 (19,3)</u>	<u>0,26</u>
C*08	9 (5,4)	6 (3,8)	15 (4,6)	0,60
C*12	6 (3,6)	13 (8,2)	19 (5,8)	0,10
C*14	5 (3,0)	4 (2,5)	9 (2,7)	0,99
C*15	6 (3,6)	4 (2,5)	10 (3,1)	0,75
C*16	9 (5,4)	13 (8,2)	22 (6,7)	0,38
C*17	1 (0,6)	4 (2,5)	5 (1,5)	0,20
C*18	-	1 (0,6)	1 (0,3)	0,47
Total	168	159	327	

Em negrito os alelos com frequência diferente entre os dois grupos e sublinhados os mais frequentes. * Teste exato de Fischer

O alelo C*04 foi mais frequente entre os indivíduos assintomáticos ($p=0,003$; RC: 037; IC 95% (0,19 – 0,72)), tabela 13. A figura 21 mostra que a presença ou ausência desse alelo não influencia os níveis de carga proviral ($p=0,186$).

Tabela 13. Distribuição dos casos de acordo com a condição neurológica e a presença do alelo HLA-C*04.

Condição Clínica	HLA-C*04		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	19 (31,7)	63 (55,3)	82 (47,1)	8,79	0,003
Assintomático	41 (68,3)	51 (44,7)	92 (52,9)		
Total	60	114	174		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 0,37; IC 95% (0,37 – 0,72)

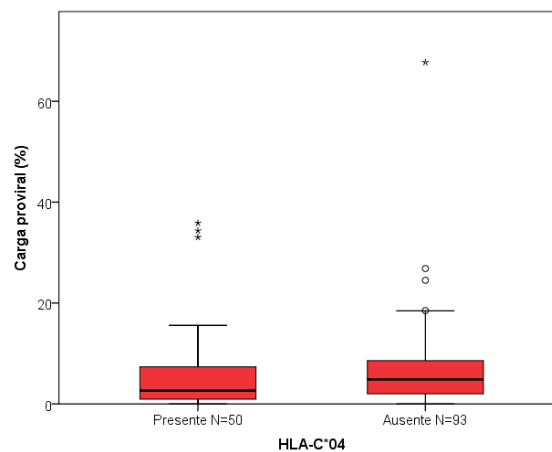


Figura 21. Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-C*04. ($p=0,186$ Mann-Whitney)

A análise dos valores da carga proviral de acordo com a presença do alelo C*04, nos grupos individualmente de assintomáticos ($p=0,84$) e de sintomáticos ($p=0,76$), não apresentou diferença significativa.

A tipificação do HLA Classe II foi realizada em 186 pacientes. A tabela 14 mostra a distribuição dos alelos em relação à condição clínica, observa-se que os alelos HLA-DRB1*11 e DRB1*13 foram os mais frequentes em ambos os grupos.

Tabela 14. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 de acordo com a presença de sintomatologia neurológica

Alelo	Assintomático	Sintomático	Total	p^*
	N (%)	N (%)	N (%)	
DRB1*01	21 (10,8)	17 (9,5)	38 (10,2)	0,73
DRB1*03	11 (5,7)	22 (12,4)	33 (8,9)	0,03
DRB1*04	18 (9,3)	16 (9,0)	34 (9,1)	0,99
DRB1*07	29 (14,9)	24 (13,5)	53 (14,2)	0,77
DRB1*08	12 (6,2)	6 (3,4)	18 (4,8)	0,23
DRB1*09	3 (1,5)	6 (3,4)	9 (2,4)	0,32
DRB1*10	5 (2,6)	7 (3,9)	12 (3,2)	0,56
<u>DRB1*11</u>	<u>30 (15,5)</u>	<u>28 (15,7)</u>	<u>58 (15,6)</u>	<u>0,99</u>
DRB1*12	2 (1,0)	3 (1,7)	5 (1,3)	0,67
<u>DRB1*13</u>	<u>35 (18,0)</u>	<u>23 (12,9)</u>	<u>58 (15,6)</u>	<u>0,19</u>
DRB1*14	7 (3,6)	6 (3,4)	13 (3,5)	0,99
DRB1*15	14 (7,2)	13 (7,3)	27 (7,3)	0,99
DRB1*16	7 (3,6)	7 (3,9)	14 (3,8)	1
Total	194	178	372	

Em negrito os alelos com frequência diferente entre os dois grupos e sublinhados os mais frequentes. * Teste exato de Fischer

O alelo HLA-DRB1*03 foi mais frequente entre os indivíduos sintomáticos ($p=0,027$ RC: 2,41 IC: 95% (1,08-5,35)), tabela 15, porém, a sua presença não influencia os níveis de carga proviral ($p=0,318$), figura 22.

Tabela 15. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DRB1*03.

Condição Clínica	HLA-DRB1*03		Total	χ^2	p^*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	21 (65,6)	68 (44,2)	89 (47,8)	4,89	0,027
Assintomático	11 (34,4)	86 (55,8)	97 (52,2)		
Total	32	154	186		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 2,41; IC 95% (1,08 – 5,35)

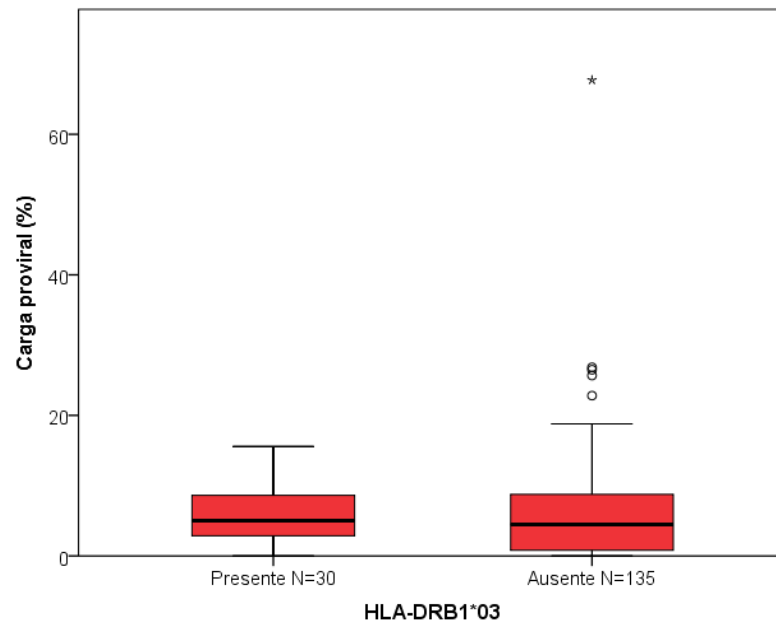


Figura 22. Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 de acordo com a presença de HLA-DRB1*03. ($p=0,318$ Mann-Whitney)

Na análise por grupos separadamente, a presença do alelo HLA-DRB1*03 influencia significativamente os níveis de carga proviral, figura 23 e 24.

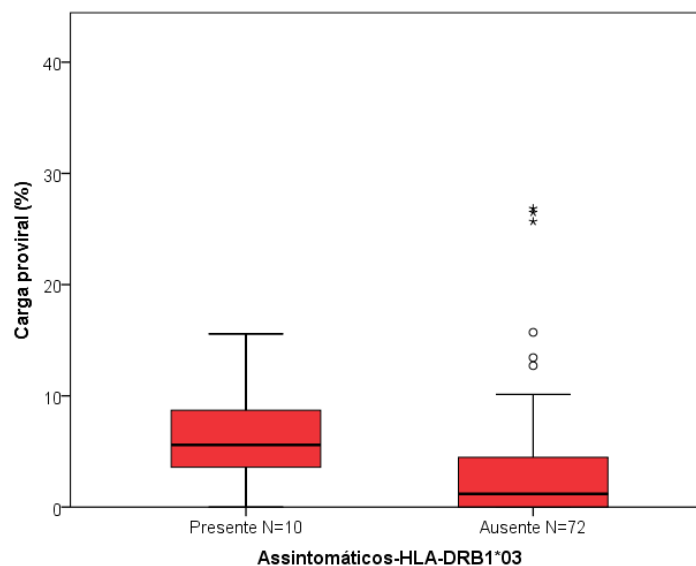


Figura 23 - Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos assintomáticos de acordo com a presença de HLA-DRB1*03. ($p=0,02$ Mann-Whitney)

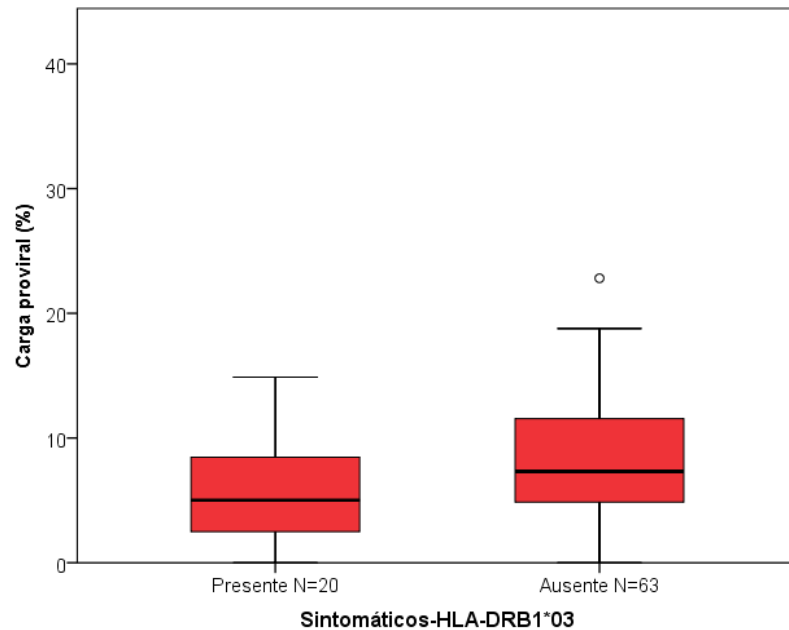


Figura 24 - Distribuição dos valores da carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos sintomáticos de acordo com a presença de HLA-DRB1*03. ($p=0,04$ Mann-Whitney)

A tipificação do locus HLA-DQA e DQB foi realizada em 60 e 185 pacientes, respectivamente. Os alelos HLA-DQA01 e DQB03 foram os mais frequentes, tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Frequência alélica do HLA-DQA nos pacientes de acordo com a condição clínica

Alelo HLA-DQA	Assintomático		Sintomático		Total		p^*
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<u>DQA1*01</u>	<u>15</u>	<u>(41,7)</u>	<u>30</u>	<u>(55,6)</u>	<u>45</u>	<u>(37,5)</u>	0,54
DQA1*02	4	(11,1)	8	(14,8)	12	(10,0)	0,75
DQA1*03	4	(11,1)	13	(24,1)	17	(14,2)	0,77
DQA1*04	2	(5,6)	3	(5,6)	5	(4,2)	0,63
DQA1*05	10	(27,8)	29	(53,7)	39	(32,5)	0,53
DQA1*06	1	(2,8)	1	(1,8)	2	(1,7)	0,51
Total	36		54		120		

Em negrito os alelos com frequência diferente entre os dois grupos e sublinhados os mais frequentes. * Teste exato de Fischer

Não observamos diferenças significativas na distribuição dos alelos DQA1*03 e DQA1*05 entre os dois grupos de pacientes, tabelas 16 e 17.

Tabela 17. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DQA1*03.

Condição Clínica	HLA-DQA1*03		Total	χ^2	p*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	13 (76,5)	29 (67,4)	42 (70,0)	0,47	0,49
Assintomático	4 (23,5)	14 (32,6)	18 (30,0)		
Total	17	43	60		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 1,56; IC 95% (0,43 – 5,89)

Tabela 18. Distribuição dos casos de acordo com a condição clínica e a presença do alelo HLA-DQA1*05.

Condição Clínica	HLA-DQA1*05		Total	χ^2	p*
	Presente N (%)	Ausente N (%)			
Sintomático	27 (75,0)	15 (62,5)	42 (70,0)	1,07	0,30
Assintomático	9 (25,0)	9 (37,5)	18 (30,0)		
Total	36	24	60		

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 1,8; IC 95% (0,58 – 5,51)

A análise dos valores da carga proviral de acordo com a presença dos alelos HLA-DQA1*03 e DQA1*05 nos assintomáticos ($p=0,79$ e $p=0,55$), e nos sintomáticos ($p=0,62$ e $p=0,73$), não apresentou diferença significativa.

Em relação ao locus HLA-DQB, o alelo DQB1*03 foi o mais frequente nos dois grupos, não foram encontradas diferenças na distribuição dos alelos de acordo com a condição clínica dos pacientes (tabela 19).

