



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**



---

**ESTUDO DO POLIMORFISMO EM GENES DA RESPOSTA IMUNE E ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÃO CLÍNICA, CARGA PROVIRAL E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1).**

**MARCOS BRAZ**

**Professor Orientador:** Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci

**Professor Co-orientador:** Dra. Silvane Maria Braga Santos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências, da área de concentração em Ciências da Saúde.

**SALVADOR, BA**

**RESUMO**

Braz, M. **ESTUDO DO POLIMORFISMO EM GENES DA RESPOSTA IMUNE E ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÃO CLÍNICA, CARGA PROVIRAL E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1)**. Salvador, 2017. Dissertação (Mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia.

O vírus linfotrópico para células T humanas (HTLV-1) é o principal agente causador da Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) 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. Existem poucos estudos na literatura avaliando o papel de genes do hospedeiro nesta infecção. Nosso objetivo foi investigar a possível associação do polimorfismo em genes da resposta imune e associação com manifestações clínicas, carga proviral e produção espontânea de citocinas na infecção pelo HTLV-1. Participou deste estudo um total de 298 indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo 164 indivíduos assintomáticos, 63 indivíduos com bexiga hiperativa e 71 pacientes com HAM/TSP coletados no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia. Estes indivíduos realizam semestralmente ou anualmente, avaliação imunológica para dosagem de citocinas e determinação da carga proviral. Adicionalmente um grupo de 380 doadores voluntários de sangue, recrutados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia, foi utilizado como grupo controle. Após a extração do DNA, foi feita a genotipagem dos polimorfismos dos genes das citocinas IL-10 (-1082 T/C; -819 A/G e -512 A/G), TNF (-308 A/G e -1031C/T), LTA (-162 G/A e +252 G/A) e BAT1(-23G/C) por PCR em tempo real. Análise de regressão logística incondicional foi realizada através do programa STATAM™ ([www.stata.com](http://www.stata.com)). As análises da associação entre diferentes genótipos de IL10 e TNF, produção de citocinas e carga proviral foram realizadas utilizando o teste de Kruskal Wallis e o teste de Mann-Whitney (U) através do programa Prism 5.0. Análise do polimorfismo no SNP rs1800896 (-1082 T/C) no gene *IL10*, mostrou um efeito protetor do alelo T em relação ao dano neurológico em ambas as comparações, **Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos** (OR=0,447; IC 0,28-0,70; p=0,001) e **HAM/TSP + Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos** (OR=0,693; IC 0,48-0,98; p=0,040). Na análise genotípica foi observado para **Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos** uma significância estatística na comparação dos genótipos *C/T X C/C* (OR=0,300; IC: 0,12-0,74; p=0,0001) e *T/T X C/C* (OR=0,175; IC: 0,06-0,45; p=0,0001). Similarmente, na comparação **HAM/TSP + Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos**, os genótipos *C/T X C/C* (OR=0,385; IC: 0,16-0,84; p=0,018) e *T/T X C/C* (OR=0,355; IC: 0,15-0,79; p=0,012) confirmam a associação com o alelo T neste marcador. Para os demais SNPs avaliados neste estudo, não foram observados resultados significantes (p >0,05). Os testes de associação entre os diferentes genótipos das três regiões promotoras de IL-10 e os genótipos das duas regiões promotoras de TNF com a carga proviral e com a produção espontânea de citocinas dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, não resultou em associações significantes (p >0,05). Como perspectiva, estas pesquisas podem ser continuadas, por meio do estudo de outros genes candidatos e avaliações funcionais que possam responder melhor como ocorrem mecanismos reguladores por parte destas variações genéticas.

**Palavras chave:** HTLV-1, HAM/TSP, SNPs, Polimorfismo, Citocinas.

## ABSTRACT

Braz, M. **STUDY OF THE POLYMORPHISM IN IMMUNE RESPONSE GENES AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICAL MANIFESTATION, PROVIRAL LOAD AND CYTOKINES PRODUCTION IN HUMAN TYPE 1 LYMPHOTROPIC VIRUS INFECTION (HTLV-1)**. Salvador, 2017. Dissertação (Mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia.