Tabela 19. Frequência alélica do HLA-DQB nos pacientes de acordo com a condição clínica

Alelo HLA-DQB	Assintomático		Sintomático		Total		p^*
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
DQB1*02	36	(19,1)	43	(23,6)	79	(21,4)	0,31
<u>DQB1*03</u>	<u>63</u>	<u>(33,5)</u>	<u>58</u>	<u>(31,9)</u>	<u>121</u>	<u>(32,7)</u>	<u>0,74</u>
DQB1*04	9	(4,8)	6	(3,3)	15	(4,1)	0,60
DQB1*05	38	(20,2)	39	(21,4)	77	(20,8)	0,78
DQB1*06	42	(22,3)	36	(19,8)	78	(21,1)	0,61
Total	188		182		370		

Os alelos sublinhados são os mais frequentes. * Teste exato de Fischer

As frequências alélicas dos genes HLA-A, -B, -C e HLA-DRB1, DQA1, DQB1 se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos estudados.

5.3. AVALIAÇÃO DOS SNPs EM GENES LIGADOS A CITOCINAS

As tabelas que se seguem demonstram as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos estudados em relação à condição clínica. No anexo de tabelas (Anexo) encontram-se as tabelas com as frequências em relação ao gênero e a cor da pele dos pacientes, assim como, as frequências alélicas e genotípicas dos pacientes originários do estado do Rio de Janeiro.

A tabela 20 apresenta os dados do polimorfismo na posição -308 G/A da citocina TNF- α , observa-se uma frequência maior para o alelo G em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas em relação à distribuição alélica, genotípica e fenotípica. O melhor modelo de herança para os dados foi o de super dominância (AIC: 213,5) representado nas duas últimas linhas da tabela ($p=0,13$ RC: 1,17 IC 95% (0,49-2,77)).

Tabela 20. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica.

TNFA -308	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
G	151	(91,0)	122	(91,0)	0,03	0,86
A	15	(9,0)	12	(9,0)	1,00	(0,45-2,23)
G/G	69	(83,1)	55	(82,1)	0,92	0,63
G/A	13	(15,7)	12	(17,9)		
A/A	1	(1,2)	-	-		
G/G (Baixo)	69	(83,1)	55	(82,1)	0,03	0,86
G/A e A/A (Alto)	14	(16,9)	12	(17,9)	1,07	(0,46-2,51)
G/G A/A	70	(84,3)	55	(82,1)	0,13	0,72
G/A	13	(15,7)	12	(17,9)	1,17	(0,49–2,77)

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

A tabela 21 apresenta os dados do polimorfismo na posição -174 G/C da citocina IL-6, observa-se uma frequência maior para o alelo G em ambos os grupos, porém, sem diferenças significativas em relação à distribuição alélica, genotípica e fenotípica. O melhor modelo de herança para os dados foi o de super-dominância (AIC: 211,6) representado nas duas últimas linhas da tabela (p=0,46; RC: 0,76 IC 95% (0,36-1,58)).

Tabela 21. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica.

IL-6 -174	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
G	136	(82,9)	112	(83,6)	0,20	0,88
C	28	(17,1)	22	(16,4)	1,04	(0,57-1,93)
G/G	56	(68,3)	48	(71,6)	0,91	0,63
G/C	24	(29,3)	16	(23,9)		
C/C	2	(2,4)	3	(4,5)		
C/C (Baixo)	2	(2,4)	3	(4,5)	0,47	0,49
G/G e G/C (Alto)	80	(97,6)	64	(95,5)	1,87	(0,30-11,56)
G/G–C/C	58	(70,7)	51	(76,1)	0,54	0,46
G/C	24	(29,3)	16	(23,9)	0,76	(0,36-1,58)

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

A tabela 22 apresenta os dados do polimorfismo na posição +874 T/A da citocina IFN- γ , observa-se uma frequência maior para o alelo A em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas em relação à distribuição alélica, genotípica e fenotípica. O melhor modelo de herança para os dados foi o de super-dominância (AIC: 205,3) representado nas duas últimas linhas da tabela ($p=0,13$ RC: 0,60 IC 95% (0,31-1,16)).

Tabela 22. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica.

<i>IFN +874</i>	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	<i>p</i>
	N	(%)	N	(%)		
A	108	(69,2)	94	(70,1)	0,03	0,86
T	48	(30,8)	40	(29,9)	1,04	(0,63-1,58)
T/T	4	(5,1)	7	(10,4)	2,97	0,23
T/A	40	(51,3)	26	(38,8)		
A/A	34	(43,6)	34	(50,7)		
A/A (Baixo)	34	(43,6)	34	(50,7)	2,97	0,23
T/A (Intermediário)	40	(51,3)	26	(38,8)		
T/T (Alto)	4	(5,1)	7	(10,4)		
A/A-T/T	38	(48,7)	41	(61,2)	2,26	0,13
T/A	40	(51,3)	26	(38,8)	0,60	(0,31-1,16)

χ^2 : qui-quadrado, RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

A tabela 23 apresenta os dados dos polimorfismos dos códons 10 e 25 da citocina TGF- β , observa-se uma frequência maior para o alelo T do códon 10 e alelo G do códon 25 em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas em relação à distribuição alélica, genotípica e fenotípica. O melhor modelo de herança para os dados do códon 10 e 25 foi o de super-dominância (AIC: 211,9 e 213,5

respectivamente). Os dados estão representados nas duas ultimas linhas do referido códon.

Tabela 23. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica.

TGFB	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
Códon 10						
T	93	(55,4)	79	(59,0)	0,26	0,61
C	73	(43,5)	55	(41,0)	1,13	(0,71-1,79)

T/T	24	(28,9)	25	(37,3)	1,83	0,40
T/C	45	(54,2)	29	(43,3)		
C/C	14	(16,9)	13	(19,4)		

T/T-C/C	38	(45,8)	38	(56,7)	1,77	0,18
T/C	45	(54,2)	29	(43,3)	0,64	(0,33-1,23)
Códon 25						
G	153	(92,2)	122	(91,0)	0,12	0,73
C	13	(7,8)	12	(9,0)	0,86	(0,38-1,96)

G/G	71	(85,5)	56	(83,6)	0,11	0,94
G/C	11	(13,3)	10	(14,9)		
C/C	1	(1,2)	1	(1,5)		

G/G-C/C	72	(86,8)	57	(85,1)	0,09	0,76
G/C	11	(13,2)	10	(14,9)	1,14	(0,45-2,89)
Baixo (C/C G/C; C/C C/C; T/T C/C)						
	1	(1,2)	5	(7,5)	4,24	0,12
Intermediário (T/C G/C; C/C G/G; T/T G/C)						
	24	(28,9)	15	(22,4)		
Alto (T/C G/G)						
	58	(69,9)	47	(70,1)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

A tabela 24 apresenta a distribuição haplotípica da citocina TGF- β entre assintomáticos e sintomáticos (p=0,15).

Tabela 24. Distribuição dos haplótipos de TGF- β dos códons 10T/C e 25G/C de acordo com a condição clínica.

TGFB haplótipos	Assintomático		Sintomático		χ^2	<i>p</i>
	N	(%)	N	(%)		
T/T G/G	20	(24,1)	23	(34,3)	10,64	0,15
T/C G/G	38	(45,8)	24	(35,8)		
C/C G/G	13	(15,7)	9	(13,4)		
T/T G/C	4	(4,8)	1	(1,5)		
T/C G/C	7	(8,4)	5	(7,5)		
C/C G/C	-	-	4	(6,0)		
T/T C/C	-	-	1	(1,5)		
T/C C/C	-	-	-	-		
C/C C/C	1	(1,2)	-	-		
Total	83		67			

χ^2 : qui-quadrado

A análise da distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos polimorfismos das citocinas TNF- α , IL-6, IFN- γ e TGF- β de acordo com o gênero não mostrou diferenças de frequências (anexo de tabelas).

A tabela 25 apresenta os dados dos polimorfismos nas posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A da citocina IL-10, observa-se uma frequência maior para o alelo A da posição -1082 e alelo C para as posições -819 e -592 em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas em relação à distribuição alélica. Os polimorfismos -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação ($p < 0,01$). Não observamos diferenças em relação à distribuição genotípica dos polimorfismos -819 e -592, porém, em relação ao -1082, a frequência do genótipo A/A foi maior entre os assintomáticos, enquanto que o genótipo G/A predominou entre os sintomáticos ($p = 0,03$). Essa diferença se expressa no fenótipo havendo uma predominância de baixos produtores entre os assintomáticos e produtores intermediários entre os sintomáticos ($p = 0,03$). O melhor modelo de herança para os dados do polimorfismo -1082 foi o de dominância (AIC: 185,5) ($p = 0,01$ RC: 2,42 IC 95% (1,19-4,91)) e para os polimorfismos -819 e -592 foi

o recessivo (AIC 187,8). Os dados estão representados nas duas últimas linhas do referido polimorfismo.

Tabela 25. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com a condição clínica.

<i>IL-10</i>	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	<i>p</i>
	N	(%)	N	(%)		
-1082						
G	42	(29,6)	50	(40,3)	3,38	0,06
A	100	(70,4)	74	(59,7)	1,61 (0,97-2,67)	
G/G	9	(12,7)	8	(12,9)	6,79	0,03
G/A	24	(33,8)	34	(54,8)		
A/A	38	(53,5)	20	(32,3)		
A/A	38	(53,5)	20	(32,3)	6,09	0,01
G/A-G/G	33	(46,5)	42	(67,7)	0,41 (0,19-0,89)	
-819*						
C	85	(59,9)	81	(65,3)	0,84	0,36
T	57	(40,1)	43	(34,7)	1,26 (0,77-2,08)	
C/C	29	(40,8)	25	(40,3)	3,83	0,15
C/T	27	(38,0)	31	(50,0)		
T/T	15	(21,2)	6	(9,7)		
C/C-T/C	56	(78,9)	56	(90,3)	3,26	0,07
T/T	15	(21,1)	6	(9,7)	2,5 (0,83-7,85)	
-592*						
C	85	(59,7)	81	(65,4)	0,84	0,36
A	57	(40,3)	43	(34,6)	1,26 (0,77-2,08)	
C/C	29	(40,8)	25	(40,3)	3,83	0,15
C/A	27	(38,0)	31	(50,0)		
A/A	15	(21,2)	6	(9,7)		
C/C-C/A	56	(78,9)	56	(90,3)	3,26	0,07
A/A	15	(21,1)	6	(9,7)	0,40(0,14-1,10)	
Baixo (ACC/ACC; ACC/ATA; ATA/ATA)	38	(53,5)	20	(32,3)	6,79	0,03
Intermediário (GCC/ACC; GCC/ATA)	24	(33,8)	34	(54,8)		
Alto (GCC/GCC)	9	(12,7)	8	(12,9)		

χ^2 : qui-quadrado, RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança. * -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação.

A tabela 26 apresenta a distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos polimorfismos de IL-10 de acordo com o gênero dos pacientes. O alelo A predomina entre os indivíduos do sexo masculino ($p=0,001$). O genótipo A/A (61,7%) predomina entre os homens, enquanto que o G/A (56,2%) entre as mulheres ($p=0,001$). Essas

diferenças se expressam no fenótipo, havendo uma frequência maior de baixos produtores entre os homens e de produtores intermediários entre as mulheres ($p=0,001$).

Tabela 26. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos polimorfismos de IL-10 de acordo com o gênero dos pacientes.

<i>IL-10</i>	Masculino		Feminino		χ^2 RC (IC:95%)	<i>p</i>
	N	(%)	N	(%)		
-1082						
G	29	(24,2)	63	(43,2)	10,49	0,001
A	91	(75,8)	83	(56,8)		

G/G	6	(10,0)	11	(15,1)	14,68	0,001
G/A	17	(28,3)	41	(56,2)		
A/A	37	(61,7)	21	(28,8)		
-819*						
C	69	(57,5)	97	(66,4)	2,24	0,13
T	51	(42,5)	49	(33,6)	1,46(0,89-2,41)	

C/C	23	(38,3)	31	(42,5)	4,77	0,09
C/T	23	(38,3)	35	(47,9)		
T/T	14	(23,4)	7	(9,6)		
-592*						
C	69	(57,5)	97	(66,4)	2,24	0,13
A	51	(42,5)	49	(33,6)	1,46(0,89-2,41)	

C/C	23	(38,3)	31	(42,5)	4,77	0,09
C/A	23	(38,3)	35	(47,9)		
A/A	14	(23,4)	7	(9,6)		
Baixa	37	(61,7)	21	(28,8)	14,68	0,001
Intermediaria	17	(28,3)	41	(56,2)		
Alta	6	(10,0)	11	(15,1)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança. * -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação.

A tabela 27 apresenta a análise genotípica do polimorfismo de *IL-10* na posição -1082 de acordo com o gênero e a condição clínica. O genótipo A/A predomina de forma significativa entre os homens assintomáticos ($p=0,02$).

Tabela 27: Distribuição do genótipo do polimorfismo -1082 da IL-10 de acordo com o gênero e a condição clínica dos pacientes.

Genótipo	Condição clínica		χ^2 RC	p* (IC95%)
	Assintomático	Sintomático		
A/A				
Feminino	8 (24,3)	13 (52,0)	4,74	0,02
Masculino	25 (75,7)	12 (48,0)		
G/A				
Feminino	21 (61,8)	20 (83,3)	2,20	0,14 [#]
Masculino	13 (38,2)	4 (16,7)	3,09(0,86-11,10)	
G/G				
Feminino	5 (55,5)	6 (75,0)	2,40(0,30-19,04)	
Masculino	4 (44,5)	2 (25,0)		
Total	76	57		

*Qui-quadrado de Pearson, RC: razão de chance, IC intervalo de confiança 95%; [#] Yates corrigido

Não se observa diferença na distribuição dos haplotipos de acordo com a condição clínica dos pacientes (p=0,16) tabela 28.

Tabela 28. Distribuição dos haplotipos de *IL-10* (-1082G/A, -819C/T e -592C/A) de acordo com a condição clínica.

<i>IL-10</i> haplótipos	Assintomático		Sintomático		χ^2	p
	N	(%)	N	(%)		
GCC/GCC	9	(12,7)	8	(12,9)	7,93	0,16
GCC/ACC	11	(15,5)	12	(19,4)		
GCC/ATA	13	(18,3)	22	(35,5)		
ACC/ACC	9	(12,7)	5	(8,1)		
ACC/ATA	14	(19,7)	9	(14,5)		
ATA/ATA	15	(21,4)-	6	(9,7)		
Total	71		62			

A Tabela 29 demonstra o perfil fenotípico da população estudada, que se caracteriza por possuir de baixa a intermediária produção de IL-10, intermediário a alto produtor de TGF- β , baixo a intermediário para IFN- γ , alto produtor de IL-6 e baixo produtor de TNF- α , de acordo com as frequências observadas.

Tabela 29. Distribuição dos polimorfismos das citocinas de acordo com o nível de produção e a condição clínica.

Citocina	Assintomático		Sintomático		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
IL-10 (-1082, -819, -592)						
Baixo	38	(53,5)	20	(32,3)	6,79	0,03
Intermediário	24	(33,8)	34	(54,8)		
Alto	9	(12,7)	8	(12,9)		
TGF-beta (códon 10 e 25)						
Baixo	1	(1,2)	5	(7,5)	4,23	0,12
Intermediário	24	(28,9)	15	(22,4)		
Alto	58	(69,9)	47	(70,1)		
IFN +874						
Baixo	34	(43,6)	34	(50,7)	2,97	0,23
Intermediário	40	(51,3)	26	(38,8)		
Alto	4	(5,1)	7	(10,4)		
IL-6 -174						
Baixo	2	(2,4)	3	(4,5)	0,47	0,49
Alto	80	(97,6)	64	(95,5)		
TNF-308						
Baixo	69	(83,1)	55	(82,1)	0,03	0,87
Alto	14	(16,9)	12	(17,9)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

A comparação das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos genes *TNF α* (-308A/G), *IL6*(-175G/C), *IFN γ* (+874 T/A), *TGF β* (códon 10C/T e códon 25C/G) e *IL10* (-1082A/G, -819T/C, -592A/C) das amostras dos portadores assintomáticos e sintomáticos, demonstrou que se encontram dentro do esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, só foi observada diferença na frequência do polimorfismo de IL10 na posição -1082.

O objetivo principal deste estudo foi analisar as distribuições alélicas, genotípicas e fenotípicas, em relação à condição clínica de portadores assintomáticos e sintomáticos do vírus HTLV-1, identificar possíveis associações com o risco ou proteção à doença neurológica, e comparar os resultados com estudos em grupos populacionais diferentes do nosso. Entretanto, foi realizada uma comparação em relação à cor da pele e gênero, e analisada a frequência alélica dos indivíduos nascidos no estado do Rio de Janeiro. O anexo 1 de tabelas apresenta a distribuição e a frequência dos alelos de HLA e de citocinas, de acordo com a cor da

pele e o gênero dos pacientes, e a frequência alélica observada na população de pacientes do Rio de Janeiro.

6. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado em 288 portadores de HTLV-1, com predominância de indivíduos nascidos no estado do Rio de Janeiro e da região nordeste do Brasil. As regiões norte e sul apresentaram poucos indivíduos. Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição em relação ao gênero e a condição clínica. O fato de haver um número maior de mulheres, deve-se a maior aderência destas ao tratamento, assim como, a maior ocorrência de pacientes do sexo feminino com doença neurológica, está provavelmente associada a fatores hormonais (Lima et al., 2005).

O estudo de associação HTLV/HLA, começou em 1988 com Usuku e colaboradores (Usuku et al, 1988), comparando os haplótipos de indivíduos com LTA e com PET/MAH. Constataram que os haplótipos encontrados nos pacientes com LTA, divergiam dos haplótipos encontrados nos portadores de PET/MAH (Tabela 1).

Em nosso estudo, observou-se que a frequência dos alelos HLA-A encontrada, foi semelhante aos dados do Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) publicado por Bouzas, (2011). Os alelos mais frequentes foram HLA-A*02 (18,9%) e -A*24 (10,3%), à exceção do alelo -A*68 (11,8%), cujo percentual no REDOME é de 6%. Em nosso estudo a frequência deste alelo foi maior nos sintomáticos ($X^2 = 10,58$ e $p = 0,001$), sugerindo um risco maior para o desenvolvimento de doença. O alelo HLA-A*68 ocorre com maior frequência em grupos indígenas das Américas, populações do sul asiático e populações africanas, e com baixa frequência em populações do sudeste asiático e regiões que estão na costa oeste do oceano Pacífico, incluindo o Japão (<http://en.wikipedia.org/wiki/HLA-A68>). Na nossa população, quando se verificou a frequência por cor da pele, houve uma predominância na população não branca (13,0%). Em portadores de HIV, este alelo está associado à alta carga viral em população africana (Tang et al., 2002) e também relacionado à transmissão rápida do vírus HIV, em parceiros heterossexuais soronegativos (Song et al., 2011). Uma característica desta molécula, é possuir na

posição 245 um resíduo maior de valina, alterando a conformação da cadeia $\alpha 3$, resultando numa interação menos eficaz do peptídeo antigênico com o linfócito T CD8 (Gostick et al., 2007). Foi relatada também em população da América do Norte, uma associação com o vírus da febre do Nilo Ocidental, cuja maioria dos indivíduos com esta infecção permanece assintomática. O alelo -A*68 estava presente nos pacientes com pior prognóstico ($p=0,013$) (Lanteri et al., 2011). Porém, em pacientes portadores da doença de Chagas, foi encontrada uma frequência maior deste alelo nos indivíduos que não apresentavam cardiomiopatia, sugerindo um efeito protetor (Cruz-Robles et al., 2004). Em nosso estudo, apesar da frequência ser maior entre os sintomáticos, quando se comparou a carga proviral entre os indivíduos que possuíam o alelo -A*68 e os que não o possuíam, não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos. Resultado semelhante também foi observado na comparação por grupo de pacientes, isto é, entre assintomáticos e sintomáticos.

O alelo HLA- A*02 é globalmente distribuído, e também foi o mais frequente em nosso estudo. Na população japonesa, este alelo foi associado à baixa carga proviral e proteção ao desenvolvimento de doença neurológica em portadores de HTLV-1 (Jeffery et al., 1999 e 2000). Entretanto, Yashiki e colaboradores (2001) ao verificarem a frequência alélica do -A*02 na mesma região do Japão, não encontraram diferenças significativas entre indivíduos mielopatas e assintomáticos. As hipóteses levantadas pelos autores para explicar resultados tão contraditórios, foi a possível existência de uma micro heterogeneidade na população do sudeste do Japão, em que a frequência alélica do gene do HLA fosse diferente entre cidades ou mesmo famílias. A outra hipótese foi a data das amostras analisadas. As amostras de Yashiki foram coletadas no período entre 1986 e 1992, enquanto as de Jeffery e colaboradores foram entre 1998 e 1999, sugerindo o início precoce de doença em que as amostras foram coletadas, e tardia, quando a doença neurológica já tinha longo tempo de evolução. Essas hipóteses foram baseadas em trabalhos que descrevem a frequência do HLA-A*02 restrita a epítomos expressos pelos linfócitos T CD8 (Yashiki et al., 2001). Vale ressaltar que a diferença de tempo entre a coleta das duas amostras foi de menos de dez anos, o que não justificaria uma seleção de células T citotóxicas restritas ao alelo -A*02 e, também não houve tempo para uma

recombinação deste alelo. Em outras populações, afro-caribenha (Deschamp et al. 2010) e iraniana (Sabouri et al., 2004), não foi encontrado o mesmo efeito protetor descrito por Jeffery e colaboradores (1999) ou alguma outra associação relevante. A constituição da população japonesa se caracteriza por sua homogeneidade, isto é, sem miscigenação e a população iraniana estudada, foi da cidade de Mashhad, localizada a noroeste do Irã, que é a segunda maior cidade do país (<http://www.mums.ac.ir/main/en/mashhadinfo>). A população iraniana é formada a partir de vários grupos étnicos existentes no Oriente Médio, sendo que os persas compõem metade da população do país (<http://www.portasabertas.org.br/cristaosperseguidos/perfil/ira>). Quando se comparou os resultados obtidos nessas duas populações, verificou-se que os alelos A*02 e C*08 não tinham o mesmo efeito protetor na população do Irã. A comparação dos resultados entre as duas populações foi diferente, isto é, enquanto no Japão o alelo A*02 mostrou proteção ($p=0,0006$), no Irã ($p=0,346$), a sua presença não influenciou a infecção.

A população brasileira tem como característica sua miscigenação, fruto da imigração de várias etnias ao longo do tempo, desde povos indígenas autóctones, descendentes de povos que migraram da Sibéria, aproximadamente há 9000 AC, colonos portugueses que chegaram ao Brasil desde 1500 até a independência em 1822, africanos trazidos como escravos no período de 1530-1850, e imigrantes vindos da Europa a partir do final do século XIX e início do século XX, e mais recentemente imigrantes da Ásia e Oriente Médio (http://pt.wikipedia.org/wiki/Demografia_do_Brasil). A avaliação de um painel HLA dos indivíduos portadores do HTLV-1 em nossa população, pode ser útil para verificar a predisposição genética para o desenvolvimento de doença. No Brasil, um estudo realizado com 93 portadores de HTLV-1, 84 indivíduos assintomáticos (90,3%) e nove indivíduos com PET/MAH (9,7%), verificou uma maior frequência do alelo HLA-A*02 nos portadores de HTLV-1 assintomáticos (47% versus 33%). Neste trabalho a presença do alelo -C*07, na ausência de -A*02, aumenta o risco para PET/MAH ($p=0,002$) (Catalan-Soares et al., 2009). No presente estudo não foi observada diferenças significativas quanto à distribuição do alelo -A*02 na comparação dos grupos assintomáticos e sintomáticos, apesar dos assintomáticos apresentarem uma

maior frequência deste alelo (20,0% versus 18,2%). A presença do alelo -A*02 não influenciou os níveis de carga proviral em nenhum dos dois grupos de pacientes.

O alelo HLA-A*29 apresentou uma distribuição maior entre os assintomáticos ($p=0,03$), e influencia a carga proviral, a sua presença diminui o número de células infectadas circulantes ($p=0,015$). Na literatura, consta que este alelo possui forte associação com a doença inflamatória corioretinopatia, uma forma rara de uveíte. Foi observado que em população europeia, mais de 96% dos indivíduos com esta enfermidade, possuem o alelo -A*29 (Brézin et al., 2011).

Entre nossos pacientes, poucos apresentaram o alelo HLA-A*36, não sendo possível realizar análise estatística devido ao tamanho amostral. Em análises filogenéticas, foi revelada uma associação do -A*36 e -A*26 com leucemia. Estes alelos presentes na população contemporânea teriam vindo de um gene ancestral do MHC de primatas, e evoluído durante milhões de anos. Sonoda e colaboradores (2011) sugerem que a baixa resposta imune aos antígenos do HTLV-1 observada, seja devido a esta evolução.

Na população japonesa, Jeffery e colaboradores (1999, 2000), associaram o alelo HLA-B*54 com susceptibilidade à doença neurológica. Em nosso estudo nenhum indivíduo apresentou este alelo. Na população brasileira, o HLA-B*54 é menos frequente, em torno de 0,2% segundo dados dos REDOME (Bouzas, 2011). Em nossa população, o alelo -B*44 apresentou uma frequência maior ($p=0,038$) no grupo dos assintomáticos e na sua presença, os níveis de carga proviral foram significativamente mais baixos ($p=0,05$). O grupo que não possui o alelo B*44 apresentou maior carga proviral, sugerindo efeito protetor em relação ao desenvolvimento de doença neurológica. Estudos em população europeia associou este alelo à proteção na esclerose múltipla ($p=0,00092$) (Healy et al., 2010). Entretanto, na população iraniana ($p=0,007$), este alelo está relacionado ao desenvolvimento de pemphigus vulgaris (Mortazavi et al., 2013).