The human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1) is the major causative agent of HTLV-1 associated with Tropical Spastic Paraparesis/Myelopathy (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia (HTLV). Most of the infected individuals remain asymptomatic, only 2 to 5% will develop one of the two diseases. There is a paucity of studies in the literature evaluating the role of host genes in this infection. Our objective was to investigate the possible association of polymorphisms in immune response genes and clinical manifestations, proviral load and spontaneous cytokine production in HTLV-1 infection. A total of 298 individuals infected with HTLV-1 were enrolled in the study, of which 164 were asymptomatic individuals, 63 were overactive bladders and 71 patients with HAM/TSP that were collected at the Professor Edgard Santos University Hospital Complex of the Federal University of Bahia. These individuals perform bi-annual or annual immunological evaluation for cytokine dosage and determination of proviral load. In addition, a group of 380 volunteer blood donors recruited from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia was used as a control group. After DNA extraction, the polymorphisms of IL-10 (-1082 T/C; -819 A/G and -512 A/G), TNF (-308 A/G and -1031 C/T), LTA (-162 G/A and +252 G/A) and BAT1 (-23G/C) were genotyped by real-time PCR. Unconditional logistic regression analysis was performed through the STAM™ program ([www.stata.com](http://www.stata.com)). The analysis of the association between different genotypes of IL10 and TNF, cytokine production and proviral load were performed using the Kruskal Wallis test and the Mann-Whitney (U) test using the Prism 5.0 program. Analysis of the polymorphism at the SNP rs1800896 (-1082 T/C) in the IL10 gene, showed a protective effect of the T allele on neurological impairment in both comparisons, Overactive Bladder vs. Asymptomatic (OR = 0,447; CI = 0,28-0,70, p = 0,001) and HAM/TSP + Overactive bladder vs. Asymptomatic (OR = 0,693, CI= 0,48-0,98, p = 0,040). In the genotypic analysis the groups Overactive bladder vs. Asymptomatic patients had a statistical significance in the comparisons C/T X C/C (OR = 0,300; CI=0,12-0,74; p = 0,0001) and T/T X C/C (OR = 0,175 -0,45, p= 0,0001). Similarly, in the comparison HAM/TSP + Overactive bladder vs. Asymptomatic, the C/T X C/C (OR = 0,385, CI=0,16-0,84, p = 0,018) and T/T X C/C (OR = 0,355, CI=0,15-0,79; = 0,012) genotypes confirm the association with the T allele in this marker. For the other SNPs evaluated in this study, no significant results were observed (p>0,05). The association tests between the different genotypes of the IL-10 and TNF promoter regions with the proviral load and the spontaneous production of cytokines from the different groups of HTLV-1 infected individuals did not result in significant associations (p>0,05). As a perspective, this study can be continued by the study of other candidate genes as well as functional evaluations that may respond better on how regulatory mechanisms occur through these genetic variations.

**Keywords:** HTLV-1, HAM/TSP, SNPs, Polymorphism, Cytokines.

**Tabela 1. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) genotipados neste estudo.**

<b>Gene SNP</b>	<b>Localização</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Alelos</b>
TNF_rs1800629	promotor(-308)	6	A/G
TNF_rs1799964	promotor	6	C/T
LTA_rs909253	Intron (+252)	6	A/G
LTA_rs1800683	5'UTR	6	A/G
BAT1_rs2239527	5'UTR	6	G/C
IL10_rs1800896	Inter/Promotor	1	T/C
IL10_rs1800871	Inter/Promotor	1	A/G
IL10_rs3024496	3'UTR	1	A/G

**Tabela 2. Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 de acordo com a idade e gênero**

<b>Características</b>	<b>Total N(298)</b>	<b>Portador assintomático N (164)</b>	<b>Bexiga hiperativa N (63)</b>	<b>HAM/TSP N(71)</b>
<b>Homem</b>	100	63	15	22
<b>Mulher</b>	198	101	48	49
<b>Idade&gt;50 anos</b>	184	94	46	44
<b>Idade≤50 anos</b>	114	70	17	27
<b>Média de idade (min-max)</b>	53(23-78)	51(23-76)	54(29-70)	53(27-78)

**TABELA 3. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs1800896 no gene *IL10*.**

<i>IL10</i> rs1800896 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
C	185(32,8%)	234(37%)	419(35,0%)
T	379(67,2%)	398(63%)	777(65,0%)

  

(N) Frequências Genótípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
CC	33(11,7%)	47(14,9%)	80(13,4%)
CT	119(42,2%)	140(44,3%)	259(43,3%)
TT	130(46,1%)	129(40,8%)	259(43,3%)