A diversidade e a expressão dos antígenos HLA-C na superfície das células são bem menores que os loci HLA-A e HLA-B (Neefjes J, Ploegh H, 1988), talvez por isso, não se tenha tantos trabalhos quanto os seus homólogos. Alguns estudos demonstraram uma forte associação do alelo -C*06 com psoríase, em população

européia ($p < 0,01$), na qual foram testados 1409 pacientes portadores da doença, e 1436 controles (Nair et al., 2009). O alelo -C*08 foi descrito como protetor na população japonesa ($p = 0,002$) infectada com HTLV-1 em relação ao desenvolvimento de doença neurológica (Jeffery et al., 2000). Em nosso estudo, nenhuma associação ocorreu com este alelo, por outro lado, em nossa população foi observado que o alelo -C*04 apresentou uma distribuição diferente entre os dois grupos, com maior frequência no grupo assintomático ($p = 0,003$), porém a presença deste alelo não influenciou os níveis de carga proviral ($p = 0,186$).

Na análise do locus DR, os alelos mais frequentes foram HLA-DRB1*01, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11 e DRB1*13, esses resultados são compatíveis com os dados do banco de doadores e receptores de medula óssea (Bouzas, 2011). Vários estudos demonstraram possíveis associações entre HLA Classe II e doenças associadas ao HTLV-1 (Tabela 1), porém em nenhum deles é citado o alelo DRB1*03, que apesar de não ser o mais frequente encontrado neste trabalho, apresentou diferença na sua distribuição ($p = 0,027$), com maior frequência entre os sintomáticos. Não houve influência na presença do alelo DRB1*03 em relação aos níveis de carga proviral ($p = 0,318$) nos dois grupos. Entretanto, quando se analisou, somente o grupo dos assintomáticos, os níveis de carga proviral foram maiores nos indivíduos que possuem este alelo ($p = 0,02$). Esta associação sugere influência do DRB1*03 e risco de doença. Na comparação somente no grupo dos sintomáticos, os indivíduos que possuem o alelo apresentaram carga proviral menor ($p = 0,04$). Este resultado, aparentemente contraditório, pode ser devido ao fato dos níveis de carga proviral serem mais elevados nos sintomáticos, e conseqüentemente mascarar o efeito isolado da presença do alelo. Por outro lado, deve se ressaltar que a presença do alelo nos indivíduos assintomáticos pode ser um fator de risco de evolução para doença.

Na análise da frequência dos alelos HLA-DQA1 e DQB1 foi observada apenas uma predominância dos alelos DQA1*03 e DQA1*05 no grupo dos indivíduos sintomáticos. O haplótipo DRB1*11DQB1*03, foi associado à dermatite infectiva em uma família portadora do vírus HTLV-1 na Jamaica (LaGrenade et al., 1996).

A doença neurológica associada ao HTLV-1 é o resultado da resposta do hospedeiro à infecção, com a expansão dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ e produção de citocinas pró-inflamatórias acarretando a lesão do sistema nervoso. O sistema HLA é um fator genético importante do hospedeiro, inúmeros estudos relatando associação de doenças infecciosas com alelos do HLA foram publicados (Blackwell et al., 2009). Estudos do perfil genético do portador de HTLV-1 podem contribuir para o esclarecimento desta infecção.

A proteína viral Tax possui um papel importante na regulação do genoma do vírus, atuando na transcrição do genoma proviral ao interagir com diversas proteínas regulatórias da célula. Também induz a expressão de genes celulares, entre eles os genes das citocinas. Diferenças na expressão dos genes das citocinas podem influenciar na evolução da infecção pelo HTLV-1 (Ahuja et al. 2007). A comparação entre os níveis de carga proviral e as concentrações no plasma das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , foi realizada por Starling e colaboradores (2012) em 87 portadores de HTLV-1 (28 PET/MAH, 32 portadores com outras condições neurológicas e 27 portadores assintomáticos), verificaram um aumento significativo da carga proviral dos mielopatas em relação aos assintomáticos ($p < 0,0001$), assim como nos níveis das citocinas IL-6 ($p = 0,0009$), IFN- γ ($p = 0,0118$), TNF- α ($p = 0,0239$) (Starling et al., 2012). Desta forma, investigar correlações entre a presença de doença e as características genóticas dos portadores do vírus, pode contribuir para o conhecimento desta infecção, em que a maioria dos indivíduos permanece assintomática.

As frequências alélicas, genóticas e fenotípicas globais dos nossos pacientes foram semelhantes às encontradas por Fabrício-Silva, (2009) em população sadia do Estado do Rio de Janeiro.

Em estudos de fatores genéticos que possam influenciar o risco de desenvolver PET/MAH na população japonesa, Vine e colaboradores (2002), verificaram em 229 pacientes com PET/MAH e 202 portadores assintomáticos, que o polimorfismo -863A do gene *TNFA* está associado à carga proviral alta ($p = 0,009$) predispondo à doença neurológica. A citocina TNF- α tem um papel importante na migração dos linfócitos T infectados através da barreira hematoencefálica. Em

experimento com uma linhagem celular que reproduz as características da barreira hematoencefálica, a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α atuaram nas células endoteliais, promovendo a permeabilidade da membrana (Miller et al., 2012). Apesar desses estudos sugerirem uma participação na patogênese da doença neurológica, não encontramos diferenças nos fenótipos desta citocina.

Na avaliação do polimorfismo na posição -174 do gene da citocina *IL6*, o alelo G considerado como alto produtor teve uma prevalência de 83,2%, e os genótipos G/G e G/C (69,7% e 26,8%), também considerados altos produtores de IL-6. Na análise em relação à condição clínica, estes genótipos foram mais frequentes nos sintomáticos. Estes resultados são semelhantes aos de Gadelha e colaboradores (2008) que avaliaram o perfil fenotípico do gene de *IL6* em população com a infecção pelo HTLV-1 da Bahia.

A importância da citocina IFN- γ também foi demonstrada em análises recentes do perfil da expressão gênica no sangue de portadores de PET/MAH e indivíduos assintomáticos, através da técnica de microarray, detectaram uma super expressão de genes que estimulam a síntese de IFN- γ . Esta super expressão estava presente em todos os leucócitos, e a intensidade correlacionada com a gravidade de PET/MAH (Tattermusch et al., 2012). Em nosso trabalho, a análise da distribuição dos polimorfismos do gene IFNG na posição +874, identificou o alelo A como o mais prevalente (69,6%) e os genótipos T/A e A/A (45,5% e 46,9%), considerados médio e baixo produtores de IFN- γ . Na distribuição entre os grupos estudados não houve diferença significativa.

A citocina pleiotrófica TGF- β faz parte da família de fatores de crescimento que regulam numerosos processos fisiológicos como o controle do ciclo celular, diferenciação e resposta imune. Experimentos com células transfectadas com plasmídeos contendo fragmento LTR, demonstraram que a citocina TGF- β pode transativar a região promotora do LTR e favorecer a replicação viral e em consequência a transmissão do vírus HTLV (Moriuchi & Moriuchi, 2002). Outros estudos *in vitro* revelaram que TGF- β aumenta a expressão de proteínas na superfície das células, entre elas a proteína GLUT-1, que atua como receptor do HTLV-1, e pode exercer um papel importante, facilitando a entrada do vírus na célula

(Jones et al., 2005). Também foi descrito que a proteína viral HBZ atua na desregulação da transcrição celular, e pode ser um dos mecanismos prováveis de transformação celular pela infecção viral em pacientes com LTA. Esta proteína está envolvida no aumento da transcrição do gene de TGF- β (Zhao et al., 2011). Esses dados demonstram que TGF- β também pode ter um papel importante na transmissão do vírus. Apesar disto, não foram notadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas dos polimorfismos nos códons 10 e 25 do gene *TGFB* em nosso estudo.

Vários estudos associaram o polimorfismo do gene de *IL10* ao desenvolvimento de doenças virais como vírus da hepatite C, vírus Epstein Barr, vírus do papiloma humano e HIV-1. No caso do HIV-1 foi descrito que o genótipo -592 A/A está associado a um alto risco e rápida progressão ao desenvolvimento de síndrome da imunodeficiência adquirida (citado em Sabouri et al., 2004). Sabouri e colaboradores (2004) investigaram o polimorfismo único na região promotora do gene de *IL-10* na posição -592 em uma população japonesa, constituída de 280 pacientes com doença neurológica, e 255 indivíduos assintomáticos. Encontraram uma forte associação ($p=0,011$) do genótipo A/C com baixo risco de desenvolver doença, e do alelo A ($p=0,001$) com baixa carga proviral. Este genótipo A/A-592 possui um efeito protetor na população testada. Em nosso estudo, diferentemente da população japonesa, o alelo C na posição -592 foi o mais frequente (62,4%), assim como os genótipos C/C e C/A (40,6% e 43,6%). Não houve diferença na distribuição deste alelo ($X^2=0,84$ e $p=0,36$) e dos genótipos ($X^2=3,83$ e $p=0,15$) nos dois grupos. Estes genótipos estão associados à alta e média produção de IL-10. Nossos resultados corroboram outro estudo realizado em população brasileira para este polimorfismo, com 133 indivíduos portadores de HTLV-1 (84 assintomáticos e 49 pacientes sintomáticos) e 100 indivíduos saudáveis da população de Salvador, Bahia, que foram testados para o polimorfismo -592 *IL-10*, houve um predomínio do alelo C (58%) e dos genótipos C/C e C/A (36,6% e 42,85%). Estes resultados foram semelhantes aos nossos, também não foi encontrada associação deste alelo com o desenvolvimento de doença neurológica (Gadelha et al., 2008). Na posição -1082

encontramos uma predominância do alelo A (65,4%) com os genótipos G/A e A/A (43,6% e 43,6%) que correspondem a baixo e médio produtor de IL-10.

Na análise do polimorfismo *IL-10* na posição -1082 por gênero, se mostrou uma frequência do alelo A maior nos homens ($p=0,001$). Quando foi comparada a frequência deste alelo com a condição clínica, observou-se que este alelo está mais presente no gênero masculino e assintomático ($p=0,02$). Entretanto, não se deve associar este alelo à condição clínica, pois foi descrito em outros estudos que a frequência alélica de certas citocinas são dependentes do sexo, tais como, estudos de longevidade/envelhecimento (Franceschi, et al., 2000, Lio et al., 2002). Nossos resultados são semelhantes ao descrito por Fabricio-Silva, 2009, em população saudável do Rio de Janeiro, contudo seria necessária uma maior amostra de pacientes para esclarecermos a relação deste alelo com a condição clínica. Na comparação da distribuição dos alelos entre sintomáticos e assintomáticos, não foi observada diferenças ($X^2=3,38$ e $p=0,06$), porém quando se compara os genótipos, observamos um predomínio significativo do genótipo A/A entre os assintomáticos, e G/A entre os sintomáticos ($X^2=6,79$ e $p=0,03$). Essa diferença ocorre ao se analisar o fenótipo em que há predomínio de indivíduos baixo produtores entre os assintomáticos, e produtores intermediários entre os sintomáticos. Ao se comparar os dados obtidos do polimorfismo -592 de *IL-10* entre a população japonesa e a nossa, fica evidente a influência dos aspectos genéticos.

Este estudo caso-controle buscou identificar marcadores genéticos presentes no polimorfismo dos genes de HLA Classe I e II, e genes das citocinas *TNFA*, *IL-6*, *IFNG*, *TGFB* e *IL-10*. Na análise do perfil HLA dos pacientes deste estudo, alguns alelos apresentaram maior prevalência entre os grupos estudados. Apesar de inúmeros trabalhos demonstrarem *in vitro*, a influência da expressão dos genes de citocinas na resposta imune, a expressão fenotípica dos alelos nos pacientes estudados, mostrou diferença apenas para *IL-10*.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A presença do alelo HLA-A*02 não influencia a condição clínica dos pacientes, nem os níveis de carga proviral.
- ✓ A presença dos alelos HLA-A*29 e HLA-B*44 apresentou maior frequência entre os assintomáticos, assim como, o grupo dos assintomáticos apresentou valores de carga proviral mais baixo que o grupo sintomático, sugerindo que estes dois alelos conferem proteção em relação ao desenvolvimento de doença neurológica.
- ✓ O alelo HLA-A*68 apresentou maior frequência entre os sintomáticos, porém sua presença não influencia valores de carga proviral. Por esta razão não é possível considerá-lo como fator de risco para o desenvolvimento de doença neurológica.
- ✓ O alelo HLA-C*04 apresentou maior frequência entre o grupo assintomático, porém sua presença não influencia os níveis de carga proviral. Por esta razão não é possível considerá-lo como proteção para o desenvolvimento de doença neurológica.
- ✓ O alelo HLA-DRB1*03 apresentou maior frequência entre os pacientes sintomáticos, a sua presença entre os portadores assintomáticos aumenta de forma significativa os níveis de carga proviral, sugerindo ser um fator de risco para o desenvolvimento de doença neurológica.
- ✓ Os polimorfismos dos genes das citocinas -308G/ATNFA, -174C/GIL-6, +874T/AIFNG, códons 10C/T e 25C/GTGF e -592A/C, -819T/CIL-10, não influenciaram na condição clínica da população estudada.
- ✓ O alelo A e genótipo A/A na posição -1082IL-10 foram mais presentes nos homens assintomáticos, porém não é possível associá-lo a proteção de desenvolvimento de doença neurológica, devido ao pequeno tamanho amostral.

8. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.

Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, Weksler B, Couraud PO, Gessain A, Romero IA, Ceccaldi PE. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol*. 2007;179(4):2576-83.

Ahuja J, Kampani K, Datta S, Wigdahl B, Flaig KE, Jain P. Use of human antigen presenting cell gene array profiling to examine the effect of human T-cell leukemia virus type 1 Tax on primary human dendritic cells. *J Neurovirol*. 2006 ;12(1):47-59.

Ahuja J, Lepoutre V, Wigdahl B, Khan ZK, Jain P. Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(4):201-8.

Andrada-Serpa, M. J., Araújo A. Q-C., Schor, D., Godoy, M., Leite, C. R., Dutra, S., Nascimento, O J. Seroepidemiological study of HTLV-I/II infection among patients with myelopathy of unknown origin and their relatives in Rio de Janeiro. *Can. J. Neurol*. 1993;Supl 4: s64.

Andrada-Serpa, M. J., Dobbin, J., Gomes, P., Linhares, D., Azevedo, J. G., Hendriks, J., Cayden, S. A., Rumjanek, V. M., Tedder, R. S. Incidence of retroviruses in some brazilian groups. *Immunol. Lett*. 1988; 18: 15-18.

Andrada-Serpa, M.,J., Tosswill, J., Schor, D., Linhares, D., Dobbin, J., Pereira, M. S.. Seroepidemiologic survey for antibodies to human retroviruses human and non human primates in Brazil. *Int. J. Cancer*.1989; 24: 389-393

Andresen V, Pise-Masison CA, Sinha-Datta U, Bellon M, Valeri V, Washington Parks R, Cecchinato V, Fukumoto R, Nicot C, Franchini G. Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood*. 2011; 118(6):1549-59.

Araújo AQ, Andrada-Serpa MJ, Paulo-Filho TA, Rodrigues MT, Prado LA. Folliculitis decalvans and human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Infect Dis*. 1995 Mar;20(3):696-9.

Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol*. 2006;5(12):1068-76.

Araújo Q-C A, Andrade-Filho S A, Castro-Costa M C, Menna-Barreto M, Almeida M S.. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey *J Acquir Immune Defic Syndr and Hum Retro*. 1998; 19: 536-541

Araújo, A. Q-C., Andrada-Serpa, M. J., Schor, D., Scheiner, M. A. M., Godoy, M.. HTLV-I/II infection among patients with myelopathy of unknown origin and their relatives in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.1994; 10: 487.

Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004;5:315–329.

Berini C, Eirin ME, Malan R, Espejo R, Delfino C, Theiler G, Biglione M. HLA association with HTLV-1/2 infection in different populations of Argentina. *Retrovirology*.2011 8(1):A107

Berneman ZN, Gartenhaus RB, Reitz MS Jr, Blattner WA, Manns A, Hanchard B, Ikehara O, Gallo RC, Klotman ME. Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):3005-9.

Biasiotto R, Aguiari P, Rizzuto R, Pinton P, D'Agostino DM, Ciminale V. The p13 protein of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) modulates mitochondrial membrane potential and calcium uptake. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1797(6-7):945-51.

Biddison WE, Kubota R, Kawanishi T, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, Connor EW, Utz U, Jacobson S: Human T cell leukemia virus type I (HTLV-1)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-1-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol* 1997, 159:2018-2025.

Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Apr;20(2):97-113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004. Epub 2009 Mar 5. Review

Bittencourt AL, Barbosa HS, Vieira MD, Farré L. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) presenting in the skin: clinical, histological and immunohistochemical features of 52 cases. *Acta Oncol*. 2009;48(4):598-604.

Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):370-85, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00048-08.

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

Bouzas, Luis Fernando da Silva - Análise da capacidade do REDOME/RENACORD em suprir as necessidades dos pacientes registrados no REREME. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-graduação em Oncologia/INCA, 2011.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-60.

Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *The Lancet.* 1973;1(7809):904–907.

Brézin AP, Monnet D, Cohen JH, Levinson RD. HLA-A29 and birdshot chorioretinopathy. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19(6):397-400.

Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens.* 1995; 46(5):355-67.

Cann AJ, Chen ISY. 1996 Human Y cell Leukemia Virus Types I and II. In: *Fields Virology.* 3ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1849-1880.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, Francio ÂS, Vanderborght PR, Parelli FP, Alter A, Salgado JL, Sampaio EP, Santos AR, Oliveira ML, Sarno EN, Schurr E, Mira MT, Pacheco AG, Moraes MO. TNF - 308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011 15;204(8):1256-63.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. Na endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(9):3666-70.

Cassar O, Capuano C, Bassot S, Charavay F, Duprez R, Afonso PV, Abel M, Walter H, Mera W, Martin PM, Chungue E, Gessain A. Human T lymphotropic virus type 1 subtype C melanesian genetic variants of the Vanuatu Archipelago and Solomon Islands share a common ancestor. *J Infect Dis.* 2007 Aug 15;196(4):510-21.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA; Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005;21(3):926-31.

Catalan-Soares BC, Carneiro-Proietti AB, Da Fonseca FG, Correa-Oliveira R, Peralva-Lima D, Portela R, Ribas JG, Gonçalves DU; Interdisciplinary HTLV Research Group (GIPH), Proietti FA. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198(1):1-3.

Cortes, E., Detels, R., Aboulafia, D. Li, X., Moudgil, T., Alam, M., Bonecker, C., Gonzaga, A, Oyafuso, L., Tondo, M., Boite, C., Hammershlak, N., Capitani, c., Slamon, D. J., Ho, D. D. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 320: 953-958.

Cruz-Robles D, Reyes PA, Monteón-Padilla VM, Ortiz-Muñiz AR, Vargas-Alarcón G. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum Immunol*. 2004; 65(1):60-5).

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

De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(8):4001-5.

De Thé G. HTLV-I/HTLV-II-a model for virus associated neurodegenerative diseases. *J Neurovirol*. 1996;2(5):297-8.

Dhib-Jalbut S, Hoffman PM, Yamabe T, Sun D, Xia J, Eisenberg H, Bergey G, Ruscetti FW. Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol*. 1994; 36(5):787-90.

Doi K, Wu X, Taniguchi Y, Yasunaga J, Satou Y, Okayama A, Nosaka K, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood*. 2005;106(3):1048-53.

Dumas M, Houinato D, Verdier M, Zohoun T, Josse R, Bonis J, Zohoun I, Massougboji A, Denis F. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1991;7(5):447-51.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003;52:1799-805.

Edwards D, Fenizia C, Gold H, de Castro-Amarante MF, Buchmann C, Pise-Masison CA, Franchini G. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*. 2011; 3(6):861-85.

Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology*. 2012;9:16.

Fabrcio-Silva, Gustavo Milson - Polimorfismo Genético de Citocinas na População do Rio de Janeiro. Tese Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

Ferreira Jr, O. C., Vaz, R. S., carvalho, M. B., Guerra, C., Fabron, A. L., Rosembliit, J., Hammerschlag, N.. Human T-lymphotropic virus type I and II infections and

correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion*. 1995; 35: 258-263.

Fields B N, Knipe D M, Howley P M. *Virology* 5^o ed. Philadelphia, PA Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, 2007.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989; 170:2081–2095.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. 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*. 1998; 102(7):1369-76.

Franceschi C, Motta L, Valensin S, Rapisarda R, Franzone A, Berardelli M, Motta M, Monti D, Bonafè M, Ferrucci L, Deiana L, Pes GM, Carru C, Desole MS, Barbi C, Sartoni G, Gemelli C, Lescai F, Olivieri F, Marchegiani F, Cardelli M, Cavallone L, Guerresi P, Cossarizza A, Troiano L, Pini G, Sansoni P, Passeri G, Lisa R, Spazzafumo L, Amadio L, Giunta S, Stecconi R, Morresi R, Viticchi C, Mattace R, De Benedictis G, Baggio G. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE). *Aging (Milano)*. 2000 Apr;12(2):77-84.

Franchini G, Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81(19):6207-11

Fujimoto T, Hata T, Itoyama T, Nakamura H, Tsukasaki K, Yamada Y, Ikeda S, Sadamori N, Tomonaga M. High rate of chromosomal abnormalities in HTLV-I-infected T-cell colonies derived from prodromal phase of adult T-cell leukemia: a

study of IL-2-stimulated colony formation in methylcellulose. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999 Feb;109(1):1-13.

Fujiyoshi T, Yashiki S, Fujiyama C, Kuwayama M, Miyashita H, Ohnishi H, Blank M, Zaninovic V, Blank A, Cartier L, et al. Ethnic segregation of HTLV-I and HTLV-II carriers among South American native Indians. *Int J Cancer.* 1995 15;63(4):510-5.

Fukuhara S, Hinuma Y, Gotoh YI, Uchino H. Chromosome aberrations in T lymphocytes carrying adult T-cell leukemia-associated antigens (ATLA) from healthy adults. *Blood.* 1983;61(1):205-7.

Gadelha SR, Junior Alcântara LC, Costa GC, Acosta AX, Rios D, Kashima S, Covas DT, Galvão-Castro B. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. *J Med Virol.* 2008;80(12):2141-6.

Gallart T, Anegón I, Woessner S, de la Fuente R, Florensa L, Sans-Sabafrén C, Vives J. Clinically benign adult T-cell chronic lymphocytosis with unusual phenotype. *Lancet.* 1983;1(8327):769-70.

Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, Muller M, Sampaio DA, Santana A, Passos LM, Proietti F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion.* 1997;37(2):242-3.)

Gasmi M, Farouqi B, d'Incan M, Desgranges C. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 Oct;10(10):1313-5.

Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome

encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol.* 2002; 76(24):12813-22.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985 24;2(8452):407-10.

Gessain A, Louie A, Gout O, Gallo RC, Franchini G. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Virol.* 1991; 65(3):1628-33.

Gessain A. [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2011; 104(3):167-80.

Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med.* 1990; 172(6):1625-31.

Goedert JJ, Li HC, Gao XJ, Chatterjee N, Sonoda S, Biggar RJ, Cranston B, Kim N, Carrington M, Morgan O, Hanchard B, Hisada M. Risk of human T-lymphotropic virus type I-associated diseases in Jamaica with common HLA types. *Int J Cancer.* 2007;121(5):1092-7.

Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, Carneiro-Proietti AB. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):577-89.

Gostick E, Cole DK, Hutchinson SL, Wooldridge L, Tafuro S, Laugel B, Lissina A, Oxenius A, Boulter JM, Price DA, Sewell AK. Functional and biophysical

characterization of an HLA-A*6801-restricted HIV-specific T cell receptor. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):479-86.

Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood.* 1997;90(11):4252-65.

Healy BC, Liguori M, Tran D, Chitnis T, Glanz B, Wolfish C, Gauthier S, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Khoury S, Hartzmann R, Fernandez-Vina M, Hafler DA, Weiner HL, Guttman CR, De Jager PL. HLA B*44: protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology.* 2010 17;75(7):634-40.

Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991; 1:97-105.

Hino S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011; 87(4):152-66).

Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun.* 2006 ;7(4):269-76.

Höllsberg P, Hafler DA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N Engl J Med.* 1993;328(16):1173-82.

Hoshino H, Esumi H, Miwa M, Shimoyama M, Minato K, Tobinai K, Hirose M, Watanabe S, Inada N, Kinoshita K, Kamihira S, Ichimaru M, Sugimura T. Establishment and characterization of 10 cell lines derived from patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(19):6061-5.

Ikeda S, Momita S, Kinoshita K, Kamihira S, Moriuchi Y, Tsukasaki K, Ito M, Kanda T, Moriuchi R, Nakamura T, et al. Clinical course of human T-lymphotropic virus type

I carriers with molecularly detectable monoclonal proliferation of T lymphocytes: defining a low- and high-risk population. *Blood*. 1993;82(7):2017-24.

Imaizumi Y, Iwanaga M, Tsukasaki K, Hata T, Tomonaga M, Ikeda S. Natural course of HTLV-1 carriers with monoclonal proliferation of T lymphocytes ("pre-ATL") in a 20-year follow-up study. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):903-4.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 3th edition. New York; 1997.

Jarrett RF, Mitsuya H, Mann DL, Cossman J, Broder S, Reitz MS. Configuration and expression of the T cell receptor beta chain gene in human T-lymphotropic virus I-infected cells. *J Exp Med*. 1986 ;163(2):383-99.

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 M, Bangham CR. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3848-53.

Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol*. 2000;165(12):7278-84.

Jin Q, Alkhatib B, Cornetta K, Alkhatib G. Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology*. 2010;396(2):203-12.

Jones KS, Akel S, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Ruscetti FW. Induction of human T cell leukemia virus type I receptors on quiescent naive T lymphocytes by TGF-beta. *J Immunol.* 2005;174(7):4262-70.

Jones N. Multiple sclerosis: HLA B*44 is protective in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6(11):584.)

Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis.* 1986; 154(5):851-7.

Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, Minami S, Uemura A, Akamatsu N, Nagai H, Murata K, Hasegawa H, Hirakata Y, Takasaki Y, Tsukasaki K, Yamada Y. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haematol.* 2005;27(4):235-41.

Kamoi K, Mochizuki M. HTLV-1 uveitis. *Front Microbiol.* 2012;3:270.

Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL, Hermansen S, Roberts C, Lal R, Heneine W, Wright D, Matijas L, Thomson R, Rudolph D, Switzer WM, Kleinman S, Busch M, Schreiber GB. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996; 12(2):193-201.

Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012 May 10;30(14):1635-40.

Kawamura K, Koshikawa N, Mochizuki S, Maruyama K. Chromosome changes associated with growth potential of HTLV-I infected human lymphocytes. *Leukemia.* 1997; 11 Suppl 3:32-4.

Kinoshita K, Amagasaki T, Ikeda S, Suzuyama J, Toriya K, Nishino K, Tagawa M, Ichimaru M, Kamihira S, Yamada Y, et al. Preleukemic state of adult T cell leukemia: abnormal T lymphocytosis induced by human adult T cell leukemia-lymphoma virus. *Blood*. 1985;66(1):120-7.

Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*. 1986; 256(17):2342

Koga Y, Iwanaga M, Soda M, Inokuchi N, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Yamaguchi K, Kamihira S, Yamada Y. Trends in HTLV-1 prevalence and incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma in Nagasaki, Japan. *J Med Virol*. 2010;82(4):668-74.

Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax-specific CD8⁺ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol*. 1998;161(1):482-8.

Kubota R, Takenouchi N, Matsuzaki T, Takashima H, Izumo S. HLA-A24-restricted HTLV-I-specific CTL response reduces the HTLV-I proviral load but the HLA increases the risk of HAM/TSP. *Retrovirology*. ;2011, 8(1):A113

LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. 1990;336(8727):1345-7.

LaGrenade L, Sonoda S, Miller W, Pate E, Rodgers-Johnson P, Hanchard B, Cranston B, Fujiyoshi T, Yashiki S, Blank M, Gibbs CJ, Manns A. HLA DRB1*03:01 haplotype in HTLV-I-associated familial infective dermatitis may predict development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Am J Med Genet*. 1996;61(1):37-41.

Lanteri MC, Kaidarova Z, Peterson T, Cate S, Custer B, Wu S, Agapova M, Law JP, Bielawny T, Plummer F, Tobler LH, Loeb M, Busch MP, Bramson J, Luo M, Norris PJ. Association between HLA class I and class II alleles and the outcome of West Nile virus infection: an exploratory study. *PLoS One*. 2011;6(8):e22948.

Lee SM, Morcos Y, Jang H, Stuart JM, Levin MC. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 296: 125–36

Lee, H., Anderson, E., Allain, J. P., Gonzaga, A. HTLV-I infection in Brazil. *Blood*. 1989; 73: 1742.

Leite AC, Mendonca GA, Serpa MJ, Nascimento OJ, Araujo AQ. Neurological manifestations in HTLV-1-infected blood donors. *J Neurol Sci* 2003; 214:49–56.

Leite AC, Silva MT, Alamy AH, Afonso CR, Lima MA, Andrada-Serpa MJ, Nascimento OJ, Araújo AQ. Peripheral neuropathy in HTLV-I infected individuals without tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol*. 2004;251(7):877-81.

Lenzi ME, Cuzzi-Maya T, Oliveira AL, Andrada-Serpa MJ, Araújo AQ. Dermatological findings of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(4):507-13.

Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC Jr, Hasty KA, Callaway JC, Zunt J, Desiderio D, Stuart JM. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med*. 2002 8(5):509-13.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:99-146.

Lima MA, Bica RB, Araújo AQ. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(2):294-6.

Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, Cavallone L, Franceschi C, Caruso C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun*. 2002;3(1):30-3.

Mahieux R, Ibrahim F, Mauclere P, Herve V, Michel P, Tekaiia F, Chappey C, Garin B, Van Der Ryst E, Guillemain B, Ledru E, Delaporte E, de The G, Gessain A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J Virol*. 1997;71(2):1317-33.

Maloney EM, Ramirez H, Levin A, Blattner WA. A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. *Int J Cancer*. 1989; 44(3):419-23.

Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449-59.

Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, Hanchard B, Blattner WA. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 1992; 51(6):886-91.

Maruyama K, Fukushima T, Kawamura K, Mochizuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res*. 1990; 50(17 Suppl):5697S-5702S.

Matsuoka M, Hagiya M, Hattori T, Asou N, Maeda S, Shimada K, Tsai SC, Sakano H, Takatsuki K. Gene rearrangements of T cell receptor beta and gamma chains in HTLV-I infected primary neoplastic T cells. *Leukemia*. 1988;2(2):84-90.

Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*. 2005 26;2:27.

McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994;371(6497):508-10.

Miller F, Afonso PV, Gessain A, Ceccaldi PE. Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence*. 2012 Mar-Apr;3(2):222-9.)

Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi S, Ishida T, Washio K, Ueda S, Hashimoto K, et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 1;91(3):1124-7

Miyamoto K, Sato J, Kitajima K, Togawa A, Suemaru S, Sanada H, Tanaka T. Adult T-cell leukemia. Chromosome analysis of 15 cases. *Cancer*. 1983;52(3):471-8.

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M, Araki S, Miyata N, Mori S, et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis*. 1992;166(4):943-4

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, Nakashima S, Mori S, Araki S, Miyata N. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res*. 1992; 83(3):236-9.

Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet*. 1989 Nov 18;2(8673):1184-7.

Moriuchi M, Moriuchi H. Transforming growth factor-beta enhances human T-cell leukemia virus type I infection. *J Med Virol.* 2002;67(3):427-30.

Mortazavi H, Amirzargar AA, Esmaili N, Toofan H, Ehsani AH, Hosseini SH, Rezaei N. Association of human leukocyte antigen class I antigens in Iranian patients with pemphigus vulgaris. *J Dermatol.* 2013 Jan 21. doi: 10.1111/1346-8138.12071.

Mostoller K, Norbury CC, Jain P, Wigdahl B. Human T-cell leukemia virus type I Tax induces the expression of dendritic cell markers associated with maturation and activation. *J Neurovirol.* 2004; 10(6):358-71.

Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S2-7.

Muniz AL, Rodrigues W Jr, Santos SB, de Jesus AR, Porto AF, Castro N, Oliveira-Filho J, Almeida JP, Moreno-Carvalho O, Carvalho EM. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006; 64(2A):217-21.

Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, Bodner AJ, Alexander SS, Blattner WA. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol.* 1991;133(11):1114-24.

Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1996; 174(4):878-80.

Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, Gudjonsson JE, Li

Y, Tejasvi T, Feng BJ, Ruether A, Schreiber S, Weichenthal M, Gladman D, Rahman P, Schrodi SJ, Prahalad S, Guthery SL, Fischer J, Liao W, Kwok PY, Menter A, Lathrop GM, Wise CA, Begovich AB, Voorhees JJ, Elder JT, Krueger GG, Bowcock AM, Abecasis GR; Collaborative Association Study of Psoriasis. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet.* 2009;41(2):199-204.

Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front Microbiol.* 2012; 3:330

Naylor SL, Sakaguchi AY, Shows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med.* 1983;157(3):1020-7.

Neefjes JJ, Ploegh HL. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with beta 2-microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur J Immunol.* 1988;18(5):801-10.

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13(17):6361-73.

Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load. *J Neurovirol.* 2006;12(3):171-7.

Ohshima K, Ohgami A, Matsuoka M, Etoh K, Utsunomiya A, Makino T, Ishiguro M, Suzumiya J, Kikuchi M. Random integration of HTLV-1 provirus: increasing chromosomal instability. *Cancer Lett.* 1998; 132(1-2):203-12.

Osame M, Igata A. The history of discovery and clinico-epidemiology of HTLV-I-associated myelopathy(HAM). *Jpn J Med.* 1989;28(3):412-4.

Osame M, Janssen R, Kubota H, Nishitani H, Igata A, Nagataki S, Mori M, Goto I, Shimabukuro H, Khabbaz R, et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol.* 1990;28(1):50-6.

Osame M, Nakagawa M, Umehara F, et al. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV- 1 associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. *J Neurovirol* 1997; 3(Suppl 1):S50–1

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.* 1986;1031-2.

Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol.* 1998; 6(3):193-7.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-9

Pombo de Oliveira M S, Loureiro P, Bittencourt A, Chattone C, Borducchi C, Carvalho S M F S, Barbosa H, Rios m, Sill A, Cleghorn F, Blattner H.. Geographic diversity of Adult T Cell Leukemia/ Lymphoma in Brazil *Int J Cancer.* 1999; 83, 291-298

Póvoa P, C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive care Med* 2002; 28:235-43.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*. 2000;61(9):863-6.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005 ;24(39):6058-68.

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

Ribeiro MA, Martins ML, Teixeira C, Ladeira R, Oliveira Mde F, Januário JN, Proietti FA, Carneiro-Proietti AB. Blocking vertical transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(11):1139-43.

Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, 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 Infect Dis*. 2004 Oct 1;190(7):1279-85.

Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic

paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 3):773-81.

Salemi M, Van Dooren S, Audenaert E, Delaporte E, Goubau P, Desmyter J, Vandamme AM. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. *Virology.* 1998 Jul 5;246(2):277-87

Sanada I, Tanaka R, Kumagai E, Tsuda H, Nishimura H, Yamaguchi K, Kawano F, Fujiwara H, Takatsuki K. Chromosomal aberrations in adult T cell leukemia: relationship to the clinical severity. *Blood.* 1985;65(3):649-54.

Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K. Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol.* 2012; 84(2):327-35

Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 17;103(3):720-5. Epub 2006 Jan 9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 6;103(23):8906.

Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973; 288(14): 704-706.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89.

Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature.* 1984 20;309(5969):640-2.

Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* 1991; 79(3):428-37

Silic-Benussi, M., Marin, O., Biasiotto, R., D'Agostino, D.M., and Ciminale, V.(). Effects of human T -cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p13 on mitochondrial K⁺ permeability: a new member of the viroporin family? *FEBS Lett.* 2010b; 584, 2070–2075

Silva MT, Mattos P, Alfano A, Araújo AQ. Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: a comparative study among TSP/HAM, asymptomatic carriers, and healthy controls. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(8):1085-9

Silva MT, Coutinho F, Leite AC, Harab RC, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. Isolated bladder dysfunction in human T lymphotropic virus type 1 infection. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(3):e34-6.

Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic carriers, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *Clin Infect Dis.* 2007;44(5):689-92.

Slattery JP, Franchini G, Gessain A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* 1999 Jun;9(6):525-40.

Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006 Aug 1;22(15):1928-9.

Song W, He D, Brill I, Malhotra R, Mulenga J, Allen S, Hunter E, Tang J, Kaslow RA. Disparate associations of HLA class I markers with HIV-1 acquisition and control of viremia in an African population. *PLoS One.* 2011;6 (8):e23469. doi: 10.1371/journal.pone.0023469. Epub 2011 Aug 17.

Sonoda S.; Yashiki S.; Kuwayama M.; Fujiyoshi T.; Jacobson S.; Manns A.; Alcalay D.; Pombo M.; Hammond M.; Nikbin B.; Blank A.; Cartier L. HLA & HTLV study group; *Human Immunology.* 1996; 47(1):120-120(1)

Sonoda S, Fujiyoshi T, Yashiki S. Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S119-23.

Sonoda S, Li HC, Tajima K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. *Cancer Sci.* 2011;102(2):295-301.

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

Takatsuki K., Uchiyama T., Ueshima Y., et al. Adult T cell leukemia: Further clinical observations and cytogenetic and functional studies of leukemia cell. *Japan J Clin Oncol* 1979; **9**: 317-324.

Takemoto S, Matsuoka M, Yamaguchi K, Takatsuki K. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood.* 1994; 84(9):3080-

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 I- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *JNeurovirol.* 2003; 9(1):29-35.

Talledo M, López G, Huyghe JR, Verdonck K, Adai V, González E, Best I, Clark D, Vanham G, Gotuzzo E, Van Camp G, Van Laer L. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *J Med Virol.* 2010;82(3):460-6.

Talledo M, López G, Huyghe JR, Verdonck K, González E, Tipismana M, Clark D, Vanham G, Gotuzzo E, Camp G, Laer L. Host genetic factors associated to proviral load in Peruvian HTLV-1 infected. *Retrovirol* 2011; 8(1):A147

Tanaka A, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoque A, Mori T, Islam S, Nakatani Y, Shinagawa M, Hoshino H. Entry of human T-cell leukemia virus type 1 is augmented by heparin sulfate proteoglycans bearing short heparin-like structures. *J Virol*. 2012; 86(6):2959-69.

Tang J, Tang S, Lobashevsky E, Myracle AD, Fideli U, Aldrovandi G, Allen S, Musonda R, Kaslow RA; Zambia-UAB HIV Research Project. Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2002; 76(16):8276-84.

Tattermusch S, Skinner JA, Chaussabel D, Banchereau J, Berry MP, McNab FW, O'Garra A, Taylor GP, Bangham CR. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog*. 2012;8(1):e1002480.

Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol*. 2005; 14(3-4):175-82. Review.

Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol*. 1997; 53(1):1-11. Review.

Trujillo JM, Concha M, Muñoz A, Bergonzoli G, Mora C, Borrero I, Gibbs CJ Jr, Arango C. Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8(5):651-7.

Tsukasaki K, Yamada Y, Ikeda S, Tomonaga M. Infective dermatitis among patients with ATL in Japan. *Int J Cancer*. 1994 Apr 15;57(2):293.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24(1):1-8.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50(3):481-92.

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

Umehara F, Izumo S, Ronquillo AT, Matsumuro K, Sato E, Osame M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-1-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994 ; 53(1):72-7.

Usuku K, Sonoda S, Osame M, Yashiki S, Takahashi K, Matsumoto M, Sawada T, Tsuji K, Tara M, Igata A. HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann Neurol*. 1988;23 Suppl:S143-50.

Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P, Venzon D, Franchini G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(48):20738-43.

Vandiedonck C, Beaurain G, Giraud M, et al. Pleiotropic effects of the 8.1 HLA haplotype in patients with autoimmune myasthenia gravis and thymus hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:15464–15469.

Vandiedonck C, Knight JC. The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2009; 8(5):379-94.

Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(4):266-81. Review.

Vernant JC. [Tropical spastic paraplegia (TSP) and HTLV1 associated to paraplegia (HAP)]. *Rev Prat.* 1990;40(22):2073-4.

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 I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2002; 186(7):932-9.

Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood.* 1998; 91(10):3574-81.

Whang-Peng J, Bunn PA, Knutsen T, Kao-Shan CS, Broder S, Jaffe ES, Gelmann E, Blattner W, Lofters W, Young RC, et al. Cytogenetic studies in human T-cell lymphoma virus (HTLV)-positive leukemia-lymphoma in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1985;74(2):357-69.

White JD, Johnson JA, Nam JM, Cranston B, Hanchard B, Waldmann TA, Manns A. Distribution of human leukocyte antigens in a population of black patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(11):873-7.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992; 1(5):353.

Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LB, Emery P, Duff GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol.* 1994;24(1):191-5.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(7):3195-9.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 31;102(22):7994-9.

Xia Q, Zhou L, Liu D, Chen Z, Chen F. Relationship between TNF- α gene promoter polymorphisms and outcomes of hepatitis B virus infections: a meta-analysis. *PLoS One.* 2011;10:6(5).

Yamaguchi K, Watanabe T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol.* 2002 ;76 Suppl 2:240-5.

Yamaguchi K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet.* 1994;343(8891):213-6.

Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, Osame M, Yoshinaga M, Nagata Y, Tara M, Nomura K, Utsunomiya A, Hanada S, Tajima K, Sonoda S. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001;17(11):1047-61.

Yasunaga J, Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int J Hematol*. 2011;94(5):435-42. Review

Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood*. 2011 18;118(7):1865-76.)

<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup002.htm

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TNF>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL6>

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IFNG>

[http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGF- \$\beta\$ 1](http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGF-beta1)

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL10>

<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tools-links.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/HLA-A68>

<http://www.mums.ac.ir/main/en/mashhadinfo>

<http://www.portasabertas.org.br/cristaosperseguidos/perfil/ira>

http://pt.wikipedia.org/wiki/Demografia_do_Brasi

ANEXO

Tabela 1. Distribuição da cor da pele de acordo com a condição neurológica.

Condição clínica	Branca		Não Branca		χ^2	p*
	N	(%)	N	(%)		
Assintomático	36	(43,2)	54	(38,3)	0,70	0,40
Sintomático	83	(56,8)	87	(61,7)		
Total	146		141			

*Qui-quadrado de Pearson; razão de chance: 1,22; IC 95% (0,76 – 1,96)

Tabela 2. Frequência alélica do HLA-A nos pacientes de acordo com a cor da pele.

Alelo HLA-A	Branca		Não Branca	
	N	(%)	N	(%)
A*01	21	(7,8)	12	(4,7)
A*02	57	(20,6)	43	(16,9)
A*03	27	(9,7)	21	(8,3)
A*11	26	(9,4)	8	(3,1)
A*23	9	(3,2)	22	(8,7)
A*24	35	(12,6)	19	(7,5)
A*25	1	(0,4)	-	-
A*26	15	(5,4)	7	(2,8)
A*29	11	(4,0)	12	(4,7)
A*30	11	(4,0)	24	(9,4)
A*31	10	(3,6)	5	(2,0)
A*32	4	(1,4)	9	(3,5)
A*33	10	(3,6)	8	(3,1)
A*34	3	(1,1)	5	(2,0)
A*36	1	(0,4)	7	(2,8)
A*66	3	(1,1)	8	(3,1)
A*68	30	(10,8)	33	(13,0)
A*74	3	(1,1)	10	(3,9)
A*80	-	-	1	(0,4)
Total	277		254	

Tabela 3. Frequência alélica do HLA-B nos pacientes de acordo com a cor da pele

Alelo HLA-B	Branca		Não Branca	
	N	(%)	N	(%)
B*07	7	-3,6	11	-6,1
B*08	15	-7,7	11	-6,1
B*13	1	-0,5	2	-1,1
B*14	9	-4,6	6	-3,3
B*15	17	-8,7	17	-9,4
B*18	12	-6,2	7	-3,9
B*27	6	-3,1	1	-0,6
B*35	27	-13,9	15	-8,3
B*37	3	-1,5	1	-0,6
B*38	6	-3,1	3	-1,7
B*39	5	-2,6	-	-
B*40	8	-4,1	6	-3,3
B*41	1	-0,5	5	-2,8
B*42	-	-	11	-6,1
B*44	14	-7,2	16	-8,9
B*45	1	-0,5	6	-3,3
B*48	5	-2,6	6	-3,3
B*49	9	-4,6	-	-
B*50	9	-4,6	6	-3,3
B*51	14	-7,2	11	-6,1
B*52	6	-3,1	5	-2,8
B*53	3	-1,5	9	-5
B*55	2	-1	1	-0,6
B*56	-	-	1	-0,6
B*57	12	-6,2	10	-5,6
B*58	-	-	8	-4,4
B*81	2	-1	3	-1,7
B*82	-	-	2	-1,1
Total		194		180

Tabela 4. Frequência alélica do HLA-C nos pacientes de acordo com a cor da pele

Alelo HLA-C	Branca		Não Branca	
	N	(%)	N	(%)
C*01	5	(2,8)	-	-
C*02	11	(6,2)	25	(16,2)
C*03	16	(9,5)	16	(10,4)
C*04	33	(18,5)	27	(17,5)
C*05	7	(3,9)	7	(4,5)
C*06	16	(8,9)	20	(13,0)
C*07	37	(21,9)	26	(16,9)
C*08	8	(4,5)	7	(4,5)
C*12	15	(8,4)	4	(2,6)
C*14	5	(2,8)	4	(2,6)
C*15	6	(3,4)	4	(2,6)
C*16	12	(7,9)	10	(6,5)
C*17	1	(0,6)	4	(2,6)
C*18	1	(0,6)	-	-
Total		173		154

Tabela 5. Frequência alélica do HLA-DRB1 nos pacientes de acordo com a cor da pele

Alelo HLA-DRB1	Branca		Não Branca	
	N	(%)	N	(%)
DRB1*01	23	(11,7)	15	(8,5)
DRB1*03	20	(10,2)	13	(7,4)
DRB1*04	22	(11,2)	12	(6,8)
DRB1*07	28	(14,3)	25	(14,2)
DRB1*08	9	(4,6)	9	(5,1)
DRB1*09	2	(1,0)	7	(4,0)
DRB1*10	8	(4,1)	4	(2,3)
DRB1*11	28	(14,3)	30	(17,0)
DRB1*12	2	(1,0)	3	(1,7)
DRB1*13	32	(16,3)	26	(14,8)
DRB1*14	8	(4,1)	5	(2,8)
DRB1*15	8	(4,1)	19	(10,8)
DRB1*16	6	(3,1)	8	(4,5)
Total	196		176	

Tabela 6. Frequência alélica do HLA-DQA nos pacientes de acordo com a cor da pele

Alelo HLA-DQA	Branca		Não Branca	
	N	(%)	N	(%)
DQA1*01	15	(30,0)	30	(42,9)
DQA1*02	6	(12,0)	6	(8,6)
DQA1*03	6	(12,0)	11	(15,7)
DQA1*04	2	(4,0)	3	(4,3)
DQA1*05	20	(40,0)	19	(27,1)
DQA1*06	1	(2,0)	1	(1,4)
Total	50		70	

Tabela 7. Frequência alélica do HLA-DQB nos pacientes de acordo com a cor da pele

Alelo HLA-DQB	Branca		Parda	
	N	(%)	N	(%)
DQB1*02	41	21,5	38	21,5
DQB1*03	64	32,5	57	32,2
DQB1*04	9	5,0	6	3,4
DQB1*05	45	22,5	33	18,6
DQB1*06	35	18,5	43	24,3
Total		194		177

Não houve diferenças na distribuição dos pacientes em relação ao local de nascimento, assim como em relação a autodenominação da cor da pele.

Tabela 8. Frequência alélica do HLA-A nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-A	Rio de Janeiro	
	N	(%)
A*01	17	(4,7)
<u>A*02</u>	<u>65</u>	<u>(17,9)</u>
A*03	34	(9,4)
A*11	24	(6,6)
A*23	20	(5,5)
A*24	39	(10,7)
A*26	17	(4,7)
A*29	18	(4,9)
A*30	27	(7,40)
A*31	14	(3,9)
A*32	12	(3,3)
A*33	11	(3,0)
A*34	6	(1,6)
A*36	7	(1,9)
A*66	2	(0,5)
A*68	39	(10,7)
A*74	10	(2,7)
A*80	1	(0,3)
Total	363	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Tabela 9. Frequência alélica do HLA-B nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-B	Rio de Janeiro	
	N	(%)
B*07	14	(5,2)
B*08	17	(6,3)
B*13	2	(0,7)
B*14	11	(4,1)
<u>B*15</u>	<u>26</u>	<u>(9,6)</u>
B*18	18	(6,6)
B*27	5	(1,8)
<u>B*35</u>	<u>27</u>	<u>(9,9)</u>
B*37	3	(1,1)
B*38	7	(2,6)
B*39	3	(1,1)
B*40	9	(3,3)
B*41	1	(0,4)
B*42	10	(3,7)
B*44	22	(8,1)
B*45	6	(2,2)
B*48	9	(3,3)
B*49	8	(2,9)
B*50	13	(4,8)
B*51	18	(6,6)
B*52	7	(2,6)
B*53	8	(2,9)
B*55	2	(0,7)
B*56	1	(0,4)
B*57	13	(4,8)
B*58	6	(2,2)
B*81	5	(1,8)
Total	271	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Tabela 10. Frequência alélica do HLA-C nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-C	Rio de Janeiro	
	N	(%)
C*01	4	(1,6)
C*02	26	(10,7)
C*03	22	(9,1)
<u>C*04</u>	<u>44</u>	<u>(18,2)</u>
C*05	14	(5,8)
C*06	23	(9,5)
<u>C*07</u>	<u>50</u>	<u>(20,7)</u>
C*08	9	(3,7)
C*12	14	(5,8)
C*14	8	(3,3)
C*15	8	(3,3)
C*16	17	(7,0)
C*17	3	(1,2)
Total	242	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Tabela 11. Frequência alélica do HLA-DRB1 nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-DRB1	Rio de Janeiro	
	N	(%)
DRB1*01	22	(8,3)
DRB1*03	22	(8,3)
DRB1*04	21	(7,9)
DRB1*07	37	(14,0)
DRB1*08	15	(5,7)
DRB1*09	5	(1,9)
DRB1*10	9	(3,4)
<u>DRB1*11</u>	<u>44</u>	<u>(16,7)</u>
DRB1*12	4	(1,5)
<u>DRB1*13</u>	<u>46</u>	<u>(17,4)</u>
DRB1*14	11	(4,2)
DRB1*15	19	(7,2)
DRB1*16	9	(3,4)
Total	264	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Tabela 12. Frequência alélica do HLA-DQA nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-DQA	Rio de Janeiro	
	N	(%)
<u>DQA1*01</u>	<u>34</u>	<u>(37,8)</u>
DQA1*02	9	(10,0)
DQA1*03	10	(11,1)
DQA1*04	3	(3,3)
<u>DQA1*05</u>	<u>32</u>	<u>(35,6)</u>
DQA1*06	2	(2,2)
Total	90	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Tabela 13. Frequência alélica do HLA-DQB nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Alelo HLA-DQB	Rio de Janeiro	
	N	(%)
DQB1*02	57	(63,3)
<u>DQB1*03</u>	<u>86</u>	<u>(95,6)</u>
DQB1*04	12	(13,3)
DQB1*05	52	(57,8)
DQB1*06	61	(67,8)
Total	268	

Os alelos sublinhados são os mais frequentes

Polimorfismos de citocinas

Tabela 14. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes de acordo com a cor da pele.