**TABELA 4. Associação entre o polimorfismo -1082 C/T no gene de *IL10* (rs1800896) e a infecção pelo HTLV-1.**

	Casos vs. Controles			Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos			HAM/TSP + Bexiga hiperativa vs. Assintomáticos		
	OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P
Global 2df			0,3268			<b>0,0014</b>			<b>0,0283</b>
<i>C/T X C/C</i>	1,210	0,72-2,01	0,461	0,300	0,12-0,74	<b>0,0001</b>	0,375	0,16-0,84	<b>0,018</b>
<i>T/T X C/C</i>	1,435	0,86-2,38	0,163	0,175	0,06-0,45	<b>0,0001</b>	0,355	0,15-0,79	<b>0,012</b>
Global 1df			0,163			<b>0,0005</b>			<b>0,0390</b>
<i>Alelo 1 – T</i>	1,194	0,94-1,50	0,136	0,447	0,28-0,70	<b>0,001</b>	0,693	0,48-0,98	<b>0,040</b>
<i>Alelo 2 – C</i>	0,837	0,66-1,05	0,136	2,235	1,40-3,54	<b>0,001</b>	1,441	1,01-2,04	<b>0,040</b>

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

**TABELA 5. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800871 no gene *IL10*.**

<i>IL10</i> rs1800871 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>G</b>	330(62,7%)	379(62,1%)	709(62,4%)
<b>A</b>	196(37,3%)	231(37,9%)	427(37,6%)

  

(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>GG</b>	109(41,4%)	117(38,4%)	226(39,8%)
<b>GA</b>	112(42,6%)	145(47,5%)	257(45,2%)
<b>AA</b>	42(16%)	43(14,1%)	85(15,0%)

**TABELA 6. Comparação entre o polimorfismo no gene de *IL10* rs1800871 A/G e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

IL10 rs_1800871 A/G	Odds	IC	P
<b>Global 2df</b>			0,4878
<i>A/G X G/G</i>	0,829	0,57-1,18	0,306
<i>A/A X G/G</i>	1,048	0,63-1,72	0,853
<b>Global 1df</b>			0,8362
<i>Alelo 1 - A</i>	0,975	0,76-1,23	0,836
<i>Alelo 2 - G</i>	1,025	0,80-1,29	0,836

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

rs3024496 A/G:

**TABELA 7. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs3024496 no gene *IL10*.**

<i>IL10</i> rs3024496 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>G</b>	195(37,8%)	240(39,2%)	435(38,6%)
<b>A</b>	321(62,2%)	372(60,8%)	693(61,4%)
(N) Frequências Genótípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>GG</b>	46(17,8%)	45(14,7%)	91(16,1%)
<b>GA</b>	103(39,9%)	150(49,0%)	253(44,9%)
<b>AA</b>	109(42,2%)	111(36,3%)	220(39,0%)

**TABELA 8. Comparação entre o polimorfismo no gene de *IL10* rs3024496 A/G e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

IL10 rs_3024496 A/G	Odds	IC	P
<b>Global 2df</b>			0,0944
<i>A/G X G/G</i>	0,671	0,41-1,08	0,105
<i>A/A X G/G</i>	0,960	0,58-1,56	0,872
<b>Global 1df</b>			0,6331
<i>Alelo 1 - A</i>	1,058	0,83-133	0,633
<i>Alelo 2 - G</i>	0,944	0,74-1-19	0,633

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

**TABELA 9. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs1800629 no gene *TNF*.**

<b>TNF rs1800629 (N) Frequências Alélicas</b>			
	<b>CASOS</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>TOTAL</b>
<b>G</b>	501(87,6%)	597(90,2%)	1098(89,0%)
<b>A</b>	71(12,4%)	65(9,8%)	136(11,0%)
<b>(N) Frequências Genótípicas</b>			
	<b>CASOS</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>TOTAL</b>
<b>GG</b>	218(76,2%)	270(81,6%)	488(79,1%)
<b>GA</b>	65(22,7%)	57(17,2%)	122(19,8%)
<b>AA</b>	3(1,0%)	4(1,2%)	7(1,1%)

**TABELA 10. Comparação entre o polimorfismo no gene de *TNF* rs1800629 A/G e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

<i>TNF</i> rs_1800629 A/G	<b>Odds</b>	<b>IC</b>	<b>P</b>
<b>Global 2df</b>			0,2305
<i>A/G X G/G</i>	1,412	0,94-2,10	0,089
<i>A/A X G/G</i>	0,928	0,20-4,19	0,924
<b>Global 1df</b>			0,1456
<i>Alelo 1 - A</i>	1,305	0,91-1,86	0,146
<i>Alelo 2 - G</i>	0,766	0,53-1,09	0,146

**Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).**

**TABELA 11. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene *TNF*.**

<b>TNF rs1799964 (N) Frequências Alélicas</b>			
	<b>CASOS</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>TOTAL</b>
<b>T</b>	429(72,7%)	472(77,6%)	901(77,4%)
<b>C</b>	127(22,8%)	136(22,4%)	263(22,6%)
<b>(N) Frequências Genotípicas</b>			
	<b>CASOS</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>TOTAL</b>
<b>TT</b>	173(62,2%)	182(59,9%)	355(61,0%)
<b>TC</b>	83(29,9%)	108(35,5%)	191(32,8%)
<b>CC</b>	22(7,9%)	14(4,6%)	36(6,2%)