TNF-308	Branca		Não Branca		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
A	16	(9,4)	11	(8,5)	0,08	0,77
G	154	(90,6)	119	(91,5)	0,89	(0,39-1,98)
G/G	69	(81,2)	55	(84,6)	1,91	0,38
G/A	16	(18,8)	9	(13,8)		
A/A	-	-	1	(1,5)		
Baixo (G/G)	69	(81,2)	55	(84,6)	0,30	0,58
Alto (G/A e A/A)	16	(18,8)	10	(15,4)	0,78	(0,33-1,86)

χ^2 : qui-quadrado, RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 15. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes de acordo com a cor da pele.

IL-6 -174	Branca		Não Branca		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
G	136	(80,0)	112	(87,5)	2,94	0,08
C	34	(20,0)	16	(12,5)	1,75	(0,92-3,33)
G/G	56	(65,9)	48	(75,0)	4,34	0,12
G/C	24	(28,2)	16	(25,0)		
C/C	5	(5,9)	-	-		
Baixo (C/C)	5	(5,9)	-	-	3,89	0,05
Alto (G/G e G/C)	80	(94,1)	64	(100,0)	0,55	(0,48-0,64)

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança

Tabela 16. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes de acordo com a cor da pele.

IFN +874	Branca		Não Branca		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
T	56	(33,3)	32	(26,2)	1,69	0,19
A	112	(66,6)	90	(73,8)	0,71	(0,42-1,19)
T/T	7	(8,3)	4	(6,6)	2,19	0,33
T/A	42	(50,0)	24	(39,3)		
A/A	35	(41,7)	33	(54,1)		
Baixo (A/A)	35	(41,7)	33	(54,1)	2,19	0,33
Intermediário (T/A)	42	(50,0)	24	(39,3)		
Alto (T/T)	7	(8,3)	4	(6,6)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança

Tabela 17. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes de acordo com a cor da pele.

TGF-beta	Branca		Não Branca		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
Codon 10						
T	94	(55,3)	78	(60,0)	0,67	0,41
C	76	(44,7)	52	(40,0)	1,21	(0,76-1,93)

T/T	26	(30,6)	23	(35,4)	0,69	0,70
T/C	42	(49,4)	32	(49,2)		
C/C	17	(20,0)	10	(15,4)		
Codon 25						
G	155	(91,2)	120	(92,3)	0,12	0,73
C	15	(8,8)	10	(7,7)	1,16	(0,50-2,67)

G/G	71	(83,5)	56	(86,2)	0,30	0,86
G/C	13	(15,3)	8	(12,3)		
C/C	1	(1,2)	1	(1,5)		
Baixo (C/C G/C; C/C C/C; T/T C/C)	4	(4,7)	2	(3,1)	0,86	0,65
Intermediário (T/C G/C; C/C G/G; T/T G/C)	24	(28,2)	15	(23,1)		
Alto (T/C G/G)	57	(67,1)	48	(73,8)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança

Tabela 18. Distribuição dos haplótipos de TGF-beta dos códons 10T/C e 25G/C de acordo com a cor da pele.

TGF-beta haplótipos	Branca		Não Branca		χ^2	p
	N	(%)	N	(%)		
T/T G/G	22	(25,9)	21	(32,3)	3,62	0,82
T/C G/G	35	(41,2)	27	(41,5)		
C/C G/G	14	(16,5)	8	(12,3)		
T/T G/C	3	(3,5)	2	(3,1)		
T/C G/C	7	(8,2)	5	(7,7)		
C/C G/C	3	(3,5)	1	(1,5)		
T/T C/C	1	(1,2)	-	-		
T/C C/C	-	-	-	-		
C/C C/C	-	-	1	(1,5)		
Total		85		65		

Tabela 19. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes de acordo com a cor da pele.

IL-10	Branca		Não Branca		X ² RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
-1082						
G	58	(38,2)	34	(29,8)	2,0	0,16
A	94	(61,8)	80	(70,2)	0,69	(0,41-1,16)

G/G	13	(17,1)	4	(7,0)	3,0	0,22
G/A	32	(42,1)	26	(45,6)		
A/A	31	(40,8)	27	(47,4)		
-819*						
C	100	(65,8)	66	(57,9)	1,73	0,19
T	52	(34,2)	48	(42,1)	0,71	(0,23-1,18)

C/C	36	(47,4)	18	(31,6)	3,86	0,14
C/T	28	(36,8)	30	(52,6)		
T/T	12	(15,8)	9	(15,8)		
-592*						
C	100	(65,8)	66	(57,9)	1,73	0,19
A	52	(34,2)	48	(42,1)	0,71	(0,23-1,18)

C/C	36	(47,4)	18	(31,6)	3,86	0,14
C/A	28	(36,8)	30	(52,6)		
A/A	12	(15,8)	9	(15,8)		
Baixo (ACC/ACC; ACC/ATA; ATA/ATA)						
	31	(40,8)	27	(47,4)	3,0	0,22
Intermediário (GCC/ACC; GCC/ATA)						
	32	(42,1)	26	(45,6)		
Alto (GCC/GCC)						
	13	(17,1)	4	(7,0)		

²: qui-quadrado, RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança. * -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação.

Tabela 20. Distribuição dos haplótipos de IL-10 (-1082G/A, -819C/T e -592C/A) de acordo com a cor da pele.

IL-10 haplótipos	Branca		Não Branca		χ^2	p
	N	(%)	N	(%)		
GCC/GCC	13	(17,1)	4	(7,0)	6,92	0,23
GCC/ACC	13	(17,1)	10	(17,5)		
GCC/ATA	19	(25,0)	16	(28,1)		
ACC/ACC	10	(13,2)	4	(7,0)		
ACC/ATA	9	(11,8)	14	(24,6)		
ATA/ATA	12	(15,8)	9	(15,8)		
Total	76		57			

Tabela 21. Distribuição dos polimorfismos das citocinas de acordo com o nível de produção e com a cor da pele dos pacientes.

Citocinas	Branca		Não Branca		X^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
IL-10 (-1082, -819, -592)						
Baixo	31	(40,8)	27	(47,4)	3,0	0,22
Intermediário	32	(42,1)	26	(45,6)		
Alto	13	(17,1)	4	(7,0)		
TGF- β (códon 10 e 25)						
Baixo	4	(4,7)	2	(3,1)	0,86	0,65
Intermediário	24	(28,2)	15	(23,1)		
Alto	57	(67,1)	48	(73,8)		
IFN +874						
Baixo	7	(8,3)	4	(6,6)	2,19	0,33
Intermediário	42	(50,0)	24	(39,3)		
Alto	35	(41,7)	33	(54,1)		
IL-6 -174						
Baixo	5	(5,9)	-	-	3,89	0,05
Alto	80	(94,1)	64	(100,0)	0,56 (0,48-0,64)	
TNF-308						
Baixo	69	(81,2)	55	(84,6)	0,30	0,58
Alto	16	(18,8)	10	(15,4)	0,78(0,33-1,86)	

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 22. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com o gênero.

TNF-308	Masculino		Feminino		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
A	15	(11,5)	12	(7,1)	1,8	0,18
G	115	(88,5)	158	(92,9)	0,58(0,26-1,29)	
G/G	51	(78,5)	73	(82,7)	2,32	0,31
G/A	13	(20,0)	12	(16,7)		
A/A	1	(1,5)	-	-		
Baixa	51	(78,5)	73	(85,9)	1,42	0,23
Alta	14	(21,5)	12	(14,1)	0,59(0,26-1,40)	

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 23. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com o gênero.

IL-6 -174	Masculino		Feminino		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
G	107	(83,6)	141	(82,9)	0,02	0,88
C	21	(16,4)	29	(17,1)	0,95(0,51-1,76)	
G/G	45	(70,3)	59	(69,4)	0,02	0,98
G/C	17	(26,6)	23	(27,1)		
C/C	2	(3,1)	3	(3,5)		
Baixa	2	(3,1)	3	(3,5)	0,02	0,89
Alta	62	(96,9)	82	(96,5)	1,13(0,18-6,99)	

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 24. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com o gênero.

IFN +874	Masculino		Feminino		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
T	41	(33,1)	47	(28,3)	0,76	0,38
A	83	(66,9)	119	(71,7)	0,79(0,48-1,32)	
T/T	5	(8,1)	6	(7,2)	1,08	0,58
T/A	31	(50,0)	35	(42,2)		
A/A	26	(41,9)	42	(50,6)		
Baixa	26	(41,9)	42	(50,6)	1,08	0,58
Intermediaria	31	(50,0)	35	(42,2)		
Alta	5	(8,1)	6	(7,2)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 25. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica de acordo com o gênero.

TGF- β	Masculino		Feminino		χ^2 RC (IC:95%)	p
	N	(%)	N	(%)		
Codon 25						
G	115	(88,5)	160	(94,1)	3,09	0,08
C	15	(11,5)	10	(5,9)	2,09(0,90-4,81)	

G/G	51	(78,5)	76	(89,4)	3,50	0,17
G/C	13	(20,0)	8	(9,4)		
C/C	1	(1,5)	1	(1,2)		

Codon 10						
T	76	(58,5)	96	(56,5)	0,12	0,73
C	54	(41,5)	74	(43,5)	0,92(0,58-1,46)	

T/T	22	(33,8)	27	(31,8)	0,12	0,94
T/C	32	(49,2)	42	(49,4)		
C/C	11	(16,9)	16	(18,8)		

Baixa	4	(6,2)	2	(2,4)	1,69	0,43
Intermediaria	18	(27,7)	21	(24,7)		
Alta	43	(66,2)	62	(72,9)		

χ^2 : qui-quadrado ,RC: razão de chance, IC: intervalo de confiança.

Tabela 26. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes do estado do Rio de Janeiro.

TNF-308	Rio de Janeiro	
	N	(%)
A	16	(7,3)
G	202	(92,7)

G/G	93	(85,3)
G/A	16	(14,7)
A/A	-	-

Baixo (G/G)	93	(85,3)
Alto (G/A e A/A)	16	(14,7)

Tabela 27. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes do estado do Rio de Janeiro.

IL-6 -174	Rio de Janeiro	
	N	(%)
G	180	(82,6)
C	38	(17,4)
G/G	74	(67,9)
G/C	32	(29,4)
C/C	3	(2,7)
Baixo (C/C)	3	(2,7)
Alto (G/G e G/C)	106	(97,2)

Tabela 28. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes do estado do Rio de Janeiro.

IFN +874	Rio de Janeiro	
	N	(%)
T	69	(32,5)
A	143	(67,4)
T/T	8	(7,5)
T/A	53	(50,0)
A/A	45	(42,4)
Baixo (A/A)	45	(42,4)
Intermediário (T/A)	53	(50,0)
Alto (T/T)	8	(7,5)

Tabela 29. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes do estado do Rio de Janeiro.

TGF- β	Rio de Janeiro	
	N	(%)
Codon 10		
T	124	(56,9)
C	94	(43,1)
Codon 25		
G	198	(90,8)
C	20	(9,2)
G/G	91	(83,5)
G/C	16	(14,9)
C/C	2	(1,8)
Baixo (C/C G/C; C/C C/C; T/T C/C)	5	(4,6)
Intermediário (T/C G/C; C/C G/G; T/T G/C)	30	(27,5)
Alto (T/C G/G)	74	(67,9)

Tabela 30. Distribuição alélica, genotípica e fenotípica dos pacientes do estado do Rio de Janeiro.

IL-10	Rio de Janeiro	
	N	(%)
-1082		
G	62	(31,9)
A	132	(68,0)
<hr/>		
G/G	11	(11,3)
G/A	40	(41,2)
A/A	46	(47,4)
<hr/>		
-819		
C	124	(63,9)
T	70	(36,9)
<hr/>		
C/C	41	(42,3)
C/T	42	(43,3)
T/T	14	(14,4)
<hr/>		
-592		
C	124	(63,9)
A	70	(36,1)
<hr/>		
C/C	41	(42,3)
C/A	42	(43,3)
A/A	14	(14,4)
<hr/>		
Baixo (ACC/ACC; ACC/ATA; ATA/ATA)	46	(47,4)
Intermediário (GCC/ACC; GCC/ATA)	40	(41,2)
Alto (GCC/GCC)	11	(11,3)

Tabela 31. Distribuição dos polimorfismos das citocinas de acordo com o nível de produção nos pacientes do estado do Rio de Janeiro

Citocina	Rio de Janeiro	
	N	(%)
IL-10 (-1082, -819, -592)		
Baixo	46	(47,4)
Intermediário	40	(41,2)
Alto	11	(11,3)
TGF-beta (códon 10 e 25)		
Baixo	5	(4,6)
Intermediário	30	(27,5)
Alto	74	(67,9)
IFN +874		
Baixo	45	(42,4)
Intermediário	53	(50,0)
Alto	8	(7,5)
IL-6 -174		
Baixo	3	(2,8)
Alto	106	(97,2)
TNF-308		
Baixo	93	(85,3)
Alto	16	(14,7)