**TABELA 12. Comparação entre o polimorfismo no gene de *TNFA* rs1799964 C/T e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

<b><i>TNF</i> rs_1799964 C/T</b>	<b>Odds</b>	<b>IC</b>	<b>P</b>
<b>Global 2df</b>			0,1261
<b><i>C/T</i> X <i>T/T</i></b>	0,808	0,56-1,15	0,239
<b><i>C/C</i> X <i>T/T</i></b>	1,653	0,81-3,33	0,160
<b>Global 1df</b>			0,8515
<b><i>Alelo 1 - C</i></b>	1,025	0,78-1,33	0,852
<b><i>Alelo 2 - T</i></b>	0,974	0,74-1,27	0,852

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

**TABELA 13. Distribuição das frequências alélicas e genóticas observadas para o polimorfismo rs1800683 no gene *LTA*.**

<i>LTA</i> rs1800683 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>G</b>	326(60,6%)	407(61,7%)	733(61,2%)
<b>A</b>	212(39,4%)	253(38,3%)	465(38,8%)
(N) Frequências Genóticas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>GG</b>	108(40,1%)	123(37,3%)	231(38,6%)
<b>GA</b>	110(40,9%)	161(48,8%)	271(45,2%)
<b>AA</b>	51(19,0%)	46(13,9%)	97(16,2%)

**TABELA 14. Comparação entre o polimorfismo no gene de *LTA* rs1800683 A/G e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

<i>LTA</i> rs_1800683 A/G	Odds	IC	P
<b>Global 2df</b>			0,0971
<i>A/G X G/G</i>	0,778	0,54-1,10	0,165
<i>A/A X G/G</i>	1,262	0,78-2,03	0,336
<b>Global 1df</b>			0,7114
<i>Alelo 1 – A</i>	1,044	0,83-1,31	0,711
<i>Alelo 2 – G</i>	0,957	0,76-1,20	0,711

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

**TABELA 15. Distribuição das frequências alélicas e genóticas observadas para o polimorfismo rs909253 no gene *LTA*.**

<i>LTA</i> rs909253 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>G</b>	211(39,2%)	253(38,3%)	464(38,7%)
<b>A</b>	327(60,8%)	407(61,7%)	734(61,3%)
(N) Frequências Genóticas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>GG</b>	50(18,6%)	46(13,9%)	96(16,0%)
<b>GA</b>	111(41,3%)	161(48,8%)	272(45,4%)
<b>AA</b>	108(40,1%)	123(37,3%)	231(38,6%)

**TABELA 16. Comparação entre o polimorfismo no gene de *LTA* rs909253 A/G e a infecção pelo HTLV-1: casos vs. controles.**

<i>LTA</i> rs_909253 A/G	Odds	IC	P
<b>Global 2df</b>			0,1248
<b>A/G X G/G</b>	0,634	0,39-1,01	<b>0,056</b>
<b>A/A X G/G</b>	0,807	0,50-1,30	0,380
<b>Global 1df</b>			0,7592
<b>Alelo 1 - A</b>	0,964	0,76-1,21	0,759
<b>Alelo 2 - G</b>	1,036	0,82-1,30	0,759

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

**TABELA 17. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene *BAT1*.**

<i>BAT1</i> rs2239527 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>G</b>	206(36,7%)	251(36,2%)	457(36,4%)
<b>C</b>	356(63,3%)	443(63,8%)	799(63,6%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
<b>GG</b>	43(15,3%)	43(12,4%)	86(13,7%)
<b>CG</b>	120(42,7%)	165(47,6%)	285(45,4%)
<b>CC</b>	118(42,0%)	139(40,0%)	257(40,9%)

**TABELA 18. Comparação entre o polimorfismo no gene de *BAT1* rs2239527 C/G e a hanseníase: casos vs. controles.**

<i>BAT1</i> rs_2239527 C/G	Odds	IC	P
<b>Global 2df</b>			0,3860
<i>G/C X G/G</i>	0,727	0,44-1,17	0,197
<i>C/C X G/G</i>	0,848	0,52-1,38	0,511
<b>Global 1df</b>			0,8596
<i>Alelo 1 - C</i>	0,979	0,77-1,23	0,860
<i>Alelo 2 - G</i>	1,020	0,81-1,28	0,860

Abreviações: Global 2df=Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).